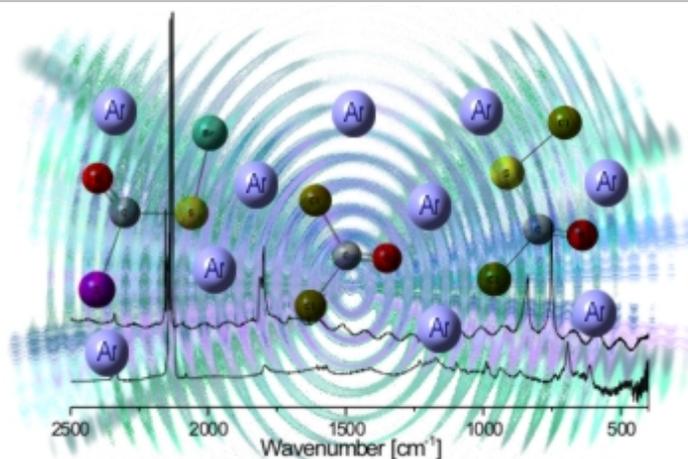


CAPÍTULO 1

Espectroscopía de matrices



1.1. Introducción

La técnica de aislamiento en matrices de gases inertes a temperaturas criogénicas data de los años 50 donde se propuso por primera vez y de manera simultánea por Whittle, Dows y Pimentel¹ y Norman y Porter,² el estudio de radicales libres en matrices de gases inertes. Sin embargo, fue el grupo de Pimentel el que profundizó y desarrolló la técnica estudiando especies reactivas en matrices de gases inertes. Existen diferentes fuentes bibliográficas disponibles que tratan acerca de la espectroscopía de matrices, muchas de las cuales se enfocan o especializan en diversos puntos de la técnica. Este capítulo está basado en la información recopilada en los siguientes libros *Matrix-Isolation Techniques: A practical Approach*,³ *Matrix Isolation Spectroscopy*,⁴ *Spectroscopy of Matrix Isolated Species*,⁵ y *Chemistry and Physics of*

Matrix-Isolated Species,⁶ así como diferentes artículos en revistas especializadas las cuales serán citadas cuando corresponda.

Los experimentos en matriz consisten en atrapar átomos o especies en un material rígido generalmente constituido por un gas o una mezcla de gases en altas diluciones los cuales al ser llevados a temperaturas criogénicas forman un ambiente rígido llamado matriz. La naturaleza rígida e inerte de la matriz en combinación con la baja proporción en la cual se encuentran las especies a estudiar (generalmente entre 1:200 a 1:1000), evitan la difusión en la matriz, previniendo las interacciones entre las especies atrapadas. Por otro lado la temperatura de trabajo (<15 K) inhibe las transiciones vibrorrotacionales de las especies y contribuye al aumento de la resolución de los espectros haciendo posible obtener espectros con un ancho de banda considerablemente menor al observado en otras fases, incluso en fase gaseosa, permitiendo diferenciar bandas con energías cercanas.

Las aplicaciones más interesantes de la técnica de matrices se pueden resumir en el estudio vibracional y estructural de especies reactivas, la detección y caracterización de intermediarios en las reacciones fotoquímicas, la generación de nuevas especies, el estudio de complejos moleculares e interacciones débiles y el estudio de conformaciones moleculares.

En este capítulo se profundiza en la técnica de la espectroscopía de matrices de gases inertes a temperaturas criogénicas ya que constituye una herramienta altamente valiosa que ofrece considerables ventajas sobre los métodos espectroscópicos convencionales.

1.2. Descripción del equipo

A continuación se describe el equipamiento básico necesario para realizar una experiencia en matriz. Dicho equipamiento consiste

principalmente en un sistema de enfriamiento de la matriz, un sistema de vacío, una ventana o lugar para depositar la muestra y formar la matriz y el sistema de generación y análisis de datos.

1.2.1. Sistema de refrigeración

Para alcanzar las temperaturas de trabajo se han utilizado y desarrollado diferentes sistemas criogénicos. En los primeros años del desarrollo de la técnica se utilizó helio líquido e hidrógeno líquido para alcanzar bajas temperaturas. Sin embargo, debido a la inflamabilidad del hidrógeno, además de las peligrosas mezclas explosivas que forma con el oxígeno se ha dado amplio uso al helio líquido en los sistemas refrigerantes. A continuación se detallan algunos sistemas de refrigeración.

1.2.1.1. Criostato de doble Dewar

El criostato de doble Dewar consiste en cuatro compartimentos de acero dispuestos en una serie de tubos concéntricos, dichos tubos contienen vacío, nitrógeno líquido, vacío y helio líquido respectivamente desde el más externo al más interno. Los compartimentos evacuados permiten que la transferencia de calor se vea disminuida. Además, el compartimiento de vacío que separa las camisas de nitrógeno y de helio líquidos posee un recubrimiento de cobre que permite menor transferencia de calor dando una menor pérdida por evaporación. Este tipo de criostatos pueden ser usados por periodos de hasta 6 horas sin reposición de helio siempre y cuando el sistema esté libre de fugas.

Entre las grandes desventajas de usar este tipo de criostatos se destacan el costo relativamente alto de los refrigerantes líquidos y el difícil manejo del dispositivo ya que su tamaño generalmente es grande.

1.2.1.2. Criostato de ciclo abierto

Este tipo de criostatos utiliza el principio de Joule Thomson (también llamado Joule-Kelvin) el cual consiste en hacer pasar un gas desde un contenedor a otro por medio de un estrangulamiento. En dicho proceso, el gas se expande adiabáticamente produciendo una disminución en la temperatura. Cuando el gas usado es helio es posible alcanzar temperaturas de hasta 4 K y puede manejarse fácilmente el rango de 4 a 300 K.

La unidad es similar al criostato de doble Dewar. La ventana para la muestra está conectada a un tubo frío, protegida de la radiación y rodeada por una camisa de vacío. La pileta formada de helio líquido enfría el recubrimiento de cobre y de esta manera enfría también la ventana en la cual se forma la matriz.

1.2.1.3. Criostato de ciclo cerrado

Este sistema de refrigeración se basa en el ciclo de refrigeración de Stirling en el cual el gas, normalmente helio, se comprime y luego se expande generalmente en dos etapas dentro del módulo principal, produciendo el enfriamiento en la etapa de expansión. El sistema consiste de una unidad compresora conectada a una unidad de expansión compacta o módulo principal por medio de líneas de alta y baja presión de helio, alimentación y retorno respectivamente. El módulo principal es pequeño pudiéndose adaptar fácilmente a la unidad de la matriz. Con este sistema es posible obtener temperaturas de alrededor de 10 K y a pesar que el refrigerador es inicialmente muy costoso, es fácil de manejar y pueden trabajar por mucho tiempo con un mantenimiento mínimo. Recientemente se han desarrollado también módulos de dos etapas capaces de operar alrededor de 4 K.

1.2.2. Ventana o receptor para la muestra

Para establecer el tipo de material del receptor sobre el cual se forma la matriz, es necesario determinar que clase de técnica espectroscópica se usará para analizar la matriz formada. Además es importante tener en cuenta que por la ubicación de la ventana en el módulo principal de la unidad (parte inferior) debe tener buen contacto térmico con el sistema refrigerante. Aunque muchos materiales son buenos conductores del calor a temperatura ambiente, a bajas temperaturas no resultan serlo. Se encontró entonces que el indio es un excelente material conductor a dicha temperatura y por tanto se usa un ensamble de indio para realizar el contacto necesario entre el receptor de la matriz y el sistema de refrigeración. A continuación se detallan los receptores o ventanas más usadas.

