

Capítulo 6.

Fotólisis estacionaria.

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

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

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

6.1. Esquema general de la metodología.

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

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

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

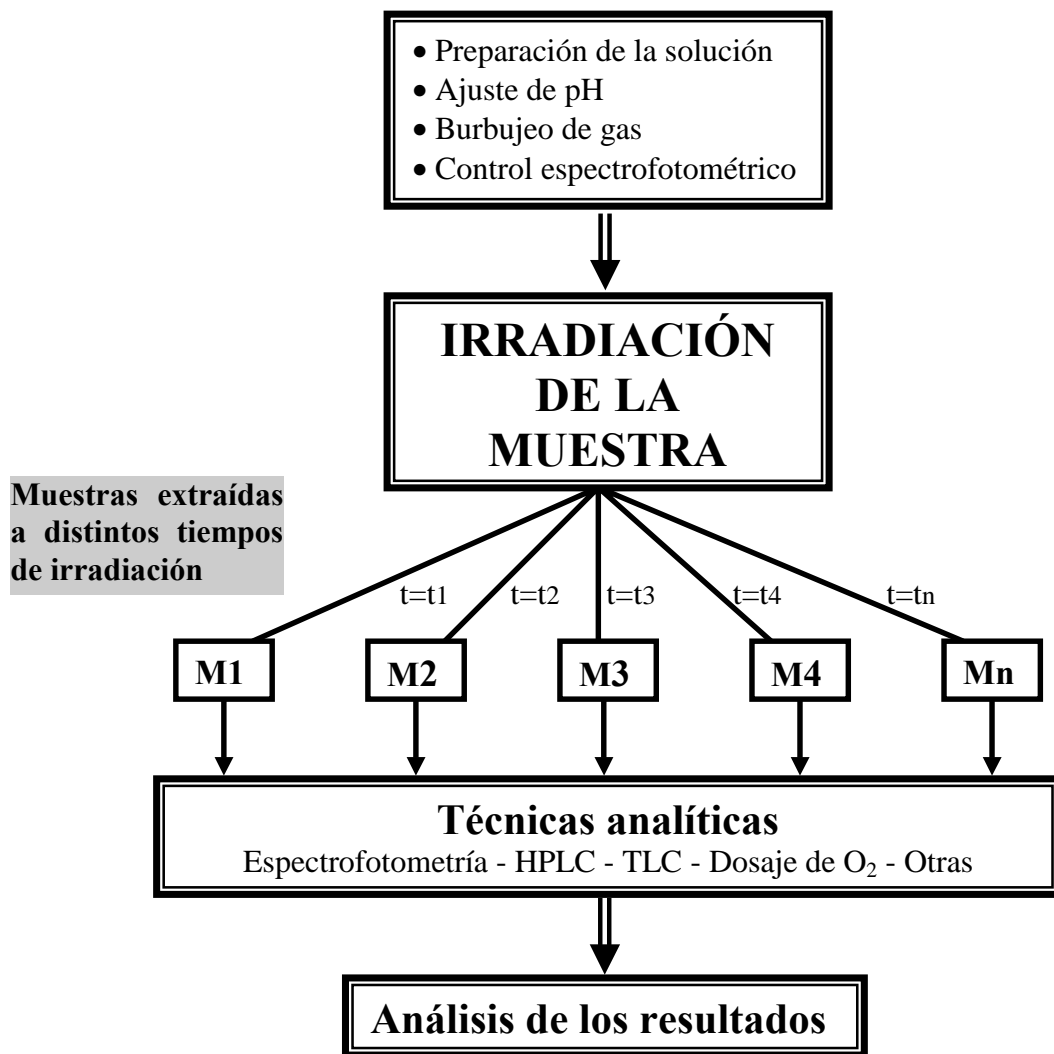


Figura 6.1. Esquema general de la metodología empleada en las fotólisis continuas.

