

## Capítulo 15.

# Estudio cinético de la reacción térmica presente en las soluciones irradiadas de ácido fólico.

---

---

Antes de iniciar este capítulo es conveniente hacer un breve repaso de algunos de los resultados presentados hasta aquí. El ácido fólico se degrada fotoquímicamente a través de, al menos, dos vías en soluciones alcalinas y en presencia de  $O_2$ . Una de ellas es similar a la estudiada en medio ácido, la otra vía produce un compuesto **A** que se transforma, sin necesidad de iluminación, en otro compuesto **B**. Esta reacción térmica produce cambios espectrales en las soluciones irradiadas de ácido fólico, una vez que se ha interrumpido la iluminación. Además la velocidad de estos cambios espectrales aumenta drásticamente si se alcaliniza la solución con una base fuerte (NaOH, KOH). A partir de la sustancia **A**, aislada mediante TLC preparativa, se logró reproducir estas variaciones espectrales. En efecto, cuando una solución de sustancia **A**, extraída de una placa de TLC, se alcaliniza, se inicia una reacción térmica que presenta un espectro diferencia normalizado similar al observado en las soluciones irradiadas, luego de interrumpir la irradiación.

A partir de estos resultados preliminares se decidió encarar el estudio cinético de la reacción térmica de conversión de la sustancia **A** en la sustancia **B**. Como objetivo principal de esta etapa se propuso encontrar una ley de velocidad para esta reacción, estudiando la dependencia de la velocidad de este proceso con el pH. En este capítulo se exponen los resultados de este estudio cinético.

La realización de los experimentos expuestos en este capítulo requirió el empleo de una metodología particular descrita en forma general en la sección 8.2. Sin embargo, algunos detalles experimentales no expuestos en dicha sección fueron incluidos en el desarrollo de este capítulo. Los experimentos que se presentarán a continuación fueron realizados

empleando dos tipos de soluciones distintas:

- soluciones de ácido fólico irradiadas en presencia de O<sub>2</sub> durante un tiempo suficientemente largo como para originar una cantidad adecuada de la sustancia **A**.
- soluciones de la sustancia **A** obtenidas aplicando la técnica TLC preparativa a soluciones irradiadas de ácido fólico.

Los resultados de ambos grupos de experimentos se presentan por separado.

## **15.1. Experimentos realizados con soluciones irradiadas de ácido fólico.**

### **15.1.11 Metodología.**

Para estos experimentos se emplearon soluciones de ácido fólico de concentración 450  $\mu$ M y pH aproximadamente 10. En estas condiciones más del 99,9% de la luz es absorbida por el ácido fólico. Por otra parte, casi el 99% de la molécula está en su forma básica. Esta condición es necesaria ya que la forma protonada de la molécula no genera sustancia **A** al ser irradiada. Sin embargo, no se usaron soluciones de pH superior a 10 para no aumentar la velocidad de la reacción que se quiere estudiar. Se supo, sobre la base de experimentos preliminares, que a pH 10 la reacción térmica es relativamente lenta. En definitiva, se buscó una condición de pH tal que permitiera irradiar sólo a la forma alcalina, pero a la cual la velocidad de degradación de sustancia **A** fuera lo suficientemente lenta.

Luego de interrumpir la iluminación, las soluciones se mezclaron rápidamente con soluciones reguladoras con el objeto de fijar el pH de la solución a un valor adecuado. Inmediatamente después de realizar esta operación, se inició el seguimiento de las variaciones espectrales.

Las medidas espectrofotométricas fueron realizadas en el equipo Cary3 (Varian), descrito en la parte experimental. Para estudiar la cinética de la reacción se registraron y almacenaron los espectros de las soluciones a distintos tiempos, y luego se analizaron las variaciones de la absorbancia como una función del tiempo para distintas longitudes de onda.

Las soluciones reguladoras usadas fueron soluciones de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,025 M preparados según técnica descrita en literatura. La mezcla de las soluciones a estudiar con el buffer se realizó de dos maneras diferentes. En los casos en los que la reacción era lo suficientemente lenta, se llevó a cabo un mezclado manual, en el cual se agregaron 4 ml de

buffer a 1 ml de solución irradiada en el interior de una celda. Este procedimiento se realizó con soluciones reguladoras de distintos valores de pH. En todos los casos se disparó un cronómetro justo en el momento de la mezcla. Luego, se colocó la celda en el espectrofotómetro y se comenzaron a realizar las medidas.

