

Tesis Doctoral

Estudio espectrofotométrico comparativo de la porfirina de Waldenström, Uroporfirina I y Porfirina 208

Salum, Yamil

1955

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Salum, Yamil. (1955). Estudio espectrofotométrico comparativo de la porfirina de Waldenström, Uroporfirina I y Porfirina 208. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n0847_Salum

Cita tipo Chicago:

Salum, Yamil. "Estudio espectrofotométrico comparativo de la porfirina de Waldenström, Uroporfirina I y Porfirina 208". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1955. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n0847_Salum

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad Nacional de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO COMPARATIVO
DE LA PORFIRINA DE WALDENSTRÖM,
UROPORFIRINA I y PORFIRINA 208

Resumen de Tesis

Yamil Salum

1955 *Res. de Tesis 1 847*

R. 247

Se ha encarado el estudio de los componentes fundamentales de la Porfirina de Waldenström con el criterio de conocer las constantes espectrofotométricas distintivas para la Uro III, Uro I y Porfirina 208, teniendo en cuenta por un lado las dificultades de las distintas escuelas para lograr su separación y reconocimiento, y por otro el estímulo que significaron los trabajos realizados por el Dr. Grinstein y colaboradores.

Ello se basa en el papel que las porfirinas están destinadas a representar en la solución de importantes problemas de química biológica y clínicos y a los adelantos técnicos con que contamos hoy día utilizando espectrofotómetros fotoeléctricos. Además se encara la demostración de que la Uroporfirina I aislada de Porfirina de Waldenström es espectrofotométricamente igual a la Uroporfirina I en casos de porfiria congénita, y la obtención de valores cuantitativos que contribuyan a ampliar nuestro conocimiento de las porfirinas.

Como antecedente existe en nuestro país un tipo de enfermo relativamente frecuente, cuya sintomatología clínica más saliente es de carácter dermatológico y al cual se lo considera como afectado de una forma de porfiria. En la orina excretada por pacientes con porfiria hepática se encontró una sustancia identificada por Waldenström como Uro III; luego Grinstein, Schwartz y Watson pusieron en duda su homogeneidad y demostraron que era una mezcla o compuesto molecular de la Uroporfirina I y Porfirina 208.

La orina fué obtenida de casos descriptos clínicamente como porfiria cutánea tardía.

Para el aislamiento de las porfirinas se han seguido las siguientes etapas:

PORFIRINA

- 12) Concentración de las porfirinas de la orina;
- 22) Esterificación de las porfirinas aisladas;
- 32) Cromatografía sobre columna de CO_3Ca ;
- 42) Cristalización;
- 52) Identificación.

Para la determinación espectrofotométrica se utilizaron los ésteres metílicos de las porfirinas Uro I, 208 y de Waldenström; además el éster de la Uroporfirina I de un caso de porfiria congénita tomado como comparación.

Se han preparado soluciones de porfirinas libres en HCl al 25% y soluciones de ésteres metílicos en cloroformo.

Las mediciones espectrofotométricas se efectuaron en un aparato Beckman D.U., trabajándose entre 650 μ y 400 μ .

Los valores obtenidos de la extinción específica se representaron gráficamente en función de la longitud de onda.

Los resultados han sido reflejados en tablas de la siguiente forma:

- I - Máximos de absorción de porfirinas libres en HCl 25%
- II - Máximos de absorción de los ésteres metílicos de porfirinas en solución clorofórmica al 5%
- III - Valores de las extinciones específicas referidas a la concentración $C = 1\%$ en solución de HCl 25%
- IV - Valores de las extinciones específicas referidas a la concentración $C = 1\%$ en solución clorofórmica.

El estudio espectrofotométrico de la Uroporfirina I y Porfirina 208 separadas de la Porfirina de Waldenström por la columna de CO_3Ca permite concluir lo siguiente:

- 12) En medio clorhídrico al 25% las posiciones de los máximos de absorción para la zona del visible y del ultravioleta son

P O R F I R I N A

muy próximas y prácticamente imposible de distinguir con el espectrofotómetro Beckman D.U.

Los máximos son:

Uroporfirina I I 596, II 554 y Soret 411 m μ

Porfirina 208 I 597, II 553 y Soret 410 m μ

Los valores de la extinción específica son:

Uroporfirina I I 65, II 229 y Soret 4900

Porfirina 208 I 68, II 234 y Soret 4890

22) En solución clorofórmica la posición de los máximos de los ésteres metílicos es también muy próxima:

Uro I I 625, II 598, III 571.5, IV 538, V 503 y Soret 404

208 I 625, II 597, III 571, IV 538, V 501 y Soret 404

Las extinciones específicas son manifiestamente diferentes

Uro I I 43, II 15, III 75, IV 101, V 182 y Soret 1550

208 I 21, II 7, III, 40, IV 56, V 92 y Soret 840

32) Los valores espectrofotométricos de la Uroporfirina I separados de la Porfirina de Waldenström coinciden con los valores de la Uroporfirina I proveniente de porfiria congénita, que se considera actualmente como Uroporfirina I de referencia.

Expte.nº 1787/954.-

Buenos Aires, 12 de Julio de 1955.-

Presentada en la fecha.-

CENBA

[Signature]
JUAN CARLOS DOMÍNGUEZ
SECRETARÍA

Buenos Aires, 13 de Julio de 1955.-

Pase a la Comisión examinadora Grupo VIII, para que tenga a bien considerar la tesis presentada por el ex-alumno de la carrera del Doctorado en Química, señor Yamil Salum.-
nt.-

< *[Signature]*
DR. ALBERTO GONZÁLEZ DOMÍNGUEZ
Dir.

[Signature]
DR. ALBERTO GONZÁLEZ DOMÍNGUEZ
Dir.

Buenos Aires, 18 de Agosto de 1955.-

En la fecha, la comisión examinadora respectiva procedió a considerar la presente tesis resolviendo aceptarla -

[Signatures]

TESIS. 847

ACIONAL DE BUENOS AIRES

CIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudio Espectrofotométrico Comparativo
de la Porfirina de Waldenström,
Uroporfirina I y Porfirina 208

TESIS

YAMIL SALUM

847

1955

Deseo expresar mi reconocimiento y gratitud al Doctor M. GRINSTEIN, cuya especialidad lo coloca en una situación mundialmente excepcional, por la dedicación que me ha brindado para introducirme teórica y prácticamente en el campo de las porfirinas.

Habiendo recibido su enseñanza y sus críticas y seguido sus disquisiciones, agradezco el caudal de conocimientos así adquiridos.

Asimismo expreso mi gratitud a la Cátedra de Química Biológica del Dr. Jorge R. Mendive y a la Sección Organoterapia del Instituto Malbrán por las facilidades otorgadas para la feliz conclusión de este trabajo.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Yamil Salum', written in black ink.

Yamil Salum

Dedico esta Tesis a todos aquéllos de quienes he recibido instrucción, directivas y consejos en los años de estudio y trabajo en el campo de la química.

ANTECEDENTES

Existe en nuestro país un tipo de enfermo, relativamente frecuente, cuya sintomatología clínica más saliente es de carácter dermatológico y al cual se lo considera como afectado de una forma de porfiria. En la orina excretada por pacientes con porfiria hepática se encontró, a mediados de 1935, una sustancia identificada por Waldenström como Uroporfirina III,

Más tarde, en 1945, dentro del atrayente campo de las porfirinas, autores como Grinstein, Schwartz y Watson pusieron en duda su homogeneidad y demostraron que era una mezcla o compuesto molecular de la Uroporfirina I y de la Porfirina 208. Desde entonces se la distingue como Porfirina de Waldenström.

Rimington y Sveinsson en 1950 encontraron que las curvas de absorción espectral de la Porfirina de Waldenström purificada cromatográficamente y la Uro I eran idénticas, aunque sus ésteres metálicos tenían diferentes puntos de fusión.

El papel que las porfirinas están destinadas a representar en la solución de importantes problemas de química biológica y clínicos, y la necesidad de conocer las constantes espectrofotométricas distintivas para la Uro III, Uro I y Porfirina 208 en base a los adelantos técnicos con que contamos utilizando espectrofotómetros fotoeléctricos, y la demostración de que la Uroporfirina I aislada de la Porfirina de Waldenström es espectrofotométricamente igual a la Uroporfirina I en casos de porfiria congénita, motivan este trabajo, cuyo objeto es obtener por determinación cuantitativa valores que contribuyan a ampliar nuestros conocimientos sobre las porfirinas.

QUE SON LAS PORFIRINAS?

Las porfirinas son pigmentos cuya composición química es en general exactamente conocida. Esto se debe especialmente a los trabajos de Hans Fischer y de su escuela, sobre la estructura de las porfirinas aisladas de estados de porfiria, que luego permitieron el estudio de la hemoglobina y que culminó con la síntesis de la Protoporfirina IX, grupo prostético de la hemoglobina.

Hoy consideramos la hemoglobina como un pigmento que contiene hierro y una hemoproteína, la globina.

La porfirina se obtiene sacando el hierro de la parte coloreada de la hemoglobina o de su derivado, la hemina.

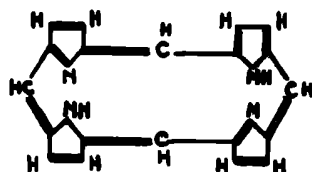
El pigmento vegetal, clorofila, como la hemoglobina, consiste en una porfirina, pero unido al magnesio en lugar del hierro.

Son también porfirinas que contienen hierro la serie de pigmentos que actúan como enzimas y participan en la regulación de la respiración celular (oxidasas, catalasas, peroxidasas, citocromos).

Tanto en la hemoglobina como en la clorofila, las porfirinas juegan química y biológicamente un papel particularmente importante en la formación de pigmentos esenciales para la vida de la célula en los reinos vegetal y animal.

ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS PORFIRINAS

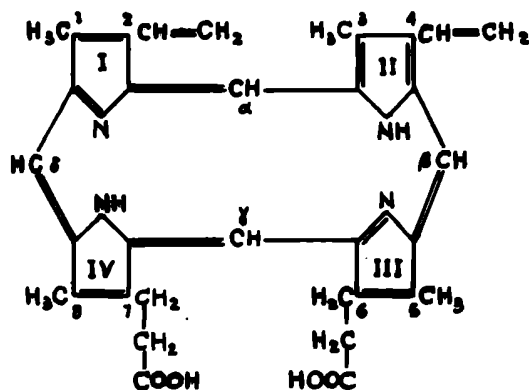
Las porfirinas son derivados del sistema de anillos cíclicos de la porfina $C_{20}H_{14}N_4$, formada por cuatro anillos pirrólicos, unidos entre sí por 4 grupos $\equiv CH$ (grupos metínicos), es decir, por un anillo central de 16 componentes con 12 átomos de carbono y 4 átomos de nitrógeno condensados con los 4 anillos pirrólicos.



Porfina

Las porfirinas difieren estructuralmente de la porfina y una de otra por las diferentes cadenas laterales, sustituyendo los 8 átomos de hidrógeno en posición β de la porfina.

El representante más importante de los tetrapirroles es la Protoporfirina IX (1)



Protoporfirina IX

La Protoporfirina IX está formada por 4 anillos pirrólicos (I, II, III, IV) unidos entre sí por 4 puentes metínicos $\equiv\text{CH}$ (α, β, γ y δ). La unión de los anillos se forma alternando ligaduras simples y dobles. Cada anillo debe ser considerado como un representante, en grado limitado, de un circuito para la conducción de la movilidad de π electrones que son responsables de la estructura de resonancia.

El compuesto adquiere un carácter aromático, como el benceno. Tiene gran estabilidad y puede ser halogenado, nitrado y sulfonado sin llegar a ser dividido en fragmentos. La reducción potencial está disminuida a un extremo tal - diferente en la mayor parte de los pigmentos - que no se reduce por el hidrosulfito o paladio-hidrógeno en solución alcalina, ya que para reducirse necesita amalgama de sodio.

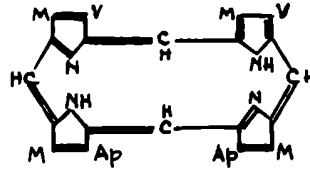
El modelo de las cadenas laterales de la Protoporfirina IX alrededor del anillo es: metil 1; vinil 2; metil 3; vinil 4; metil 5; ácido propiónico 6; ácido propiónico 7 y metil 8.

La porfirina tiene una estructura de resonancia plana, es decir, todos los átomos de resonancia están unidos en un mismo plano.

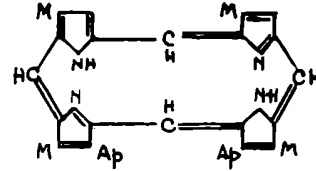
El espectro de absorción consiste en una serie de bandas prominentes extendidas a través de la región visible; porque la resonancia y la absorción de la luz están grandemente aumentadas y cambiantes a lo largo de la longitud de onda.

PORFIRINAS NATURALES

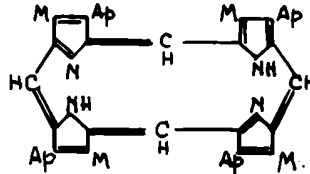
Protoporfirina $C_{34}H_{34}N_4O_4$



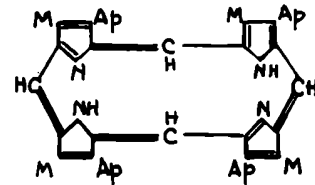
Deuteroporfirina $C_{30}H_{30}N_4O_4$



Coproporfirina $C_{36}H_{38}N_4O_4$

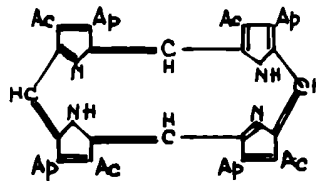


Copro I

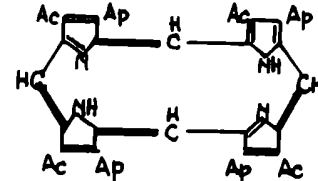


Copro III

Uroporfirina $C_{40}H_{38}N_4O_{16}$

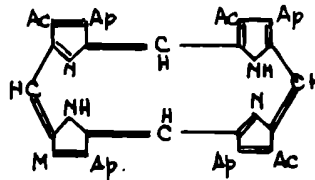


Uro I



Uro III

Porfirina
de
Waldenström

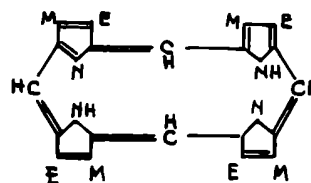


Porfirina 208 ?

- M. - CH_3
- V. - $CH=CH_2$
- Ac - CH_2-COOH
- Ap - CH_2-CH_2-COOH
- E - CH_2-CH_3
- Al - $HOH-CH_3$

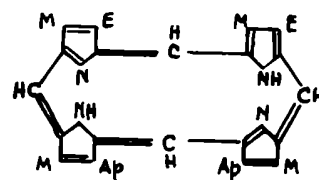
PORFIRINAS ARTIFICIALES

Etioporfirina $C_{32}H_{38}N_4$



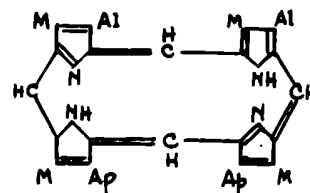
Etio I

Mesoporfirina $C_{34}H_{38}N_4O_4$



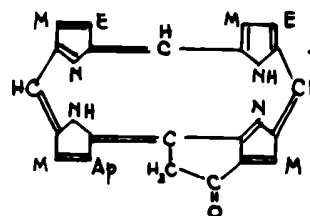
Meso IX

Hematoporfirina $C_{34}H_{38}N_4O_6$



Hemato IX

Filoporfirina



Pirroporfirina

Rodoporfirina

Porfirina C

} derivados de la clorofila

derivada del citocromo C

PORFIRINAS EN LA NATURALEZA

El sistema de anillos de la porfirina se encuentra en numerosos pigmentos de los reinos animal y vegetal (clorofila, hemina, hemoglobina, citocromo, etc.) que están ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya sea como constituyentes de otros pigmentos o como el producto de desintegración de los mismos, así también como sustancias sintetizadas por los organismos vivos.

