

## Capítulo 7.

# Análisis de las soluciones irradiadas

---

---

Como se adelantó en el capítulo anterior, en éste se describirán las técnicas utilizadas para analizar las soluciones irradiadas. Entre ellas por la utilidad y calidad de la información obtenida se destacan cuatro: espectrofotometría, cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y medida electroquímica del O<sub>2</sub> disuelto. La forma específica en que fue aplicada cada una de estas técnicas se explica en cuatro secciones separadas. Al final del capítulo se mencionan otras técnicas empleadas de importancia menor.

### 7.1 Consideraciones generales.

Básicamente la metodología que se expondrá en este capítulo persiguió tres objetivos principales, los cuales se analizan a continuación por separado.

- *Identificación de productos de reacción:* Los patrones comerciales de las sustancias cuya fotólisis fue estudiada, así como muchos de los potenciales productos de reacción son accesibles comercialmente. El ácido fólico fue provisto por Merck, pterina, ácido *p*-aminobenzoico y 6-carboxipterina por Sigma-Aldrich. Schircks Laboratories es una empresa Suiza dedicada especialmente a la síntesis de pterinas y sustancias relacionadas. De este laboratorio fueron obtenidos patrones de pterina, 6-formilpterina, 6-carboxipterina, 6-metilpterina, 6-hidroximetilpterina, biopterina, leucopterina, xantopterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Todos estos reactivos presentan una pureza de más del 98% y fueron utilizados sin ulteriores tratamientos de purificación.

Las soluciones preparadas con los distintos patrones, las cuales serán llamadas

soluciones patrón, fueron analizadas con las técnicas disponibles. La comparación de estos resultados con los obtenidos sobre las soluciones irradiadas permitió, en muchos casos, la identificación de fotoproductos.

- *Caracterización de productos de reacción.* Se encontró, en ciertos experimentos, que los resultados de los análisis realizados sobre las soluciones irradiadas no podían adjudicarse a ninguno de los patrones disponibles. Esto permitió descartar ciertas vías de descomposición. Asimismo estos resultados fueron usados para caracterizar fotoproductos que no pudieron ser identificados. De esta manera, se pudo especular sobre ciertas características químicas de los mismos.
- *Cuantificación de productos de reacción.* Se determinó la concentración de las distintas sustancias involucradas en las reacciones estudiadas empleando, fundamentalmente, medidas realizadas por HPLC. Se prepararon soluciones patrón de concentración conocida a partir de las cuales se realizaron las correspondientes curvas de calibración. En algunos casos especiales se logró medir la concentración mediante técnicas espectrofotométricas. La concentración de O<sub>2</sub> fue determinada empleando un electrodo sensible al mismo.

A partir de todas estas determinaciones se obtuvo, para las fotólisis estudiadas, la evolución de la concentración de diversas sustancias involucradas en las mismas. El análisis de estos perfiles de concentración permitió el cálculo de los rendimientos cuánticos, a la vez que, en algunos casos, permitió realizar consideraciones cinéticas y dilucidar aspectos de los mecanismos de reacción.

## **7.2. Espectrofotometría.**

### **7.2.1. Introducción.**

Los espectros de absorción fueron tomados con el equipo y técnica descritos en la sección 5.2. La metodología básica que se aplicó empleando esta técnica consiste en tomar a distintos tiempos de la fotólisis espectros de absorción de la solución irradiada.

El análisis directo de estos datos permite decidir, en primer lugar, si existen cambios espectrales o no. En caso afirmativo, esto implica que hay cambio químico en la solución y, por ende, se ha producido una reacción fotoquímica. En caso negativo, es muy probable que el o los solutos presentes en la solución de partida sean fotoestables. Esto es así porque las

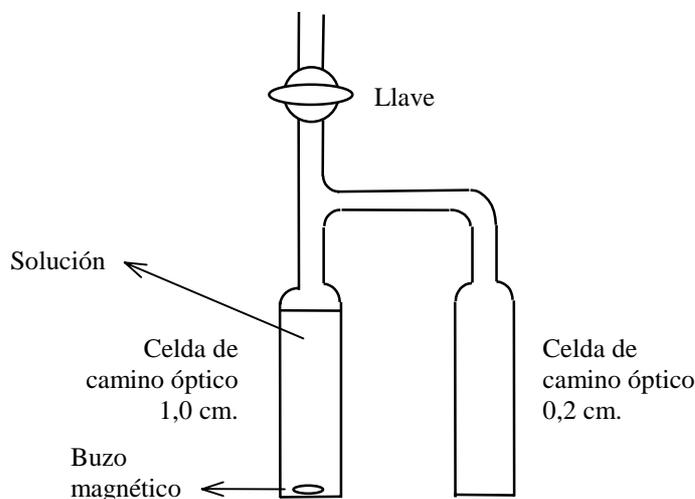
pterinas poseen espectros muy sensibles a los cambios químicos en sus moléculas. Por ejemplo, en los estudios realizados con las soluciones de los patrones comerciales no se han detectado dos derivados pterínicos que posean espectros indistinguibles. Tampoco se encontró ningún caso en el cual durante la fotólisis no se detectaron cambios espectrales y luego se hayan detectado cambios químicos a través del análisis por otras técnicas.

Como se mencionó en la sección 6.2 muchos experimentos se realizaron en condiciones tales que, durante una primera etapa de la fotólisis, el reactivo absorbía casi toda la luz incidente. Es decir, que la absorbancia de la solución en ciertas zonas del espectro fue muy elevada. Esto implica que, en tales condiciones experimentales, no se puede tomar un espectros de absorción directamente de la celda irradiada. En efecto, las medidas de absorbancias mayores que 2,5, realizadas con el espectrofotómetro empleado, contienen cierto error producto de desviaciones a la ley de Lambert-Beer. Por encima de 3, las medidas son inaceptables.

Para solucionar este problema se recurrió a una celda doble, compuesta por dos celdas simples de cuarzo de distinto camino óptico. Un esquema de este dispositivo óptico puede apreciarse en la figura 7.1. El mismo consta de una celda de 1 cm de espesor donde se coloca la solución mientras es irradiada y, otra, de 0,2 cm de espesor a la cual se trasvasa parte de la solución para poder obtener los espectros, luego de lo cual se pasa la solución nuevamente a la celda de mayor camino óptico para ser irradiada nuevamente. En el texto y, en particular en las leyendas de las figuras que muestren resultados de experimentos realizados empleando este dispositivo óptico, se distinguirá entre camino óptico de irradiación y camino óptico de observación. Esta celda doble contiene, además, una llave que permite evitar el intercambio gaseoso durante la fotólisis.

Con estos datos se realizaron gráficas de absorbancia versus tiempo para distintas longitudes de onda. El análisis de estas gráficas permite evaluar algunos aspectos cinéticos del proceso estudiado. Por ejemplo, observar si existe una primera etapa en la cual la velocidad de la reacción es constante, detectar en qué momento se producen cambios en las pendientes, comparar si el comportamiento cinético es similar a distintas longitudes de onda de observación, etc. Estos análisis fueron realizados para todas las reacciones estudiadas. A modo de ejemplo, obsérvese la figura 7.2 donde se representa, a distintas longitudes de onda, los cambios registrados como una función del tiempo en un experimento particular cuyas condiciones se indican al pie de esa figura. No obstante, estas representaciones gráficas no

serán incluidas en la discusión de cada fotólisis, a menos que se considere estrictamente, necesario para no extender demasiado dichas secciones.