1.2.2.1. Ventanas para espectroscopía IR

Los mejores materiales a ser usados en espectroscopía IR de matrices son ventanas de 25 mm de diámetro de CsBr o CsI, acopladas en una ventana receptora de cobre o cobre niquelado, atornillado sobre el fondo del módulo principal del refrigerador. A diferencia de las ventanas de KBr y NaCl, las ventanas de CsBr o CsI no se desgastan tan fácilmente, además, son más flexibles haciéndolas menos frágiles y con menos riesgo de fractura al acoplarlas en el receptáculo de cobre.

1.2.2.2. Ventanas para espectroscopía Raman

Las técnicas espectroscópicas que no requieren la transmisión de la luz a través de la muestra tales como la espectroscopía Raman, generalmente se emplea una placa de metal unido en la parte inferior del sistema de refrigeración. En este caso el contacto térmico entre la placa metálica y el sistema de refrigeración es más eficiente. Entre los

materiales más usados se encuentran las placas pulidas de aluminio, ventanas de silicio y las placas de oro las cuales pueden también usarse en espectroscopía IR de reflexión.

1.2.2.3. Ventanas para usar en espectroscopía de absorción electrónica

Para la espectroscopía de absorción electrónica los materiales de primera elección son también las ventanas de CsBr o CsI, ya que también pueden usarse en espectroscopía IR y resultan convenientes cuando se quieren medir ambas espectroscopías en una misma matriz. Sin embargo, dichas ventanas tienen la desventaja de formar con el uso centros de color que absorben la luz UV. Además, las ventanas que están muy deformadas, no proporcionan buenos espectros en las longitudes de onda más cortas.

Las ventanas de CaF₂ proporcionan mejores resultados en los espectros UV visible. Asimismo, aunque la ventana es bastante quebradiza, una vez instalada resiste mucho tiempo de uso y además si se tiene una ventana perfectamente pulida, es posible realizar varias capas de la matriz sin perder la calidad de la misma. La ventana de CaF₂ puede usarse en espectroscopía IR sólo hasta alrededor de 840 cm⁻¹, por tanto, sólo es adecuada para ser empleado en combinación con la espectroscopía IR si no se necesita observar frecuencias por debajo de este valor.

Por otro lado el zafiro es un material alternativo para ser utilizado en espectroscopía UV visible. Sin embargo, aunque es más resistente que el CaF₂ es mucho más costoso.

1.2.2.4. Receptor para espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico (ESR)

Para esta espectroscopía el receptor usado para depositar la matriz es un tubo delgado generalmente de cobre o zafiro. Tanto el tubo para depositar la matriz como el compartimento de vacío deben ser lo suficientemente delgados como para que encajen en la cavidad del espectrómetro.

1.2.3. Sistema de vacío

Para el trabajo en espectroscopía de matrices es fundamental un sistema de vacío eficiente ya que este reduce las pérdidas por calentamiento y remueve las impurezas. Generalmente, resulta suficiente el uso de una bomba difusora de aceite apoyada por una bomba rotatoria y una trampa de nitrógeno líquido.

En un experimento típico de matrices la presión del sistema, y en especial la presión de la unidad, debe ser capaz de mantenerse por debajo de 10^{-6} torr. Un vacío más eficiente ($< 10^{-10}$ torr), requiere que las uniones estén cerradas con pastas duras y se requiere de muchas horas de evacuación.

1.2.4. Control de la temperatura

Existen diferentes dispositivos que permiten medir y controlar la temperatura de la matriz. Dichos dispositivos varían en material y en costo dependiendo del rango de temperatura que se desee medir. Los dispositivos más usados son las termocuplas, y aunque no son las más precisas tienen un bajo costo, de tamaño pequeño y con un sistema electrónico sencillo para la medida de la temperatura. Otro de los dispositivos usados es el diodo de silicio, el cual es más preciso en la medición pero tiene un costo alto y es más sensible a los campos

magnéticos. Los bulbos de vapor de hidrógeno son muy sensibles en el rango de 16 a 24 K, por ello se utilizan en combinación con las termocuplas ya que puede ser empleado como calibrador.

Por otro lado es útil para los experimentos de matrices tener la posibilidad de calentar lentamente la matriz con el fin de permitir una difusión lenta de las especies para lo cual se utiliza una pequeña resistencia de calentamiento.

1.2.5. Sistema para manejo de gases

Para la manipulación de los gases y la preparación de las mezclas que se depositarán en la matriz es necesario utilizar una línea de vacío. Si bien no se necesita de un montaje complicado, la línea de vacío debe estar dotada de un manómetro que permita conocer la composición de la mezcla de gases y entradas que permitan la toma de gas diluyente y de los analitos que compondrán la matriz.

1.2.6. Sistema para la generación de especies

La técnica de matrices tiene su mayor importancia en la posibilidad de estudiar especies altamente reactivas tales como intermediarios y radicales libres. Las bajas temperaturas de trabajo (<15 K) posibilitan la preservación de las especies, incluso aquellas altamente inestables y reactivas, por largos periodos de tiempo, facilitando su detección por técnicas sencillas como la espectroscopía infrarroja. Sin embargo, dichas especies deben formarse ya sea justo antes del depósito (durante su tiempo de vuelo desde el puerto de entrada hasta en la ventana fría) o cuando la matriz ya se ha formado sobre la ventana. Entre los métodos más conocidos para generar especies se encuentran la irradiación con luz UV, la pirólisis y las reacciones químicas. También se

utiliza la irradiación con rayos X, el bombardeo electrónico y protónico, el ultrasonido, la descarga de microondas y las descargas eléctricas.

1.2.6.1. Fotólisis

La fotólisis, como su nombre lo indica, consiste en la aplicación de luz, generalmente UV, para la generación de otras especies.

Para experimentos fotoquímicos en matrices se utilizan lámparas de arco de mediana y alta presión como las lámparas de Hg o las de Hg-Xe las cuales cubren un amplio rango del UV y el visible (200 a 800 nm), o lámparas de plasma de argón las cuales tienen una mayor intensidad en la región de 210 a 260 nm. Por otro lado existen lámparas de arco de baja presión, la más común es la lámpara de Hg de baja presión la cual produce luz monocromática de 254 nm. La tabla 1.1 resume el rango de longitud de onda de algunas lámparas.

Tabla 1.1 Rango de longitud de onda de algunas lámparas.

| Tipo de Lámpara | Rango [nm] |
|------------------------|-------------------|
| Hg de alta presión | 245 – IR cercano |
| Xe de alta presión | 150 – 900 |
| Hg-Xe de alta presión | 150 – 1400 |
| Deuterio | 170 – 400 |
| Xe | 147 – 210 |
| Kr | 125 – 180 |
| Ar | 107 – 160 |
| Ne | 75 – 100 |

Por otro lado cuando se usan fuentes de luz de amplio espectro resulta útil filtrar una determinada longitud de onda o rango que no se necesita para la excitación de la matriz. Estos experimentos se pueden realizar fácilmente con el uso de filtros ópticos. Tales filtros pueden

variar desde simples filtros de vidrio coloreados, hasta filtros con avanzados diseños de interferencia, los cuales permiten el paso selectivo de luz con cierta longitud de onda mientras se bloquea el paso del rango o longitud de onda indeseada. Los filtros pueden ser: filtros de corte de vidrio, filtros de interferencia, filtros de soluciones o espejos dicróicos, los cuales reflejan ciertas longitudes de ondas y transmiten otras.^{7,8}

En los apartados 1.5.4 y 1.5.5.1 se discutirán más a fondo las aplicaciones de la fotoquímica de matrices como medio para formar nuevas especies.

1.2.6.2. Pirólisis

El proceso de pirólisis en matrices, como su nombre lo indica, consiste en aplicar calor a la mezcla gaseosa justo antes de que ésta sea depositada sobre la ventana fría con el fin de producir una reacción o serie de reacciones térmicas y que los productos e intermediarios sean detectados por la técnica espectroscópica elegida. Generalmente el dispositivo más convencional consiste en colocar un tubo de pirólisis compacto de cuarzo o un material refractario como la pirofilita [$\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$], el cual se ensambla en uno de los puertos de entrada de la unidad apuntando directamente hacia la ventana fría, así los productos de la pirólisis alcanzarán directamente la ventana sin entrar en contacto con otras superficies y como el camino es tan corto la posibilidad de reacciones secundarias se ve disminuida.