Es interesante destacar que las porfirinas han sido halladas en ciertas rocas, depósitos geológicos, carbones, aceites minerales, bitúmenes y fosfatos como una indicación del origen animal o vegetal de estas sustancias.

Asimismo han sido halladas pequeñas cantidades de porfirinas clorofílicas y complejos metálicos de porfirinas en aceites minerales.

Las cantidades de porfirinas en forma libre en la naturaleza son relativamente pequeñas; son pocas las especies en que se encuentran porfirinas en una cantidad que, por su color, sean fácilmente perceptibles a simple vista o cuya absorción pueda ser examinada físicamente. Por esta razón el estudio y separación de estos pigmentos a menudo es dificultoso, pero con la ayuda del análisis fluoroscópico se han revelado cantidades mínimas de porfirinas debido a su fluorescencia roja. Con este medio pueden verse trazas de porfirinas distribuidas en los reinos animal y vegetal así como también en distintas variedades de microorganismos y levaduras.

Es necesario destacar que la aparición de una fluorescencia roja no debe ser tomada siempre como indicación de la presencia de porfirina porque otras sustancias también la producen.

Únicamente el examen espectroscópico de la fluorescencia roja puede determinar la naturaleza del material fluorescente con exactitud. Por ejemplo: ciertos derivados de bilirrubina y clorofila, así como ciertos alcaloides y extractos medicinales, también dan fluorescencia roja que no tiene relación con la fluorescencia de las porfirinas.

En el cuadro siguiente se puede observar un resumen de las porfirinas halladas en el reino animal en cantidades grandes, no comunes, o bajo condiciones que no poseen una relación directa, como es evidente, con el metabolismo de la hemoglobina.

PORFIRINAS EN ANIMALES

Animal	Especie	Porfirina	Tejido	Referencia
Mamíferos				
	<i>Sciurus niger</i> (zorro americano)	Uroporfirina	Normalmente en huesos, orina, etc.	Turner (2)
	Hombre, vacunos, porcinos	Uroporfirina	Huesos y dientes en condiciones patológi- cas (porfiria congé- nita)	
	Roedores (ratas)	Protoporfirina	Glándulas Harderianas	Darrien y Turchini
	Erizo	Coproporfirina	Espinas	id.
Aves	Varias especies	Protoporfirina	Pigmentación marrón en la cáscara del huevo de gallinas oscuras; manchas negras, rojas, marrones en cáscaras de huevos de diferentes especies.	Fischer y colabora- dores. Völker
	Otides de Sud-Afri- ca (Lofotis, Liso- tis). Lechugas	Coproporfirina	Plumas	Darrien y Turchini Völker
	Turaco	Complejo cúprico de Uroporfirina	Plumas	Fischer, Halger Himington
Anélidos	Lombrices (tierras cálidas)	Protoporfirina	Bandas rojas	Dhéré
Moluscos	Pteria (almeja per- lada Sud Americana)	Uroporfirina Conchoporfirina	Concha	Fischer y colabora- dores
Celenterados	Corales y Anémonas de mar.	"Poliperitrina"		Mac Munn

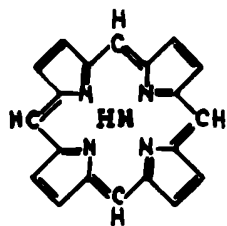
PROPIEDADES DE LAS PORFIRINAS

Se estudian las propiedades de las porfirinas en relación directa con la espectrofotometría.

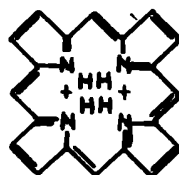
ESTRUCTURA DEL ANILLO DE LA PORFINA:

La sustancia madre de los anillos tetrapirrólicos es la porfina. Las uniones dobles pueden ser escritas de diferente forma debido a la resonancia. Esta puede considerarse predominando en el interior de un anillo de 16 miembros conteniendo 8 dobles ligaduras, que contribuyen a la resonancia del núcleo pirrólico. (3)

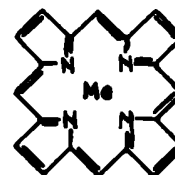
Si se consideran dos isómeros, los dos átomos de hidrógeno pueden escribirse como ligados en un caso a dos nitrógenos adyacentes y en otro caso a dos átomos de nitrógeno opuestos. Si no se toman isómeros, y la evidencia favorece este punto de vista, puede luego dibujarse uno de los átomos de hidrógeno de la porfina neutral como repartido igualmente entre los 4 átomos de nitrógeno, siendo colocado un H en el centro y justo debajo del plano del anillo (indicado como un H partido) y el otro en el centro y justo arriba del plano del anillo.



Porfina neutral



Porfina ácida



Porfina metálica neutral

La incertidumbre de colocar los dos átomos de hidrógeno de la porfina desaparece cuando se agregan dos protones en solución ácida, o cuando dos átomos de hidrógeno son desplazados por un átomo de metal bivalente.

Hay suficiente espacio en el centro del anillo para los 4 cuatro átomos de hidrógeno o átomos de metal que se encuentren en el plano del anillo obteniendo una estructura de resonancia simétrica.

ESPECTRO DE ABSORCION DE LAS PORFIRINAS:

Todas las porfirinas neutrales tienen 4 bandas de absorción en el visible entre 500 y 700 m μ y en el ultravioleta intenso la banda de Soret alrededor de 400 m μ . La posición y número de las bandas máximas varían, dependiendo del solvente y del pH en el cual se miden las porfirinas.

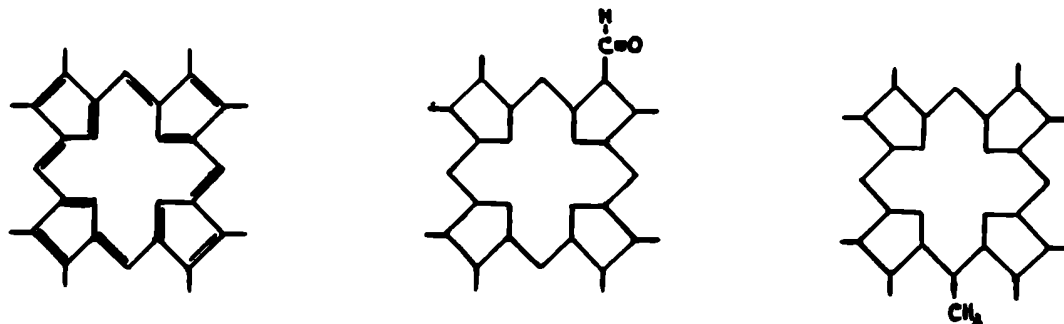
La mayor parte de las determinaciones de Stern y colaboradores se efectuaron en dioxane. En general, con mayor índice de refracción de los solventes, las bandas más grandes cambian con la mayor longitud de onda (4).

Siguiendo la clasificación de Stern, pueden distinguirse tres tipos de espectros visibles:

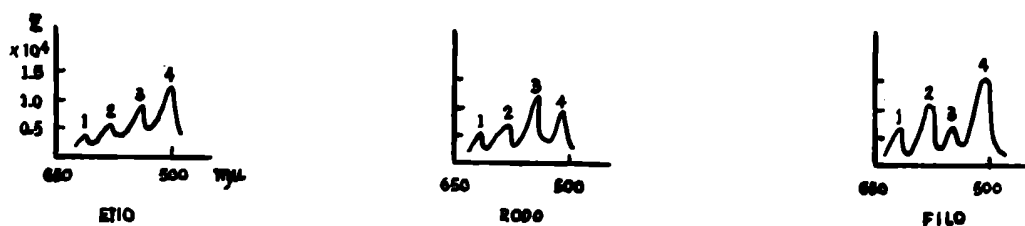
El tipo Etio (escalonado) posee una serie regular ascendente de bandas;

el tipo Rodo tiene la cuarta banda más baja que la tercera - la tercer banda es "muy fuerte" y

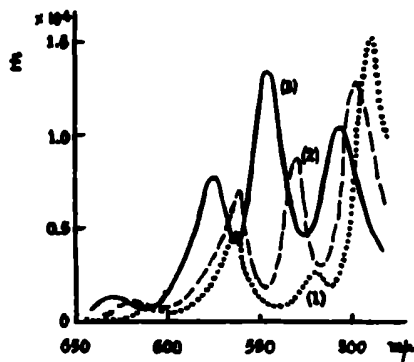
la tipo Filo tiene una tercer banda que es "muy débil".



Espectro tipo de la porfina



La porfina, sustancia madre, no tiene cadenas laterales y es de tipo Filo (fig. curva 1). Si se agregan cadenas laterales, la tercer banda aumenta gradualmente en altura como la porfina 1-4 ácido dipropiónico y es casi de tipo Etio la metil 1,5-dietil 2,6 porfina (curva 2). Es de tipo Etio (o espectro de absorción escalonado) en las porfirinas que se encuentran en la naturaleza en la cual todos los pirroles tienen cadenas laterales en posición β , y es un excelente método para su identificación.



COLOR DE LAS PORFIRINAS:

El color de las soluciones de porfirinas es, en general, rojo violáceo, variando con el pH de la solución y la naturaleza del solvente. Este color y el espectro de absorción dependen del tipo de porfirina y gracias a este último es posible identificar diferentes porfirinas y medirlas cuantitativamente por espectrofotometría.

Las variaciones de color de acuerdo con el pH es de particular importancia.

En medio alcalino el color es rojo naranja o pardo, mostrando el espectro de absorción de 4 a 6 bandas principales.

En medio ácido el color está entre el rojo brillante y el violeta, y el espectro de absorción tiene 3 bandas principales.

Debe destacarse que la concentración del solvente puede modificar ligeramente el espectro de la porfirina, así por ejemplo se ha demostrado que las soluciones de porfirina en HCl muestran una ligera desviación del espectro cerca del ultravioleta.

Las bandas de absorción más importantes están en el rojo y el verde; las más intensas han sido halladas en el azul y el violeta.

Teóricamente es posible diferenciar las porfirinas por medio de su espectro de absorción. La mayor parte de las bandas espectrales están situadas muy cerca unas de otras. Sólo es posible una diferenciación individual con un espectroscopio sensible y un operador experimentado.

EFECTO DEL pH SOBRE EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN Y FLUORESCENCIA:

En solución ácida (por ej. HCl N) dos núcleos pirrólicos de la porfina se combinan con dos protones de aproximadamente el mismo pK para formar una estructura de resonancia simétrica. Las diferencias entre porfirinas neutras y ácidas se reflejan en su espectro de absorción y fluorescencia. Comparando con la forma neutral de cuatro bandas en el visible, el espectro de absorción de la forma ácida tiene dos bandas principales en el visible y una marcadamente más alta en la zona ultravioleta.

El espectro de fluorescencia de las porfirinas es un tipo de imagen especular del espectro de absorción.

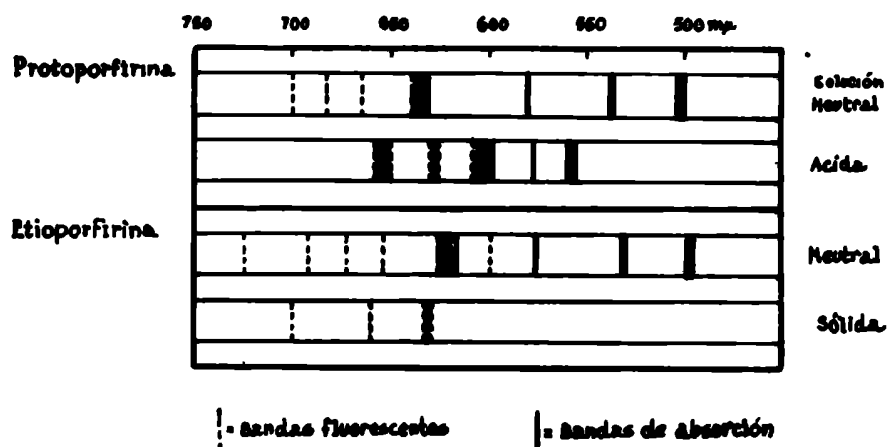
El espectro de fluorescencia completo es excitado generalmente por cualquier longitud de onda en las cercanías de una banda de absorción.

La luz emitida es roja y consiste en una serie de bandas, siendo la banda fluorescente muy intensa en una longitud de onda justo cerca del rojo de la primer banda de absorción.

Únicamente cuando los tetrapirroles forman cadena cerrada poseen fuerte fluorescencia con estructura de bandas.

Las porfirinas neutras tienen una banda principal y tres bandas fluorescentes débiles mientras la forma ácida posee tres bandas fluorescentes prominentes.

La porfirina sólida posee un espectro de absorción del lado de las longitudes de onda grandes y muestran una emisión espectral desplazada hacia el rojo (p.e. etioporfirina sólida).



Es posible demostrar que la fluorescencia de porfirina pura en solución de alcohol absoluto es todavía visible en una dilución de 1:50.000.000 (5×10^{-7}) y que el límite extremo para la fluorescencia visible de la porfirina en solución de ácido sulfúrico y en amoníaco está en la región de 1:1.000.000.000 (1×10^{-9}).

ABSORCION DE LA LUZ:

El espectro de absorción de las porfirinas es tan característico que es de fundamental importancia para su reconocimiento, valoración y para diferenciar unas porfirinas de otras. Las bandas son agudas y por la posición de sus máximos pueden distinguirse fácilmente.

Las porfirinas disueltas en solventes orgánicos tienen un espectro de cuatro bandas típico en la región visible, también puede observarse un número de pequeñas bandas sumadas a las cuatro bandas principales. La importancia de las bandas principales aumenta del lado de las pequeñas longitudes de onda. Confirmándolo hay una banda muy importante alrededor de los 400 mμ que fué observada por primera

vez por Soret en la hemoglobina y por Gangee en las porfirinas. Se llama comúnmente Banda de Soret (5). Ver gráfico nº 5.

El espectro de absorción de las porfirinas disueltas en álcali diluído es similar al "espectro neutral"; los grupos carboxilos de ácido propiónico de las cadenas laterales son separadas de los núcleos cromógenos por cadenas alifáticas y el anión formado ejerce únicamente una pequeña influencia sobre la absorción de la luz en la parte visible del espectro. Las bandas de absorción, sin embargo, alteran algo su posición y son menos agudas. Particularmente en el ultravioleta la banda se altera unos 20 a 30 m μ del lado de las longitudes de onda pequeñas y decrece grandemente su importancia.

Este fenómeno se interpreta como debido a una agregación o polimerización de las moléculas de porfirina y se observa también con compuestos metálicos de porfirinas como la hematina.