**Figura 7.1.** Celda empleada para observar la evolución de los espectros durante las fotólisis continuas.

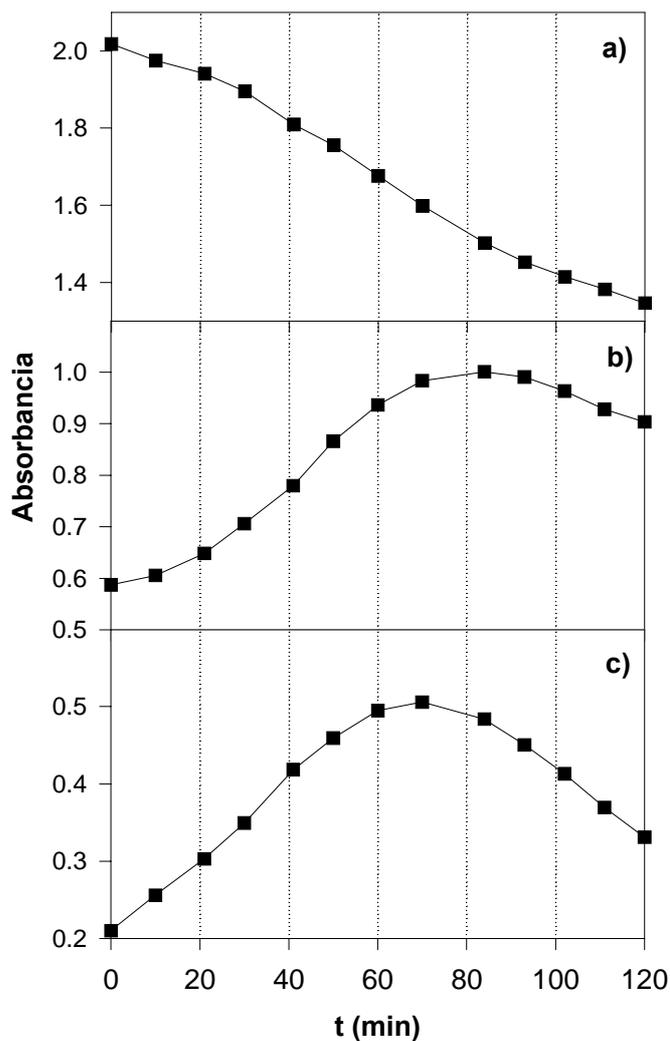
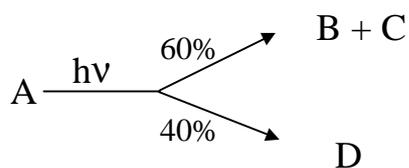
Por otro lado, con los espectros de absorción tomados a distintos tiempos de fotólisis se obtuvieron los espectros diferencia experimentales (que serán llamados espectros DE o, simplemente, EDE). Se procedió de la siguiente manera: a cada espectro absoluto obtenido durante una fotólisis ( $E(t=t_n)$ ) se le resta el espectro absoluto obtenido antes de irradiar ( $E(t=0)$ ). Por ejemplo:

$$EDE(t=t_1) = E(t=t_1) - E(t=0)$$

Cabe aclarar que esta operación, realizada con espectros, implica restar para cada longitud de onda la absorbancia de  $E(t=0)$  a la absorbancia de  $E(t=t_1)$ . En definitiva, para cada fotólisis se obtiene una serie de espectros diferencia, un espectro por cada tiempo distinto de 0 en el que fue analizada la solución ( $EDE(t=t_n)$ , con  $n= 1,2,3,\dots$ ).

Los espectros absolutos y los espectros DE obtenidos en una determinada fotólisis se graficaron y analizaron. Fundamentalmente en este análisis se tuvo en cuenta la presencia y constancia en el tiempo de puntos isobésticos. Está claro que, mientras ocurra un único proceso, se mantendrán constantes los puntos isobésticos. “Único proceso” no implica, en este caso, una reacción que ocurra en una sola etapa, ni siquiera una única reacción. Por el contrario, implica la generación de productos en proporciones constantes. Por ejemplo,

supongamos que un determinado reactivo se descompone fotoquímicamente por dos vías de la siguiente manera:

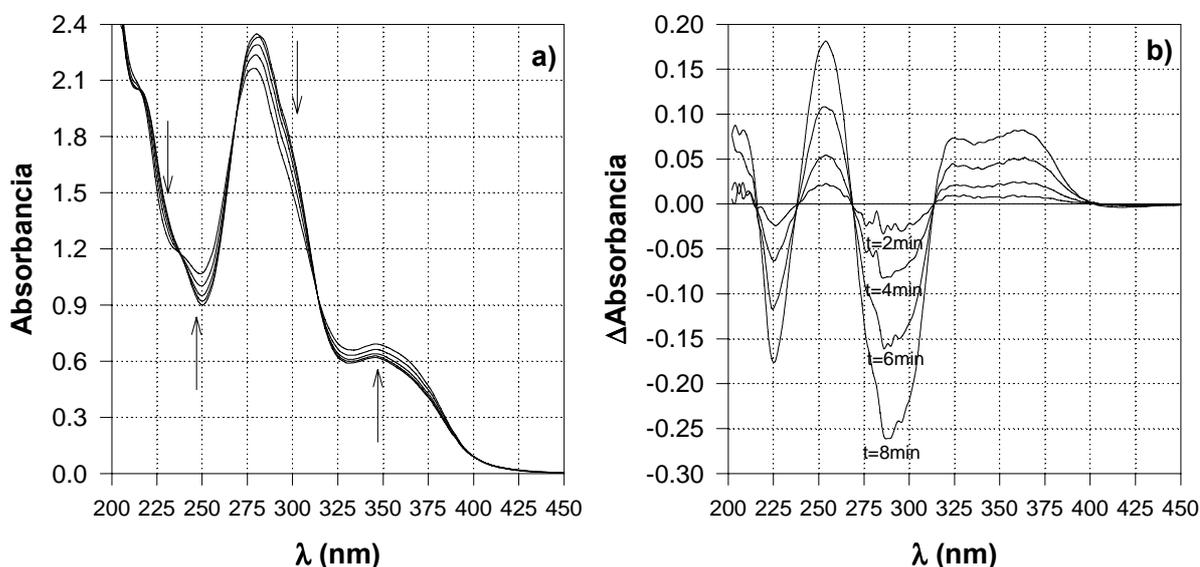


**Figura 7.2.** Fotólisis de una solución de ácido fólico (450  $\mu\text{M}$ ,  $\text{pH}=11$ ). Absorbancia en función del tiempo de irradiación. Camino óptico 2 mm. a) 295 nm. b) 325 nm. c) 400 nm.

Mientras se mantenga este esquema de reacción se considera que existe un único proceso (fotólisis primaria). Es decir, mientras sólo existan estas dos reacciones de descomposición fotoquímica, cada una con una estequiometría fija, mientras la proporción de reactivo descompuesto a través de cada vía se mantenga constante. Por otra parte, esta

definición no podrá aplicarse si aparecen otras vías de descomposición del reactivo (por ejemplo, por reacción con alguno de los productos) o si aparecen reacciones fotoquímicas secundarias (fotólisis secundaria) en las cuales se degraden los productos. Esta definición de “único proceso”, si bien arbitraria, resulta útil y será empleada con este sentido en el resto del trabajo de tesis.

En las figuras 7.3 y 7.4 se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en una fotólisis del ácido fólico en medio ácido. En la figura 7.3.a se observan los espectros de absorción absolutos tomados cada 2 minutos durante los primeros 8 minutos. Puede observarse, aunque con cierta dificultad, que existen puntos isobésticos que se mantienen aproximadamente sin variaciones durante este período. En la figura 7.3.b, donde se muestran los correspondientes espectros DE, la constancia de los puntos isobésticos se aprecia mejor. En definitiva, en este ejemplo se observa un único proceso fotoquímico hasta los 8 minutos. En la figura 7.4 puede observarse que luego de este primer período los puntos isobésticos comienzan a cambiar de posición a medida que avanza la fotólisis; además, también cambia la posición de los máximos y mínimos de los espectros DE. Esto indica la aparición de otros procesos.

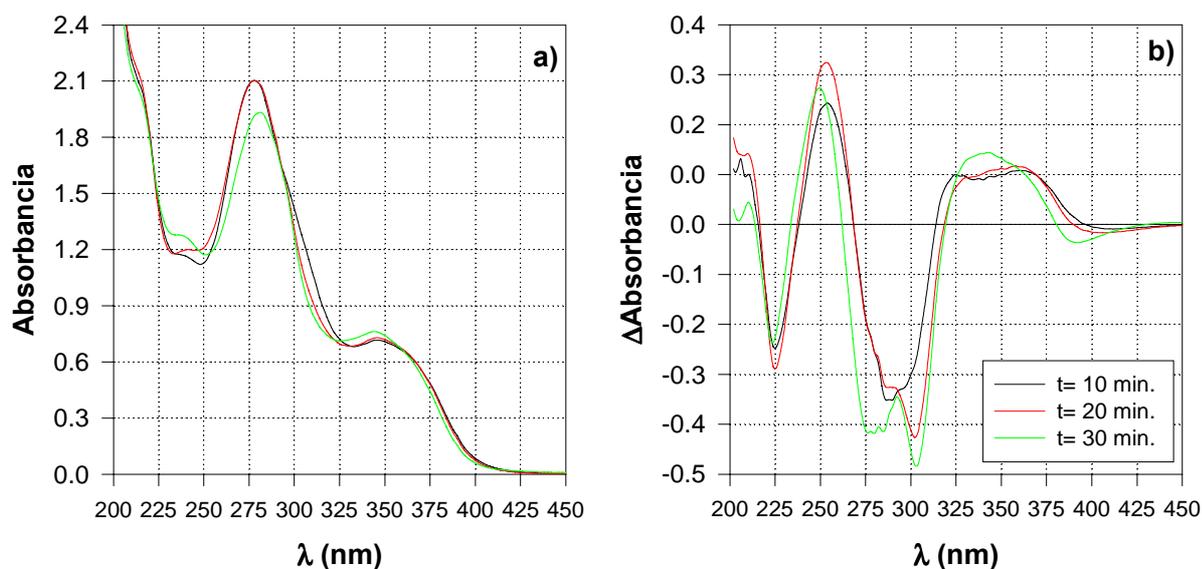


**Figura 7.3. Resultados de una fotólisis realizada sobre una solución de ácido fólico (450  $\mu$ M, pH=6). a) Espectros de absorción tomados cada 2 min, camino óptico 0,2 cm. Las flechas indican el sentido del cambio. b) Espectros DE obtenidos a los mismos tiempos de irradiación.**

Este tipo de análisis es muy útil para evaluar, por ejemplo, en qué momento se

vuelven importantes las reacciones de fotólisis secundaria. De esta manera, se puede poner límite al tiempo de irradiación dentro del cual se harán otros tipos de análisis espectrofotométricos o se aplicarán otras técnicas en los cuales se desea aislar el primer proceso fotoquímico. Más aún, los experimentos cromatográficos, tanto de TLC como de HPLC fueron diagramados teniendo en cuenta, entre otros aspectos, los resultados de estos análisis previos.