6.2. Preparación de las soluciones a irradiar.

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

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

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

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

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

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

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

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

6.3. Condiciones de irradiación.

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

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

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

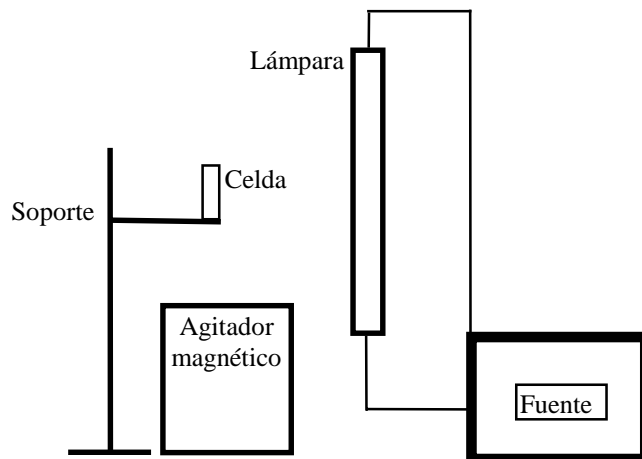


Figura 6.2. Esquema del dispositivo empleado para realizar las fotólisis continuas.

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

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

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

6.4. Determinación del rendimiento cuántico de una reacción.

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

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

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

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

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

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

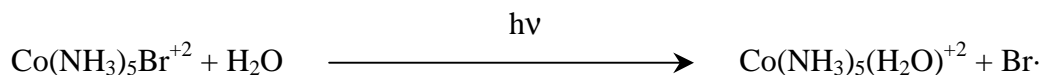
Si se mide la velocidad de desaparición de un reactivo o la velocidad de aparición de un producto puede calcularse el rendimiento cuántico de una reacción mediante las siguientes ecuaciones.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

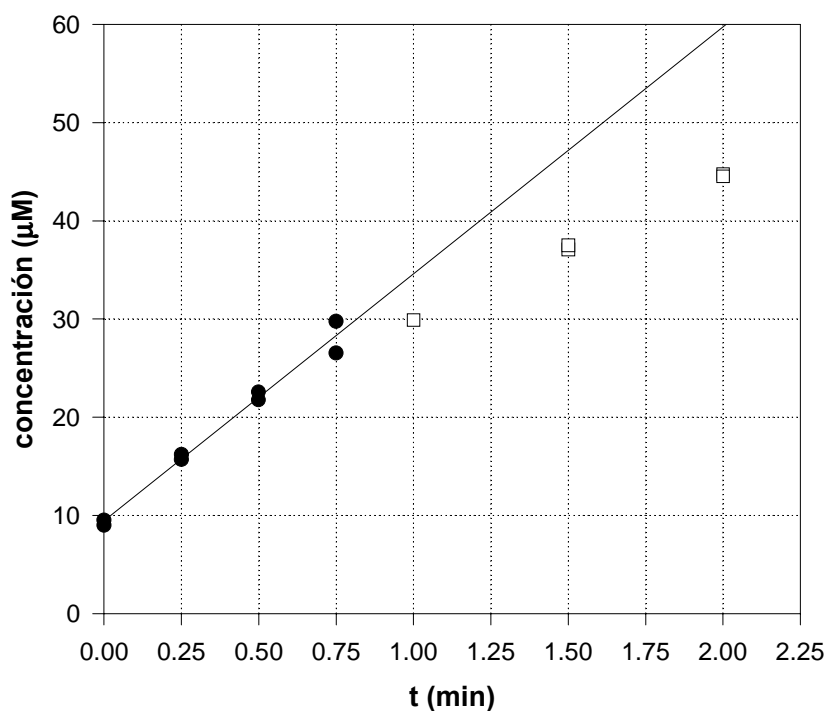


Figura 6.3. Evolución de la concentración de producto (6-carboxipterina) durante la fotólisis de 6-formilpterina. Se puede distinguir un primer período (●) en el cual se observa una cinética de orden 0 y, posteriormente, una disminución de la pendiente (□). La línea representa la regresión lineal realizada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