Se realizaron experimentos de control para verificar si el pH de las soluciones se modificaba luego de realizar la mezcla. De esta manera, para diferentes soluciones reguladoras se midió el pH inmediatamente después de realizar la mezcla con la solución fotolizada y luego de finalizar la reacción térmica. En ninguna de las pruebas de control se observaron modificaciones en el pH.

En ciertas condiciones, que se detallarán más adelante, la reacción se vuelve tan rápida que ocurre parcialmente dentro del tiempo de mezclado manual (unos 20 segundos). En estos casos se recurrió a la utilización de un accesorio de flujo detenido (stopped flow) SFA-20 de Hi-Tech, especialmente diseñado para ser usado en los espectrofotómetros Cary, utilizando de ellos su sistema de detección óptica. Este accesorio, reduce el tiempo de mezclado a unos 10 milisegundos.

### **15.1.2. Análisis cinético de los resultados.**

En la figura 15.1.a se muestran las variaciones espectrales observadas luego de alcalinizar una solución fotolizada en las condiciones experimentales detalladas en la sección anterior (pH=10,0). Estos cambios se deben, obviamente, al proceso térmico que se está analizando. En la figura 15.1.b se muestran los espectros DE para distintos tiempos luego de la mezcla con el buffer, los cuales fueron obtenidos restando el primer espectro tomado luego de la alcalinización a los restantes. Pueden apreciarse tres puntos isobéuticos bien definidos que se mantienen en todo el rango de tiempo analizado.

A partir de estos resultados se construyeron gráficas de la absorbancia en función del tiempo. En la figura 15.2 se muestran varias curvas obtenidas en distintas zonas del espectro. Este proceso se ajusta a una cinética de primer orden, es decir que puede representarse con la siguiente ecuación:

$$\ln(\Delta A) = -k' \cdot t + \text{cte con } \Delta A = | A_t - A_\infty |$$

donde,  $A_t$  es la absorbancia al tiempo  $t$ ,  $A_\infty$  es la absorbancia a tiempo infinito;  $k'$  es la constante cinética aparente de primer orden y  $t$  es el tiempo. En la figura 15.3 se muestran

representaciones de  $\ln(\Delta A)$  como una función del tiempo. Se comprobó que las pendientes de estas representaciones no dependen de la longitud de onda de análisis.