Normalizando los espectros DE a distintos tiempos se obtuvieron los correspondientes espectros diferencia experimental es normalizados (espectros DEN o, simplemente EDEN). Cabe recordar que normalizar un espectro significa dividir la absorbancia a cada longitud de onda por un número elegido arbitrariamente de acuerdo a la conveniencia de cada caso. En este trabajo, los espectros ED fueron normalizados dividiendo por la absorbancia de uno de sus máximos o mínimos de absorbancia.



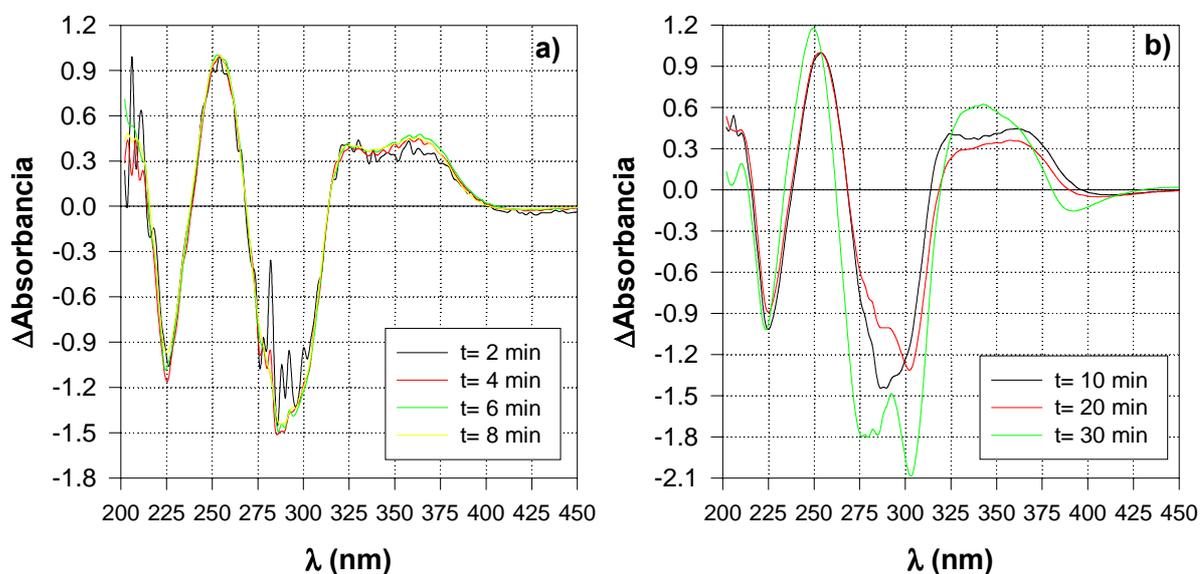
**Figura 7.4. Resultados obtenidos en el mismo experimento de la figura 7.3, pero a tiempos de irradiación mayores. a) Espectros de absorción. b) Espectros DE correspondientes.**

Si en un período de tiempo, durante una fotólisis, se tiene un único proceso, dentro del error experimental, los espectros DEN a distintos tiempos serán iguales. Por el contrario, serán diferentes si existe más de un proceso. Este es un criterio adicional que se aplicó también para determinar durante cuánto tiempo, dentro de un experimento, podía considerarse la existencia de un único proceso fotoquímico (fotólisis primaria).

A modo de ejemplo, en la figura 7.5 se muestran los espectros DEN correspondientes

a los espectros DE graficados en las figuras 7.3.b y 7.4.b. En la figura 7.5.a se observa que, como era de esperar, los espectros DEN dentro de los primeros 8 minutos son similares entre sí. No obstante, cuando los cambios espectrales son pequeños, la propagación de errores puede afectar los espectros DE y, consecuentemente, los espectros DEN. Esto es particularmente significativo en los primeros estadios de la fotólisis. De esta manera, puede observarse en la figura 7.5.a que uno de estos espectros, el correspondiente a 2 minutos, presenta diferencias considerables con respecto a los demás.

En la figura 7.5.b pueden observarse los espectros DEN correspondiente a tiempos mayores de irradiación. Se aprecia que, a medida que avanza la fotólisis, las diferencias en estos espectros se hace mayor indicando la presencia de otras reacciones que se suman al proceso fotoquímico primario.



**Figura 7.5.** a) Espectros DEN obtenidos a partir de los espectros DE de la figura 7.3.b. b) Espectros DEN obtenidos a partir de los espectros DE de la figura 7.4.b.

### 7.2.2. Identificación de productos.

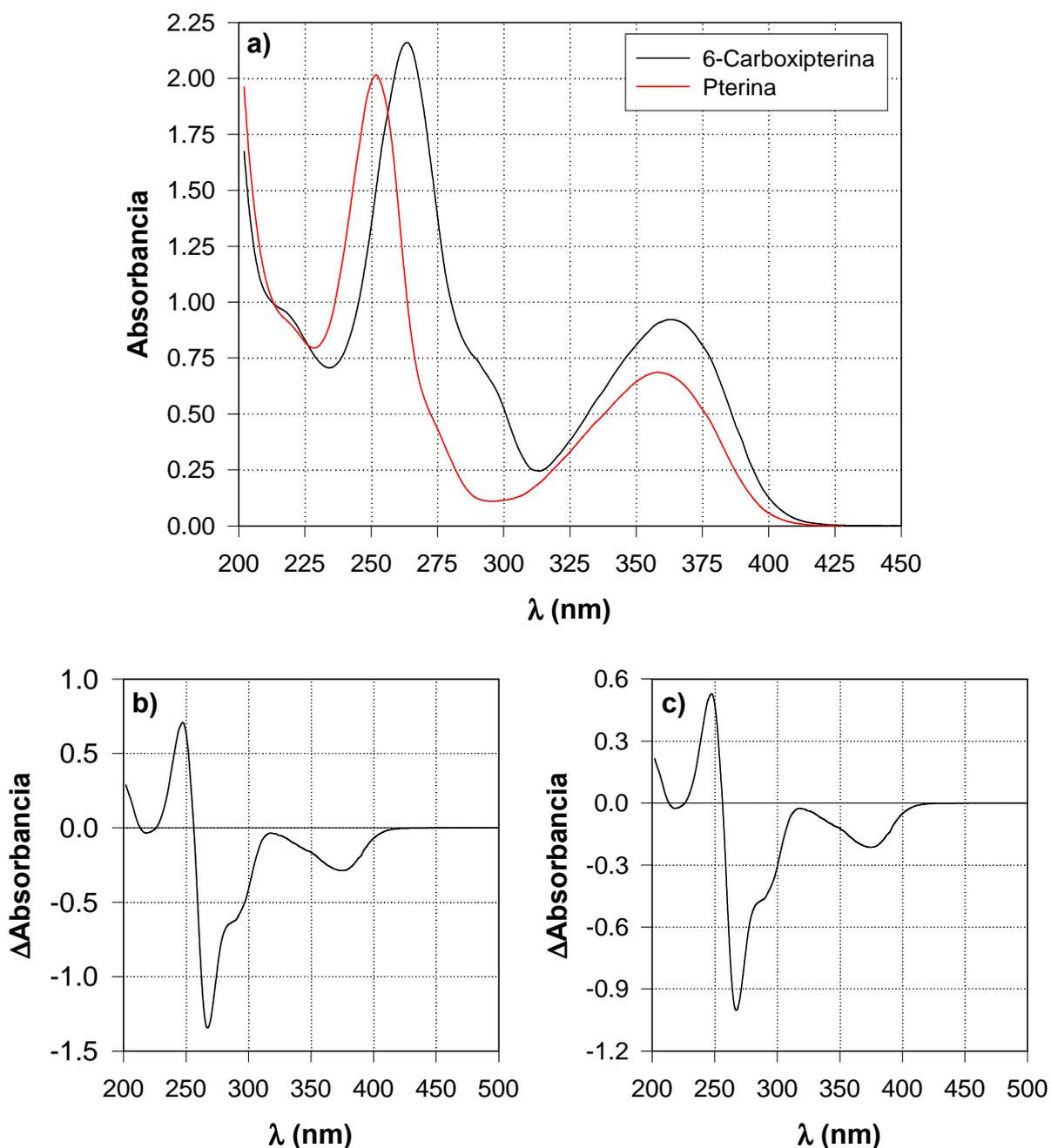
En esta sección se expondrá el método aplicado para identificar productos de reacción a partir del análisis espectral. El primer paso de este procedimiento consiste en proponer a una o más sustancias como posibles productos de determinada reacción fotoquímica. Esta hipótesis puede basarse en antecedentes de literatura, en el análisis cualitativo de los cambios espectrales registrados durante la fotólisis o en ambos. Luego de plantear una hipótesis, se registran los espectros de soluciones del reactivo y de la o las sustancias propuestas como

productos. Es importante, si la estequiometría propuesta es 1:1 (caso más común), que las soluciones preparadas para este fin tengan la misma concentración. De no ser así, es imprescindible corregir los espectros para obtener todos los espectros correspondientes a la misma concentración. Finalmente, se resta el espectro de los productos al espectro del reactivo, obteniéndose un espectro diferencia teórico (espectro DT o, simplemente EDT). Este espectro es normalizado para generar el correspondiente espectro diferencia teórico normalizado (espectro DTN o, simplemente EDTN).

