

## Capítulo 8.

### Estudios complementarios.

---

---

En este capítulo se expondrán las técnicas complementarias que fueron aplicadas en este trabajo de tesis, pero que escapan a la metodología general presentada en el diagrama de la figura 6.1 y desarrollada en los capítulos 6 y 7. En particular, se expondrán los aspectos generales de los métodos de fotólisis de flash y flujo detenido. Ambos métodos permiten el análisis cinético de reacciones químicas. Los resultados de estos estudios aportaron información sobre el mecanismo de algunos de los procesos estudiados. También se describirá la técnica empleada para determinar rendimientos cuánticos de producción de  $^1\text{O}_2$ . Por último, se expondrán brevemente los análisis que se realizaron sobre algunas muestras con un equipo de HPLC con detector de masas.

#### 8.1. Método de fotólisis de flash.

##### 8.1.1. Introducción.

Este método, más conocido como flash fotólisis, fue desarrollado por R. G. W. Norrish y G. Porter en 1948 y es utilizado actualmente para el estudio de procesos fotofísicos y fotoquímicos, así como para el estudio cinético de reacciones térmicas rápidas iniciadas a partir de la generación fotoquímica de reactivos. Básicamente, esta técnica consiste en someter al material estudiado, contenido en una celda de reacción, a un corto e intenso flash de luz, generando una cantidad relativamente elevada de moléculas excitadas, a partir de las cuales se producirán cambios en el sistema. La evolución temporal de los mismos es seguida por espectroscopía de absorción o de emisión.

La resolución temporal está limitada por la duración del flash, que es usualmente del

orden de los microsegundos en el caso de las lámparas de plasma (flash fotólisis convencional) y del orden de los picosegundos o nanosegundos cuando se utilizan láseres pulsados (láser flash fotólisis). La intensidad del flash debe ser suficientemente alta como para producir un cambio medible en la composición química del sistema, pero de muy corta duración en comparación con la vida media de los procesos que se desea estudiar. La duración del flash se define, generalmente, como el tiempo durante el cual la intensidad de la luz se mantiene por encima de la mitad del valor máximo. Los límites de sensibilidad del método, por su parte, están determinados por factores tales como la absorción de luz del sistema en estudio y las especies transientes formadas, la potencia del flash y las características del sistema óptico y de detección.

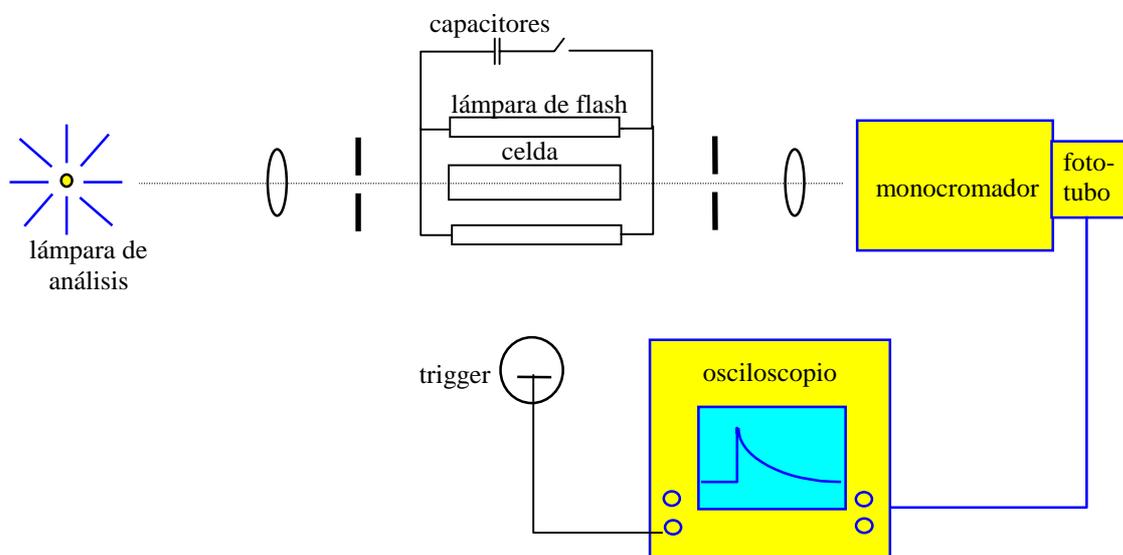
Existen dos variantes técnicas para el seguimiento espectroscópico de los cambios químicos generados por el flash, denominadas flash espectroscopía y espectroscopía cinética. En la primera, se registra en un espectroscopio un espectro a un tiempo preseleccionado después del flash, por medio de la aplicación a la muestra de un segundo flash. En la segunda, se determina, a una longitud de onda preseleccionada, la variación temporal de la absorción del sistema. Para ello, se utiliza un haz luminoso proveniente de una fuente de luz continua (luz de análisis), que se colima, se hace pasar a través de la celda de reacción, atraviesa un monocromador, es detectado por un fotomultiplicador y registrado en un osciloscopio.