En oposición a la formación del anión, la formación de los cationes porfirina actúa sobre los átomos de nitrógeno del sistema de la porfirina y tiene una influencia profunda sobre la curva de absorción. En el espectroscopio "el espectro de porfirina ácida" muestra dos bandas de absorción distintiva con una tercer banda muy débil entre ellas.

SOLUBILIDAD:

Muchas porfirinas son solubles en HCl, NaOH, KOH, en ácido acético-éter y varios disolventes orgánicos. En general son insolubles o muy ligeramente solubles en agua, alcohol, éter puro y acetona.

Las sales alcalinas de las coproporfirinas son fácilmente solubles en agua.

Ciertas porfirinas pueden ser extraídas de sus soluciones etéreas con HCl. Las coproporfirinas pueden extraerse con HCl 0,1%, la Deuteroporfirina con HCl 0,4% y la Protoporfirina con HCl 2%.

Los ésteres de las porfirinas son fácilmente solubles en cloroformo y también la Protoporfirina en cloroformo conteniendo HCl; la Deuteroporfirina es parcialmente soluble en solventes. Sin embargo, debe usarse el cloroformo libre de alcohol.

La Uroporfirina no es soluble en éter, alcohol amílico, cloroformo o ácidos débiles (ácido acético), pero es, por el contrario, soluble en álcalis.

Finalmente muchas porfirinas son solubles en alcohol amílico cuando está presente el ácido acético y en alcohol conteniendo HCl.

Solubilidad y pH:

Las porfirinas son compuestos anfóteros con punto isoeléctrico alrededor de pH 3.0-4.5; su carácter ácido depende de los grupos carboxilo en las cadenas laterales. Su carácter como base débil depende de la presencia de dos nitrógenos terciarios en sus núcleos pirrólicos.

La partición de las porfirinas entre agua y solventes orgánicos (particularmente éter), depende de la naturaleza de las cade-

nas laterales y del pH. Las porfirinas sin cadenas laterales acídicas pueden ser extraídas del éter sólo por ácidos minerales fuertes formando diclorhidratos.

Las porfirinas con dos a cuatro grupos carboxílicos en sus cadenas laterales pasan de la fase acuosa al éter a pH 3.0-4.0, al cual sus grupos ionizables no llevan cargas; y son extraídas del éter por ácidos minerales como clorhidratos y por los álcalis como sales.

Las porfirinas con ocho carboxilos (uroporfirinas) no pueden ser extraídas por éter etílico. La extracción de las porfirinas del éter por ácidos fuertes es una propiedad de gran importancia para su purificación.

Los grupos carboxílicos de las porfirinas son fácilmente esterificables. Los ésteres metílicos son todos solubles en cloroformo.

Los efectos de la diferencia en solubilidad debido a las cadenas laterales y las diferencias en pK en las cuales los protones se adicionan a los nitrógenos del pirrol, pueden ser combinados para lograr la separación de porfirinas muy semejantes.

Un método basado en la combinación de estas propiedades fué primero sistemáticamente aplicado y usado en gran escala por Willstätter.

El método de Willstätter consiste en una solución de porfirinas en éter y su extracción con una solución acuosa de HCl de diferentes concentraciones.

El "número de HCl" es la constante física característica de las porfirinas. (6)

El número de HCl se define como el por ciento de HCl en solución acuosa que puede extraer $\frac{2}{3}$ de la porfirina, de una solución

etérea saturada de agua cuando se mezcla con igual volumen de la solución clorhídrica.

La solución etérea se prepara para que contenga 20 mg. por ciento de porfirina o una solución saturada que contenga menos.

Las cadenas laterales alifáticas aumentan la solubilidad en éter y llevan el número de HCl a valores muy altos.

Los valores pK relativos a los átomos de nitrógeno del anillo pueden ser estimados a partir del número de HCl.

Conant, Chow y Dietz han establecido el valor de $pK_{A_{CH}}$ para un gran número de pirroles relacionados. Por ejemplo, la Uroporfirina I a pH 4 es prácticamente insoluble en ácido acético o éter y puede ser separada de otras porfirinas.

METALOPORFIRINAS:

Un gran número de metales pueden incorporarse al anillo de la porfina; únicamente se encuentran en forma abundante las del hierro (hematina) y magnesio; las restantes han sido encontradas como complejos de cobre y zinc, en trazas, y bajo condiciones especiales (7, 8 y 9).

Cuando un ión metálico bivalente se introduce en la porfina puede considerarse como desplazando dos protones, la coordinación del átomo metálico con los cuatro átomos de nitrógeno, produciendo dentro una estructura de resonancia simétrica.

El espectro de absorción consiste en general en dos fuertes bandas, siendo el máximo dentro de las zonas 520-540 y 550-580 $m\mu$.

Las porfirinas ácidas tienen las bandas desplazadas hacia el rojo: 555 y 595 $m\mu$.

La importancia de formar sales complejas es una propiedad destacada de las porfirinas.

La naturaleza de los complejos metálicos fué investigada por Willstätter. Otros autores han obtenido compuestos con Zn, Co, Ni y Sn, etc.

La estabilidad de los complejos metálicos varía grandemente; el agua extrae K y As; el ácido acético diluído extrae al Mg y Pb; el ácido clorhídrico la Ag, Zn, Sn y Fe.

Todos estos complejos cristalizan muy bien especialmente los ésteres metálicos. Estos últimos son también solubles en cloroforno y dan un espectro de absorción característico.

Punto de fusión de las sales metálicas
de los ésteres metálicos de las porfirinas (Mertens) (10)

<u>Ester metálico más</u>	<u>Cu</u>	<u>Fe</u>	<u>Zn</u>
Coproporfirina I	284°C	240°C	299°C
Coproporfirina III	206	179	212-217
Uroporfirina I	320	238-280	-
Uroporfirina III	304	-	328

PUNTO DE FUSION:

La importancia de los derivados cristalinos reside en que ofrecen un medio para identificar las porfirinas por determinación de su punto de fusión y particularmente en razón de que por este medio pueden distinguirse los isómeros.

Puntos de fusión de los ésteres metálicos de las porfirinas

Dobriner (11)

<u>Ester metálico de</u>	<u>Punto de fusión</u>
Protoporfirina IX	226-228°C
Deuteroporfirina IX	216
Coproporfirina I	252
Coproporfirina III	142-172
Uroporfirina I	284
Mesoporfirina IX	208-212

Los cristales de los ésteres de las diversas porfirinas, contrariamente a las porfirinas libres, poseen como característica importante un punto de fusión bien definido.

Algunas veces es prácticamente imposible obtener cristales libres de otras sustancias con el correspondiente punto de fusión; también puede notarse que ciertas porfirinas son inestables a la temperatura del punto de fusión.

Los valores del punto de fusión de los ésteres que figuran en la bibliografía difieren en cantidades manifiestas de los consignados en la tabla. Una explicación sería que las impurezas metálicas o mezclas de porfirinas difíciles de separar por los métodos comunes ocasionan estas diferencias.

PORFIRINAS INDIVIDUALES

COPROPORFIRINAS $C_{20}H_6N_4(CH_3)_4(CH_2CH_2CO_2H)_4$

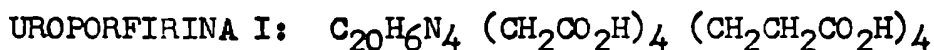
De los cuatro isómeros posibles sólo Copro I y Copro III tienen especial importancia. La síntesis fué realizada por Fischer y colaboradores (12, 13 y 14).

La COPROPORFIRINA I se encontró primero en heces, más tarde en orina, en embriones de pollos jóvenes; se presenta en el líquido amniótico, meconio y suero fetal en el último mes del embarazo (no en el suero de la madre) pero desaparece después de nacer y luego sólo se encuentran trazas en la orina normal y heces.

En algunos casos clínicos, la Copro I se encuentra excretada en cantidades aumentadas cuando se produce una regeneración rápida de la sangre. Este hecho está en favor de la hipótesis de que la Copro I es un sub-producto de la síntesis normal de la protoporfirina.

La COPROPORFIRINA III fué aislada primero por Van der Bergh y colab. a partir de orinas de enfermos con porfiria crónica.

La excreción de Coproporfirina III predomina sobre la Copro I en condiciones tóxicas como la intoxicación por plomo y en las anemias aplásticas.



La Uroporfirina I fué descubierta por Fischer en la orina de enfermos con porfiria crónica. También se encuentra en las conchas de las almejas del género Pteria. Turner descubrió que el zorro americano, *Sciurus niger*, es un caso de porfiria congénita, ya que excreta grandes cantidades de Uroporfirina I. Además la excreción de grandes cantidades y su depósito en huesos y tejidos es característico de la porfiria congénita.

Su estructura fué determinada recientemente (15), con exclusión de otras posibilidades, como ser pruebas directas o por síntesis. Por descarboxilación se obtiene la Coproporfirina I (calentando en baño de aceite, suspendida en ácido clorhídrico 1% bajo presión a 180°), aunque con rendimiento pequeño. Esto prueba que la Uroporfirina I es una coproporfirina tetracarboxilada.

El punto de fusión del éster octametílico encontrado por varios autores es 284 - 291°. Fischer dió 302° (corr. 311°C) después Grinstein y colab. encontraron que el punto de fusión del éster purificado por cromatografía era 284° C; estos autores estiman que el punto de fusión alto obtenido se debe a una mezcla de sales complejas o a productos de saponificación parcial.

En algunos casos de porfiria no fué posible fraccionar la Uro III de Waldenström en Uro I y 208; pero el trabajo de Grinstein (16) concluye diciendo que la Uro III se comporta como una entidad cromatográfica en columna de CO_3Ca y es una combinación molecular de Uro I y porfirina 208.

Watson denomina a estos complejos:

Porfirina de Waldenström tipo A: fraccionable en Uroporfirina I y Porfirina 208, y

Porfirina de Waldenström tipo B: combinación molecular.

En resumen, los trabajos de la escuela de Watson confirman lo hallado por Grinstein en 1945, es decir, "acidificando la orina a pH 3.0 - 3.2 y extrayéndola con acetato de etilo se obtiene una porfirina descrita por Waldenström como Uro III, que es una mezcla o combinación molecular de 75% de Uro I y 25% de una porfirina de 7 carboxilos que distinguimos como Porfirina 208.

PORFIRINA DE WALDENSTROM, UROPORFIRINA III (?):

En el año 1935 (17) se aisló de orinas humanas tipo agudo una porfirina insoluble en éter etílico y con algunas propiedades similares a la de la Uroporfirina I aislada de porfirias congénitas o eritropoiéticas.

Posee las siguientes características: Se extrae por acetato de etilo de soluciones a pH 3.0 - 3.2; funde alrededor de 255° - 260° C; la fluorescencia mínima de la Uro III está a pH 3.1 - 3.2; la Uro I la da a pH 2.9 - 3.0. El análisis elemental C, H y N coincide con el de la Uro I; el número de metoxilos encontrado es 24.24% en lugar de 26.3% si fueran de 8 carboxilos; por descarboxilación Waldenström obtuvo Copro III.

En estas condiciones la Uro III difiere de la Uro I de la misma manera que la Copro III de la Copro I.

Las experiencias de Grinstein y colaboradores introdujeron cierta duda sobre la existencia de la Uro III. Por cromatografía con CO_3Ca (Tswett) se cambió completamente este concepto, ya que da varias bandas como correspondiendo a una mezcla y no a una entidad química.

PORFIRINA 208, FIRIAPORFIRINA (Grinstein):

En su primera publicación, Grinstein y colaboradores (9) manifiestan que por su procedimiento de fraccionamientos de ésteres por medio de cromatografía obtienen del éster Uro III una fracción que posee punto de fusión de la Uro I (284^o C) y la segunda un punto de fusión 208^oC. Esta última de acuerdo con los resultados analíticos era un ácido heptacarboxílico más bien que un ácido octocarboxílico, dando Copro III por descarboxilación.

Algunas veces fué posible aislar este éster y otras obtuvieron únicamente el éster de Uro I de heces de pacientes porfíricos

El éster metílico cristaliza en metanol más lentamente que la Uro I, pero lo hace cuantitativamente y en forma de agujas largas, flexibles, con tendencia a formar rosetas compactas. Los cristales son diferentes de los de la Uro I; tienen un tono rojo vino y los de la Uro I color cobrizo. Funden a 207^o - 208^o en forma más bien definida soluble en acetato de etilo a pH 3.0 - 3.2. Se estableció fehacientemente que es una porfirina de 7 carboxilos.

PORFIRIA

En el cuadro clínico de esta enfermedad, los síntomas observados dependen directamente de una formación grande y exagerada de porfirinas en el cuerpo, junto con una modificación del metabolismo de los pigmentos.

Es ésta una enfermedad más común de lo que se cree; su conocimiento es muy deficiente, pero en los últimos tiempos se ha ampliado su horizonte asignándosele una trascendencia mayor de la que se había sospechado, estando actualmente en un período de plena evolución.

Los núcleos pirrólicos sintetizados normalmente por el organismo son utilizados, en parte, para la síntesis de protoporfirina IX, que combinada con Fe da lugar a la formación del hem, grupo prostético de la hemoglobina y de otros pigmentos respiratorios.

La gran cantidad de porfirinas presentes en condiciones patológicas y la discusión de la patogénesis en la hiperproducción de pigmentos estaría conectada con una lesión orgánica o con un cambio funcional en el sistema.

La eliminación exagerada de porfirinas no está relacionada necesariamente con producción exagerada de pigmentos. Podría considerarse como una inhibición fisiológica en la destrucción de la porfirina.

En los casos de porfiria existe una formación muy acentuada de porfirinas anormales, entre las que se destacan la Uro I y la Porfirina 208 y otras no identificadas aún. Además se encuentran otros pigmentos como el porfobilinógeno y también en cantidades superiores a la normal Copro I y III.

En general, se la considera una enfermedad provocada por factores de tipo tóxico, aunque también podrían existir porfirias adquiridas en un terreno sin predisposición especial y causada por un agente específico.

Los casos de porfiria humana presentan una sintomatología diversa, como ser:

Alteraciones profundas de la piel, especialmente en partes expuestas directamente a la luz (fotosensibilización): ampollas y necrosis que pueden llegar a la pérdida de partes importantes de la nariz y orejas;

Hipertrichosis: cólicos abdominales; trastornos nerviosos con parálisis parcial o total; insuficiencias hepáticas, anemias hemolíticas con esplenomegalia, trastornos endócrinos, etc.

CLASIFICACION DE LAS PORFIRIAS (18 - 19 - 20):

En base a la distinta sintomatología clínica se han elaborado diversas clasificaciones.

La más moderna es la CLASIFICACION DE WATSON (1950)

I.- Porfiria eritropoietica

II.- Porfiria hepática

- a) aguda intermitente
- b) cutánea tarda
- c) tipo mixto o combinado
- d) latente

En el tipo I las porfirias anormales y coproporfirinas se forman en las células inmaduras de la médula ósea.

En las del tipo II, las porfirinas anormales y porfobilinógeno se forman en el hígado.

PARTE EXPERIMENTAL

RECOLECCION DEL MATERIAL:

La orina fué obtenida de casos descriptos clínicamente como "Porfiria cutánea tardía" (21) suministrada por el Dr. A. Lazzari de la Sala II del Hospital Fernández, estudiándose además las provenientes de otras fuentes.