Imagínese el siguiente experimento hipotético: por fotólisis, la 6-carboxipterina, presente en una solución 100  $\mu\text{M}$ , se transforma completamente en pterina y  $\text{CO}_2$ . Obviamente, el resultado sería una solución 100  $\mu\text{M}$  de pterina (el  $\text{CO}_2$  no se considera, pues no absorbe luz en la zona del espectro analizada). Los espectros DE y DEN de este experimento son respectivamente iguales a los espectros DT y DTN, obtenidos de la manera antes indicada. Siguiendo esta línea de razonamiento, puede comprenderse rápidamente que si la transformación del experimento hipotético no fuera completa, es decir, si sólo una proporción de la 6-carboxipterina se transformara en pterina, el espectro DE sería distinto al DT, pero el DEN sería igual al DTN. Teniendo en cuenta ahora los experimentos de fotólisis, puede concluirse que si la reacción estudiada coincide con la reacción propuesta, el espectro DTN debe ser igual, dentro del error experimental, a los espectros DEN obtenidos durante la fotólisis.

Con el fin de proveer un ejemplo experimental, se analizará la descomposición fotoquímica de la 6-carboxipterina en medio alcalino y en ausencia de  $\text{O}_2$ . Se propone como producto de la reacción a la pterina. Se obtienen los espectros de absorción de sendas soluciones acuosas de concentración 100  $\mu\text{M}$  (figura 7.6.a). Se resta el espectro de la pterina al de la 6-carboxipterina, obteniéndose el correspondiente espectro DT (figura 7.6.b); el cual, por último, se normaliza (tomando arbitrariamente el valor de la diferencia de absorbancia a 268 nm) lográndose el espectro DTN (figura 7.6.c). Una vez realizado todo este proceso se procede, como se muestra en la figura 7.7, a la comparación de este espectro DTN con los espectros DEN obtenidos a partir de los espectros registrados durante la irradiación de la 6-carboxipterina bajo las condiciones experimentales antes precisadas. Puede apreciarse que estos dos espectros son muy similares. Este resultado es una evidencia a favor de la hipótesis planteada. Esto no descarta la existencia de otras vías de degradación cuantitativamente menores, pero sugiere fuertemente que la principal reacción de fotodescomposición de la

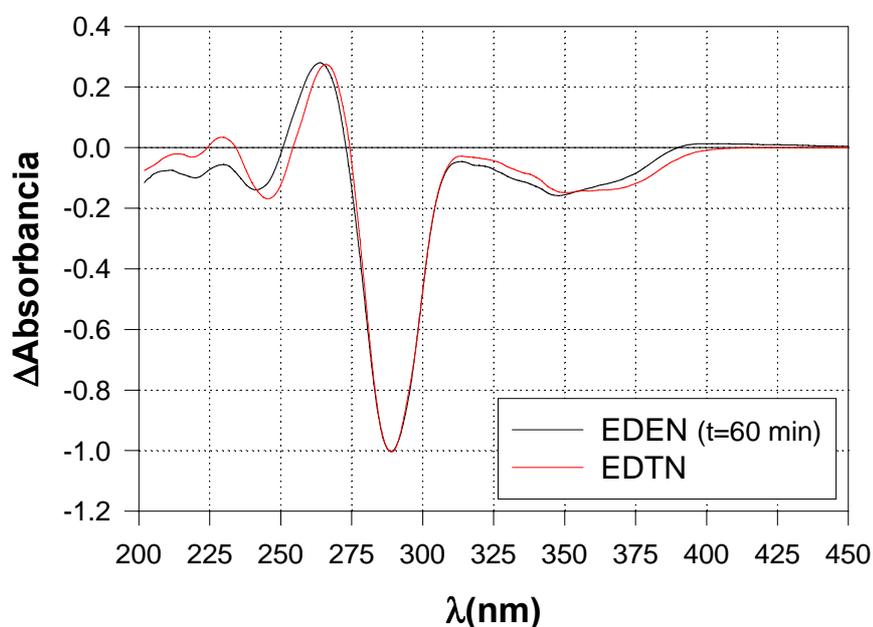
6-carboxipterina, en las presentes condiciones experimentales, es su descarboxilación a pterina. La probabilidad de que la reacción no sea la propuesta, pero que tenga espectros DEN tan parecidos al espectro DTN analizado es muy baja pues, como se dijo, los espectros de absorción de esta familia de compuestos son muy sensibles a pequeñas diferencias químicas en su estructura.



**Figura 7.6.** a) Espectros de una solución de 6-carboxipterina (100  $\mu$ M, pH=11,0) y de una solución de pterina (100  $\mu$ M, pH=11,0). b) Espectro DT obtenido a partir de los espectros de a). c) Espectro DTN obtenido a partir del espectro DT.

Teniendo los espectros de las soluciones patrón es fácil combinarlos entre sí, para obtener una serie de espectros DTN, los cuales sirvieron para compararlos con los espectros DEN obtenidos en los experimentos de fotólisis. De esta manera, en muchos casos se logró una primera aproximación en la identificación de diferentes fotoproductos de las transformaciones fotoquímicas estudiadas. Sin embargo, siempre se recurrió a la corroboración posterior mediante las técnicas cromatográficas que se describirán en las siguientes secciones. En otros casos, en los cuales los espectros DTN no coincidieron en absoluto con los DEN, este procedimiento sirvió para descartar la presencia de ciertas sustancias como principales productos de reacción. Más aún, como se verá más adelante, existen algunos ejemplos puntuales en los cuales la coincidencia fue parcial, sugiriendo que la reacción propuesta existía, pero que no era la única vía de descomposición del reactivo.

Para concluir, y como puede desprenderse de lo expuesto en esta sección, los análisis detallados de los espectros de absorción, registrados a distintos tiempos de irradiación durante los experimentos de fotólisis continua, fueron de gran utilidad para orientar la identificación de los productos de reacción y diseñar ulteriores experimentos empleando otras técnicas. Debido a esto, esta metodología siempre fue empleada antes que las otras al iniciar el estudio de las distintas reacciones fotoquímicas.



**Figura 7.7.** Comparación de espectros DEN y DTN para identificar la reacción que ocurre en la fotólisis de la 6-carboxipterina en medio ácido y ausencia de  $O_2$ .

### **7.3. Cromatografía en capa delgada (TLC).**

La cromatografía en capa delgada de partición, que es usada habitualmente para separar mezclas de compuestos polares, ha sido reportada como adecuada para la separación de derivados pterínicos (Scott, 1980; McCormack y Newman, 1985). En base a la misma, fueron diseñados los experimentos que se describen en esta sección. El método para este caso particular consiste en utilizar celulosa (o celulosa modificada) como fase estacionaria y una solución acuosa de una sal, o mezclas de solventes polares ( $H_2O$ , alcoholes, acetonitrilo, etc) como fase móvil. La celulosa permite, por un lado, sembrar cantidades considerables de soluciones acuosas para ser analizadas, por otro, admite que el solvente de corrida (fase móvil) contenga  $H_2O$ .

Con este método se persiguieron dos objetivos principales. En primer lugar, se buscó aportar información que ayuda en la identificación de fotoproductos (cromatografía analítica). En segundo lugar, se empleó una variación de esta técnica para aislar cantidades significativas de los productos de reacción (cromatografía preparativa) que fueron sometidas a ulteriores análisis. Esta segunda aplicación del método fue llevada a cabo, sobre todo, en aquellos casos en los cuales se detectó algún fotoproducto que no pudo ser fácilmente identificado empleando las soluciones patrón.