Otro tipo de técnica más actual es la llamada pirólisis pulsada,^{9,10} el cual consiste de un capilar de aproximadamente 1 mm de diámetro interno y unos pocos centímetros de longitud, insertado dentro de un tubo de óxido de aluminio. El calentamiento lo proporciona un espiral de tungsteno o molibdeno que envuelve alrededor de un centímetro de dicho capilar y puede proporcionar temperaturas de hasta 2000 K. La mezcla se deja pasar por pulsos permitiendo que el gas pase rápidamente y se deposite en la matriz en el orden de los 2 milisegundos.

Una forma menos convencional de pirólisis para la formación de especies reactivas es con el uso de tubos de pirólisis que contienen diferentes reactivos químicos, los cuales al ser calentados y al entrar en contacto con el material de interés, producen la reacción.

1.2.6.3. Celdas Knudsen

Consiste en una celda elaborada de un metal o algún material refractario, el cual posee un orificio por donde pasa el flujo de gas cuando la celda se calienta. Dicha técnica se usa en matrices para depositar analitos poco volátiles en la matriz, para realizar reacciones a alta temperatura y analizar los productos que condensan en la matriz y para generar flujo de átomos metálicos.

1.2.6.4. Descarga de microondas

Pequeñas descargas de microondas pueden usarse también para excitar una muestra y generar otras especies. Las descargas de microondas son muy drásticas y se usa generalmente para producir átomos los cuales reaccionan con otras especies.

1.2.7. Sistema de recepción y análisis de datos

Para la recopilación y el análisis de la información, se requiere el uso de técnicas espectroscópicas, las cuales entregan la información en forma de espectros, interpretados según la naturaleza de la técnica y el fenómeno medido.

1.3. Técnicas espectroscópicas

Existen diversas técnicas espectroscópicas compatibles con el estudio en matrices a bajas temperaturas. La técnica más usada es, sin duda, la espectroscopía infrarroja, debido a la valiosa información que proporciona, su fácil acceso y la simpleza del montaje para el estudio de matrices. Otros tipos de espectroscopías se han implementado para el estudio de matrices a temperaturas criogénicas tales como la espectroscopía Raman, espectroscopía UV visible, resonancia de espín electrónico, resonancia magnética nuclear, Mössbauer y varios tipos de espectroscopía de emisión. A continuación se tratarán las técnicas espectroscópicas más usadas.

1.3.1. Infrarrojo de especies aisladas en matrices

El uso de la espectroscopía IR de especies en condiciones de matriz fue la técnica usada por Whrittle, Dows y Pimentel en 1954.¹ Además fue la técnica empleada por el grupo de Pimentel para las subsecuentes investigaciones y desarrollo de esta técnica.

El avance de la tecnología ha permitido el desarrollo de espectrofotómetros de infrarrojo por transformada de Fourier y el mejoramiento de las fuentes de láser infrarrojos. Ambos avances han contribuido al mejoramiento de la resolución, lo cual, en combinación con las características que proporciona la técnica de matrices permiten resolver más claramente el espectro, haciendo más fácil su interpretación.

1.3.2. Raman de especies aisladas en matrices

El uso de la espectroscopía Raman para el estudio vibracional de especies en condiciones de matriz comenzó en 1965 con el estudio de CH₄ en matriz de kriptón.¹¹ Otros trabajos no se hicieron esperar y en

1971 se reportó el estudio por espectroscopía Raman de otras especies en condiciones de matriz.¹²

La utilización de la espectroscopía Raman en matrices es altamente valiosa sobre todo para el estudio de aquellas moléculas que tienen modos vibracionales poco o nada activos al infrarrojo, ya que se presenta como un complemento a dicha técnica. Si bien los modos vibracionales inactivos en infrarrojo pueden activarse como consecuencia de la matriz, un espectro Raman no dejaría dudas a la hora de asignar dichas vibraciones.

1.3.3. Espectroscopía electrónica de especies aisladas en matrices

La espectroscopía de absorción electrónica fue la primera técnica espectroscópica empleada para caracterizar especies inestables en condiciones de matriz, debido a su alta sensibilidad.¹³ Sin embargo, su uso es limitado ya que pueden caracterizarse especies pequeñas, mientras que para especies más grandes las bandas de absorción son más anchas haciendo más difícil la asignación.

La espectroscopía de absorción electrónica ha servido como herramienta para incursionar en otras técnicas las cuales pueden proveer más información estructural.

1.4. Preparación de la matriz

Para la preparación de mezcla de gases para la formación de la matriz es indispensable, como se mencionó anteriormente, contar con un sistema de manejo de gases tal como una línea de vacío, así como los materiales con los adaptadores necesarios para manipular muestras gaseosas.

Por otro lado, para la preparación de las soluciones gaseosas es necesario contar con gases diluyentes de alta pureza ya que debido a la sensibilidad de la matriz y la alta proporción del gas diluyente, cualquier impureza que este contenga, puede interferir y producir absorciones equivalentes a la del analito de interés. De igual manera la muestra del analito o analitos de interés, deben contar también con una alta pureza.

1.4.1. Gases para la formación de la matriz rígida

La espectroscopía de matrices exige un esfuerzo adicional en la pureza de los componentes que contenga la matriz, y como se mencionó antes, una simple impureza del gas que formará la matriz rígida puede interferir, ya que la proporción de los analitos es muy baja. La elección del gas depende del propósito del experimento y en condiciones óptimas debe formar a las temperaturas de trabajo, sobre la ventana fría, una película transparente y vítrea con buenas propiedades espectroscópicas. Dependiendo de la naturaleza de la matriz, los gases diluyentes pueden ser químicamente inertes (Ar, N₂, Kr, etc), donde el gas proporciona únicamente el aislamiento de las especies en un ambiente rígido, o reactivos (O₂, CO, CH₄, etc), donde el gas que forma el ambiente rígido interacciona con las especies en la matriz, bien sea por reacción inducida por un factor externo como la luz o por reacción química directa con otras especies reactivas formadas dentro de ésta. De un mismo modo, es común realizar, para diferentes propósitos, mezclas de gases, bien sean inertes (Ar/N₂), reactivas (CO/CH₄) o inertes/reactivas (Ar/CO).

Los gases Ar y N₂ son en general los gases de primera elección para la realización de experiencias en matrices debido a su bajo costo (especialmente el N₂) y las temperaturas de trabajo no tan exigentes como cuando se trabaja con neón, donde se requiere una temperatura menor a 6 K. El Kr y el Xe son en general más costosos que el Ar aunque puede trabajarse a mayores temperaturas sin riesgo de evaporación de la matriz.

1.4.2. Relación molar o relación de la matriz

Como se ha tratado en varios apartados de éste capítulo, para obtener las condiciones de matriz, en la cual la especie o especies aisladas estén atrapadas por el gas inerte y donde la probabilidad de interacciones intermoleculares sean bajas, es necesario que la dilución sea alta. En general los trabajos en matrices se realizan en proporciones especie/gas que van desde 1/200 hasta 1/1000. En ocasiones pueden emplearse también relaciones más bajas o más altas dependiendo del requerimiento en algún estudio específico.

1.4.3. Mezcla de la especie o las especies con el gas de la matriz

Para la preparación de la mezcla entre la especie o especies a estudiar y el gas diluyente se debe conocer al menos la volatilidad de la especie de interés, ya que dependiendo de esta característica se elige el método para realizar la mezcla.