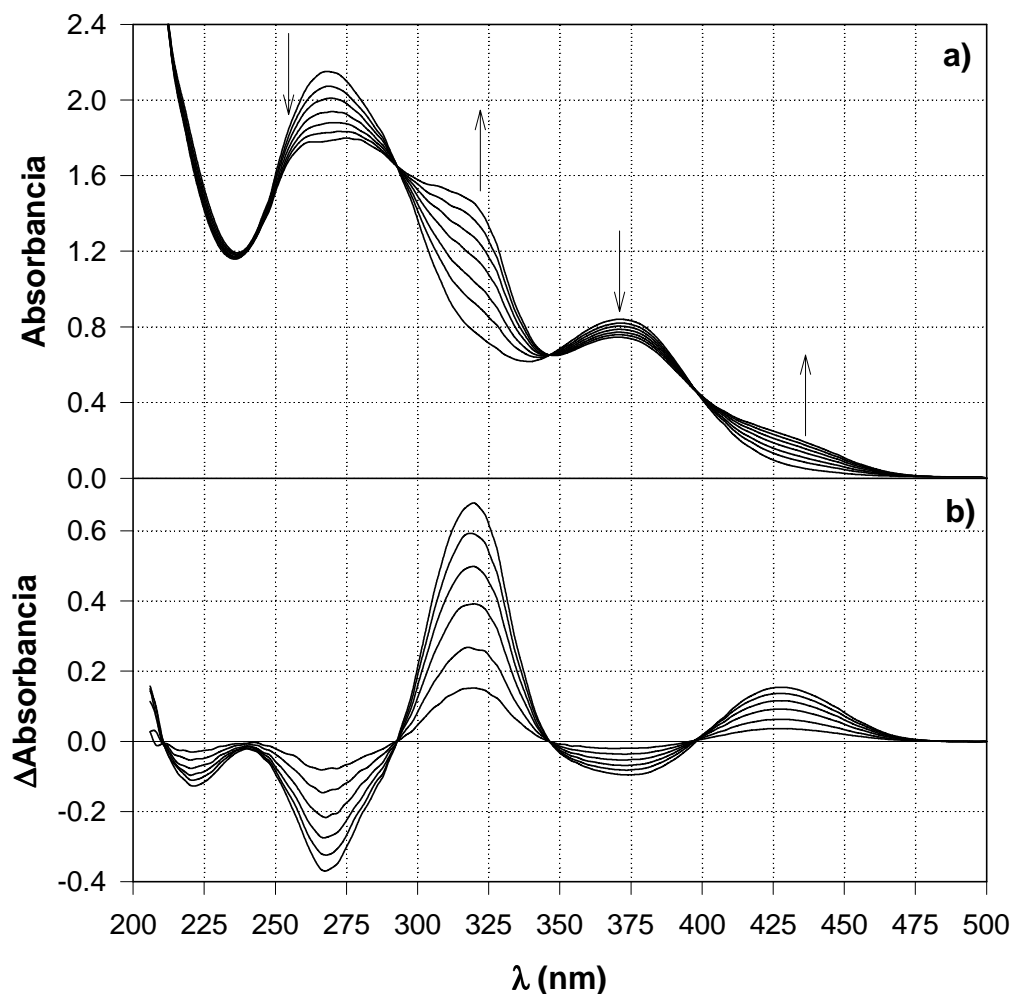
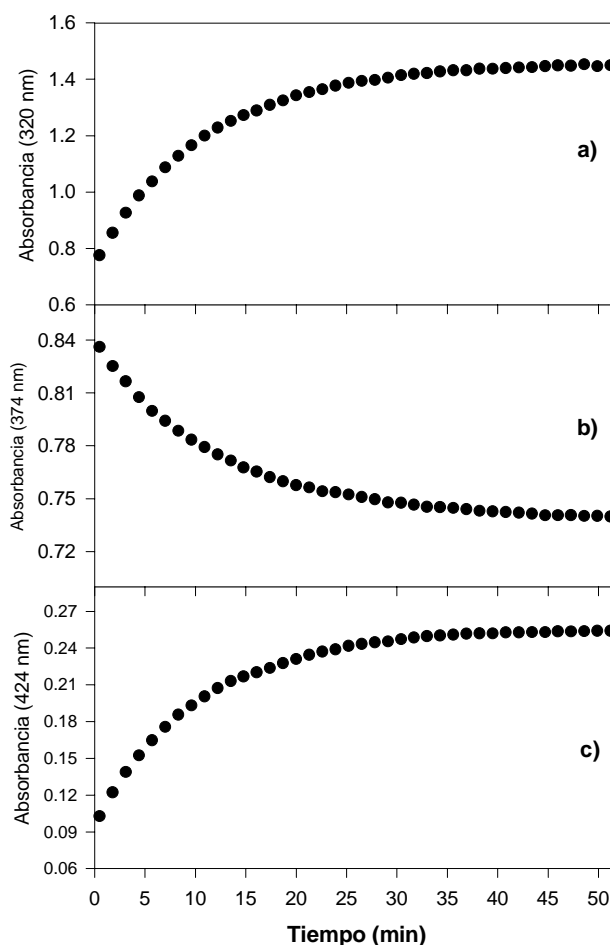


Figura 15.1. a) Evolución del espectro de una solución de ácido fólico fotolizada a pH 10 y luego alcalinizada a pH 10,5 con un buffer de fosfatos. El tiempo 0 corresponde al momento de la alcalinización. Los espectros mostrados corresponden a los siguientes tiempos: 0,5; 3,1; 5,7; 9,6; 14,8; 22,6 y 48,6 min. Las flechas indican el sentido del cambio. b) Espectros DE correspondientes.

Este comportamiento muestra que la reacción estudiada es de primer orden respecto a la sustancia A. Puede por lo tanto proponerse la siguiente ecuación:

$$-d[A]/dt=k'.[A] \quad (1)$$

donde [A] representa la concentración de la sustancia A.