En estos experimentos fueron usados tres tipos de placas cromatográficas: placas de DEAE-celulosa de 100  $\mu m$  de espesor, marca Whatman; placas de celulosa de 250  $\mu m$  de espesor con marcador fluorescente, marca Sigma-Aldrich y placas de DEAE-celulosa de 250  $\mu m$  de espesor, marca Baker. Las primeras fueron usadas en la identificación de productos de reacción, mientras que las dos últimas fueron empleadas, fundamentalmente, en las cromatografías preparativas.

Soluciones acuosas de  $NH_4Cl$  de distinta concentración fueron usadas como fase móvil. Las velocidades relativas con las cuales migran los diversos compuestos analizados en este trabajo dependen sensiblemente de la concentración de esta sal. Por lo tanto, se realizó un estudio minucioso para determinar bajo qué condiciones de concentración se obtenían separaciones aceptables en los distintos experimentos de fotólisis continua. Básicamente, y dependiendo de los productos de reacción particulares, se emplearon soluciones de concentración 0,3 % (p/v) y 3 % (p/v).

Una vez realizada la corrida cromatográfica, para el revelado de las placas, se

aprovechó la fuerte emisión fluorescente que presentan la pterinas al ser irradiadas con luz UV-A. De esta manera, cuando se expone una placa a la luz UV-A pueden observarse las características manchas emisoras de luz azul sobre un fondo negro. Las intensidades relativas de la luz emitida por las manchas dependen, evidentemente, no sólo de la cantidad de la sustancia fluorescente sino también de otros factores tales como el coeficiente de extinción molar y el rendimiento cuántico de fluorescencia. Por otra parte, algunas sustancias fueron reveladas sin necesidad de ser irradiadas por luz UV-A, debido a que presentan manchas coloreadas. Por último aquellas sustancias incoloras y no fluorescentes pudieron ser reveladas empleando la placa con indicador fluorescente citada anteriormente. En estas placas, las manchas se observan oscuras sobre un fondo fluorescente.

### **7.3.1. TLC analítica.**

Se realizaron corridas cromatográficas con soluciones preparadas a partir de los patrones comerciales. En estos ensayos se ajustaron detalles experimentales tales como la concentración de las soluciones sembradas, la cantidad de gotas sembradas, etc. Además, como se mencionó anteriormente, se realizaron pruebas con soluciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de distintas concentraciones y con mezclas de solventes. En estos experimentos fueron determinados los valores del factor de retardo ( $R_f$ ) para los distintos patrones. Cabe recordar que el  $R_f$  se define como el cociente entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por el solvente de corrida en un mismo período de tiempo. El  $R_f$  depende de la fase estacionaria, de la fase móvil y de la sustancia analizada, pero no de otros factores tales como el tiempo que dura la corrida, la distancia recorrida por la sustancia, el tamaño de la placa, etc. En la tabla 7.1 se muestran resultados obtenidos con las soluciones patrones.

Contando con la información de la tabla se procedió a aplicar esta técnica a las soluciones sometidas a fotólisis. En cada experimento se sembró sobre la misma placa cromatográfica una alícuota de la solución irradiada (típicamente 20 gotas desde tubo capilar de vidrio) junto con soluciones patrón del reactivo y de los posibles productos de reacción. Luego se determinaron los valores de  $R_f$  para todas las manchas presentes en la placa y se compararon entre sí. También se tomó en cuenta la forma de las manchas, ya que se observó que distintos patrones presentaban diferencias en este aspecto. En casi todos los experimentos se realizaron corridas cromatográficas empleando soluciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,3%(p/v) y 3%(p/v). Cuando se consideró necesario se recurrió a la realización de otras corridas utilizando

distintos solventes. Para guardar registro de los experimentos, las placas, bajo irradiación, fueron fotografiadas con una cámara digital Casio QV-120 o con una cámara Mavica de Sony.

Sustancia	Detección visual <sup>(a)</sup>	Fluorescencia <sup>(b)</sup>	Rf	
			NH <sub>4</sub> Cl 3% (p/v)	NH <sub>4</sub> Cl 0,3% (p/v)
Acido fólico	Sí	No	0,14	0,00
Pterina	No	Sí	0,34	0,49
6-carboxipterina	No	Sí	0,39	0,17
6-formilpterina	No	Sí	0,41	0,42
6-metilpterina	No	Sí		0,48
6-hidroximetilpterina	No	Sí		0,53
Xantopterina	Sí	Sí	0,32	0,38
Ac. <i>p</i> -aminobenzoilglutámico	No	No	1,00	1,00

**Tabla 7.1. Resultados de TLC realizados sobre soluciones patrones. (a) Esta columna indica si la posición de la mancha puede visualizarse simplemente por el color del compuesto. (b) Fluorescencia de las manchas al ser irradiadas con luz UV de 350 nm.**

### 7.3.2. TLC preparativa.

Como se mencionó anteriormente, una variación de esta técnica fue aplicada para separar productos de reacción y obtener soluciones de los mismos. En esta modalidad, la siembra se realizó “en banda”. Esto quiere decir que las gotas no fueron aplicadas sucesivamente una sobre la otra en el mismo lugar o punto, sino que fueron aplicadas a lo largo de una línea perpendicular a la dirección de movimiento del solvente de corrida. Una vez que se evapora el solvente sobre la línea de siembra se repite la operación. Realizando esta maniobra varias veces puede sembrarse un volumen mucho mayor de muestra; sin embargo, sólo puede sembrarse una solución por placa. Esto no es ningún inconveniente porque en este caso lo que se quiere lograr es preparar una solución de un producto aislado de los demás y no comparar con patrones. Luego de realizar la corrida se obtiene una placa en la cual a distintas alturas (según los correspondientes valores de Rf) se encuentran los productos separados.

Las placas cromatográficas empleadas en esta modalidad fueron también de celulosa o

celulosa modificada, pero de mayor espesor (250  $\mu\text{M}$ ); llamadas, frecuentemente, placas semipreparativas. La mayor cantidad de fase estacionaria por unidad de área permite aumentar el volumen de muestra sembrada sin perder la capacidad de separación. Concretamente fueron utilizadas placas de DEAE-celulosa (Baker) y celulosa con indicador fluorescente (Sigma).

En estos experimentos se fotolizaron volúmenes mayores de solución, generalmente entre 10 y 20 ml en tubos de ensayo. Luego de la irradiación las soluciones fueron concentradas, disminuyendo su volumen por evaporación de  $\text{H}_2\text{O}$  hasta aproximadamente 0,5 a 1 ml. Esta operación fue realizada en un equipo rotavapor. Típicamente se evaporó el agua de las soluciones fijando la temperatura entre 30 y 40  $^{\circ}\text{C}$  y la presión entre 0,5 y 2 cm de Hg. De esta manera, se aumentó la masa de las sustancias separadas, no sólo por sembrar un volumen mayor de solución, sino también por la mayor concentración de la misma. Además en todos los casos en los cuales fue aplicada esta técnica se realizaron controles de TLC analítica para verificar que el tratamiento de concentración de la muestra no hubiera alterado químicamente a las sustancias presentes en la misma. Es decir, se tomaron alícuotas de las soluciones irradiadas antes y después de ser concentradas y se realizaron ensayos en los cuales se controlaron que ambas soluciones presenten el mismo patrón cromatográfico; o sea, la misma cantidad de sustancias reveladas y con los mismos valores de  $R_f$ .

Luego de realizar la correspondiente corrida cromatográfica, cada una de las bandas obtenidas fue recortada de la placa y raspada para recoger en un tubo de ensayo el sólido contenido en ella. Posteriormente se agregaron a cada tubo soluciones para separar la sustancia de interés de la fase estacionaria y se agitaron durante unos minutos. Los tubos fueron centrifugados 15 minutos a 4000 r.p.m. y se separó el sobrenadante, quedando en el fondo de los tubos la mayor parte de la fase estacionaria. Por último, las soluciones fueron filtradas, empleando filtros de nylon MSI (0,1  $\mu\text{m}$ ), para eliminar las partículas de celulosa más pequeñas que no precipitaron durante la centrifugación.

Respecto a la elección de la solución que se agregó en cada caso para separar la sustancia de interés de la celulosa, hay que aclarar que se realizaron numerosas pruebas para determinar las condiciones óptimas de extracción. Se ensayaron soluciones de KOH (pH= 11,0),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3%(p/v) y HCl de varias concentraciones. Luego de realizar el procedimiento de extracción se obtuvieron los espectros UV-visible de los sobrenadantes para investigar la presencia del analito en los mismos.

De esta manera, se lograron aislar distintos productos de reacción en soluciones

acuosas. Estas soluciones fueron sometidas posteriormente a diversos estudios. Por ejemplo, se compararon sus espectros de absorción con los de soluciones patrón y se realizaron análisis por HPLC. Esto permitió, en casos donde se dudaba si una determinada sustancia, separada por TLC, correspondía a un patrón, corroborar o descartar tal hipótesis. Por otro lado, esta técnica sirvió para aportar información valiosa en aquellos casos en los cuales se separaron productos de los cuales no se tenían patrones. En efecto, como se describirá más adelante, las soluciones de las sustancias desconocidas fueron sometidas a diversos análisis, que permitieron su caracterización.