La recolección se efectuó en frascos de boca ancha, color ámbar, manteniéndola al abrigo de la luz y en lugar fresco. Cuando no se la pudo trabajar enseguida de ser recibida, se le agregó una capa de acetato de etilo y se conservó en heladera, a excepción de las destinadas para la obtención de la Porfirina de Waldenström.

Algunas veces se encontró dificultad - a posteriori - trabajando orinas viejas. Se emulsionan por agitación con el solvente. Esto se subsana por agregado de unas gotas de ácido acético en la ampolla de decantación y haciéndola rotar ligeramente o agitándola muy suavemente.

El volumen total de orinas trabajadas alcanza a unos 30 litros.

CONTROL:

Las orinas de estos enfermos poseen un color que varía del amarillo ámbar oscuro al rojo vino.

A la luz ultravioleta y en un ambiente oscuro emite una fluorescencia roja. Al espectroscopio y en un espesor de unos 5 cm. se observan las dos bandas características del complejo de Zn - uroporfirina con una máxima absorción entre 530 y 550 m μ . Por acidifi-

cación con HCl conc., dicho espectro se transforma en el de la porfirina en medio ácido, con una banda intensa y ancha y con un máximo entre 545 y 555 m μ y otra débil y estrecha y con un máximo entre 590 - 600 m μ . Esta acidificación permite descartar la presencia de oxihemoglobina cuyo espectro de absorción es muy similar al del complejo. Si las bandas son debidas a la presencia de oxihemoglobina, por acidificación desaparecen siendo reemplazadas por una banda de hematina ácida ubicada en la zona roja a 630 - 640 m μ .

La reacción del porfobilinógeno (22) es negativa.

Entre las porfirinas excretadas por la orina, predomina por su cantidad, el complejo que se distingue como Porfirina de Waldenström y que se encuentra combinado con el zinc.

AISLAMIENTO:

Para la obtención de las porfirinas se han seguido los métodos descritos en el trabajo original del Dr. Grinstein (9).

Como precaución fundamental se utilizaron drogas y solventes puros libres de metales.

Aislamiento de las porfirinas de casos de porfiria:

Consta

de las siguientes etapas:

- 12) Concentración de las porfirinas de la orina.
 - a) Adsorción con talco acidificando a pH 3.0 - 4.0 con ácido acético.
 - b) Extracción con acetato de etilo.
 - c) Extracción con acetato de etilo previa acidificación de la orina con HCl a pH 3.0 - 3.2 extrayendo con éter etílico las coproporfirinas. Se obtiene así la Porfirina de Waldenström.

- 29) Esterificación de las porfirinas aisladas por el método del alcohol metílico saturado con HCl gaseoso.
- 39) Cromatografía sobre columna de CO_3Ca según Tswett.
- 49) Cristalización de los ésteres metílicos, separación y purificación por cromatografía.
- 59) Determinaciones de identificación: punto de fusión, espectro de absorción, etc.

a) Aislamiento por el método del talco:

Previa acidificación

de la orina a pH 3.0 - 3.5 con ácido clorhídrico o acético, se adsorbe por agregado de talco (libre de metales y perfumes).

Por cada 1000 ml. de orina contenidos en un erlenmeyer de 2 litros o frasco Pyrex de 4 litros es acidificada la orina con ácido acético hasta obtener un pH 3.0 - 3.5, o viraje del papel rojo congo al gris franco. Se agrega talco en pequeñas porciones y se agita fuertemente comprobando que el líquido sobrenadante no posea bandas. Si ello no ocurre, se sigue agregando nuevas porciones de talco y repitiendo hasta observar sobre una alícuota de sobrenadante la desaparición de las bandas. En este punto se procede a la filtración del talco con un filtro Buchner al vacío que retiene el talco con las porfirinas adsorbidas. Una vez escurrido y seco se lleva a un desecador con cloruro de calcio y al vacío, dejando durante una noche y en la oscuridad. Luego sigue la esterificación.

b) Aislamiento por el método del acetato de etilo:

Por este

método se extraen de la orina todas las porfirinas.

Se acidifica la orina con HCl al 20% hasta obtener un pH 3.0 - 3.2 (color gris franco del rojo congo).

Por cada volumen de orina se utiliza 1.5 volúmenes de acetato de etilo en forma alternada para enriquecimiento del solvente, evitando emulsiones, y observando la desaparición de bandas con el espectroscopio. Bastan por lo general dos extracciones. Para asegurar una extracción eficiente, se utilizó un aparato agitador modelo International 2 (A.H. Thomas Co. Phila.) para cuatro frascos de un litro, los que se renuevan cada quince minutos y utilizando una ampolla de decantación para separar las fases. Las porciones ricas en porfirinas se juntan y extraen con HCl al 10% en muy pequeñas cantidades (2 - 5 ml.) comprobando la desaparición de bandas en el líquido rojo intenso. Las distintas porciones clorhídricas son mezcladas y neutralizadas con solución de acetato de sodio saturado hasta el viraje del papel rojo congo. En este pH las porfirinas empiezan a precipitar. Se deja estacionado hasta el día siguiente en la heladera, obteniéndose una precipitación prácticamente total.

Se separa el precipitado por filtración y una vez escurrido, se lo seca en un desecador al vacío.

El material seco está en condiciones de ser esterificado.

Se ensayó el uso del acetato de butilo en reemplazo del acetato de etilo. Se observó que requiere más tiempo la sedimentación de HCl, pero que da un extracto coloreado más intenso. Podría objetarse la posibilidad de que este solvente contuviera peróxidos y la necesidad de emplear una temperatura mayor en la recuperación del mismo. Por lo demás no se han encontrado diferencias.

c) Obtención de la Porphirina de Waldenström:

La orina es acidificada con ácido acético utilizando 50 cc. de ácido acético glacial por cada litro de orina. Se extrae luego con 1500 cc. de éter sulfúrico (libre de peróxidos) agitando durante unos cinco minutos. Se separa el éter y se extrae nuevamente con otros 1500 cc. El éter de la primera extracción se usa para una nueva orina y así se repite el proceso.

El éter total se lava con solución de acetato de sodio al 1% (unos 20 cc. por litro). Si la solución de acetato tiene fluorescencia roja, se vuelve a mezclar con la orina (es la fracción Uro I y 208 arrastrada por el éter). El éter extrae todas las coproporfirinas; tratado con ácido clorhídrico se obtiene un extracto que llevado a pH 3.2 - 3.4 da un precipitado de coproporfirinas.

La orina libre de coproporfirinas, se acidifica esta vez con HCl al 10% hasta un pH 3.0 - 3.2 y se extrae con 1.5 vol. de acetato de etilo por cada uno de orina, hasta que se constate la desaparición de bandas de absorción, observando con el espectroscopio un espesor de 10 cm. Prácticamente bastan dos extracciones.

El acetato de etilo se lava con agua (controlando fluorescencia) dos o tres veces; una vez poco coloreada se suspende el lavado y se comienza a extraer con HCl al 10% en porciones sucesivas de 2 ml. hasta que la capa clorhídrica no manifieste más la banda de absorción de porfirinas (controlada en tubo de ensayo).

Las distintas porciones clorhídricas son mezcladas y neutralizadas con solución saturada de acetato de sodio controlando el pH con el viraje del papel rojo congo al gris. En estas condiciones,

las porfirinas precipitan. Se deja unas horas en heladera y se vuelve a extraer con acetato de etilo, lavando con agua y extrayendo con HCl pero esta vez al 25%.

Los extractos clorhídricos se neutralizan con acetato de sodio saturado y el pequeño volumen con precipitado se deja estacionado en heladera hasta el día siguiente, lográndose una precipitación prácticamente completa.

Se separa el precipitado por filtración y se deja secar en desecador al vacío. El material seco se esterifica suspendiéndolo en un exceso de alcohol metílico saturado con clorhídrico gaseoso y dejándolo estacionado a temperatura ambiente, en la oscuridad, hasta el día siguiente.

El material esterificado es muy soluble en cloroformo; se agrega a la solución alcohólica en un volumen de 1/10 y luego un gran exceso de agua destilada hasta la separación de la capa clorofórmica que arrastra los ésteres porfirínicos presentes. La solución clorofórmica una vez separada con un embudo de decantación, se lava dos veces con agua destilada, una vez con solución amoniacal al 10%, dos con agua destilada y una con cloruro de sodio al 7%.

Una vez decantada la capa clorofórmica se filtra con un papel de filtro mojado en cloroformo y se lleva a sequedad por medio de una destilación al vacío en aparato con juntas esmeriladas. El residuo obtenido se cristaliza por medio del alcohol metílico dando cristales con las características descritas por Waldenström.

29) Esterificación:

En el caso del talco: el total seco se suspende y se cubre con un exceso de alcohol metílico saturado con ácido clorhídrico gaseoso, dejándolo estacionado hasta el día siguiente al abrigo de la luz. Se filtra nuevamente por un embudo Buchner, lavando el talco con porciones sucesivas de cloroformo hasta que el filtrado no manifieste más bandas de absorción al espectroscopio.

Al volumen total de cloroformo que contiene las porfirinas se le agrega un gran volumen de agua destilada. Así el cloroformo decanta arrastrando todas las porfirinas y dejando un sobrenadante blanco lechoso que se aclara por estacionamiento.

La solución clorofórmica que contiene los ésteres porfirínicos se lava con el método ordinario, es decir, dos veces con agua destilada, una vez con solución amoniacal al 10%, dos veces con agua destilada y una vez con solución de cloruro de sodio al 7%. Decantada la capa clorofórmica, se filtra por un papel de filtro previamente mojado con cloroformo. El volumen resultante se destila al vacío con un sistema de conexiones esmeriladas. El residuo rojo parduzco obtenido está en condiciones de ser sometido a la cromatografía.

En el caso del acetato de etilo: el material seco se esterifica como se detalla para el caso del talco, luego siguen la extracción clorofórmica, lavado, etc., obteniéndose las porfirinas en forma de ésteres metílicos.

32) Purificación del éster metílico por cromatografía con carbonato de calcio:

Grinstein utiliza la técnica original de Tswett (23, 24) y recomienda el tubo cromatográfico ideado por Zechmeister y Cholnoky (25, 26, 27). Se usó un tubo cromatográfico de 20 por 200 mm. adaptado a un kitasato y conectado a una trompa de vacío. Se ensayaron varios tipos de carbonato de calcio, seleccionados entre varias calidades destacándose lamentablemente uno de procedencia U.S.A. pero cuya firma no fué posible certificar.

La columna cromatográfica se prepara así: se conecta el vacío al kitasato colocando un pequeño trozo de algodón dentro de la columna y luego el carbonato de calcio que llene la columna golpeándola en los costados con una varilla de madera especial. Se interrumpe el agregado de carbonato de calcio cuando alcanza 9/10 del tubo y con la misma varilla se presiona en la parte superior suavemente hasta conseguir una superficie bien homogénea y una columna bien compacta, especialmente en la parte superior donde no debe haber ninguna fisura.

Esta preparación es de gran importancia y se obtiene así una columna en condiciones de ser utilizada en cromatografía que consta de las siguientes etapas:

a) Adsorción del soluto sobre la parte superior de la columna: el residuo seco de los ésteres metílicos obtenidos en la forma indicada se disuelve con pocas gotas de cloroformo caliente diluyendo con benceno hasta obtener una disolución total.

El vacío continúa funcionando y se introduce la solución bencénica en cantidad tal que se obtenga una banda de absorción en la parte superior de la columna de aproximadamente $1/6$ de la longitud total de la misma. Es de extremo cuidado mantener una capa líquida en la parte superior de la columna, donde se agregan porciones sucesivas de bencene hasta lograr la absorción de gran parte del soluto.

b) Desarrollo del cromatograma: se utiliza una mezcla de 10 partes de benceno y dos partes de cloroformo. Una vez logrado el cromatograma estable en cuanto al número y posición relativa de las bandas, se deja escurrir al solvente lo más posible y se desconecta el vacío.

c) Expulsión de la columna de carbonato de calcio.

d) Separación mecánica de las partes: teniendo en cuenta los detalles de técnica se usa un bisturí cortando las distintas zonas con toda precaución.

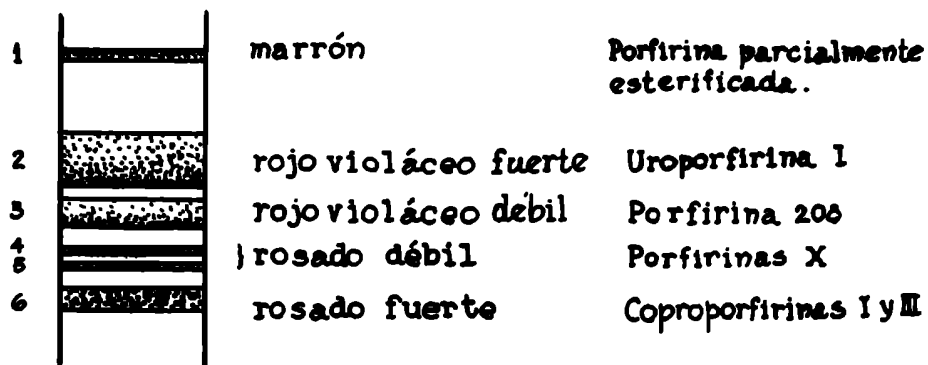
e) Elusión de las porfirinas correspondientes a las bandas formadas: las fracciones se suspenden en distintas porciones de cloroformo para eluir las porfirinas absorbidas que pasan a la fase cloroformica, dejando un precipitado de CO_3Ca prácticamente blanco. La posición y los límites de las distintas bandas se fijan previamente, a simple vista, si son suficientemente coloreadas o iluminando con ultravioleta que da una fluorescencia roja en la zona. Las soluciones cloroformicas se filtran por placa de vidrio poroso y al vacío, lo que permite lavar mejor el precipitado.

f) Se concentra por destilación al vacío en un balón chico con juntas esmeriladas hasta lograr un residuo seco.

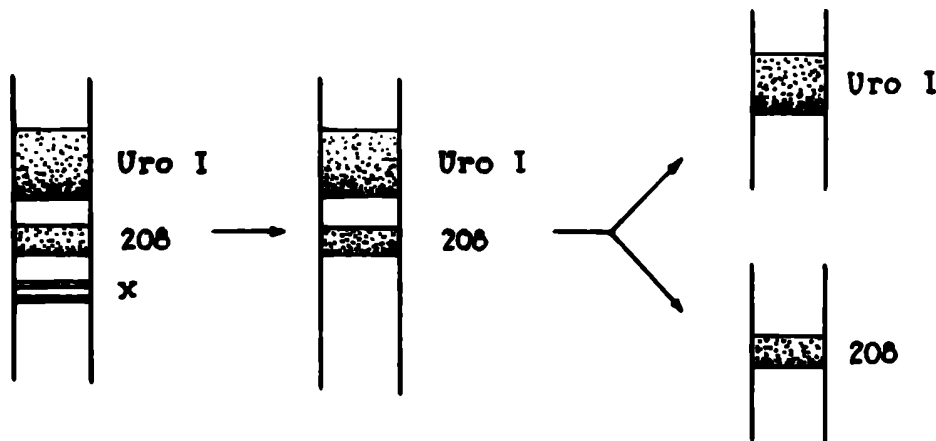
g) Obtención de entidad cromatográfica: cada una de las fracciones se cromatografía nuevamente hasta conseguir cromatogramas de una sola banda.