### **8.1.2. Equipo.**

En los estudios presentados en este trabajo se empleó un equipo de flash fotólisis convencional. En la figura 8.1 se muestra un esquema del aparato Xenon Co., Modelo 720 C, utilizado; su óptica y electrónica fueron modificadas a fin de aumentar la sensibilidad de detección (San Román et al., 1982). La muestra es colocada en una celda de reacción cilíndrica de cuarzo de 1 cm de diámetro y 10 cm de longitud, que posee una camisa también de cuarzo, la cual permite termostatar la muestra o colocar soluciones filtros que eviten el paso de luz de ciertas regiones del espectro. La celda es iluminada por dos lámparas de flash convencionales Xenon Co. FP-5-100C ubicadas paralelamente a la misma. La energía eléctrica del flash proviene de un banco de capacitores que se carga a un alto voltaje y está dentro del rango comprendido entre 50 y 2000 J. La duración del flash, por su parte, está entre 50 y 200  $\mu$ seg.

El equipo consta de un sistema de análisis óptico que se encuadra dentro del método

de espectroscopía cinética mencionado anteriormente. Se emplea una lámpara de análisis de tungsteno-halógeno (Riluma PN240, 24V., 240W), con un intervalo de emisión de 340 a 650 nm. Se empleó un monocromador Bausch & Lomb y la detección de la señal luminosa se logra mediante un fotomultiplicador RCA1P28 o Hamamatsu RCA 4840, alimentado mediante un divisor de tensión resistivo-capacitivo. La señal anódica del fotomultiplicador se envía a la entrada diferencial de un osciloscopio Leader LBO-5825 que está sincronizado con el disparo de las lámparas de flash. Las señales obtenidas (trazas) son digitalizadas empleando una placa de comunicación entre el osciloscopio y una computadora (PC) que fue desarrollada por personal del Laboratorio de Electrónica del INIFTA.



**Figura 8.1.** Esquema del equipo de flash fotólisis.

### 8.1.3. Análisis de los resultados.

Si durante el proceso estudiado se forma un intermediario que absorbe más luz que el reactivo a la longitud de onda de análisis, el osciloscopio registrará una señal del tipo de la que se muestra en la figura 8.2.

Debe aclararse que, como el transiente absorbe sólo una pequeña fracción de luz, es necesario amplificar la ganancia del osciloscopio, en cuyo caso la posición correspondiente al 0% de transmitancia no aparecerá en la pantalla del mismo. La respuesta del osciloscopio ( $x$ ) es proporcional a la intensidad luminosa ( $I$ ); por lo tanto, pueden plantearse las siguientes relaciones:

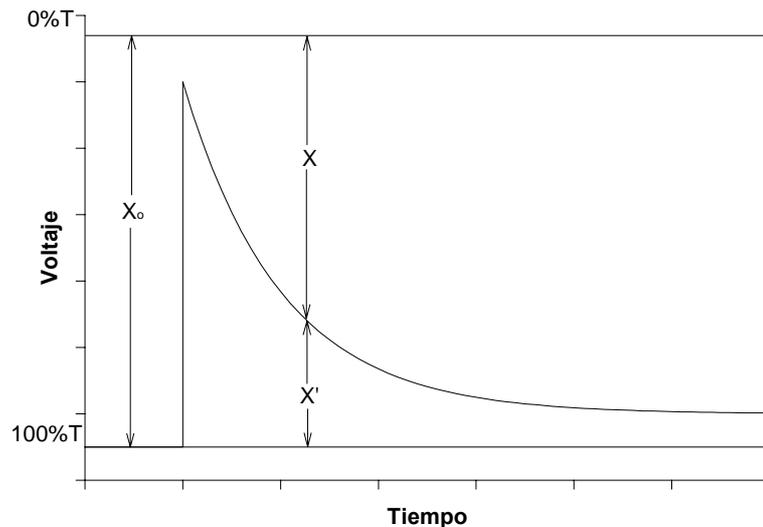
$$I_0 = k \cdot x_0$$

$$I = k \cdot x$$

donde  $k$  es una constante que depende de la sensibilidad del detector. Considerando estas ecuaciones y la ley de Lambert-Beer puede escribirse la siguiente relación:

$$A = \log(I_0/I) = \log(x_0/x) = \epsilon_\lambda \cdot C_t \cdot l$$

donde  $\epsilon_\lambda$  es el coeficiente de extinción molar del transiente a la longitud de onda  $\lambda$ ,  $C_t$  es su concentración al tiempo  $t$  después del flash y  $l$  es el camino óptico.



**Figura 8.2.** Esquema de una traza obtenida en un experimento de flash fotólisis en la que se observa la desaparición (decaimiento) de un transiente formado debido al flash.

La amplitud de la señal ( $x$ ) está dada en unidades de voltaje. Con el fin de convertir estos valores en absorbancia o transmitancia porcentual, se ajusta a 1 voltio el 100% de transmitancia de la luz de monitoreo utilizando un comparador diferencial conectado al osciloscopio. Como la línea correspondiente a 0% de transmitancia no se registra, no se obtienen las amplitudes  $x$  para cada intervalo de tiempo, pero sí las que fueron marcadas como  $x'$  en el esquema de la figura 8.2. La relación entre  $x$  y  $x'$  viene dada por:

$$x' = x_0 - x$$

Puede plantearse entonces, teniendo en cuenta que  $x_0 = 1000$  mV, la siguiente ecuación:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{x_0}{x_0 - x'}\right)$$

y, por lo tanto:

$$A = \log\left(\frac{1000}{1000 - x'}\right) = \epsilon_\lambda \cdot C_t \cdot l$$

## **8.2. Estudios cinéticos**

En una de las reacciones fotoquímicas estudiadas se encontró que uno de los fotoproductos no era estable y se descomponía en una reacción térmica. La cinética de este proceso fue estudiada mediante técnicas convencionales y mediante la técnica denominada flujo detenido (stopped flow).

### **8.2.1. Estudios cinéticos mediante técnicas convencionales.**

Se denomina de esta manera a aquellos métodos en los cuales se mezclan manualmente los reactivos y luego se monitorea alguna propiedad del sistema en función del tiempo. Es evidente que, para estudiar la cinética de una reacción de esta manera, el tiempo en el cual se completa la reacción debe ser mayor al tiempo que se emplea en el mezclado de las soluciones. De lo contrario, no se podrá medir la variación de ninguna propiedad.

En los experimentos que se expondrán en el capítulo 15, las mezclas fueron llevadas a cabo en celdas de cuarzo de 4 ml de capacidad. Se midió la variación de la absorbancia de la solución mezcla a distintas longitudes de onda como una función del tiempo. Estas medidas fueron realizadas con el espectrofotómetro Cary3 de Varian descrito anteriormente.