#### **7.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).**

Esta técnica posee gran capacidad para separar sustancias, mucho mayor que las técnicas de TLC de partición. Considerando que en las soluciones irradiadas analizadas existen varios fotoproductos esta cualidad adquiere gran importancia. Además, este método permite cuantificar un compuesto si se cuenta con el patrón correspondiente; y, en consecuencia, calcular rendimientos cuánticos. Sin embargo, la técnica de HPLC utilizada en este trabajo, no permite aislar las fracciones separadas; es decir, que no puede realizarse ningún análisis ulterior sobre soluciones de los productos separados. Lo cual sí puede hacerse, como se explicó en la sección anterior, con las fracciones separadas por TLC. Como puede observarse, ambas técnicas se complementan en el análisis de los fotoproductos.

Para estas medidas se empleó un equipo HPLC 500 B de Konic Instruments. Se utilizó una columna de separación de fase reversa C18 HPLC Spherisorb S5 ODS2 (250 x 46 mm). El sistema de detección consistió en un espectrofotómetro Lambda 1000 Bischoff HPLC. De acuerdo a antecedentes encontrados en literatura (Kang D. et al., 1998) se realizaron ensayos con distintos eluyentes. En estas pruebas no se encontró una única fase móvil que pudiera separar adecuadamente todos los componentes de las soluciones irradiadas en todos los experimentos de fotólisis continua. En la tabla 7.2 figuran las condiciones de corrida adoptadas para estos estudios.

El sistema de detección permite escoger la longitud de onda de análisis entre 200 y 400 nm. Muchos de los estudios cromatográficos se realizaron a 340 nm, zona en la cual casi

todos los derivados pterínicos presentan una banda característica. En otros experimentos se trabajó en la zona de 270 a 300 nm.

Se realizaron corridas cromatográficas con soluciones de patrones comerciales. Los tiempos de retención ( $t_R$ ) fueron comparados con los obtenidos para las sustancias presentes en las soluciones irradiadas. Se detectó que los valores de  $t_R$  de una determinada sustancia variaban en corridas llevadas a cabo en las mismas condiciones experimentales, pero realizadas en distintos días de trabajo. Estas variaciones llegaron en algunos casos hasta un 20%. La razón de esta baja reproducibilidad en los valores del  $t_R$  no pudo ser dilucidada y, por ende, para evitar dudas en la identificación de sustancias, se corrieron soluciones patrón, en cada día de trabajo.

Nombre	Composición	Flujo	pH
Sistema I	95% Acetato de Na 50 mM, ácido cítrico 5mM en H <sub>2</sub> O 5% Metanol	1,0 ml/min	5,2
Sistema II	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20mM, EDTA 2,5 mM	1,0 ml/min	5,5
Sistema III	93% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20mM, EDTA 2,5 mM 7% Acetonitrilo: H <sub>2</sub> O (60:40)	1,0 ml/min	5,5
Sistema IV	90% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20mM, EDTA 2,5 mM 10% Acetonitrilo: H <sub>2</sub> O (60:40)	(a) 1,0 (b) 1,5 ml/min	5,5

**Tabla 7.2. Sistemas de solvente de corrida empleados. La composición está expresada como una relación de volúmenes. El pH que se indica en la última columna se refiere a la solución acuosa correspondiente antes de realizar la mezcla.**

Para cuantificar las sustancias separadas por esta técnica, se realizaron curvas de calibración empleando soluciones patrón. En cada caso, se preparó, por pesada, la solución de la mayor concentración que se quería ensayar y, a partir de ella, soluciones de menor concentración diluyendo con H<sub>2</sub>O. De este modo, se obtuvieron series de soluciones de concentración conocida. Cada una de las soluciones fue inyectada en el equipo y se obtuvo el correspondiente cromatograma que consiste en una gráfica de la señal del espectrofotómetro en función del tiempo de corrida. La señal es proporcional a la absorbancia de la solución a la

longitud de onda seleccionada. Posteriormente se integró el área debajo de los picos presentes en los cromatogramas y se construyeron curvas de área en función de la concentración. En las figuras 7.8, 7.9 y 7.10 se muestran algunas de dichas curvas.

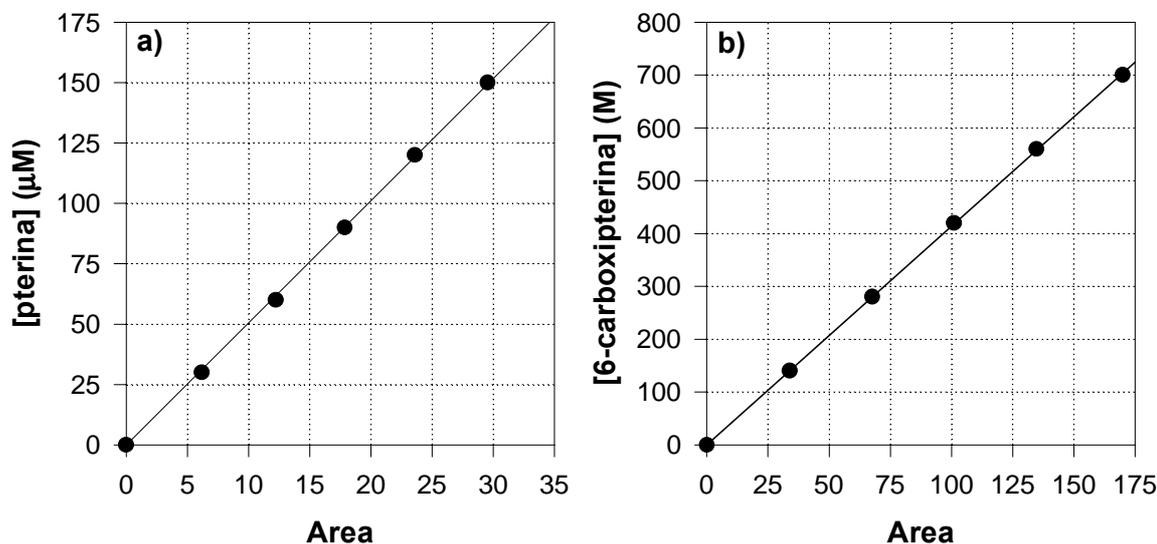


Figura 7.8. Curvas de calibración realizadas con el sistema de corrida II (tabla 7.2). a) 6-carboxipterina, longitud de onda de análisis= 286 nm. b) pterina, longitud de onda de análisis= 270 nm.