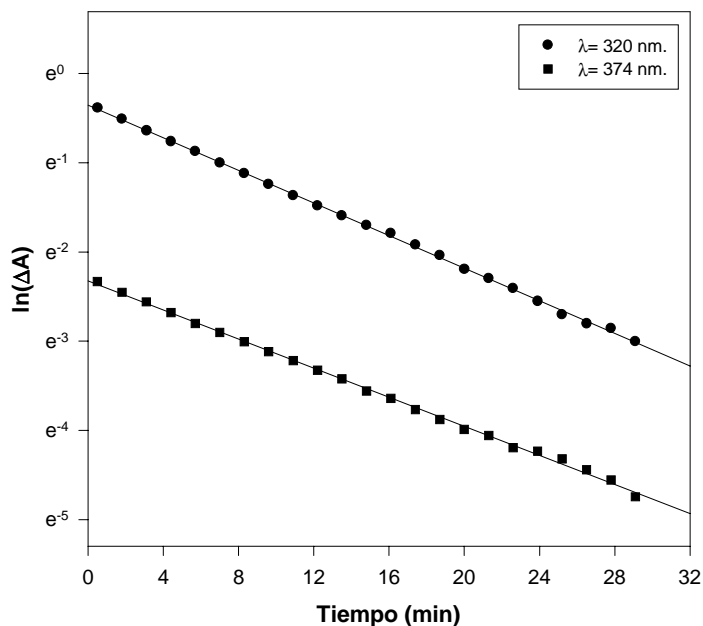
**Figura 15.2.** Evolución de la absorbancia en función del tiempo para distintas  $\lambda$ . Estos datos corresponden al experimento mostrado en la figura 15.1. a) 320 nm. b) 374 nm. c) 424 nm.

Se realizó una serie de experimentos similares al descrito empleando soluciones reguladoras de distinto pH. Para cada experimento se obtuvo la constante aparente  $k'$ . En todos los casos se observó un comportamiento cinético de primer orden y en ninguno se observó dependencia de dicha constante con la longitud de onda.

En la tabla 15.1 se muestran los promedios para cada uno de estos experimentos. Se observa una fuerte dependencia de  $k'$  con el pH. Si se grafican los valores de esta constante en función de la concentración de iones hidroxilo puede apreciarse una dependencia lineal. Este comportamiento se muestra en la figura 15.4.

Como puede observarse en la tabla 15.1 y en la figura 15.4, la reacción se acelera sensiblemente al aumentar el pH. En las últimas tres series de experimentos (pH=11,94; 12,10 y 12,75) la reacción se vuelve tan rápida que una porción importante de la misma transcurre

en el tiempo de mezcla. Para estos experimentos se recurrió al empleo de la técnica de flujo detenido.



**Figura 15.3.** Comportamiento de primer orden para de las cinéticas representadas en la figura 15.2. Las rectas corresponden a las regresiones lineales calculadas.

pH	[OH <sup>-</sup> ] (M)	k' (min <sup>-1</sup> )
10,60	3,981x10 <sup>-4</sup>	0,0253
10,90	7,943x10 <sup>-4</sup>	0,0531
11,25	1,778x10 <sup>-3</sup>	0,0993
11,60	3,981x10 <sup>-3</sup>	0,275
11,80	6,310x10 <sup>-3</sup>	0,406
11,94	8,710x10 <sup>-3</sup>	0,582
12,10	1,26x10 <sup>-2</sup>	0,776
12,75	5,62x10 <sup>-2</sup>	2,819

**Tabla 15.1.** Constantes cinéticas obtenidas en experimentos realizados a distintos pH. Cada valor es el resultado de promediar, al menos, 10 constantes correspondientes a distintas  $\lambda$ .

De acuerdo a estos resultados puede observarse que el valor de la constante cinética aparente ( $k'$ ) aumenta linealmente al aumentar la  $[\text{OH}^-]$ . Puede escribirse la siguiente expresión para  $k'$ :

$$k' = k \cdot [\text{OH}^-] + k''_o$$

con  $k = 63,0 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  y  $[\text{OH}^-]$  expresada en M. La ordenada al origen ( $k''_o$ ), dentro del error experimental es 0. La ecuación (1) puede, entonces, escribirse

$$-d[\text{A}]/dt = k \cdot [\text{OH}^-] \cdot [\text{A}]$$

De acuerdo a esta ley de velocidad la reacción de transformación de la sustancia **A** a la **B** es de primer orden para  $[\text{OH}^-]$ .