Resultados de la cromatografía:

Por separación cromatográfica de los ésteres metílicos de las porfirinas y otros pigmentos se observaron bandas coloreadas según el siguiente esquema:



Por recromatografías sucesivas de la Porfirina de Waldenström de las bandas 2 y 3 se logran separar la Uro I y 208.



Separadas se lavaron con benzol durante una hora y luego se confirmó el cromatograma de banda única por observación de la columna a la luz ultravioleta.

49) Cristalización de los ésteres metílicos:

Obtenido el cromatograma de una sola banda, comprobado con luz ultravioleta, el éster metílico está en condiciones de ser cristalizado separando el trozo de columna donde se halla absorbido; una vez evaporado el solvente, se suspende en cloroformo, se filtra por placa de vidrio poroso y la solución clorofórmica límpida se concentra evaporando a baño maría y al vacío. El residuo aún caliente se transfiere con unas gotas de cloroformo a un tubo de ensayo y se le añade dos a tres vol. de alcohol metílico; se mezcla y calienta a baño maría hasta expulsión del cloroformo. Es indispensable un enfriamiento muy lento, especialmente para aquellas porfirinas que cristalizan con dificultad. (como la Porfirina 208). En otros casos se deja cristalizar en heladera.

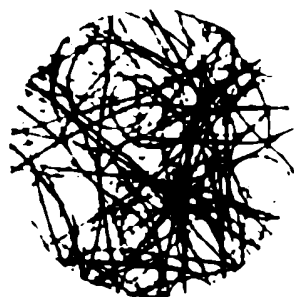
Al cabo de cierto tiempo el éster precipita en partículas macroscópicas totalmente cristalinas; se observa un precipitado coloreado y un sobrenadante generalmente incoloro. Cada una de estas partículas es una agrupación de muchos cristales.

Las formas cristalinas de las porfirinas y de sus derivados ofrecen un medio teórico de identificación. Esta distinción, sin embargo, no es generalmente practicable siendo la forma cristalina muy semejante para individuos diferentes. Normalmente los cristales son agujas o filamentos curvos, agrupados en centros o rosetas de estructura complicada; asimismo no son raras las formas de prismas rectos.

Los estudios más cuidadosos de las formas cristalinas sobre las porfirinas han sido efectuados por Fischer.

Resultados de la cristalización:

Las fotografías siguientes muestran la Uroporfirina I en forma de cabellos finos entrelazados, bien definidos y la Porfirina 208 como un conglomerado cristalino con aspecto de roseta.



Uro I



208

52) Punto de fusión:

Se utilizó un aparato para micro-punto de fusión con calentamiento eléctrico (x).

Se colocaron unos pocos cristales entre dos cubreobjetos apretándolos firmemente y ubicándolos en la depresión del block. Al calentar se observaron los cristales hasta la aparición de una pequeña gota de líquido entre los cubreobjetos observándose inmediata-

(x) Cedido gentilmente por el Dr. A. Novelli en la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Farmacia.

tamente la temperatura en el termómetro que da el punto de fusión. Como norma se aumentó rápidamente la temperatura hasta unos 20º del punto de fusión y luego lentamente en los últimos 10º.

El aparato se calibró con sustancias puras que cubrían la zona utilizada del termómetro y también con protoporfirina IX (de hemoglobina).

Asimismo después de cada punto de fusión se efectuaron re-cristalizaciones por tres veces consecutivas como mínimo, o sea, hasta la obtención de un punto de fusión constante.

Puntos de fusión de los ésteres metílicos de las porfirinas

Resultados obtenidos

Esteres metílicos	Punto de fusión
Protoporfirina IX (control)	225º
Uroporfirina I	271-274º
Porfirina 208	208-213º
Porfirina de Waldenström	246-248º
Uroporfirina I (Porf. cong.)	282-284º

Comprobación de identidad cromatográfica única:

Con una alícuota de los cristales se hace una cromatografía y se comprueba a la luz ultravioleta si hay otras bandas. En ninguno de los casos Uro I y 208 ha sido posible observarlo, quedando asentado que es un material que está en condiciones de ser usado espectroscópicamente.

ESPECTROFOTOMETRIA

TEORIA DE ABSORCION DE LA LUZ: (28)

Cuando un haz paralelo de luz monocromática pasa a través de un medio absorbente homogéneo, la intensidad del haz disminuye exponencialmente con el espesor del medio. Si I_0 es la intensidad del rayo incidente, I la del rayo emergente y l el espesor del medio, tenemos la relación:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = K.l = D = E$$

donde K es el coeficiente de absorción.

La función $D = \log_{10} \frac{I_0}{I}$ se llama densidad óptica

De aquí: $D = K.l$

E es la extinción o absorbancia cuando $l = 1$ cm.

Si además el medio absorbente es una solución en la cual las moléculas disueltas son independientes de otras e igualmente influenciadas a cualquier concentración por las moléculas de un solvente coloreado, la densidad es una función lineal de la concentración del soluto. Es la ley de Beer, que se puede escribir:

$$D = K_{\text{esp}} \cdot C \cdot l$$

C concentración de la sustancia en gramos por litro.

K_{esp} coeficiente de absorción específica.

l espesor de la capa de solución en cm.

De ello se obtiene

$$K = \frac{D}{C.l} = \frac{E}{C.l}$$

$$C = \frac{E}{K.l}$$

Frecuentemente, pero no siempre, las sustancias obedecen a la ley de Beer. Cuando no, debe atribuirse la desviación a que la solución no cumple con los requerimientos de independencia de las moléculas disueltas y la influencia constante del solvente con la concentración. En otras palabras, se puede concluir que ocurren asociaciones, disociaciones, formación de complejos o cambios en la solvatación.

Puesto que las leyes de absorción de la luz se cumplen estrictamente sólo con luz monocromática, las varias constantes espectrofotométricas son verdaderas constantes únicamente bajo las mismas condiciones. En la práctica las mediciones se efectúan usando una fuente de luz que da un espectro continuo, una posición de la cual se selecciona en cada situación del espectrofotómetro. El ancho de banda transmitido es una función de ambas entradas y salidas de la ramura, y a menos que varíen continuamente, podría ser más grande en la zona roja del espectro que en la azul debido a los cambios de dispersión con la longitud de onda. (29, 30)

Cuando en la solución hay más de una sustancia absorbente y todavía es aplicable la ley de Beer, cada sustancia opera independientemente con el rayo de luz. Así la densidad resultante es debida a la suma de los componentes individuales.

MÉTODOS DE MEDIDA:

Para los propósitos de espectrofotometría, el espectro óptico es considerado usualmente el comprendido en tres regiones, la ultravioleta, la visible y la infrarroja, además la primera y la última de éstas puede ser subdividida.

Las técnicas de medición de la absorción espectral se determina bajo consideraciones del orden de la longitud de onda. En el caso de las porfirinas, las bandas de absorción más significativas se encuentran principalmente en la porción visible del espectro, y el ultravioleta cercano es la zona significativa más próxima.

Pocos compuestos tienen bandas pronunciadas en el infrarrojo, pero comparativamente muy poca atención se ha prestado a esta región. (31)

Espectrofotómetro fotoeléctrico de cuarzo

Beckman Modelo D.U. (32)

El instrumento contiene un prisma de cuarzo que opera en un circuito electrónico y con el cual pueden realizarse con velocidad y precisión convenientes una amplia variedad de investigaciones y trabajos de control. Consiste en un monocromador de cuarzo, con fuente de luz, soporte para células de absorción, fototubos gemelos y está construido sobre un medidor electrónico para traducir las corrientes de la célula en lecturas directas del por ciento de transmisión y densidad.

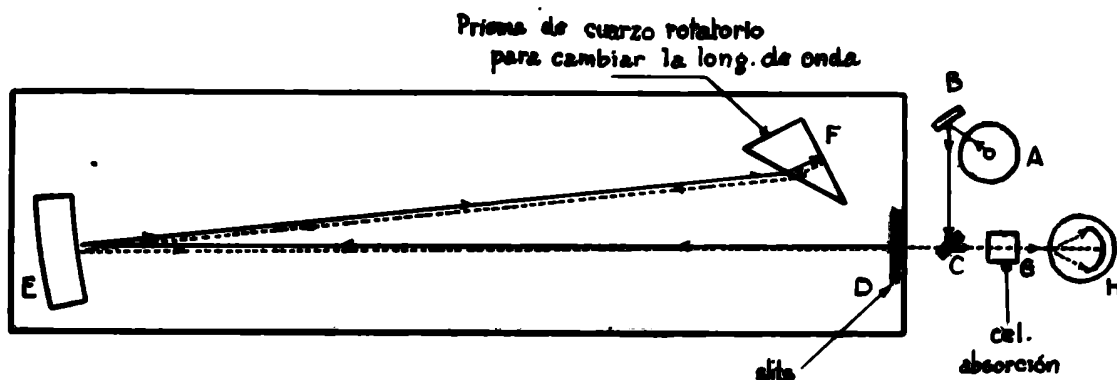


Diagrama esquemático mostrando el sistema óptico

- A. lámpara
- B. espejo
- C. espejo
- D. diafragma
- E. espejo
- F. prisma
- G. célula de absorción
- H. fototubo

Monocromador:

Es de tipo de autocolimación con prisma de cristal de 30° , con un diámetro efectivo de 50 mm. que da una alta dispersión en el ultravioleta. La escala de longitud de onda consiste en una espiral plana de cuatro vueltas con una longitud total aproximada de 100 cm., graduada desde 200 μ a 2000 μ . Se recomienda que las medidas se limiten entre 220 y 1000 μ teniendo una seguridad de escala de 1 μ .

Ranura:

Las ranura de entrada y salida, que trabajan hasta un máximo de 13 mm., están instaladas juntas en el extremo derecho del instrumento y protegidas, por estar construidas con cuarzo, siendo simultánea y continuamente ajustables desde 0,01 a 2.0 mm. por un mecanismo que permite un ajuste preciso y suave, particularmente cuando el ancho de la ranura es pequeño.

En las operaciones la ranura es ajustable hasta la obtención de un ancho de banda mínimo con una lectura de escala total de la medida indicadora. Este ancho de banda nominal es menor que 2 μ , sobre todo en los bordes extremos de las zonas del visible y ultravioleta.

Indicador de medida electrónica:

La lectura directa de la densidad y el porcentaje de transmisión se hace posible con un potenciómetro y amplificador electrónico.

La posición del interruptor en 0.1 permite abarcar una expansión de la escala de transmisión para lecturas más seguras de soluciones con menos de 10% de transmisión.

Fuentes de luz:

El modelo DU para valores entre 320 y 1000 m μ posee una lámpara de tungsteno de 6 volts; la corriente es suministrada por una batería de 6 volts.

El sistema de espejos enfoca una imagen del filamento a través de la entrada de la ranura en tal forma que el monocromador es completamente iluminado. La lámpara está en un compartimento ventilado, fijada por soportes alineados con el monocromador.

Resumiendo, se emplean como fuentes luminosas lámparas de incandescencia para el espectro visible, lámparas de vapor de mercurio o tubos de hidrógeno para el ultravioleta y para el infrarrojo, la lámpara incandescente de Nernst.

Soporte de tubos:

Las células de absorción standard para un recorrido de luz de 10 mm. se acomodan en un soporte de cuatro agujeros colocados en un compartimento protegido de la luz, pudiendo moverse desde el frente del instrumento por una varilla corrediza. Las cubetas de 1 cm. son de vidrio Corex o de sílice fundida.

Fototubos:

Los dos fototubos ocupan el mismo compartimento de las células. La varilla corrediza pone en posición cada tubo y simultáneamente produce la conexión eléctrica.

Un obturador y una llave permiten que la corriente oscura del fototubo pueda ser controlada en cualquier momento sin sacar las células o cambiar el lugar del medidor electrónico.

En el compartimento de los fototubos se mantiene una baja humedad utilizando un desecante que asegure la estabilidad de los circuitos.

El sistema posee un fototubo de óxido de cesio con una alta sensibilidad desde 1000 a 600 m μ y un fototubo sensible al ultravioleta que cubre la transmisión con una sensibilidad desde 625 a 220 m μ .

Este fototubo sensible al ultravioleta puede ser usado con la lámpara de tungsteno en la región de 625 a 320 m μ .

Sistema óptico:

El esquema representa la fuente de luz en A; se enfoca por una lente condensadora B en la lente C a 45 $^{\circ}$ sobre el plano de la ranura D. La entrada de la ranura es la menor de las dos ranuras similares colocadas verticalmente sobre otra separada unos 2 cm. a partir del centro. La luz incidiendo sobre la lente colimadora E es devuelta paralelamente y reflejada hacia el prisma de cuarzo F. La superficie de atrás del prisma de cuarzo está oscurecida, así la luz refractada en la primera cara es devuelta por el mismo camino, manteniendo la refracción como si emergiera del prisma, como un haz paralelo, el cual es nuevamente reflejado por la lente colimadora y enfocado en el espectro en el plano de la ranura D.

La luz de la longitud de onda para el cual el prisma es colocado pasa a través del monocromador por la ranura superior, y por la célula de absorción G al fototubo H.

Los espectrofotómetros requieren una calibración periódica en las escalas de densidad y longitud de onda.

En la mayor parte de los casos es un procedimiento simple, pero al cual no debe restársele importancia.

Con los aparatos de control automático, puede hacerse un control diario sin ningún esfuerzo, tomando la curva de absorción de un filtro de vidrio standarizado.

Con los instrumentos visuales, la escala de longitud de onda puede controlarse ocasionalmente por medio de una lámpara de neón y la escala de densidad, leyendo un filtro de vidrio standard, a una o dos longitudes de onda seleccionadas.

La curva de absorción: (33, 34, 35)

Trazando una de las constantes fotométricas en relación con la longitud de onda de la luz incidente se construye una curva espectrofotométrica. Los valores más convenientes son los coeficientes de extinción específica y molar (o milimolar).

Las bandas de absorción visibles en un espectroscopio simple son representadas por una curva de absorción con picos, y las posiciones claras del espectro, por depresiones (valles). Sin embargo, algunos espectros, parecen tener visualmente bandas distintas, pero las correspondientes bandas de absorción muestran únicamente regiones de curvatura cambiante, sin la menor separación entre ellas.

Cada espectro se encuentra frecuentemente en mezclas de sustancias las cuales separadamente tienen bandas finas que están superpuestas. Esto, sin embargo, puede también ocurrir en sustancias puras.

Una sustancia pura, bajo idénticas condiciones, tiene una curva de absorción característica y el coeficiente de extinción molar en cualquier longitud de onda es una constante. Las longitudes de onda registradas usualmente son las de absorción máxima, particularmente aquéllas con bandas más intensas, donde existen varias.

Cuando las curvas de absorción de dos sustancias de igual concentración están superpuestas, en general pueden cortarse en uno o más puntos, llamados puntos isosbéticos.

Las curvas de absorción de mezclas en equilibrio de dos sustancias interconvertibles de concentración total constante igual-

mente podrían pasar a través de los puntos isobéuticos y la determinación experimental de esta condición es un criterio de una mezcla en equilibrio.