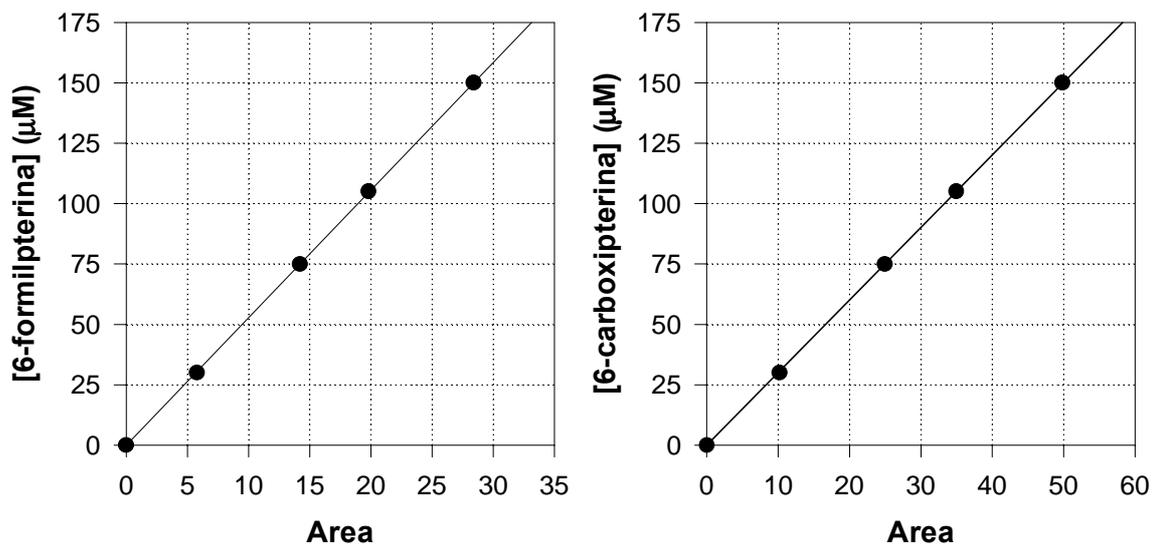
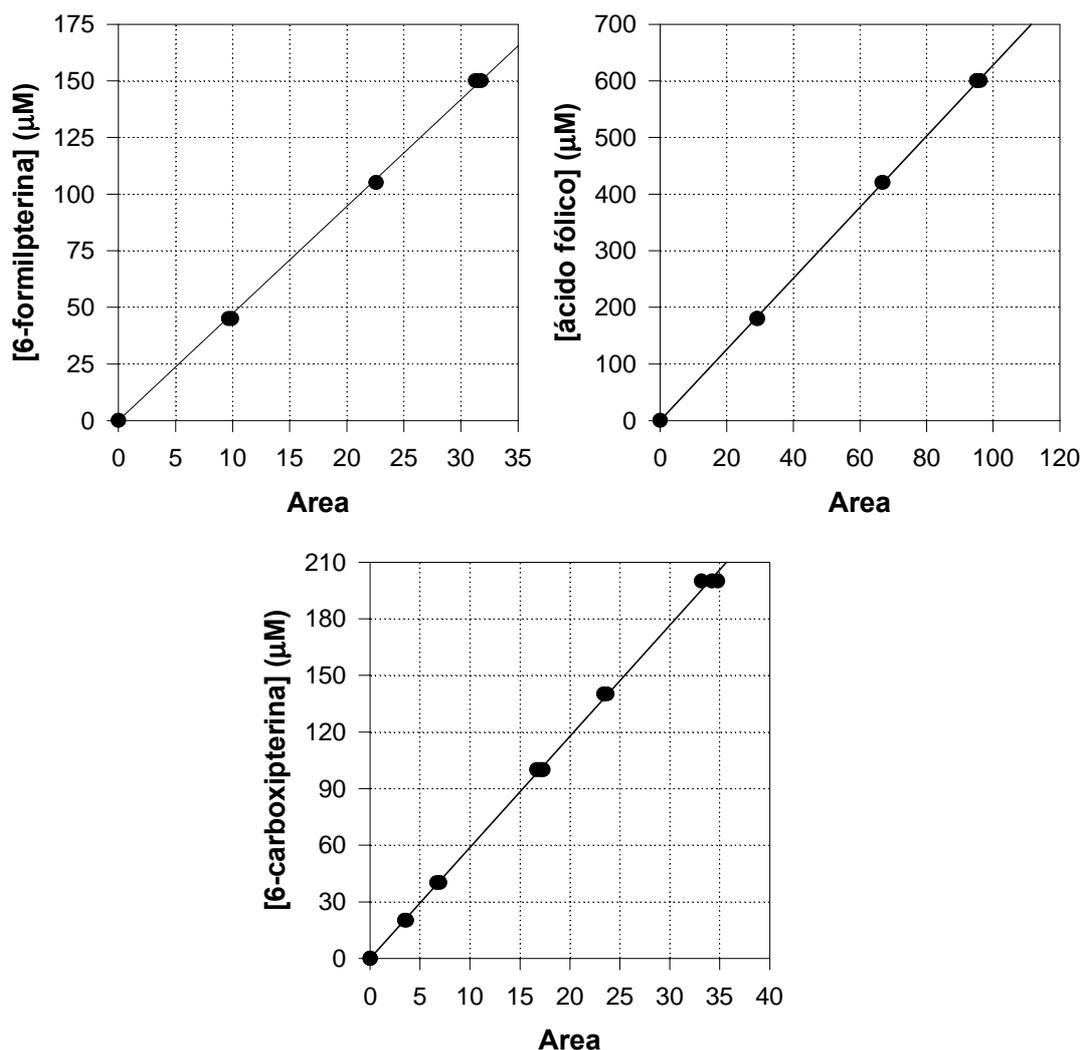


Figura 7.9. Curvas de calibración realizadas con el sistema de corrida IVa (tabla 7.2). longitud de onda de análisis= 280 nm. En ambos gráficos cada punto es el promedio de dos medidas de área.



**Figura 7.10.** Curvas de calibración realizadas con el sistema de corrida III (tabla 7.2). longitud de onda de análisis= 340 nm. Las áreas para cada concentración no fueron promediadas.

Estas curvas de calibración fueron realizadas para todas las sustancias que se cuantificaron. Además se llevaron a cabo en las mismas condiciones experimentales de corrida en las cuales se analizaron las soluciones irradiadas de los experimentos donde se cuantificaron reactivos y productos. Cabe aclarar que la dispersión observada en la determinación de los  $t_R$ , no se observó en la determinación de las integrales de los picos cromatográficos. En efecto, soluciones de la misma concentración analizadas bajo las mismas condiciones dos días distintos de trabajo que presentaron diferencias apreciables en los  $t_R$ , no lo hicieron en las áreas de integración.

Puede apreciarse en todas las gráficas una relación lineal entre el área y la concentración. Para cada curva de calibración se realizó una regresión lineal de la cual se obtuvo la correspondiente pendiente. Este valor fue utilizado, posteriormente, como factor de conversión entre el área obtenida en los experimentos de fotólisis y la concentración. De esta manera, a partir del análisis cromatográfico de las soluciones irradiadas durante distintos tiempos se obtuvieron las curvas de concentración en función del tiempo.

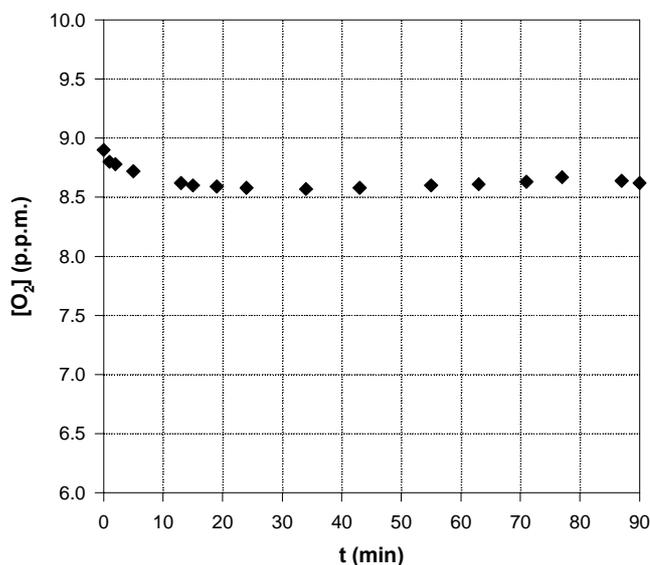
### **7.5. Determinación de O<sub>2</sub>.**

La concentración del O<sub>2</sub> disuelto en las soluciones irradiadas fue determinado electroquímicamente empleando un electrodo sensible a O<sub>2</sub> (Orion, modelo 37-08-99). Para realizar estas medidas se recurrió al uso de una celda de vidrio pyrex provista de cierre hidráulico dentro de la cual se colocó el electrodo y la solución a irradiar; este dispositivo permite fotolizar la solución y dosar el O<sub>2</sub> al mismo tiempo. El electrodo posee en su extremo un buzo magnético, otro se colocó en el fondo de la celda. Un agitador magnético se ubicó por debajo de la celda, de modo tal que las soluciones fueron agitadas durante los experimentos. Por otra parte, la celda se llena completamente con la solución a analizar y el electrodo se ajusta de tal manera que no se permite el intercambio de gases durante el experimento. Además, la membrana del electrodo está protegida de luz UV durante la irradiación por un dispositivo plástico.

Una vez que se prepara todo el dispositivo, se realiza la medida de la concentración de O<sub>2</sub> en la solución antes de ser irradiada. Es necesario puntualizar que, en todos los experimentos llevados a cabo con esta técnica, se emplearon soluciones iniciales saturadas en aire. Finalmente se inicia el experimento de fotólisis estacionaria y, sin apagar la lámpara, se efectúan las medidas a distintos tiempos de irradiación.

Se realizó un experimento control para descartar que la disminución en la concentración de O<sub>2</sub> observada pudiera deberse al descenso en la solubilidad del mismo como consecuencia del calentamiento producido por la lámpara. Si bien el aumento de la temperatura de la solución es de sólo unos pocos grados centígrados, este efecto debía ser tenido en cuenta por la fuerte dependencia con la temperatura que muestra la solubilidad del O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. El resultado de este control (figura 7.11) muestra que se produce un ligero

descenso de la concentración de O<sub>2</sub> en los primeros minutos de irradiación para luego alcanzar un valor que se mantiene con ligeras oscilaciones. Estos cambios, como se verá cuando se presenten los resultados, pueden despreciarse frente a los cambios observados en las fotólisis que transcurren con consumo de O<sub>2</sub>.



**Figura 7.11. Medida de la concentración de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O bajo irradiación. Este control se realizó respetando las condiciones y geometría empleadas en las fotólisis y con la misma lámpara.**

Las medidas electroquímicas de O<sub>2</sub> disuelto en el medio durante las fotólisis sirvieron para determinar si dicho gas participaba o no en las reacciones fotoquímicas estudiadas. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser comparados cuantitativamente con aquellos obtenidos en otros experimentos, pues las condiciones experimentales diferían mucho a causa del dispositivo especial empleado para estas medidas.