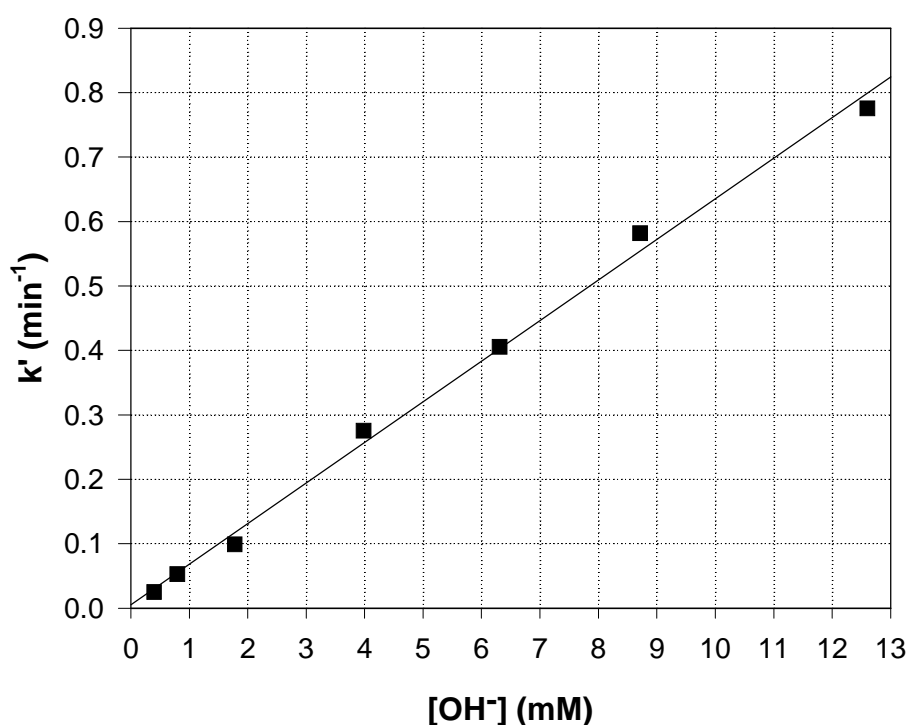


Figura 15.4. Dependencia lineal de la constante  $k'$  con la concentración de hidroxilos.

## 15.2. Experimentos realizados con soluciones de sustancia A preparadas por TLC preparativa.

### 15.2.1. Metodología.

En otro grupo de experimentos, se utilizaron soluciones de la sustancia **A** extraída de corridas de TLC preparativa. Este procedimiento fue explicado en la sección 7.4.2. Para

obtener estas soluciones se sembraron en banda soluciones de ácido fólico de pH=10, irradiadas en tubo de ensayo (15 a 20 ml) durante 60 minutos y luego concentradas a presión reducida. Se usaron placas de DEAE-celulosa (250 $\mu$ m) (Baker) y celulosa con indicador fluorescente (250  $\mu$ m) (Sigma). Solución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl 3%(p/v) fue empleada como fase móvil y como solvente de extracción. Mediante esta técnica se obtienen soluciones de la sustancia **A** de concentración suficientemente alta como para poder registrar espectros de absorción adecuados para realizar el estudio cinético.

Al igual que en el grupo de experimentos de la sección anterior, para iniciar la reacción térmica se mezclaron alícuotas de estas soluciones con soluciones de buffer fosfatos de pH conocido. En este caso, debido a la alta concentración de iones amonio de las soluciones de la sustancia **A**, se trabajó con soluciones reguladoras más concentradas (0,1 M). Aún así, el pH de la mezcla fue en todos los casos significativamente menor al pH original de las soluciones reguladoras.

Debido a esto, el pH se midió inmediatamente después de la mezcla. Además, una vez completada la reacción, se volvió a controlar el pH. En ningún caso hubo diferencia entre ambos valores de pH. En los experimentos realizados empleando la técnica de flujo detenido, el pH inmediatamente después de la mezcla no puede ser medido. Por lo tanto, en estos casos se tomó el pH sobre las soluciones recogidas luego de los disparos (mezclas), es decir, después de finalizar el experimento.