Este equipo presenta dos modalidades para realizar estudios cinéticos. En el modo cíclico, el equipo se programa para tomar espectros de absorción en un rango preestablecido de longitudes de onda, a intervalos definidos de tiempo. Debido al tiempo necesario para barrer un espectro, este modo no puede usarse cuando la reacción estudiada es demasiado rápida. En estos casos es más apropiado el modo cinético. En él, el aparato fija su monocromador en una longitud de onda especificada y se graban los valores de absorbancia como una función del tiempo. Además el equipo cuenta con un software que permite reducir el ruido de los espectros.

### **8.2.2. Técnica de flujo detenido.**

Como se detallará en el capítulo 15, bajo ciertas condiciones, la reacción se vuelve tan rápida que no puede ser estudiada mediante las técnicas convencionales. En estos casos se recurrió a la implementación de la técnica de flujo detenido, mediante la cual, es posible seguir el curso de reacciones cuyos tiempos medios están comprendidos en intervalos de tiempo del orden de los milisegundos.

El aspecto crucial de esta técnica es que logra una muy buena mezcla de pequeñas cantidades de las soluciones de los reactivos en un tiempo muy breve, comparado con el necesario para el mezclado manual. Los aparatos de flujo detenido consisten, básicamente, en un dispositivo que mezcla dos soluciones muy rápidamente inyectándolas en una cavidad, la cual está ajustada con un émbolo que se mueve hacia atrás a medida que los fluidos entran. El flujo cesa cuando el émbolo alcanza un tope y la reacción continúa en las soluciones muy bien mezcladas. Se hacen medidas en función del tiempo, generalmente espectroscópicas, sobre el material mezclado.

La figura 8.3 muestra el esquema básico de un equipo de flujo detenido. Las soluciones con los reactivos son depositadas inicialmente en jeringas de reservorio (R), desde donde pueden llenarse jeringas de vidrio (J), mediante un conjunto de válvulas (V). Estas últimas jeringas poseen émbolos accionables simultáneamente por un martillo (A) conectado a un circuito neumático con aire comprimido aportado por un compresor (C). Ambas soluciones, al ser disparado el mecanismo, son impulsadas hacia una unidad mezcladora (M) completándose el mezclado en unos pocos milisegundos. A su vez parte de la mezcla queda en la celda de observación (O); que posee ventanas de cuarzo. Al mismo tiempo es accionado el émbolo de frenado (D). Todo el sistema de circulación de soluciones, excluyendo los reservorios, está termostatzado con agua proveniente de un termostato

Generalmente, estos equipos poseen un dispositivo espectrofotométrico asociado. El haz de luz, proveniente de una fuente (F) es enviado a un monocromador (B). El haz de luz ( $L_o$ ) cuya longitud de onda se elige de acuerdo con el sistema bajo observación, pasa a través de la celda de observación (O). El haz emergente (L) incide en un sistema de detección (P), la señal resultante es registrada, y, por último, es digitalizada y analizada.

En los laboratorios de la división de Cinética y Fotoquímica del INIFTA se cuenta con dos aparatos de flujo detenido. Uno es un equipo Durrum modelo D-110 y el otro es un accesorio SFA-20 de Hi-Tech. El primero consiste, esencialmente, en un espectrofotómetro ultravioleta-visible acoplado a un dispositivo de mezclado rápido. La señal adquirida por un fotomultiplicador es registrada y almacenada por un osciloscopio. El segundo es un aparato especialmente diseñado para ser usado en los espectrofotómetros Cary, utilizando de ellos todo su sistema óptico. Las medidas fueron realizadas con este últimos dispositivo, sin embargo, se realizaron algunos controles con el primero para corroborar los resultados obtenidos.