BANDAS DE ABSORCIÓN EN LA REGION VISIBLE

Según Fischer (36)

Solvente	Longitud de onda de las bandas de absorción					
	Uroporfirina					
HCl 25%	596.6	577.6	553.6	511.3		
NaOH N/10	612.0	560.5	539.0	503.7		
Ester metílico en HCl 25%	596.9	576.7	553.6			
Cloroformo	626.2	599.0	581.4	570.5	537.3	500.8

Según Schumm (37)

HCl 25%	597.1	554.1	410.7		
KOH N/10	618.0	567.5	538.4	501.8	

ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA

	Uroporfirina	
HCl 2 N	400.6	413.7 - 399.8
Cloroformo	408.0	466.0 - 275.0

TECNICA PARA LA PREPARACION DE SOLUCIONES USADAS EN LA DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA

Material:

Se utilizaron los ésteres metílicos de las porfirinas Uro I, 208 y de Waldenström; además el éster de la Uro I aislado por el Dr. Grinstein de un caso de porfiria congénita estudiado en el Laboratorio de Watson (~~EEUU~~).

Pesadas:

El material secado al vacío se conservó en desecador y en la oscuridad hasta el momento de ser pesado. Se utilizó para ello una balanza Sartorius cuya precisión es de 0.01 mg. (x). Los pesafiltros preparados especialmente se introdujeron posteriormente en frascos de vidrio de 50 cc. con tapa esmerilada hasta el momento de efectuar la solución.

Las pesadas efectuadas fueron las siguientes:

Uro I	a) 0.00107 g.
	b) 0.00260 g.
208	c) 0.00048 g.
	d) 0.00123 g.
Waldenström	e) 0.00080 g.
	f) 0.00120 g.
Uro I (Porf. congénita)	g) 0.00070 g.
	h) 0.00050 g.

(x) Cátedra de Química Orgánica Dr. A. Novelli.

Soluciones de porfirinas libres:

Los ésteres metílicos de las porfirinas se saponifican previamente con HCl al 25% obtenido por titulación (título exacto).

Calculando el peso molecular del éster de Uro I: $C_{40}H_{38}N_4O_{16}$ en 962, el ácido tiene un peso molecular de 830.

Se preparó una solución en HCl 25%, que si bien es de 5% respecto al éster, como porfirina libre correspondè a una concentración de 43.1 mg/l, y para la solución diluída al tomar 1 ml. de la solución original y llevarla a 25 ml. con HCl 25%, resulta un valor final de 1.72 mg/l.

Para lograr una saponificación completa de la solución, se la deja durante la noche a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, siendo usada el mismo día de su preparación.

En el caso de la Porfirina 208, y estimando que sólo posee 7 carboxilos, corresponderá un peso molecular 884, pero como porfirina libre, 786. Luego, las soluciones tienen una concentración de 44.4 mg/l y la diluída 1.77 mg/l.

Soluciones de ésteres metílicos:

El cloroformo utilizado (uso anestésico) se destiló previamente envasándolo en ampollas cerradas y conservándolo al abrigo de la luz y en heladera.

Las soluciones clorofórmicas en una concentración de 5% se preparan poco tiempo antes de su medición, evitándose así pérdidas por evaporación. Las diluciones menores se efectuaron tomando 1 ml. y llevándolo a una concentración de 0.33%.

En todo momento se han extremado las precauciones para que el material volumétrico, cubetas, reactivos, etc., estuvieran libres de metales.

Determinaciones espectrofotométricas:

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman D.U. efectuándose los trabajos en los laboratorios de Obras Sanitarias de la Nación con la supervisión del Dr. Rodolfo García.

En cada cubeta se colocaron sucesivamente soluciones de HCl 25%, Uro I, 208 y Waldenström, comenzándose a trabajar desde los 650 μ hasta los 400 μ , tratando de obtener el mayor número de puntos cercanos a los máximos.

Se ha trabajado con la máxima sensibilidad y utilizando una ranura (slit) variable, es decir, limitando el ancho de la banda obteniéndose los valores que se detallan como ejemplo:

Longitud de onda μ	Slit mm
650-610	0.037
605-593	0.043
592-598	0.054
560-510	0.062
500-490	0.120
460-440	0.140
440-400	0.158

Llegado a esta zona de los 400 μ , es necesario utilizar diluciones muy grandes; se trabajó entre 440 y 380 μ aproximadamente.

Cada uno de estos valores fué obtenido controlando el aparato antes y después de cada determinación. En los casos en que no

se obtuvieron valores consistentes, se repitieron las lecturas hasta hallar el valor aceptable.

Los valores de la extinción específica fueron calculados utilizando tablas, interpolando cuando fué necesario entre valores y no por lectura en el limbo del aparato por considerar que era más dificultoso y exigía mayor tiempo en las apreciaciones.

Como confirmación de los valores hallados, se efectuó una nueva determinación en todos los casos y una tercera en los de soluciones diluídas porque aparecían unos máximos sucesivos alrededor de la banda de Soret.

Representación gráfica de los valores obtenidos: (38)

Como se dijo en la página 45, se ha representado la extinción específica E en función de la longitud de onda ($\mu\mu$) de la luz incidente, de acuerdo con lo siguiente:

Gráfico 1: Uroporfirina I en HCl 25%

- " 2: Porfirina 208 en HCl 25%
- " 3: Porfirina de Waldenström en HCl 25%
- " 4: Uroporfirina I de porfiria congénita en HCl 25%
- " 5: Ester metílico de la Uroporfirina I en sol. clorofórmica
- " 6: " " " " Porfirina 208 " " "
- " 7: " " " " Uroporfirina III " " "
- " 8: " " " " Uroporfirina I (P.C)" "
- " 9: " " " " Porfirina de Waldenström y de las dos porfirinas que la forman en solución clorofórmica.

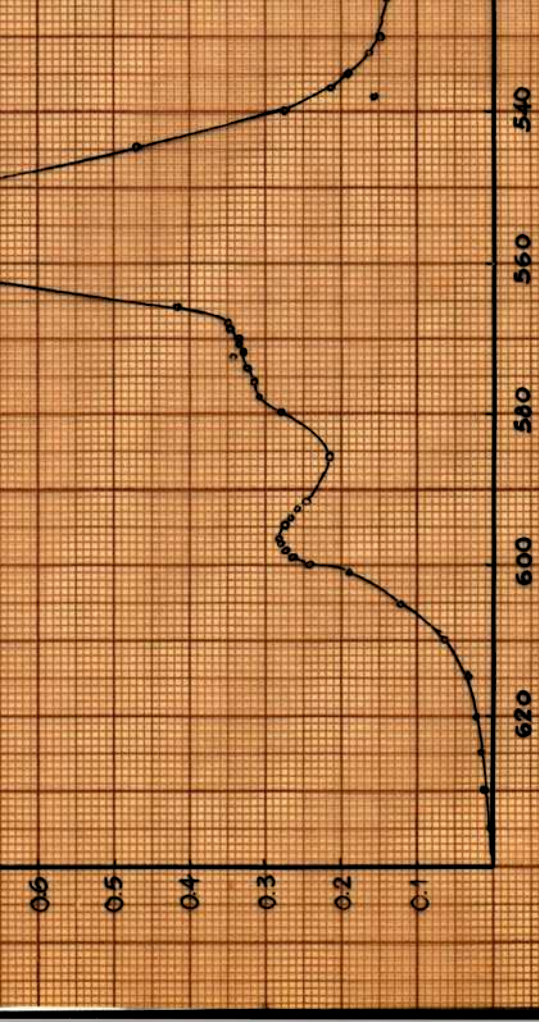


Gráfico I : Espectro de absorción de l
Concent. 43.1mg/l entre 640-43

PORFIRINA 208

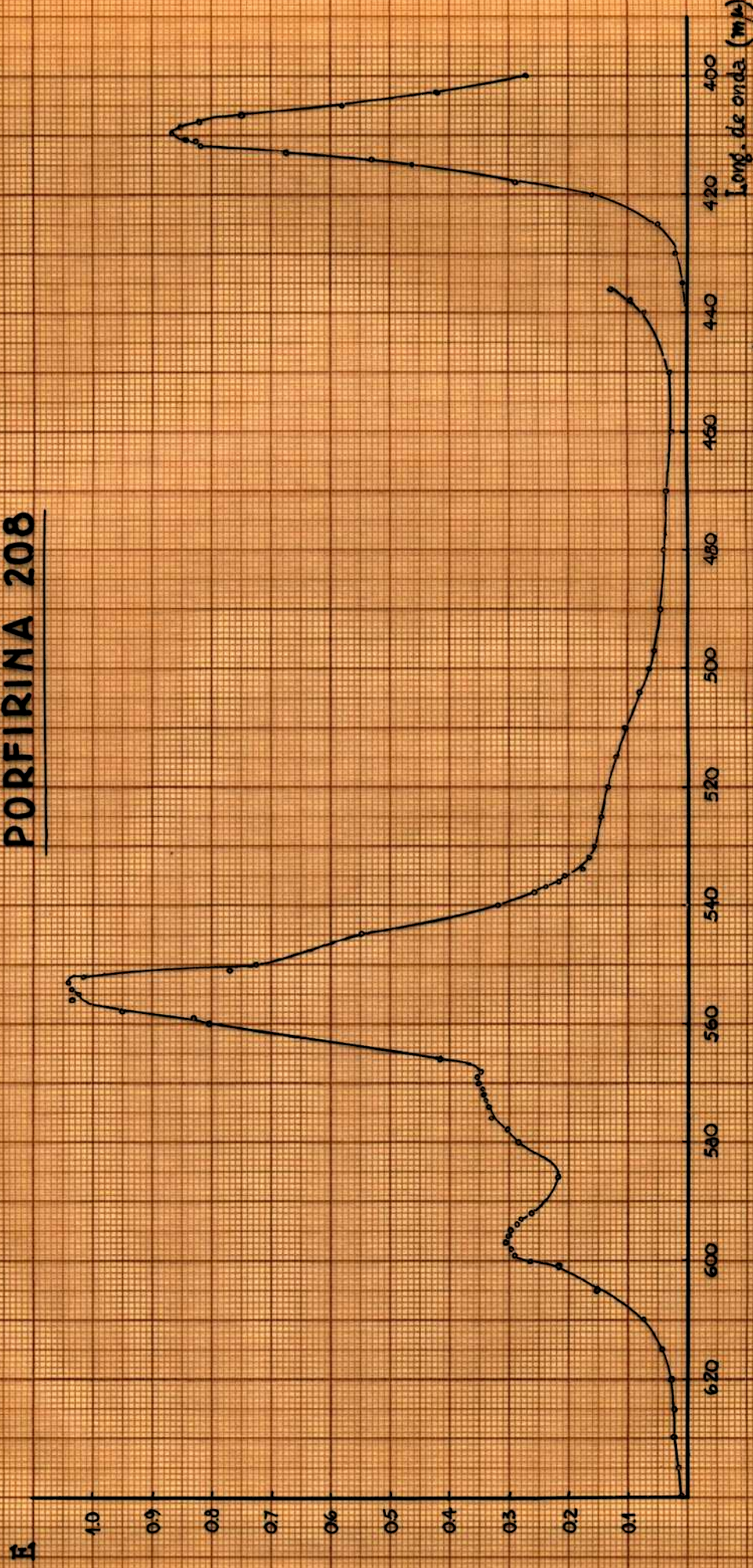


Gráfico I: Espectro de absorción de la PORFIRINA 208, en HCl 25%

Concent. 44.4 mg/l entre 640-635 mμ y 1.77 mg/l entre 400-440 mμ

PORFIRINA DE WALDENSTRÖM

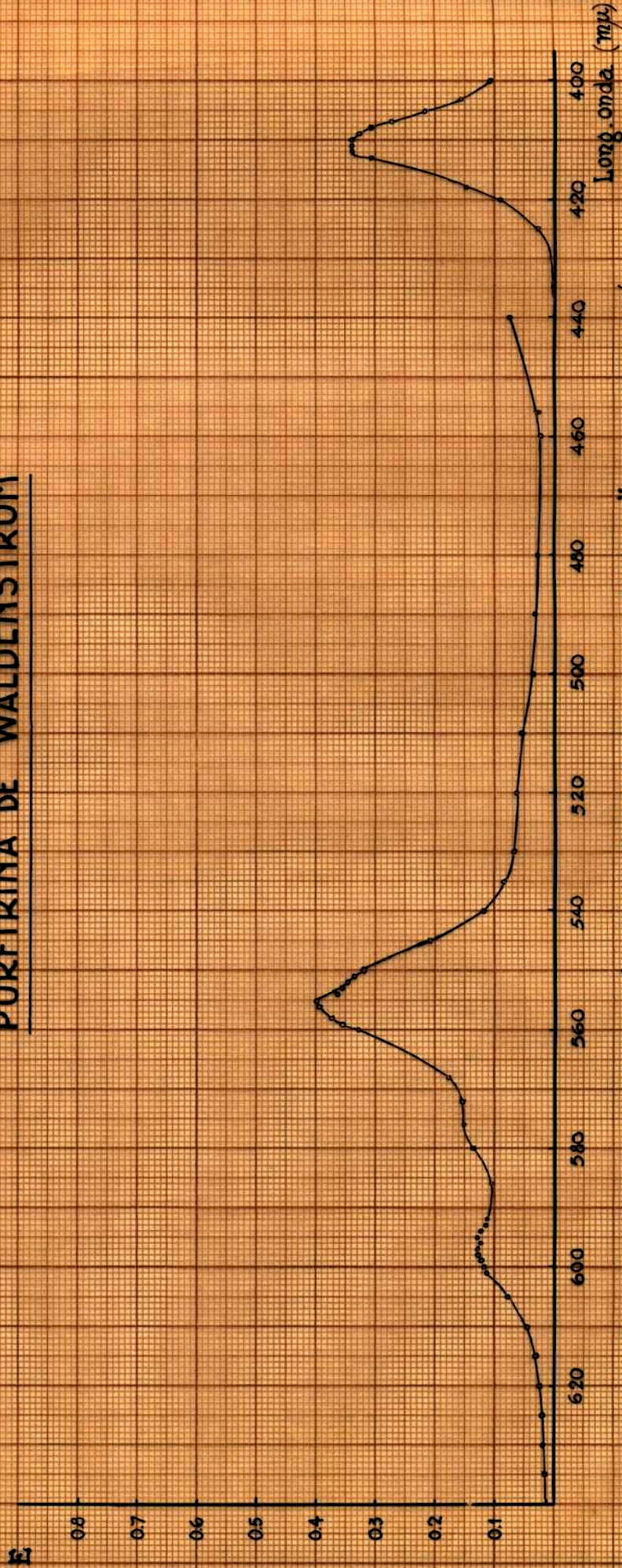
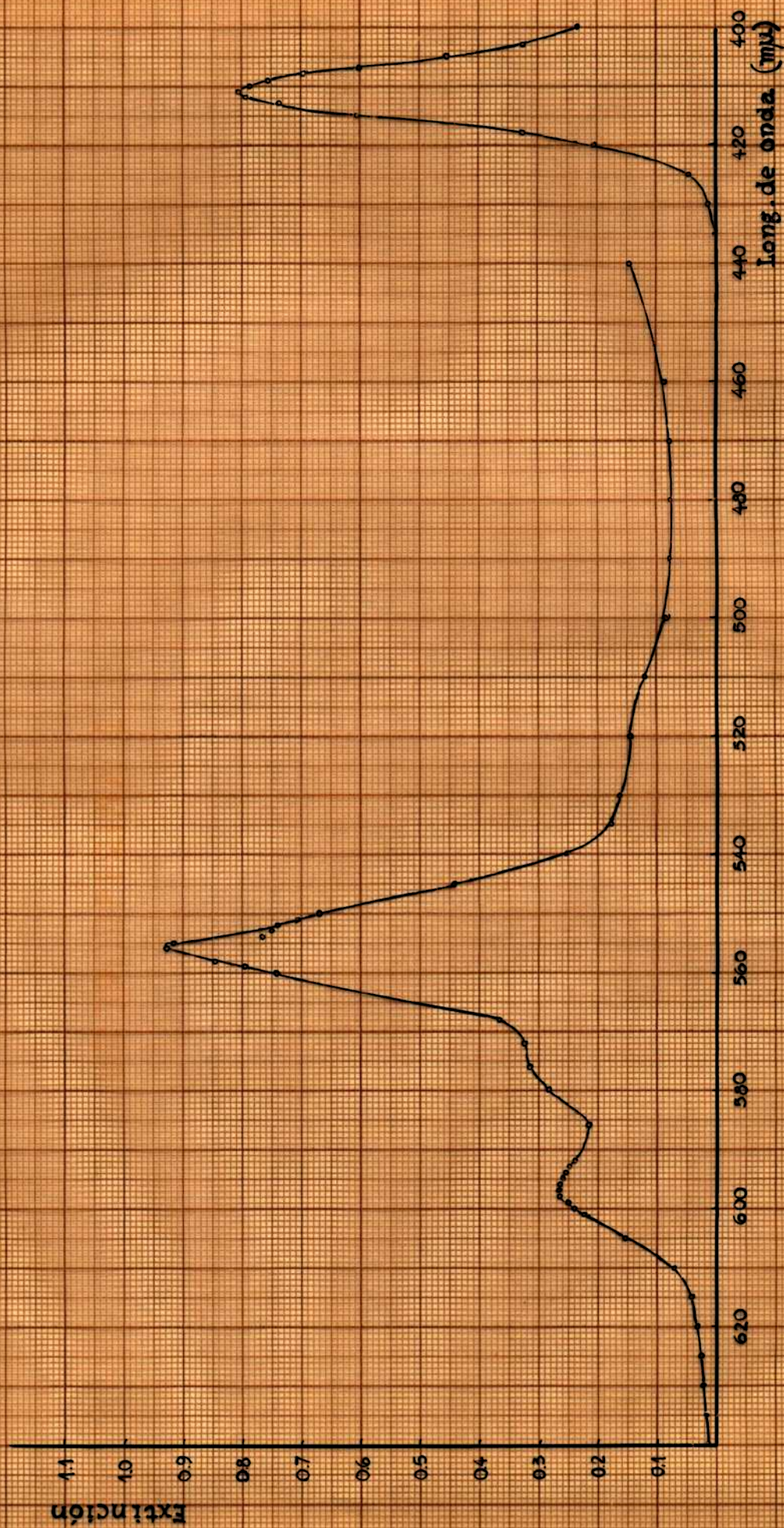