Cuando se trata de una mezcla volátil o al menos con algo de presión de vapor a temperatura ambiente (mínimo 0,5 torr), la mezcla puede ser preparada en una línea de vacío en fase gaseosa usando métodos manométricos estándares. Es decir, se realiza una premezcla en fase gaseosa en un balón para gases de al menos 1 litro de volumen el cual se conecta directamente en el puerto de entrada de la unidad. Balones para gases de menor volumen son empleados generalmente cuando se trabaja con sustancias muy costosas, mientras que un balón de un volumen más grande se usa cuando la sustancia de interés tiene poca presión de vapor.

Para el análisis de sustancias menos volátiles la preparación de la mezcla resulta algo más complicada. En estos casos se busca vaporizar la muestra previo a la deposición sobre la ventana, por ejemplo por medio del calentamiento controlado del analito, sin embargo, se debe tener cuidado de no provocar la descomposición de la muestra y para ello se

debe conocer la naturaleza y estabilidad térmica de la misma. El gas diluyente se hace pasar sobre la muestra a velocidad controlada realizando una mezcla *in situ*. Con este método se hace difícil conocer la relación molar de los componentes de la matriz, pero resulta útil para el estudio de sustancias poco volátiles.

Para muchos experimentos en matrices donde la muestra es poco volátil aunque no sea importante conocer la relación molar en la matriz, resulta conveniente, si es posible, tener una idea de la relación. Groner y colaboradores en 1973,¹⁴ reportaron un método para conocer la relación molar en la matriz utilizando un láser pequeño (He-Ne de 2mW). La luz del láser se dirige hacia la ventana fría y se recolectan los datos de la luz reflejada con un radiómetro. Cada capa en la matriz produce una interferencia limitando la intensidad de la luz reflejada. Entonces, si se conoce la densidad del gas diluyente se puede realizar una medida de los mmoles por hora depositados en la ventana. Es recomendable el uso de una válvula micrométrica de aguja para controlar el flujo de gas y estandarizar las condiciones de la deposición pudiéndose estimar el número de moles de analito depositados sobre la ventana por una simple medida del tiempo.

1.4.4. Métodos de deposición de matrices

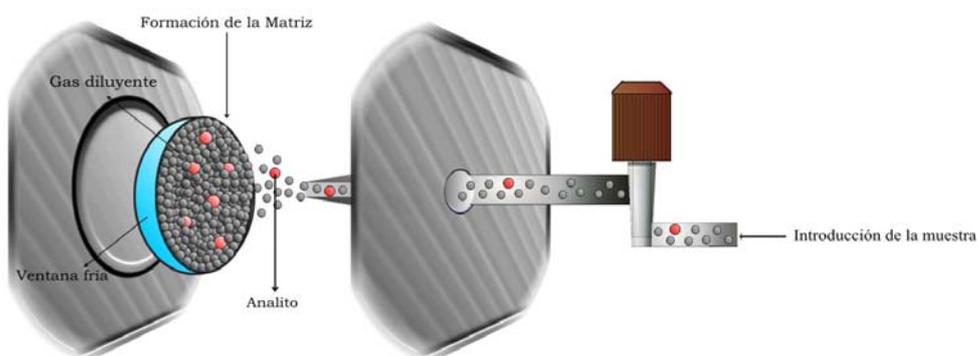


Figura 1.1. Formación de la matriz sobre la ventana fría

Para la deposición en la matriz se utilizan dos técnicas, la técnica de deposición por pulsos y la técnica de deposición continua. A continuación se detallarán cada una de ellas. La figura 1.1 ilustra el concepto de formación de la matriz sobre la ventana fría.

1.4.4.1. *Deposición por pulsos*

La técnica de deposición por pulsos¹⁵ está basada en una serie de condensaciones rápidas sobre la ventana fría. Este método de deposición requiere de un segmento o espacio, previo al puerto de entrada de la unidad, regulado por dos llaves, las cuales permiten o impiden el paso desde el contenedor de la mezcla gaseosa hacia la ventana fría.

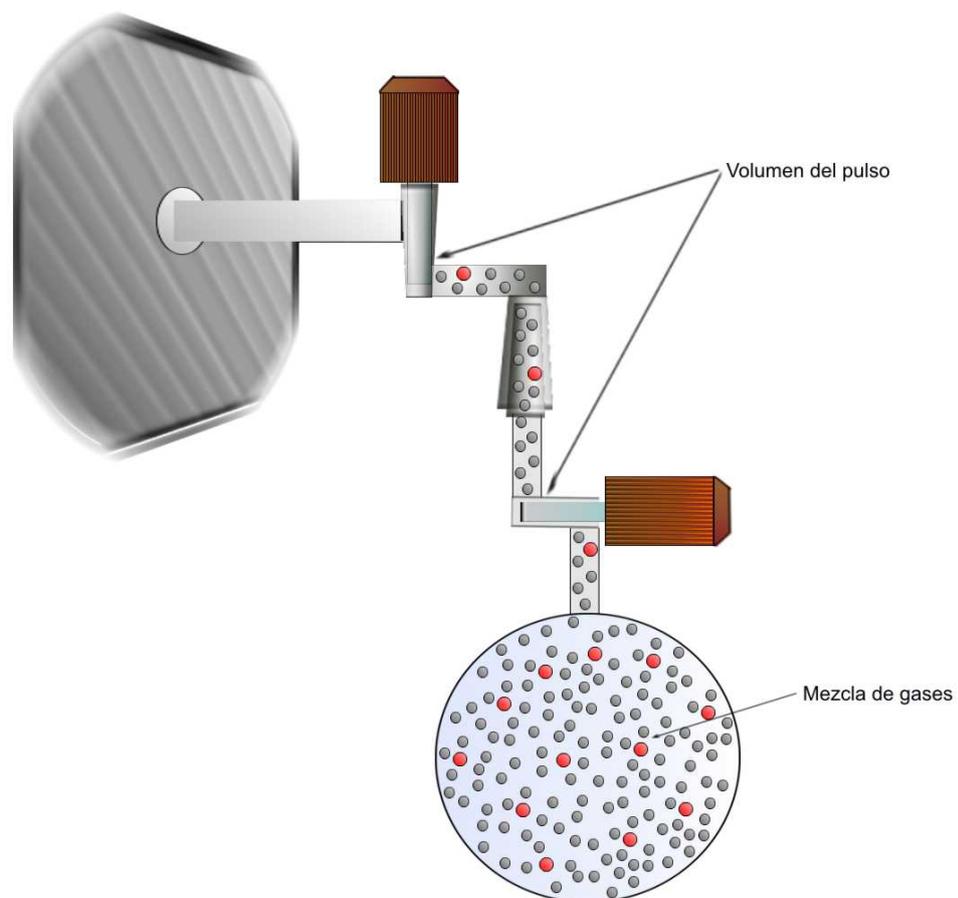


Figura 1.2. Ilustración del método de deposición por pulsos usado en la técnica de matrices

El depósito se realiza expandiendo primero la mezcla gaseosa desde el balón que lo contiene hacia el segmento vacío, y luego, por apertura de la llave más próxima a la unidad, se permite el paso de la mezcla contenida en dicho segmento hacia la ventana fría. Este procedimiento se considera como un pulso y se repite tantas veces como el experimento lo requiera. La figura 1.2 ilustra el concepto de pulsos en la técnica de matrices.

La técnica de deposición por pulsos es empleada cuando se prepara la mezcla gaseosa con anterioridad, es decir, cuando se realiza una premezcla de los componentes gaseosos que formarán la matriz. Presenta varias ventajas tales como una mejor calidad de la matriz formada con mejores propiedades ópticas ya que se forman matrices más transparentes. Además, los efectos causados por la presencia de gases residuales en la matriz, tales como aire y vapor de agua, se ven reducidos.