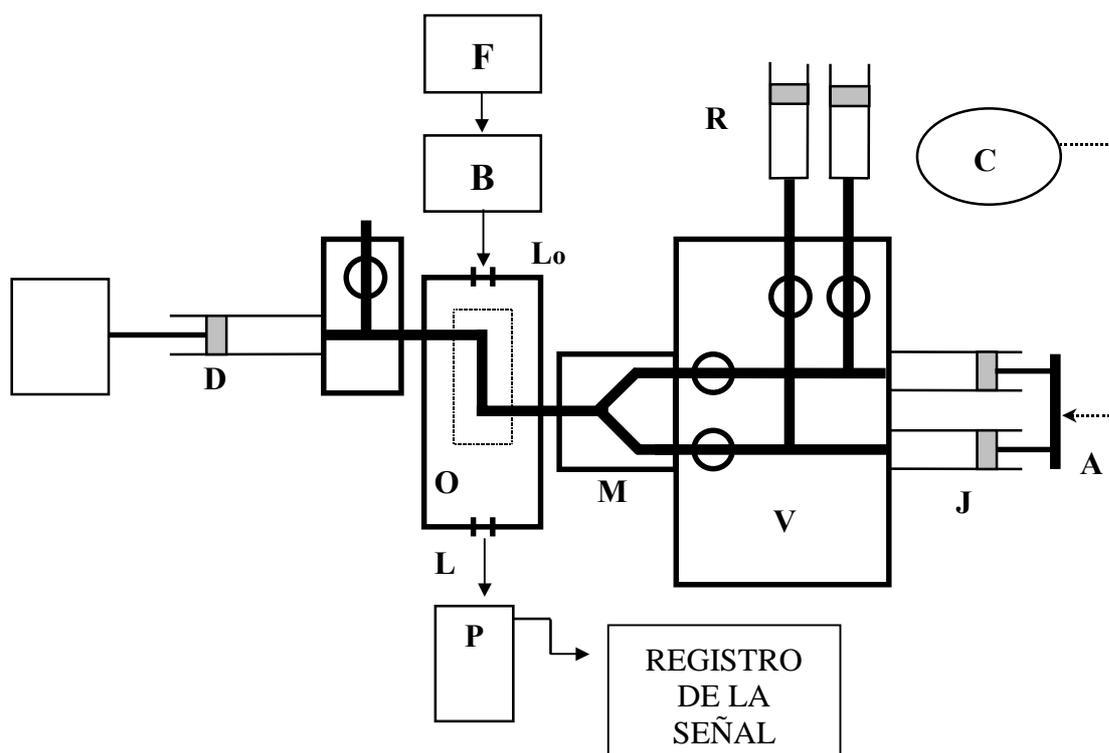


Figura 8.3. Esquema básico de un equipo de flujo detenido.

### 8.3. Determinación de producción de $^1\text{O}_2$ .

Se realizaron experimentos para determinar si algunos de los compuestos estudiados generan  $^1\text{O}_2$  fotoquímicamente. Estas medidas fueron realizadas durante una estada de trabajo en el Instituto Engler Bunte de la Universidad de Karlsruhe, Alemania, en el marco de un convenio de cooperación e intercambio existente entre los grupos de investigación del Dr. André Braun y del Dr. Alberto L. Capparelli.

El fundamento de la técnica empleada consiste en la medida de la luminiscencia del  $^1\text{O}_2$  a 1270 nm cuando se irradia, en forma continua, una solución en agua pesada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de la sustancia que se quiere investigar. Este método usa  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente ya que se obtienen señales mucho mayores que usando  $\text{H}_2\text{O}$ , con lo cual, el método aumenta su sensibilidad significativamente. La razón de este efecto, reside en que el tiempo de vida del  $^1\text{O}_2$  en  $\text{D}_2\text{O}$  es de 62  $\mu\text{s}$ , mientras que en  $\text{H}_2\text{O}$  es de sólo 3,8  $\mu\text{s}$ . Por consiguiente, en el sistema de irradiación continua que emplea la técnica se obtiene una mayor concentración estacionaria de la especie

excitada que se investiga.