Gráfico II : Espectro de absorción de la PORFIRINA de WALDENSTRÖM, en HCl 25%.

UROPORFIRINA I



Gráf IV : Espectro de absorción de la UROPORFIRINA I (Porfiria congénita) en HCl 25%
Concent. 43,1 mg/l entre 640-435 mμ y 1,72 mg/l entre 440-400 mμ

UROPORFIRINA I

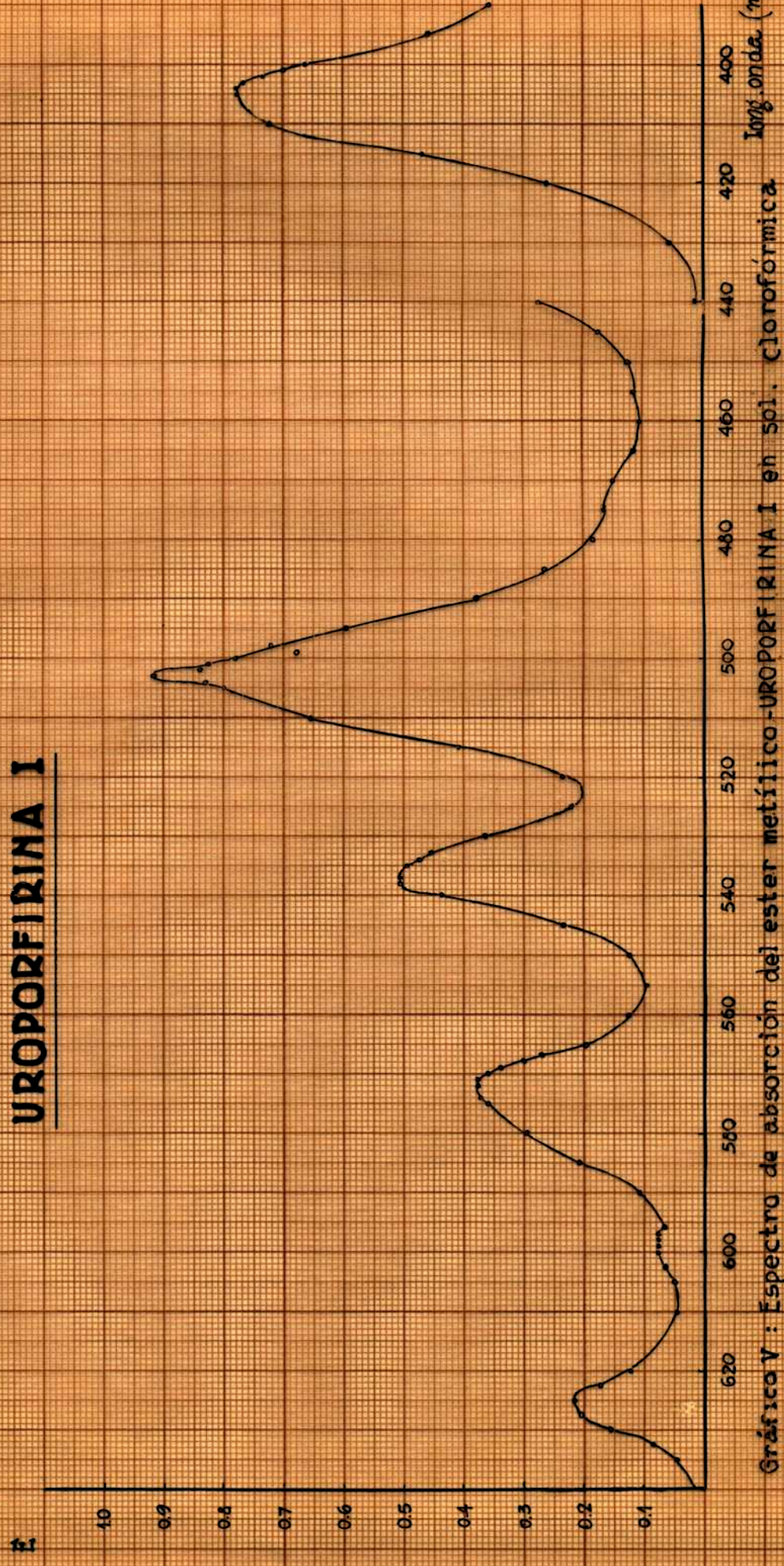


Gráfico V : Espectro de absorción del ester metílico-UROPORFIRINA I en sol. clorofórmica

Concentración 5% para 640 - 440 μ y 0,33% para 440 - 390 μ .

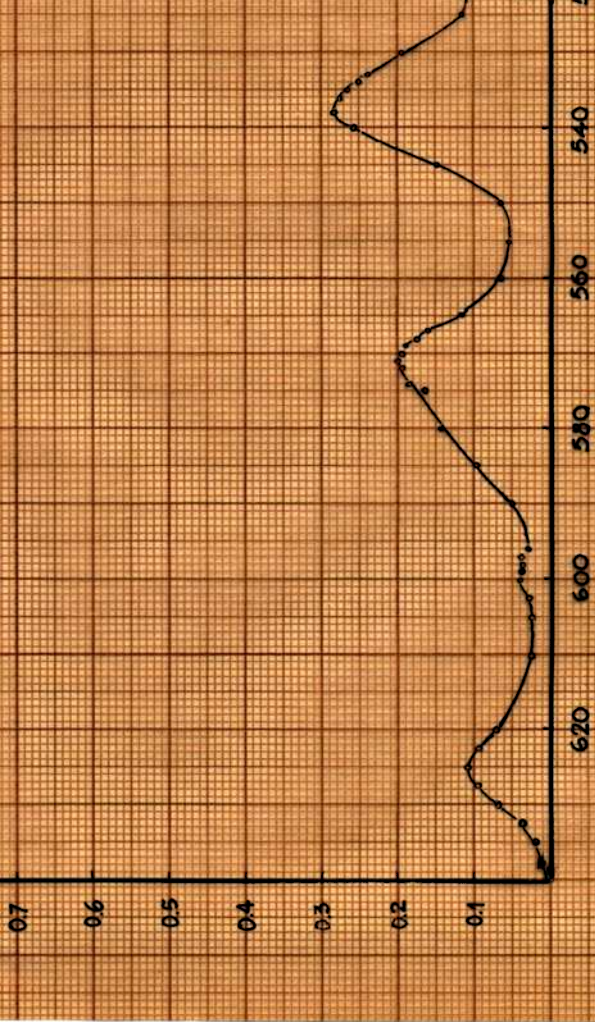


Gráfico VI : Espectro de absorción
Concent. 5% para 6

PORFIRINA DE WALDENSTRÖM



Gráfico VII: Espectro de absorción del ester metílico-UROPORFIRINA III en solución cloroformica.
Concent. 5% para 640-440 mμ y 0.33% para 440-390 mμ.

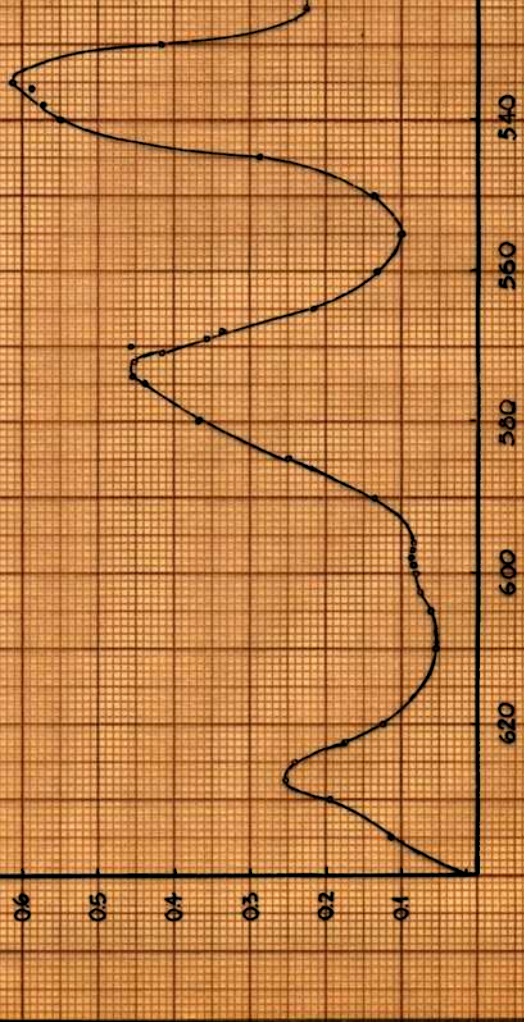


Gráfico VIII : Espectro de absorción del ester met
Concentración 5% para 640 .

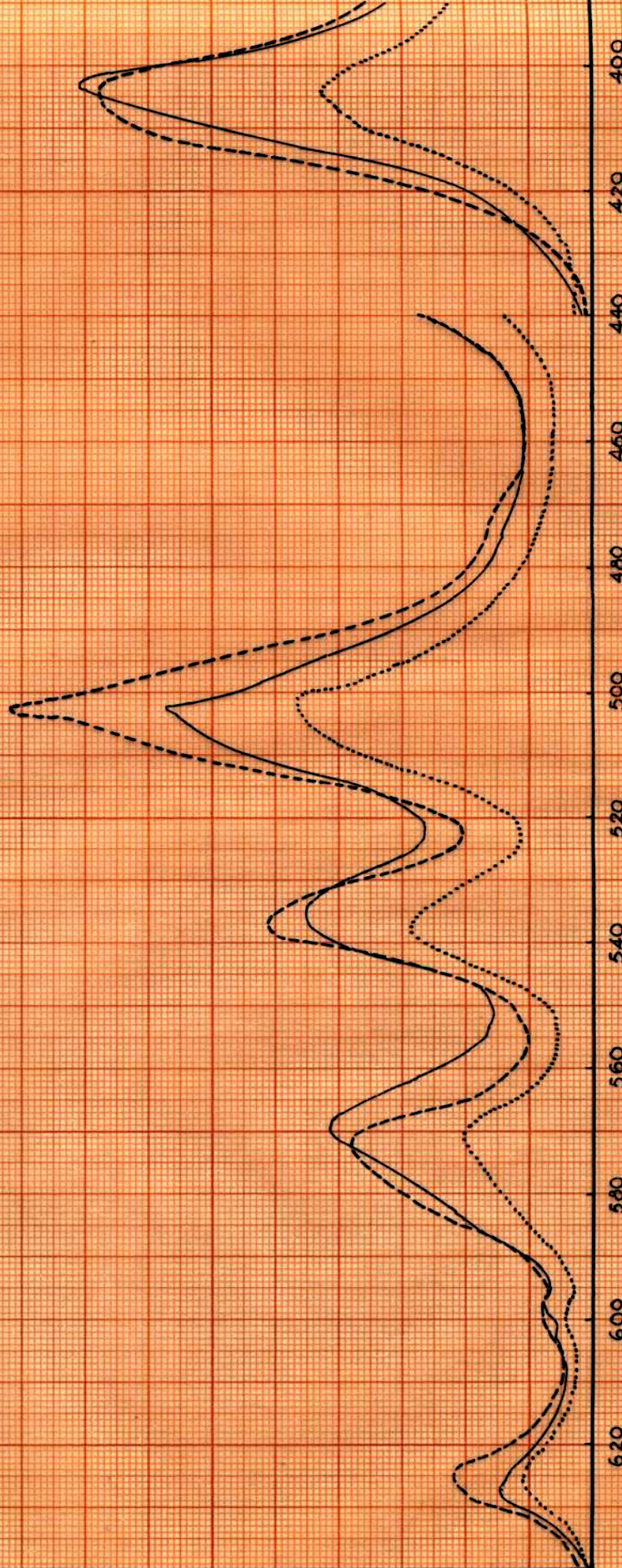
Porfirina de Waldenström —————

Uroporfirina I - - - - -

Porfirina 208 ······

E

0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1



Long onda (m)

Gráfico IX : Gráfico comparativo de los espectros de absorción de los ésteres metílicos de la Porfirina de Waldenström y de las dos porfirinas que la forman.