1.4.4.2. Deposición continua

La técnica de deposición continua consiste en la adición lenta pero ininterrumpida de los componentes de la matriz sobre la ventana fría. En esta técnica se utiliza una válvula de aguja la cual regula el flujo de gas, permitiendo el paso muy lento de éste. Con este método de deposición los componentes de la matriz pueden estar o no premezclados, por lo tanto constituye la herramienta más útil y adecuada para el depósito de sustancias poco volátiles y es esencial cuando se deben emplear especies muy reactivas. La velocidad en el depósito puede variar de acuerdo al tipo de experimento realizado, pero generalmente se utiliza un rango de entre 1 y 10 mmol por hora. De este modo, la formación de una matriz puede requerir largos periodos de tiempo, siendo una de las principales desventajas de este método.

1.4.5. Remoción de la matriz

Una vez terminado el experimento de matriz, es necesario remover las capas de la matriz sobre la ventana. La remoción se fundamenta básicamente en el calentamiento de la ventana fría, ya sea permitiendo el calentamiento lento cuando se desconecta el sistema de enfriamiento (calentamiento de forma natural) o por aplicación de calor adicional sobre la ventana. Para sistemas en que se usa un controlador de temperatura es posible aumentar controladamente la temperatura de la ventana hasta lograr la evaporación de la matriz ya sea con el sistema de refrigeración encendido o apagado. Sin embargo, si se prefiere apagar el sistema de enfriamiento, no se recomienda aplicar calor a la ventana, salvo si así se requiere, debido a que las resistencias que producen el calentamiento pueden verse afectadas.

Por otro lado, se recomienda realizar la evacuación de la matriz mediante el sistema de vacío proporcionado por la bomba mecánica porque de este modo se evita que pueda condensar agua sobre la ventana fría, siendo perjudicial para las ventanas de sales solubles tales como KBr, CsBr y CsI. Además se protege la bomba difusora de sustancias que puedan resultar agresivas.

1.5. Experimentos en matrices

Los experimentos realizados en matrices dependen de las necesidades y propósitos deseados. La principal utilidad de la espectroscopia de matrices radica en el estudio de especies inestables, aunque esto no quiere decir que los estudios sobre especies estables no sean interesantes. A continuación se presenta un esbozo de los estudios más usados que pueden realizarse con esta técnica.

1.5.1. Estudio de moléculas estables

El estudio de moléculas estables en matrices de gases inertes se lleva a cabo utilizando excesos del gas inerte para disminuir la probabilidad de interacción intermolecular, teniendo en cuenta que la interacción con el gas inerte utilizado es baja. La condensación rápida de la mezcla gaseosa sobre la ventana fría hace presumir que las características observadas en la matriz son las mismas que existen en estado gaseoso a la temperatura previa a la deposición.

El estudio de moléculas estables en matrices resulta útil y conveniente para determinar la estructura molecular de una especie, para el análisis de mezclas, para mejorar la calidad de un espectro obtenido de manera convencional y sobre todo para obtener espectros de especies cuyos espectros son complicados en otras condiciones. Por ejemplo, cuando en un espectro IR, aun en fase gaseosa, de una sustancia, hay absorciones con energías muy cercanas, generalmente se presenta una banda envolvente, ensanchada o con hombros, haciéndose difícil distinguir una absorción de otra. El espectro de matrices de gases inertes se caracteriza porque las absorciones se presentan como bandas delgadas y agudas, debido a que las transiciones vibrorrotacionales se encuentran prácticamente inhibidas a las temperaturas de trabajo.

1.5.2. Estudio de complejos moleculares

La técnica de matrices resulta muy adecuada para el estudio de interacciones débiles tales como los complejos moleculares de Van der Waals, gracias a la alta sensibilidad que proporciona esta técnica.

Para el estudio de complejos pueden emplearse tres métodos. El primero consiste en la preparación y el depósito de manera separada de las especies a estudiar sobre la matriz, sin embargo, ambas mezclas gaseosas se depositan simultáneamente en la matriz por el método de deposición lenta, permitiendo el encuentro entre las especies justo antes

de entrar en contacto con la ventana fría. El segundo método consiste en la realización en fase gaseosa de la mezcla de las especies de interés diluidas en el gas elegido para la formación del ambiente rígido. De esta manera las especies interaccionan en estado gaseoso formando los complejos, y la matriz refleja el equilibrio existente en estado gaseoso a la temperatura en la cual se encontraba la mezcla justo antes de la deposición. De un mismo modo, la realización de la premezcla permite realizar ya sea la deposición continua o la deposición por pulsos. Para el estudio de complejos, donde la calidad de la matriz es importante, ya que en general las absorciones son poco intensas y los corrimientos debidos a la formación de complejos pueden ser muy pequeños, resulta generalmente conveniente realizar la deposición por pulsos ya que como se mencionó antes, con dicho método se obtiene una mejor calidad de la matriz, con mejores propiedades ópticas y donde la probabilidad de que condense aire o agua sobre la ventana es menor. Una ventaja adicional vinculada a la deposición por pulsos es el empleo de un dispositivo más sencillo para el depósito de la mezcla gaseosa.

El tercer método utilizado para el estudio de complejos moleculares, especialmente usado en este trabajo, es la formación de complejos como consecuencia de la irradiación fotoquímica de un compuesto depositado en la matriz. En ese caso, como los fragmentos que se forman fotoquímicamente se encuentran dentro del mismo sitio de matriz, la interacción entre ellos se ve favorecida.

1.5.3. Estudio de equilibrios conformacionales

El estudio vibracional de especies en matrices a temperaturas criogénicas resulta especialmente conveniente cuando se espera que la especie pueda adoptar diferentes conformaciones las cuales están en equilibrio a una determinada temperatura. Generalmente las absorciones en el IR, correspondientes a cada conformación, presentan energías muy cercanas, las cuales no pueden ser observadas en un espectro IR común en fase líquida o gaseosa, salvo aquellas absorciones que presentan gran

diferencia de energía y que son relativamente intensas. Dado que en el espectro IR de matrices el ancho de banda disminuye notablemente, es posible entonces observar las absorciones correspondientes a cada conformero.

Para el estudio del equilibrio conformacional en matrices, se pueden realizar diferentes experimentos que permiten ver tanto las absorciones correspondientes a las conformaciones menos estables como la variación de las mismas ante un fenómeno externo como la luz (irradiación de la matriz) o la temperatura (antes de la deposición sobre la ventana).

El experimento más común consiste en variar la temperatura de la mezcla gaseosa sometiéndola a diferentes temperaturas previo a la deposición. Se observa en la matriz el aumento y disminución de las intensidades de las bandas, asignando de este modo, las absorciones que aumentan al incrementar la temperatura a la conformación menos estable y las que disminuyen al conformero más estable.

Otro de los métodos para observar el cambio conformacional y poder realizar una asignación más confiable de las absorciones correspondientes a cada conformación, consiste en irradiar la matriz en tiempos cortos con el fin de lograr la conversión de un conformero a otro con la irradiación. Puede suceder que también se produzca la fotodescomposición de la sustancia, sin embargo, las absorciones existentes al tiempo cero de irradiación que muestren un incremento a expensas de otras que disminuyen pueden relacionarse con las absorciones correspondientes a otras conformaciones menos estables. Por eso, para evitar la fotólisis de la muestra, es recomendable realizar periodos muy cortos de irradiación o buscar una radiación selectiva que le proporcione energía a la sustancia estudiada pero que no genere su descomposición.

1.5.4. Fotoquímica de matrices

La fotoquímica de matrices es una valiosa herramienta con la que es posible estudiar los mecanismos por medio de los cuales se llevan a cabo los procesos fotoevolutivos ya que la técnica de matrices posibilita la detección de intermediarios que hacen parte del proceso. Esta técnica se fundamenta en el sometimiento de una especie a la radiación adecuada con el fin de conocer su comportamiento en dichas condiciones, lográndose por ejemplo, el aislamiento de confórmeros constitucionales y rotacionales así como su fotoevolución a otras especies, proporcionando información acerca de los intermediarios y productos del proceso, muchos de ellos desconocidos e inestables. El estudio e identificación de las especies que se forman como consecuencia de la irradiación posibilita la determinación de canales de fotoevolución, permitiendo de esta manera el diseño de mecanismos de evolución fotoquímica.