El pD ( $-\log [D^+]$ ) fue medido con un pH-metro convencional, aplicando la siguiente corrección a cada medida (Salomaa P. et al., 1964).

$$pD = pH + 0,4.$$

Donde pH es el valor obtenido del peachímetro. El pD fue ajustado mediante el agregado de pequeños volúmenes de soluciones concentradas de hidróxido de sodio deuterado (NaOD) y de ácido clorhídrico deuterado (DCl). Las soluciones problemas fueron preparadas de modo tal que la absorbancia a la longitud de onda de excitación sea mayor a 0,8.

El equipo cuenta con una lámpara de excitación Xe/Hg Osram de 1kW. El haz de luz pasa a través de un filtro de agua y un monocromador ISA Jobin Yvon, de 6 nm de ancho de banda, antes de incidir en la celda que contiene la muestra. La longitud de onda de excitación fue 367 nm. La mencionada celda, de 1x1 cm, es de cuarzo y puede contener aproximadamente 3,5 ml de solución.

La luz emitida es colectada por un espejo y pasa primero a través de un chopper calibrado a 11 Hz; luego pasa por un filtro tipo cut-off de 1000 nm y por un filtro de interferencia de 1271 nm, para incidir, finalmente, en un fotodiodo de Germanio ubicado en ángulo recto respecto al haz incidente. Este dispositivo de detección trabaja a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , por lo cual consta de un sistema de refrigeración que emplea una mezcla de  $\text{CO}_2$  sólido y alcohol isopropílico para alcanzar dicha temperatura. El detector de Germanio está conectado a un registrador X-Y Omnigraphic de Houston Instrument y a un osciloscopio digital HP 54602B, 150 Mz.

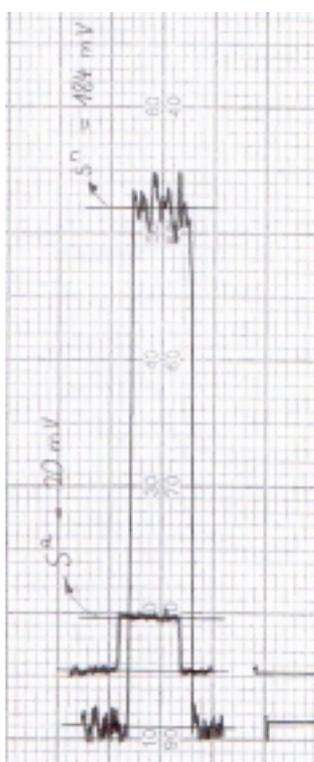
Cada medida se realizó registrando, primero, una línea de base sin irradiación, luego se iluminó la muestra y, por último, se realizó nuevamente una línea de base sin irradiación. Típicamente se registraron las señales durante 3 minutos para cada una de las tres etapas de la medida. En la figura 8.4 se muestra el registro de una señal. Además se tomaron los espectros de absorción antes y después de la irradiación en un espectrofotómetro Cary5 de Varian. Este control se realizó para determinar si durante la iluminación de la muestra se producía transformación química de la misma.

La diferencia entre el valor de la señal y la línea de base es proporcional a la concentración del  $^1\text{O}_2$  que se genera en la muestra como consecuencia de la irradiación. La magnitud de esta diferencia se compara con la correspondiente a una referencia para determinar el rendimiento cuántico de producción de  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) de una sustancia. La referencia

es una solución, también en D<sub>2</sub>O, de una sustancia cuyo Φ<sub>Δ</sub> es conocido. A la relación entre ambas señales se le debe introducir dos factores de corrección. Así pues, el cálculo se realiza aplicando la siguiente ecuación.

$$\Phi_{\Delta}^X = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^X}{Se^R} \cdot \frac{W^R \cdot \lambda^R}{W^X \cdot \lambda^X} \cdot \frac{(1 - 10^{-A^X})}{(1 - 10^{-A^R})} \quad (1)$$

donde Φ<sub>Δ</sub> es el rendimiento cuántico de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, Se es la diferencia entre la señal durante la irradiación y la línea de base, W es la potencia de la radiación, λ es la longitud de onda de excitación y A es la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación. El superíndice X indica a la muestra, mientras que el R indica a la referencia.