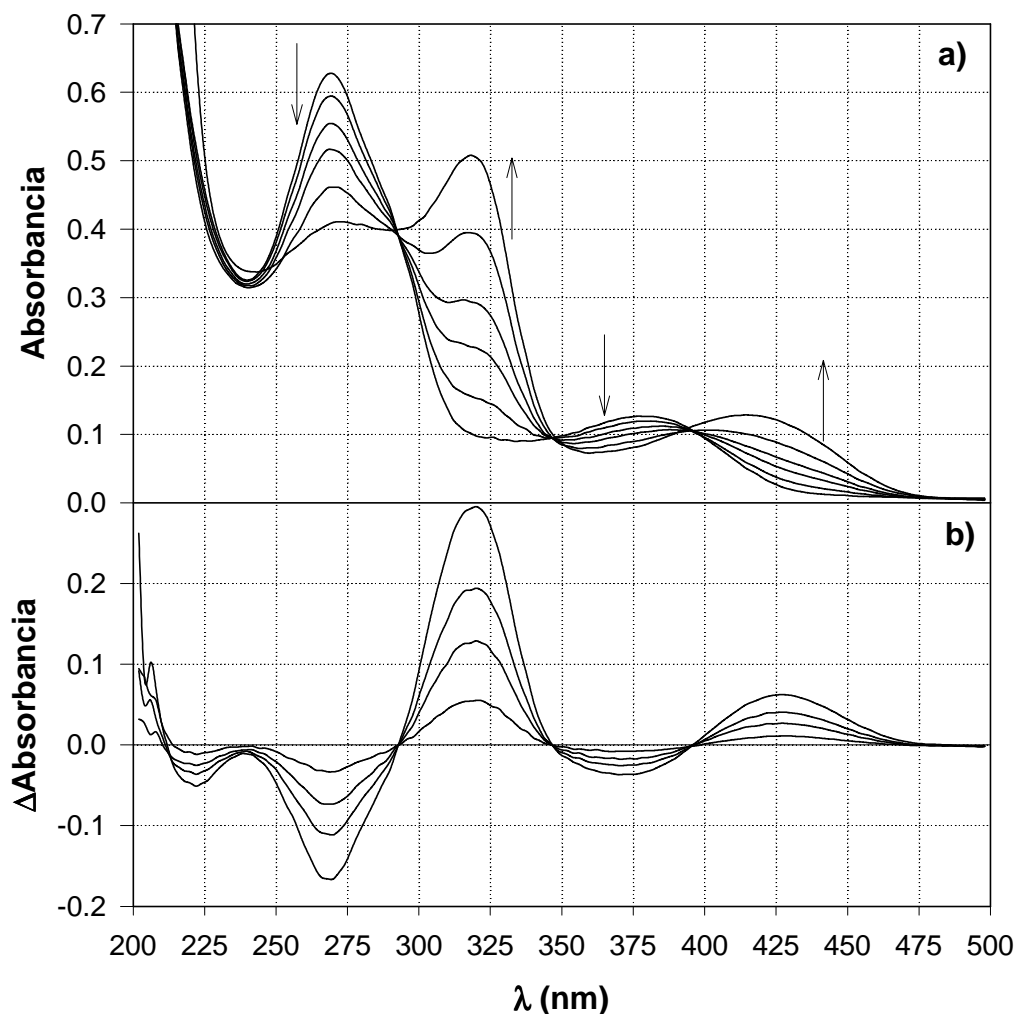
### **15.2.2. Análisis cinético de los resultados.**

En la figura 15.5 se muestra la evolución del espectro de una solución de la sustancia **A**, extraída como se explicó en la sección anterior, luego de ser mezclada con una solución reguladora. Estos cambios espectrales se deben, a la reacción térmica de conversión de la sustancia **A** en la sustancia **B**. En la figura 15.5.b se muestran los espectros DE para distintos tiempos luego de la alcalinización.

Una observación importante que puede hacerse es que, si bien los espectros registrados en la figura 15.5 son muy distintos a los mostrados en la figura 15.1, los espectros DE son similares, lo cual es una evidencia más que corrobora que la reacción térmica es la conversión de la sustancia **A** en la sustancia **B**. Las diferencias de los espectros de absorción se deben, obviamente, a que en la solución del experimento de la figura 15.1 están presentes, además de estas dos sustancias, restos de ácido fólico y los otros productos que se generan en la fotólisis