1.5.5. Reacciones fotoquímicas en matrices

La reacción fotoquímica en matrices de gases inertes es uno de los métodos más usados para generar nuevas especies, teniendo como ventaja la posibilidad de estudiar procesos bimoleculares. Además, con esta técnica se hace accesible la obtención y el estudio de aquellas moléculas altamente inestables que sólo pueden ser obtenidas y conservadas a muy bajas temperaturas. Además, gracias a que en condiciones de matriz las especies se mantienen por largos periodos de tiempo, se pueden usar una o varias técnicas espectroscópicas para analizar la matriz.

La técnica se fundamenta en que cuando se mezclan dos especies diferentes y se diluyen con un gas, se espera que en un mismo sitio de matriz se encuentren las dos especies de interés para la reacción. Además, que por la aplicación de luz, se genere la interacción y reacción entre ambas especies. Para reacciones fotoquímicas en matrices generalmente se usan mezclas más concentradas, lo cual aumenta la

probabilidad de que se encuentren dos especies de interés en un mismo sitio.

En un experimento convencional de este tipo los componentes de la mezcla de reacción son depositados sobre la ventana fría. Luego de registrar el espectro de la matriz sin irradiar, se comienza la excitación de la matriz con la fuente elegida para el experimento, detectando los cambios sufridos en ésta por medio de una simple medición con una técnica espectroscópica.

Existen tres técnicas para realizar la reacción y el seguimiento de los cambios en la matriz las cuales dependen de los propósitos de la experiencia. El primero y más simple de los métodos consiste en irradiar la matriz por un periodo de tiempo determinado al final del cual se mide el espectro. Sin embargo, con este método se pierde información acerca del mecanismo del proceso fotoevolutivo, ya que sólo se detectan los productos finales de la fotorreacción, siendo poco probable que se detecten los productos intermediarios. De un mismo modo, si no se dispone de un sistema de irradiación probado y estandarizado, una irradiación prolongada, puede incurrir en el calentamiento de la ventana evaporando la matriz o permitiendo la difusión de los componentes sobre la ventana.

El segundo método, aunque un poco más laborioso, permite un mayor control de los cambios que sufre la matriz. En este caso se somete la matriz a irradiaciones consecutivas por periodos de tiempo determinados, los cuales son generalmente cortos en los primeros periodos y se van incrementando paulatinamente. El espectro de la matriz debe medirse entre tiempo y tiempo de irradiación, detectándose el aumento de la intensidad de las absorciones nuevas y la disminución de la intensidad de las absorciones existentes. Así por ejemplo, una reacción determinada se inicia con 1 minuto de irradiación, luego de medido el espectro se irradian 2 minutos más para un total de 3 minutos, luego 3 minutos más para un total de 6 y así sucesivamente. Generalmente se observan cambios rápidos durante los primeros

minutos y luego sobreviene una meseta la cual determinará el fin de la experiencia. Pero es en medio de estos cambios rápidos donde se puede obtener información valiosa para poder inferir un determinado mecanismo. El tercer método consiste en irradiar la matriz de manera continua y realizar la detección espectroscópica de manera simultánea a la irradiación.

1.5.6. Otras reacciones

La formación de otras especies en matrices puede ser impulsada también por la generación de especies reactivas justo previo a la deposición sobre la ventana, las cuales reaccionan con otra especie de interés ya sea durante el tiempo de vuelo desde el puerto de entrada de la unidad y la ventana o una vez formada la matriz, cuando se continua el experimento con irradiación. En el primero de los casos, se realiza una codeposición simultánea de las dos especies diluidas cada una en el gas elegido para la formación del ambiente rígido, sin embargo, una o ambas especies de interés se tratan previamente para producir especies reactivas, por ejemplo con irradiación con luz UV visible en vacío, pirólisis, descarga microondas, etc., y de este modo, las especies interaccionan y reaccionan previo a la fijación sobre la ventana. En este punto podría también continuarse con irradiación sobre la ventana, todo depende de los propósitos puntuales en el experimento.

Puede suceder que dos especies muy reactivas reaccionen sin necesidad de la aplicación de un procedimiento previo al depósito, por tanto se preparan las mezclas gaseosas por separado y se depositan simultáneamente permitiendo el encuentro de las especies en el camino hacia la ventana, o simplemente una vez formada la matriz, permitir la difusión y la interacción de las especies llevando la matriz a una temperatura levemente superior a la de trabajo (por ejemplo 35 K por 10 minutos).

1.6. Ventajas de la espectroscopía de matrices

La técnica de aislamiento en matrices de gases inertes ha abierto una importante vía de estudio de especies tanto conocidas como desconocidas ofreciendo grandes ventajas sobre los métodos convencionales, tales como la poca cantidad de muestra que se necesita para el análisis ya que es una técnica altamente sensible. De un mismo modo, la baja concentración de la muestra de interés sumado al hecho de que se encuentra diluido en grandes proporciones de gas inerte (a menos que los propósitos del experimento requieran otra cosa), disminuye la probabilidad de que ocurran colisiones moleculares y la temperatura extrema de trabajo (generalmente menor de 15 K) proporciona un ambiente rígido previniendo la difusión de las especies de interés. En los apartados anteriores de este capítulo se han mencionado diversas características de la técnica y sus ventajas, las cuales se resumen a continuación.

1. La matriz formada con gases inertes de alta pureza proporcionan una transparencia efectiva en una amplia región del espectro.
2. La espectroscopía de matrices resulta conveniente cuando se pretenden realizar estudios que involucran la utilización de varios métodos espectroscópicos.
3. La técnica de aislamiento en matrices posibilita el estudio de equilibrios conformacionales o tautoméricos.
4. Las perturbaciones sufridas por la especie aislada, debidas a su interacción con los átomos del gas noble son mínimas.
5. La reducción de la dispersión de los niveles de energía de la especie o especies en estudio, que conjugado con la temperatura extremadamente baja y la rigidez de la matriz, inhibe las transiciones en los estados rotacionales, conduciendo a una reducción de la anchura intrínseca de las bandas de los espectros vibracionales conseguidos en estas condiciones.

6. El aumento de la resolución debido a la supresión de la estructura rotatoria.
7. Las especies existentes en el ambiente rígido a la temperatura de trabajo presentan alta estabilidad, lo cual hace posible mantenerlas inalteradas por largos periodos de tiempo para su estudio. Los principales factores que proporcionan dicha estabilidad son:
 - a. La baja temperatura, la cual reducen al mínimo la energía térmica disponible, disminuyendo la posibilidad de que ocurran reacciones térmicas o de disociación.
 - b. La baja concentración del compuesto de interés la cual reduce al mínimo la posibilidad de encuentro o colisión entre la especie o especies en estudio.
 - c. El ambiente rígido de la matriz el cual inhibe los movimientos rotacionales de las partículas.
8. La técnica permite detectar y caracterizar intermediarios de las reacciones resultantes del tratamiento de la mezcla antes o después de la deposición con diferentes factores tales como luz UV visible, temperatura, microondas, etc.

1.7. Efectos de matriz

Con el fin de realizar una interpretación correcta del espectro de matrices, es necesario entender los diferentes efectos que pueden observarse en la matriz. Estos pueden ser tanto efectos físicos, como químicos y de sitios de matriz (también llamados de caja), aunque, afortunadamente, gracias a la baja interacción entre las especies de interés y el gas inerte, se espera que las bandas IR presenten sólo pequeños corrimientos en comparación con las absorciones observadas en fase gaseosa.