**Figura 8.4. Señales correspondientes a una solución de rosa de bengala en D<sub>2</sub>O (pD=11,4). Las dos señales corresponden a dos amplificadores diferentes con distinta sensibilidad.**

Debido a la diferencia entre la intensidad de la luz incidente (I<sub>0</sub>) a las longitudes de onda λ<sup>R</sup> y λ<sup>X</sup> a causa del espectro de emisión de la lámpara, es necesario introducir el factor de corrección I<sub>0</sub><sup>R</sup> / I<sub>0</sub><sup>X</sup>. Este factor puede escribirse como W<sup>R</sup> · λ<sup>R</sup> / W<sup>X</sup> · λ<sup>X</sup>. W se mide con una termopila Laser Instrumentation modelo 154. El otro factor que está presente en la ecuación (1), [(1 - 10<sup>-A<sup>X</sup></sup>) / (1 - 10<sup>-A<sup>R</sup></sup>)], se origina en la diferente cantidad de fotones

absorbidos por la muestra y por la referencia.

En las medidas realizadas en medio ácido se empleó fenalenona como referencia, excitándola a 367 nm. Este compuesto presenta un  $\Phi_{\Delta}$  igual a 0,975. Las soluciones fueron preparadas de tal manera que la absorbancia de las muestras fue igual al de la referencia ( $A_X=A_R$ ). Además, como en este caso,  $\lambda^X = \lambda^R$  la ecuación (1) se reduce a:

$$\Phi_{\Delta}^X = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^X}{Se^R}$$

En medio alcalino, en cambio, se utilizó rosa de bengala como referencia ( $\Phi_{\Delta} = 0,75$ ). En este caso este compuesto se excita a 547 nm, ya que a 367 su coeficiente de extinción molar es muy bajo. Por esta razón el factor que hace la corrección necesaria por la diferencia de intensidad a diferentes longitudes de onda ( $W^R \cdot \lambda^R / W^X \cdot \lambda^X$ ) no puede ser eliminado. Para estas medidas también se trabajó con absorbancias de la muestra y la referencia iguales a las respectivas longitudes de onda de excitación.

#### **8.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas como sistema de detección (HPLC-masas).**

Ciertas muestras fueron analizadas con la técnica HPLC-masas. Estos experimentos fueron realizados en el marco de un convenio de cooperación existente con los Dres. Edmondo Pramauro y Ezio Pellizetti del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Torino (Italia).

El equipo consta, básicamente, de un módulo convencional de HPLC del cual sale el eluido que es transportado hacia un espectrómetro de masas. El líquido pasa primero por un evaporador de infrarrojos en el cual se retira la mayor parte del disolvente y, luego, por dos cámaras diferenciales de vacío. Finalmente, la muestra ingresa en el espectrómetro de masas propiamente dicho. Primero se vaporiza en la cámara de ionización, la cual genera iones gaseosos de peso molecular una unidad menor al de la molécula analizada ( $M-1$ ) y fragmentos más pequeños. Por último ingresa en el analizador de masas en el cual se obtiene el correspondiente espectro de masas. En definitiva, los distintos componentes de la solución analizada son primero separados en la columna del cromatógrafo y luego se obtiene un espectro de masas para cada uno de ellos por separado.

Para la separación se empleó una columna RP-C18 Chrompack inert-sil ODS 3. La elusión se realizó empleando una solución de acetato de amonio 20 mM (pH= 3,3) (A) y metanol (B). Se operó en gradiente partiendo de una mezcla de 80% de A y 20% de B hasta llegar a 100% de B en 40 minutos.

Las muestras analizadas se prepararon mediante la técnica TLC preparativa descrita anteriormente (sección 7.3.2). Soluciones irradiadas fueron sembradas y las correspondientes bandas fueron recortadas y enviadas para su estudio. Antes de ser analizadas por HPLC-masas, las sustancias fueron separadas de la fase estacionaria como se explicó en la mencionada sección.