## **7.6. Otros métodos analíticos empleados en las fotólisis estacionarias**

### **7.6.1. Determinación colorimétrica de aldehídos.**

Se investigó la presencia de compuestos con grupos funcionales carbonílicos mediante la técnica colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se empleó una variante de la técnica general que fue usada previamente con compuestos pterínicos (Robinson et al., 1990). Este procedimiento analítico consiste en la utilización de una solución al 0,1%(p/v) de

2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl 2 M, la cual reacciona con los compuestos carbonílicos para dar la correspondiente fenilhidrazona que tiene un máximo de absorción a 500 nm.

Esta técnica sirve para detectar y cuantificar compuestos carbonílicos sin diferenciar entre aldehídos y cetonas. Debido a esto, en todos aquellos casos en los cuales esta prueba colorimétrica resultó positiva, se realizó el ensayo de Tollens justamente para distinguir entre estos dos tipos de compuestos. Este último ensayo se basa en la reducción, que producen los aldehídos, del ión  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  a partir de una solución amoniacal de  $\text{AgNO}_3$ . Por el contrario, las cetonas no reducen al ión  $\text{Ag}^+$ . A su vez, todos los ensayos de Tollens que se realizaron resultaron positivos.

La técnica colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina fue realizada sobre soluciones irradiadas en las cuales se sospechaba la presencia de compuestos aldehídicos. Puede determinarse la concentración del aldehído debido a que el  $\epsilon$  de las hidrazonas a 500 nm es conocido y no varía mucho entre las mismas. Sin embargo, en estos ensayos no se pretendió averiguar la concentración absoluta, sino, simplemente establecer si se generaban aldehídos como productos de reacción y analizar cualitativamente la evolución de su concentración durante la fotólisis. De esta manera, se realizaron gráficas de absorbancia a 500 nm en función del tiempo de irradiación.

### **7.6.2. Fotólisis realizadas en presencia de alcohol furfurílico.**

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de ciertas reacciones sugirió que intermediarios activados del  $\text{O}_2$  podrían participar en el mecanismo de las mismas. Existen ensayos tendientes a dilucidar problemas de este tipo. En particular, puede recurrirse al empleo de secuestradores selectivos de determinadas especies reactivas. Se denomina secuestrador selectivo a una sustancia que reacciona muy rápidamente con la especie reactiva en cuestión y no reacciona con otras especies.

De esta manera, para determinar si en una reacción fotoquímica participa cierta especie reactiva, se agrega a la solución que será irradiada una cantidad elevada de un secuestrador selectivo adecuado. Es importante controlar que el mismo no absorba luz, o que, si lo hace no lo haga en alta proporción. En cuanto a la concentración, hay que elegirla de acuerdo a las reactividades relativas, pero, en principio, una concentración que sea un orden de magnitud superior a la del reactivo puede aceptarse como adecuada. Por último, se realiza la fotólisis bajo las mismas condiciones que otras realizadas en ausencia del agente

secuestrante y se comparan los resultados de los experimentos realizados en presencia y en ausencia del mismo. Se asume que el intermediario reactivo buscado, si existe, reaccionará totalmente con el secuestrador selectivo, o, al menos, en una proporción apreciable. Por lo tanto, una disminución de la velocidad de la reacción en el experimento realizado en presencia del secuestrador indica la participación de la especie reactiva investigada.

En particular, se investigó la participación del oxígeno singlete, cuyas propiedades fueron presentadas en la sección 4.4 (Foote C. S. y Clennan E. L., 1995). En el caso particular de la técnica aplicada en este trabajo se empleó alcohol furfurílico como agente secuestrante (Haag, W. R. et al., 1984 a y b; Haag, W. R. y Hoigné J., 1986). Como puede apreciarse en la figura 7.12, este compuesto reacciona rápidamente con el  $^1\text{O}_2$  para dar un endoperóxido intermediario que luego se transforma en una serie de productos (Blough N. V. y Zepp R. G., 1995). La figura 7.13, por su parte, muestra el espectro de absorción de una solución de alcohol furfurílico de concentración igual a la usada en los experimentos. Puede observarse que a la longitud de onda de excitación (350 nm) absorbe una cantidad de luz despreciable.

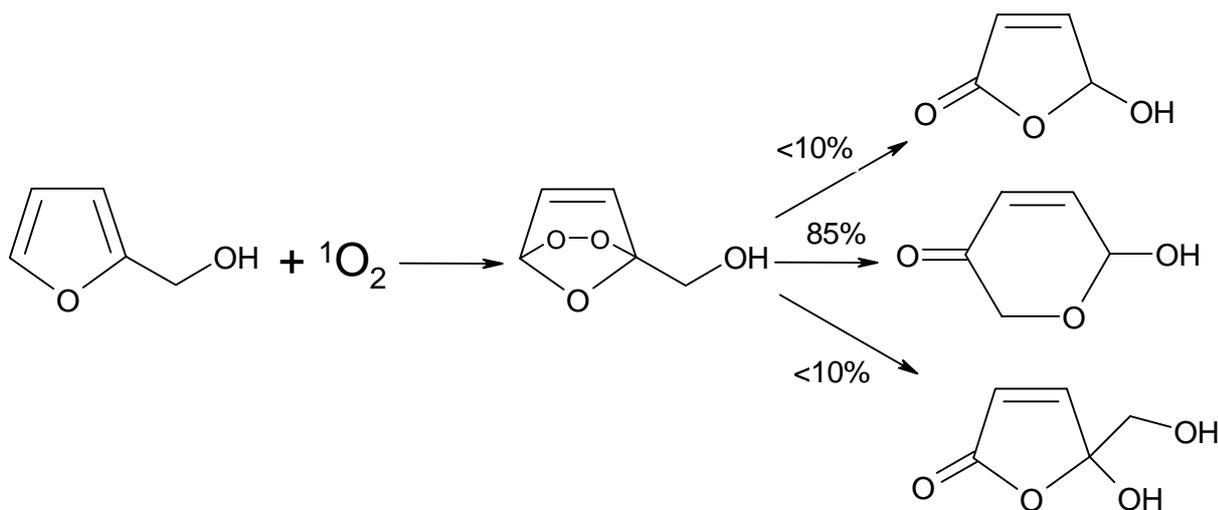


Figura 7.12. Reacciones del  $^1\text{O}_2$  con el alcohol furfurílico.

Para ello, se realizaron experimentos de fotólisis estacionaria en condiciones similares a las descritas anteriormente, pero en presencia de alcohol furfurílico 10 mM. Esta concentración superó, en todos los casos, en más de 10 veces a la del reactivo fotolizado (generalmente comprendida ente 0,15 y 0,7 mM). Por último, las soluciones irradiadas fueron analizadas por HPLC, determinándose las concentraciones de reactivos y productos (no se midió el consumo de alcohol furfurílico).

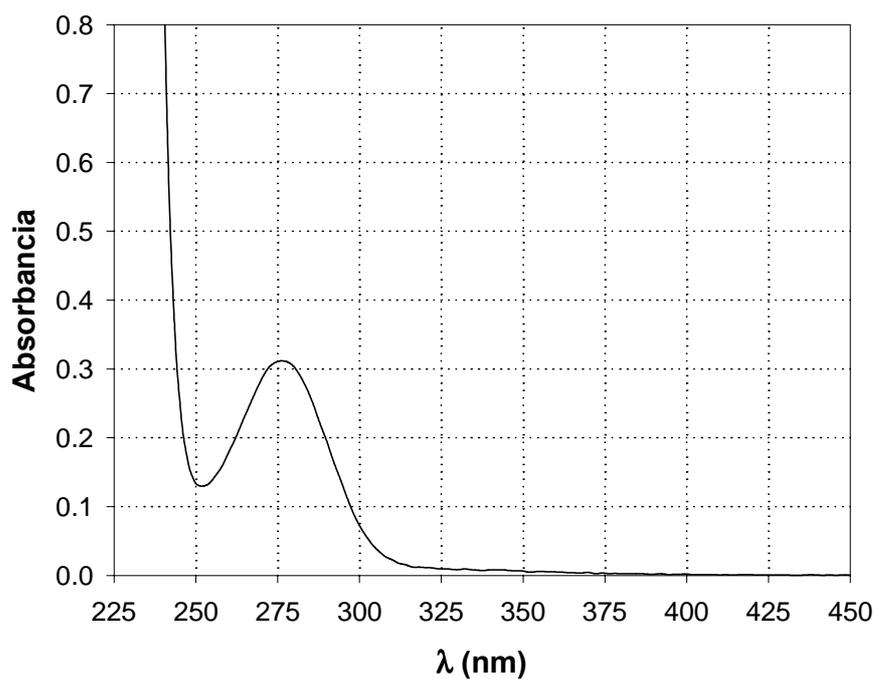


Figura 7.13. Espectro de absorción de una solución 10 mM de alcohol furfurílico en agua.