1.7.1. Efectos físicos

Como se mencionó antes, uno de los principales efectos que sufren las especies en condiciones de matriz, es la inhibición de las transiciones en los estados rotacionales. La figura 1.3 ilustra el espectro IR en estado gaseoso del CO₂ en la región 2400 a 2280 cm⁻¹ en comparación con el espectro de esta misma molécula en una matriz de Ar 1 en 10000 a 15 K, medida con una resolución de 0,125 cm⁻¹. Como se observa en la figura el espectro de la matriz muestra dos bandas delgadas en comparación con el espectro IR en fase gaseoso donde se observan las ramas P y R, resolviéndose claramente la estructura fina rotacional, las cuales se extienden considerablemente casi 100 cm⁻¹. Este ancho de banda puede solapar cualquier otro producto cuya absorción recaiga en esa zona. El efecto de la matriz, lleva a la disminución del ancho de banda por inhibición de la estructura fina de rotación. Sin embargo, se puede observar la aparición de otras bandas en el espectro de matriz, las cuales pueden ser no esperadas.

Los efectos físicos que pueden ocasionar la aparición de absorciones extras en el espectro son la resonancia de Fermi, las interacciones variables entre el gas que forma el ambiente rígido y el analito y la agregación molecular.

La resonancia de Fermi, puede hacerse evidente en el espectro de matriz. Así también las interacciones variables entre el gas que forma el ambiente rígido y el analito aumentan cuando este último puede ocupar los huecos producidos como consecuencia de la ausencia de los átomos del gas diluyente en determinados puntos de la matriz. Dichos huecos pueden variar en tamaño y forma generando diversos ambientes para la sustancia de interés (ver figura 1.4) y son diferentes dependiendo del gas o mezcla de gases diluyentes utilizados. De este modo, se generan pequeñas variaciones en la energía de la molécula, evidenciando en el espectro absorciones extras que varían en número, intensidad y energía dependiendo del gas diluyente utilizado. Algunos modos vibracionales pueden verse más afectados que otros, por esta razón es erróneo

interpretar que todos los modos vibracionales de una especie van a ser observados con un mismo patrón de desdoblamiento. La figura 1.5 ilustra las absorciones observadas para el modo vibracional del $\text{ClC(O)OCH}_2\text{CH}_3$ al variar el gas diluyente de Ar a N_2 .

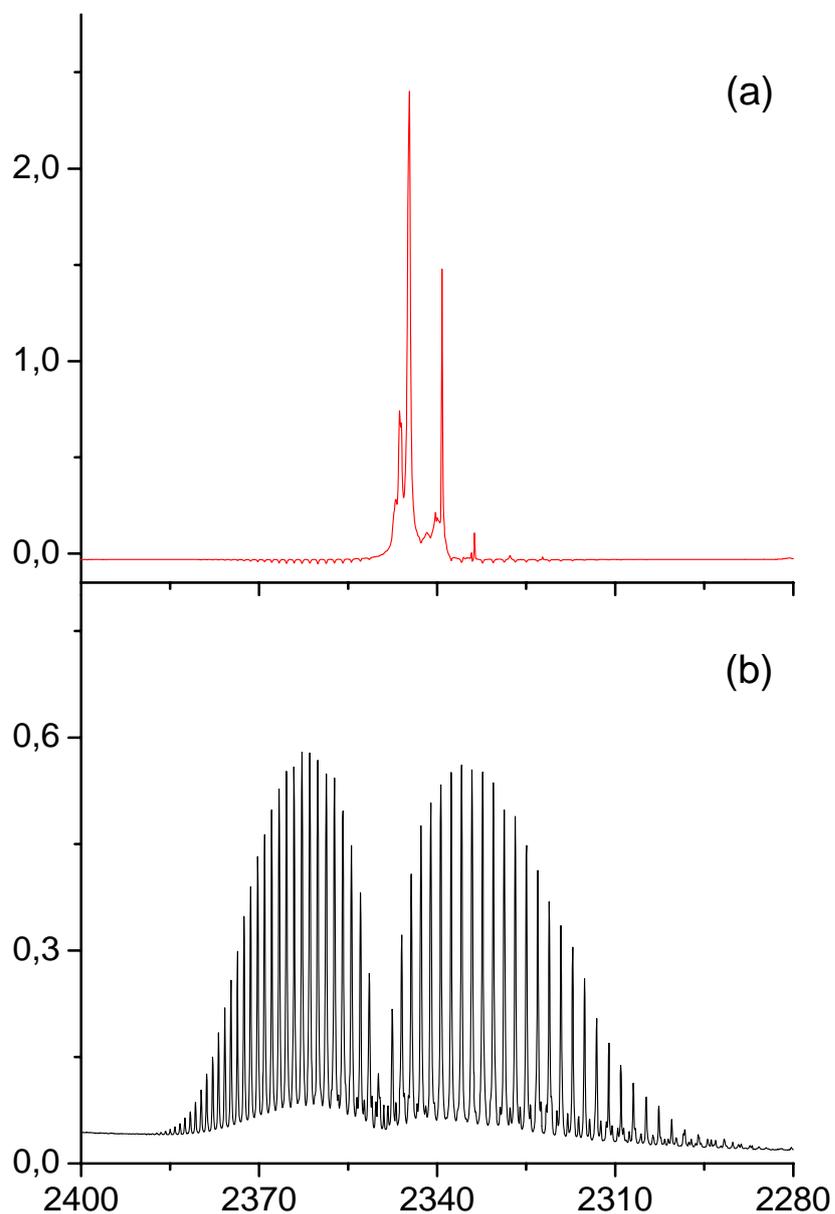


Figura 1.3. Comparación del espectro IR en la región de 2400 a 2280 cm^{-1} de una matriz de Ar dopada con CO_2 a ~ 15 K (a), en comparación con el espectro del CO_2 en fase gaseosa (b)

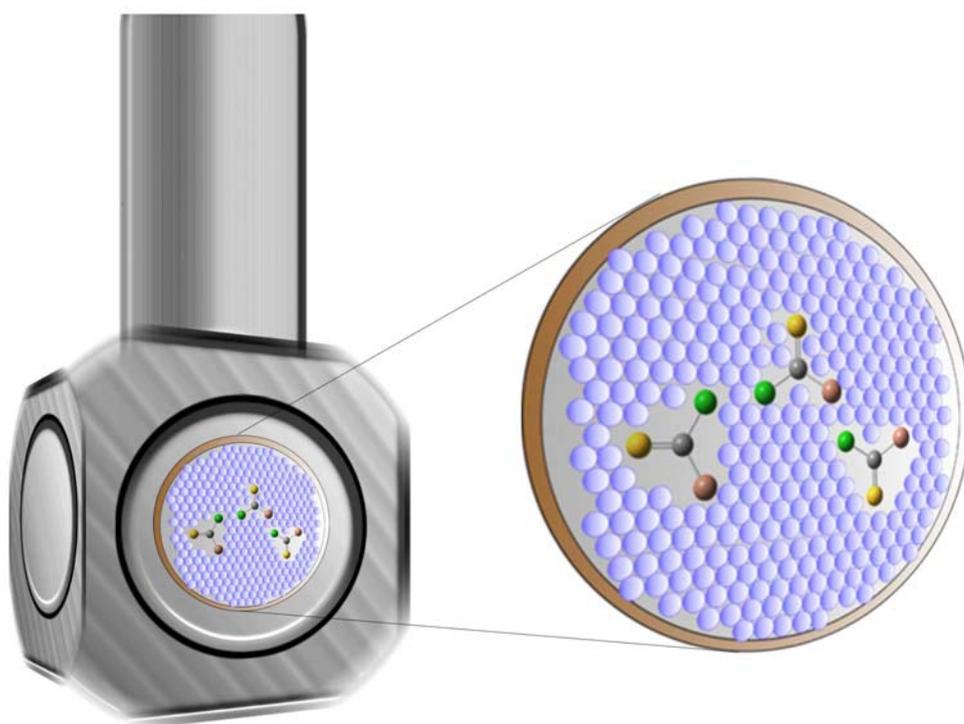


Figura 1.4. Esquematación de los sitios de matriz que se producen sobre la ventana fría

La interacción entre las especies de interés puede también provocar la aparición de absorciones extras en el espectro. Para algunas especies, donde la interacción es débil, la energía puede verse afectada muy poco, sin embargo, existen interacciones que pueden ser muy fuertes, tales como los puentes de hidrógeno donde el corrimiento puede ser grande. La agregación molecular se puede contrarrestar por disminución de la concentración del analito en la matriz, sin embargo cuando se produce dimerización se deben aplicar otros métodos tales como variación de la temperatura previa al depósito para romper o disminuir la interacción. Por otro lado, las impurezas en la matriz tales como agua, nitrógeno, etc, también pueden interaccionar con las especies de interés produciendo corrimientos.