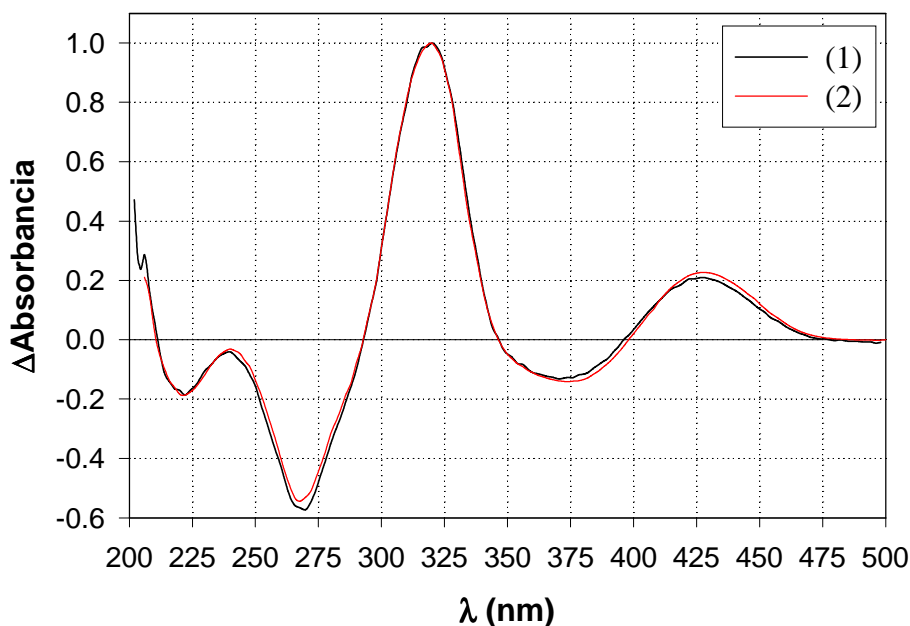


directa (6-formilpterina, 6-carboxipterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico). En la figura 15.6 se muestran espectros DEN de ambos tipos de experimentos y puede apreciarse que, dentro del error experimental, son iguales.



**Figura 15.5.** a) Evolución del espectro de una solución de sustancia A alcalinizada a pH 9,45 con un buffer de fosfatos. El tiempo 0 corresponde al momento de la alcalinización. Los espectros mostrados corresponden a los siguientes tiempos: 0; 20; 59; 104; 215 min y 48 horas. Las flechas indican el sentido del cambio. b) Espectros DE correspondientes.

Se procedió de la misma manera como se hizo con el otro grupo de experimentos; es decir, para distintas condiciones de pH, se tomaron espectros a distintos tiempos a partir del momento de la mezcla de la solución de sustancia A con la solución reguladora. Posteriormente se realizaron gráficas de la absorbancia como una función del tiempo para distintas longitudes de onda y se llevó a cabo el análisis cinético de las mismas.



**Figura 15.6.** Comparación de espectros DEN obtenidos con los dos tipos de experimentos detallados en el texto. (1) espectro obtenido del experimento mostrado en la figura 15.5 ( $t=104$  min.) (realizado con solución de la sustancia A obtenida por separación en TLC). (2) espectro obtenido del experimento mostrado en la figura 15.1 ( $t=48,6$  min.) (experimento realizado con solución fotolizada de ácido fólico).

Como era de esperar, se encontró que el proceso se ajustaba a una cinética de primer orden y que las constantes cinéticas aparentes ( $k'$ ) eran independientes de la longitud de onda. En la figura 15.7 se muestra, a modo de ejemplo, una de las gráficas analizadas. Se llevaron a cabo cuatro experimentos cada uno de los cuales se realizó a un determinado pH. En la tabla 15.2 se listan los promedios de  $k'$  obtenidos.

En la figura 15.8 se muestra una gráfica en la cual fueron incluidos los valores de  $k'$  obtenidos en ambos grupos de experimentos. Puede apreciarse que la correlación entre ambos es muy buena. Asimismo, el valor de  $k$ , obtenido de esta gráfica ( $62,8 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) es prácticamente igual al obtenido analizando únicamente los datos del primer grupo de experimentos ( $63,0 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ ). Estos resultados muestran, por otra parte, que las demás sustancias presentes en las soluciones de ácido fólico irradiadas no afectan la velocidad de la reacción estudiada.