TABLA I

MAXIMOS DE ABSORCION DE PORFIRINAS LIBRES EN HCl 25%

	Porfirina		I	II	Soret
Gráfico 1	URO I	h.	596 (x)	554	411
		t.	597.0	553.8	410.3
Gráfico 2	208	h.	597	553	410
		t.	595.8	552.6	408.7
Gráfico 4	URO I (p.c.)	h.	597.5	556	411
		t.	597	553.8	410.3

(x) valores en μ

h: " hallados

t: " de tablas (9)

TABLA II

MAXIMOS DE ABSORCION DE LOS ESTERES METILICOS DE PORFIRINAS
en solución clorofórmica

Graf.	Porfirina		I	II	III	IV	V	Soret
V	URO I	h	625	598	571.5	538	503	404
		t	625.8	599	571	535.7	503.4	406
VI	208	h	625	597	571	538	501	404
		t	625	598	569.9	534.6	500.8	-
VII	WALD.	h	627.5	597	570	536	503	403.5
		t	625	-	570	535	501	406
VIII	URO I (P.C.)	h	627.5	598	570	535	502	405
		t	625	599	571	535.7	503.4	406

TABLA III

VALORES DE LAS EXTINCCIONES ESPECIFICAS E
REFERIDA A LA CONCENTRACION C.1% EN SOLUCION DE HCl 25%

		I	II	Soret
URO I	M	596	554	411
	E	65	229	4900
208	M	597	553	410
	E	68	234	4890
URO I (p. c.)	M	597.5	556	411
	E	64	215	4650

M: Máximos (m_μ)

E: Extinción específica E $\frac{1}{1\%}$ cm.

TABLA IV

VALORES DE LAS EXTINCCIONES ESPECIFICAS E
REFERIDA A LA CONCENTRACION C:1% EN SOLUCION CLOROFORMICA

		I	II	III	IV	V	Soret
URO I	M	625	598	571.5	538	503	404
	E	43	15	75	101	182	1550
208	M	625	597	571	538	501	404
	E	21	7	40	56	92	840
WALDENSTRÖM	M	627.5	597	570	536	503	403.5
	E	28	16	83	80	134	1600
URO I (p.c.)	M	627.5	598	570	535	502	405
	E	50	17	90	122	192	1750

RESULTADOS

En la tabla I, renglón h, están expuestos los valores de los máximos de absorción correspondientes a la Uroporfirina I y a la Porfirina 208 obtenidas a partir de la Porfirina de Waldenström. En la misma figuran los valores de la Uro I aislada de orina de un caso de porfiria congénita. Estos datos corresponden a soluciones en HCl al 25%.

En la misma tabla, renglón t, se hallan los valores espectrofotométricos de la Uroporfirina I y Porfirina 208 aislada de Porfirina de Wäldenström, determinados por otros autores. (9)

Puede apreciarse que las diferencias entre los valores hallados para las distintas porfirinas son tan pequeñas, que están por debajo de la capacidad de resolución del aparato.

En la tabla II, renglón h, están consignados los máximos de absorción de los ésteres metílicos de la Uroporfirina I y Porfirina 208 obtenidos de la Porfirina de Waldenström, y la Uroporfirina I aislada de porfiria congénita. Estos valores corresponden a una solución clorofórmica.

El examen demuestra que las diferencias halladas entre la Uroporfirina I y la Porfirina 208 no pueden ser resueltas por el aparato. En cambio, las de la Uroporfirina I de Porfirina de Waldenström y la Uroporfirina I de porfiria congénita, en general, son más significativas.

En particular para la Uroporfirina I y Porfirina 208 los máximos I, II, III, IV, V y Soret aparecen muy cercanos.

En el cotejo entre la Uroporfirina I y la 208 con la de Waldenström de la que provienen, vemos que la Porfirina 208 acusa una discrepancia mayor que la Uroporfirina I.

Asimismo, la diferencia entre las dos Uroporfirinas I entre sí es escasa.

Los valores de la Uroporfirina I de porfiria congénita, típica Uroporfirina I, son los que se han utilizado como referencia.

En la tabla III figuran las extinciones específicas E correspondientes a los máximos que figuran en el renglón M, referidas a la concentración $C = 1\%$ en solución de HCl al 25%. Los valores entre la Uroporfirina I y Porfirina 208 muestran una diferencia apreciable para la banda II y la de Soret.

Asimismo entre la Uroporfirina I de Waldenström y la Uroporfirina I de orina de porfiria congénita, el valor de las extinciones acusa discrepancias notables en las tres bandas.

En la tabla IV las extinciones específicas en solución clorofórmica son muy diferentes tal como aparecen para la Uroporfirina I y Porfirina 208 donde hay una extinción de aproximadamente un 50% menor en esta última.

A su vez, al cotejar los valores de extinción de la Porfirina de Waldenström con los de la Uroporfirina I y 208, de la cual provienen, los mismos aparecen en una forma intermedia.

Las extinciones específicas de la Uro I de Waldenström y la Uro I de porfiria congénita, son diferentes pero en un grado tal que sus valores discrepantes pueden atribuirse a varias causas como se discute a continuación. Para la Uro I de Waldenström todos los valores son menores en un 15% aproximadamente con respecto a la Uro I de porfiria congénita.

DISCUSIONES

Si bien los valores de los máximos de absorción de las soluciones clorhídricas y clorofórmicas son poco diferentes, y se encuentran dentro del orden obtenido por los autores Grinstein, Schwartz y Watson (9) quienes usaron el espectrógrafo de Hilger para la zona ultravioleta y el espectroscopio de Zeiss para la zona visible - que parece ser más sensible para determinadas zonas que el Beckman D.U. - las diferencias observadas en cuanto a posiciones no serían significativas dentro de las condiciones en que se usó el aparato.

Si se tiene en cuenta que para la zona más sensible del aparato el valor está dentro de los 10 Angstroms (1 μ), significa que los valores hallados son satisfactorios.

Respecto de la extinción específica en medio clorhídrico las diferencias entre Uro I y 208 son relativamente pequeñas. Si ellas fueran significativas su importancia será revelada por los estudios en ejecución.

Pero en cuanto a los valores en solución clorofórmica hay una apreciable diferencia entre ambas porfirinas.

Si observamos la extinción específica de la Uro I de porfiria congénita y la aislada de Porfirina de Waldenström, se destaca que en esta última los valores de E son menores. Esto podría explicarse como una presencia de Porfirina 208 que no ha sido factible separar por la cromatografía de CO_3Ca , a pesar de las repetidas re-cromatografías, recristalizaciones, comprobación de ente cromatográfico único, etc. Ello estaría de acuerdo con el punto de fusión relativamente bajo comparado con los obtenidos.

El trabajo de Rimington y Sveinsson (38) destaca que el valor de la intensidad de absorción de la banda de Soret (405 μ) correspondiente a una cuidadosa preparación de Uroporfirina I disuelta en HCl 0.5 N es $E = 6517$ y para el éster metílico en cloroformo $E = 2067$.

Además señala los siguientes valores de la extinción específica de la Uroporfirina I en solución clorofórmica:

I 39, II 67, III 91, IV 151 y Soret 2067

y para la Porfirina de Waldenström:

I 39, II 69, III 92, IV 155 y Soret 2100.

Cabe destacar que de la comparación de los valores obtenidos con los de la tabla IV, resulta que éstos son más cercanos a la Uroporfirina I obtenida a partir de la Porfirina de Waldenström que los de la Uroporfirina I de porfiria congénita.

CONCLUSIONES

El estudio espectrofotométrico de la Uroporfirina I y Porfirina 208 separadas de la Porfirina de Waldenström por la columna de CO_3Ca permite concluir lo siguiente:

12) En medio clorhídrico al 25% las posiciones de los máximos de absorción para la zona del visible y del ultravioleta son muy próximas y prácticamente imposible de distinguir con el espectrofotómetro Beckman D.U.

Los máximos son:

Uroporfirina I	I 596,	II 554	y Soret 411 $\mu\mu$
Porfirina 208	I 597,	II 553	y Soret 410 $\mu\mu$

Los valores de la extinción específica son:

Uroporfirina I	I 65,	II 229	y Soret 4900 $\mu\mu$
Porfirina 208	I 68,	II 234	y Soret 4890

22) En solución clorofórmica la posición de los máximos de los ésteres metílicos es también muy próxima:

Uro I	I 625,	II 598,	III 571.5,	IV 538,	V 503	y Soret 404
208	I 625,	II 597,	III 571	IV 538,	V 501	y Soret 404

Las extinciones específicas son manifiestamente diferentes:

Uro I	I 43,	II 15,	III 75,	IV 101,	V 182	y Soret 1550
208	I 21,	II 7,	III 40,	IV 56,	V 92	y Soret 840

32) Los valores espectrofotométricos de la Uro I separados de la Porfirina de Waldenström coinciden con los valores de la Uro I provenientes de porfiria congénita, que se considera actualmente como Uroporfirina I de referencia.

BIBLIOGRAFIA

1. GRANICK S. and GILDER H., Adv. Enzymol. The Tetrapyrrools.
8: 305, 1947
2. TURNER W.J., J. Biol. Chem. 118: 519, 1937.
3. VANNOTTI A., Porphyrins. Hilger. London 1954.
4. STERN A. and WENDERLEIN H., Z. physik. Chem. A 174: 81, 1935.
5. LEMBERG R. and LEGGE J.W., Hematin compounds and bile pigments
1949.
6. GRINSTEIN M., La Prensa Médica Argentina 27: 2265-2312, 1940.
7. NESBITT S. and WATKINS C.H., Am. J. Med. Sci., 203: 74, 1942.
8. TURNER W.J., Arch. Internal Med., 61: 762, 1938.
9. GRINSTEIN M., SCHWARTZ S. and WATSON C.J., J. Biol. Chem.
157: 323, 1945
10. MERTENS E., Z. physiol. Chem. 250: 57, 1937.
11. DOBRINER K., J. Biol. Chem. 120: 115, 1937.
12. FISCHER H. and ANDERSAG H., Ann. 458: 117, 1927.
13. FISCHER H. and HIERNIS J., Z. physiol. Chem. 196: 155, 1937.
14. FISCHER H. PLATZ K. and MORGENROTH K., Z. phys. Chem. 182: 265, 1929
15. MAC DONALD and STEDMAN, J. Am. Chem. Soc. 75: 3040, 1953.
16. GRINSTEIN M., ALDRICH R., HAWKINSON V. and WATSON C.J.,
J. Biol. Chem. 179: 983, 1949.
17. WALDENSTRÖM J., Acta Med. Scand. Sup. 82, 1937.
18. GRINSTEIN M., Bioquímica de la porfiria. Tesis de Profesorado.
La Prensa Méd. Arg. (en prensa), 1954.
19. WATSON C.J., Porphyria. Adv. Internal Med., 1954.
20. BORDA J.M., Porfirinas y Porfiria. L. Etchegoyen, 1946.
21. BEREFERVIDE J.J., SEANE M., LAZZARI A. y SANZ ALSINA B., La
Prensa Médica Arg. 41: 47, 1954.

22. WATSON C.J. and SCHWARTZ S., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 47: 393, 1941
23. KENCH J.E., Biochem. J. 37: II, 1943.
24. RIMINGTON C., Biochem J. 37: VII, 1943.
25. MC SWINEY R.R., NICHOLAS R.E.H. and PRUNTY F., Biochem. J. 46: 147, 1950.
26. ZECHMEISTER L. and CHOLNOCKY L., Principles and Practice of Chromatography, New York, 1941.
27. WALDENSTRÖM J. and VAHLQUIST B., Z. physiol. Chem. 260: 189, 1939.
28. HEILMEYER L., Spectrophotometry in Medicine. Hilger. London, 1943.
29. COOKSON G. and RIMINGTON C., Biochem. J. 57: 476, 1954.
30. La naturaleza de los espectros, Sandoz (Basilea), 1952.
31. HAGENBACH A., AUERBACHER F. and WIEDEMANN E., Helv. Chim. Acta 9: 1, 1936.
32. CARY H.H. and BECKMAN A.O., J. Optical Soc. Am. 31: 682, 1941.
33. ALBERS V.M. and KNORR A.V., J. Chem. Phys. 4: 422, 1936.
34. JOPE E.M. and O'BRIEN J., Biochem J. 39: 239, 1945.
35. STERN A. and WENDERLEIN H., Z. physik. Chem., A 170: 337, 1934.
36. FISCHER H. and ORTH H., Die Chemie des Pyrrols, Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig 1937.
37. SCHUMM A., Spektoroch Anal. nat. organ. Farbstoffe, 1927 cit. por 3.
38. RIMINGTON C. and SVEINSSON S.L., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2: 209, 1950.

Ysal

M. L. L. L.

INDICE

	Pág.
Antecedentes	1
Qué son las porfirinas?	2
Estructura química de las porfirinas	3
Cuadro de porfirinas naturales	
Cuadro de porfirinas artificiales	
Porfirinas en la naturaleza	5
Cuadro de porfirinas en animales	7
Propiedades de las porfirinas	8
Estructura del anillo de la porfina	8
Espectro de absorción de las porfirinas	9
Color de las porfirinas	11
Efecto del pH sobre el espectro de absorción y fluorescencia	12
Absorción de la luz	13
Solubilidad	15
Metaloporfirinas	17
Punto de fusión	18
Porfirinas individuales	20
Coproporfirinas	20
Uroporfirinas	21
Porfirina de Waldenström	22
Porfirina 208	23
Porfiria	24
Clasificación de las porfirias	25
Parte experimental	26
Recolección del material	26
Control	26
Aislamiento	27
12) Concentración de las porfirinas de la orina	27
a) Aislamiento por el método del talco	28
b) Aislamiento por el método del acet. de etilo	28
c) Obtención de la Porfirina de Waldenström	30
22) Esterificación	32
32) Purificación del éster metílico por cromatografía con carbonato de calcio	33
Resultados de la cromatografía	35
42) Cristalización de los ésteres metílicos	36
Resultados de la cristalización	37
52) Punto de fusión	37

P O R F I R I N A

Espectrofotometría	39
Teoría de absorción de la luz	39
Métodos de medida	41
Espectrofotómetro fotoeléctrico de cuarzo Beckman	41
Diagrama esquemático del sistema óptico	42
Descripción	42
Sistema óptico	44
Curva de absorción	45
Cuadro del espectro de absorción	46
Técnica para la preparación de soluciones usadas en la determinación espectrofotométrica	47
Material	47
Pesadas	47
Soluciones de porfirinas libres	48
Soluciones de ésteres metílicos	48
Determinaciones espectrofotométricas	49
Representación gráfica de los valores obtenidos	50
Tabla I: Máximos de absorción de porfirinas libres en HCl	51
Tabla II: Máximos de absorción de los ésteres metílicos de porfirinas en solución clorofórmica	52
Tabla III: Valores de las extinciones específicas referidas a la concentración C=1% en sol. de HCl	53
Tabla IV: Valores de las extinciones específicas referidas a la concentración C=1% en sol. clorofórmica	54
Gráfico I: Espectro de absorción de Uro I en HCl	
Gráfico II: " " " " la Porfirina 208 en HCl	
Gráfico III: " " " " " Porf. de Waldenström	
Gráfico IV: " " " " " Uro I (porfiria congénita) en HCl	
Gráfico V: Espectro de absorción del éster metílico de la Uro I en solución clorofórmica	
Gráfico VI: Espectro de absorción del éster metílico de la Porfirina 208. en solución clorofórmica.	
Gráfico VII: Espectro de absorción del éster metílico de la Uroporfirina III en solución clorofórmica.	
Gráfico VIII: Espectro de absorción del éster metílico de la Uroporfirina I (porf. cong.) en sol. clorof.	
Gráfico IX: Comparación de los espectros de absorción de los ésteres metílicos de la Porfirina de Waldenström y de las dos porfirinas que la forman.	
Resultados	55
Discusiones	57
Conclusiones	59
Bibliografía	60