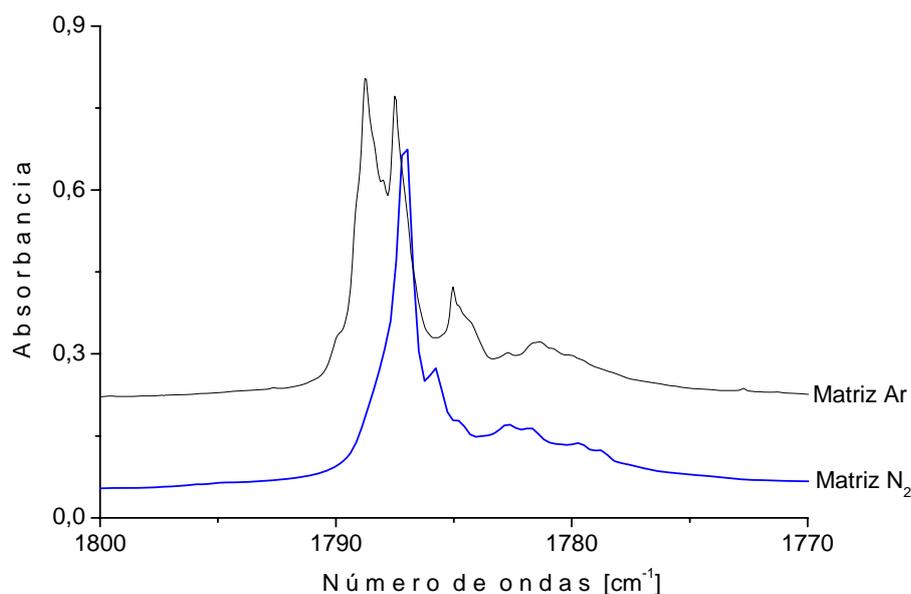


Figura 1.5. Comparación del espectro IR de las matrices de Ar y N₂ del ClC(O)OCH₂CH₃ en la región correspondiente al estiramiento C=O desde 1800 a 1770 cm⁻¹

Por último es importante destacar que moléculas muy pequeñas tales como HCl, H₂, etc., pueden rotar en la matriz a las temperaturas de trabajo, y por tanto en el espectro IR aparecen múltiples absorciones. Una de las principales características de la estructura rotacional de una banda vibracional es que ésta muestra un comportamiento que depende de la temperatura, debido a los cambios en la población de los niveles de energía rotacional, lo cual puede ayudar a determinar cuales absorciones son debidas a este hecho.

1.7.2. Efectos químicos

Cuando se realizan experiencias de matrices y se elige el gas diluyente que formará el ambiente rígido, se prefieren generalmente gases químicamente inertes, pero dependiendo de los objetivos de la experiencia se pueden elegir otros gases reactivos tales como CO. Sin embargo, los gases considerados inertes tales como Ar, Kr, Ne, Xe y N₂ (excepto N₂ en las matrices que involucra metales con los cuales se

presenta coordinación) pueden presentar interacciones con el analito, lo cual produce corrimientos no esperados. El gas neón ha mostrado ser el gas más inerte, pues es el que menor interacción ha producido con muchas especies, sin embargo, el trabajo con Ne requiere de temperaturas de trabajo inferiores a los 6 K, lo cual no está disponible en muchos laboratorios.

1.7.3. Efectos de jaula (Efecto “Cage”)

Este efecto se observa cuando en un mismo sitio de matriz se encuentran dos o más especies distintas, las cuales pueden interaccionar (sin reaccionar) generando perturbaciones en las absorciones observadas experimentalmente. Dicho efecto es más común cuando se generan especies fotoquímicamente por irradiación de la matriz, a menos que la dilución de la matriz sea baja y la probabilidad de encontrar dos especies en un mismo sitio sea mayor. Sin embargo, puede ocurrir, que por efecto mismo de la irradiación las moléculas generadas se ubiquen de diferentes maneras en el sitio de matriz, produciendo interacciones de manera distinta sobre cada átomo que forma la especie y por tanto en el espectro pueden observarse absorciones extras.

Especies generalmente pequeñas podrían tener la suficiente energía para escapar del sitio de matriz, bien sea hacia otro sitio vacío u otro ocupado con otras especies. Este hecho generaría otro tipo de interacciones que pueden también incurrir en las características observadas en los espectros.

1.8. Química computacional

Con el desarrollo de la informática en los últimos años se han desarrollado programas computacionales basados en la química cuántica, capaces de simular un sinnúmero de propiedades

fisicoquímicas tales como la estructura o estructuras estables de una especie química determinada, la diferencia de energía entre ellas, etc. Además, también es posible predecir el espectro vibracional que presenta una determinada especie en estado gaseoso.

La química computacional desempeña un papel fundamental para la identificación de las especies formadas en un determinado proceso llevado a cabo en la matriz, tales como los productos de fotoevolución de una especie o los productos de una reacción fotoquímica, bien sean conformeros de alta energía, nuevas especies, intermediarios reactivos o complejos moleculares.

REFERENCIAS

1. Whittle, E.; Dows, D. A.; Pimentel, G. C. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 1943.
2. Norman, I.; Porter, G. *Nature*, **1954**, *174*, 508- 509.
3. Dunkin, I. *Matrix-Isolation Techniques: A practical Approach*; Oxford University press Inc.: New York, **1998**.
4. Barnes, A. J.; Orville-Thomas, W. J.; Müller, A.; Gaufrès, R.; *Matrix Isolation Spectroscopy*; Reidel Publishing Company: Dordrecht, Holland, **1981**.
5. Almond, M. J.; Downs, A. J.; Hawes Clark, R. J. H.; Hester, R. E. *Spectroscopy of Matrix Isolated Species*; John Wiley & Sons; **1989**.
6. Andrews, L.; Moskovits, M. *Chemistry and Physics of Matrix-Isolated Species*; Elsevier Science Pub. Co. North-Holland: Amsterdam, **1989**
7. Montalti, M.; credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T. *Handbook of Photochemistry*, CRC Press, New York, **2006**.
8. Rabek, J. F. *Experimental methods in photochemistry and photophysics*, Parts 1 and 2
9. Clauberg, H.; Minsek, D. W.; Chen, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 99-107.

10. Maier, G.; Pacl, H.; Reisenauer, H. P.; Meudt, A.; Janoschek, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12712-12720.
11. Cabana, A.; Anderson, A.; Savoie, R. *J. Chem. Phys.*, **1965**, *42*, 1122-1123.
12. Shirk, J. S.; Claassen, H. H. *J. Chem. Phys.*, **1971**, *54*, 3237-3238.
13. Meyer, B. *Science*, **1970**, *168*, 783-789.
14. Groner, P.; Stolkin, I.; Günthard, H. *J. Phys. E* **1973**, *6*, 122-123.
15. Perutz, R. N.; Turner J. J. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1973**, *69*, 452-461.