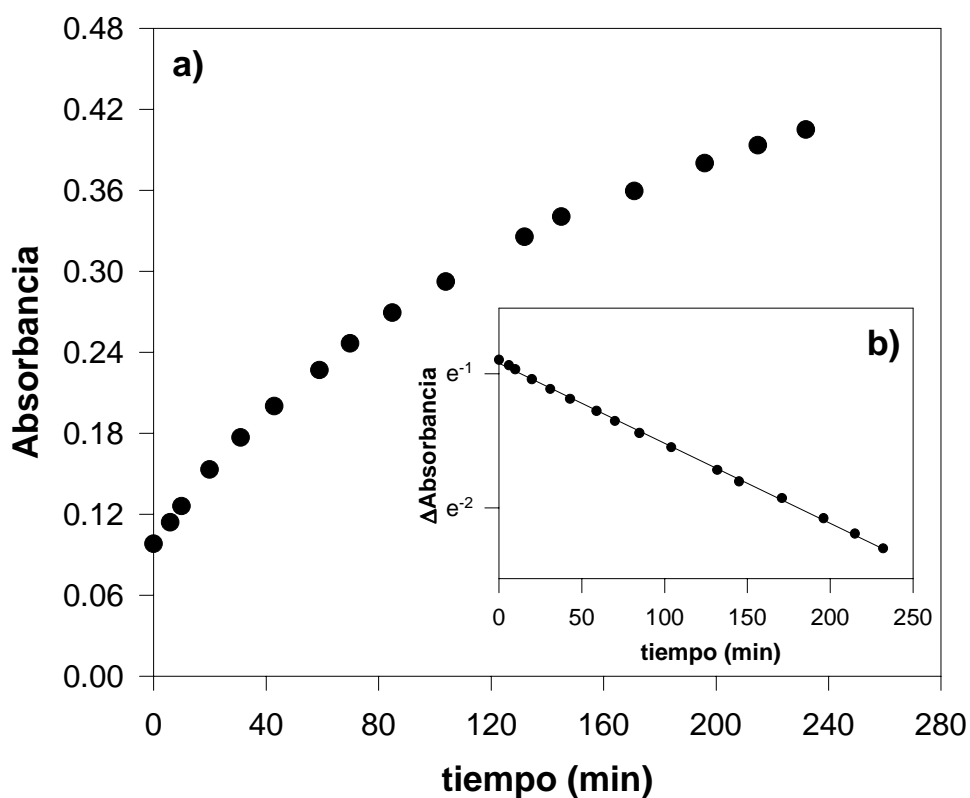
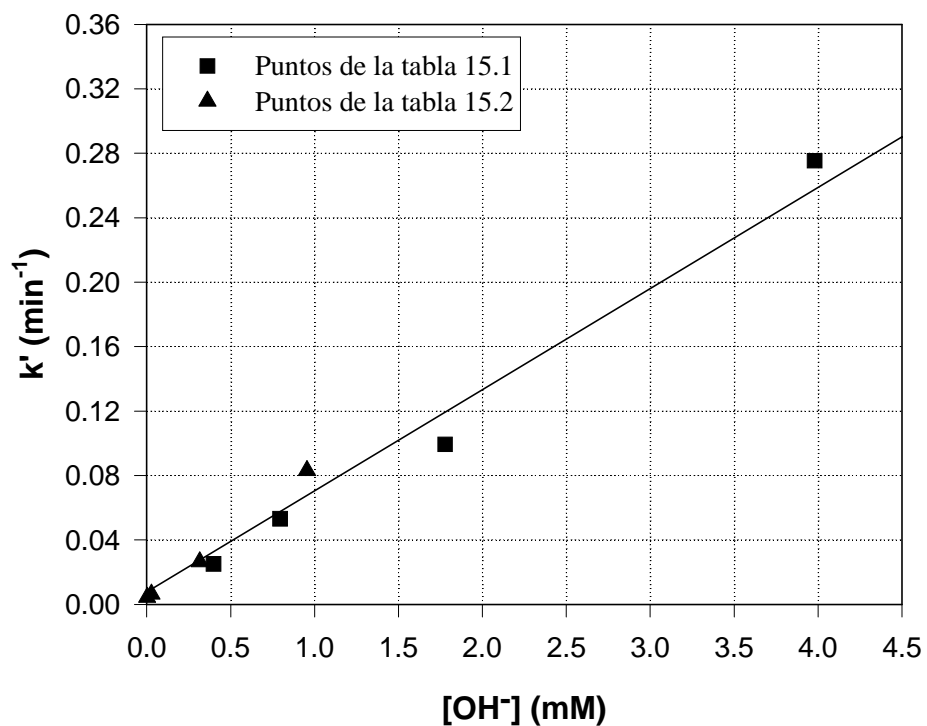


Figura 15.7. Análisis cinético del experimento mostrado en la figura 15.5. a) Absorbancia vs. tiempo a 320 nm. b) Se muestra el comportamiento cinético de primer orden.

pH	[OH <sup>-</sup> ] (M)	k' (min <sup>-1</sup> )
8,48	3,02x10 <sup>-6</sup>	4,47x10 <sup>-3</sup>
9,45	2,82x10 <sup>-5</sup>	6,51x10 <sup>-3</sup>
10,50	3,16x10 <sup>-4</sup>	2,65x10 <sup>-2</sup>
10,98	9,55x10 <sup>-4</sup>	8,32x10 <sup>-2</sup>

Tabla 15.2. Constantes cinéticas obtenidas en experimentos realizados a distinto pH, con solución de la sustancia A obtenida mediante TLC. Cada valor es el resultado de promediar, al menos, diez constantes correspondientes a distintas λ.



**Figura 15.8.** Dependencia lineal de la constante  $k'$  con la concentración de hidroxilos. La regresión lineal fue realizada con todos los puntos utilizados en la regresión de la figura 15.4 (incluso los que no aparecen en esta gráfica), más los datos de la tabla 15.2.