



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

“Radiólisis de los ácidos o-, m- y p-hidroxibenzoicos”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. MARIBEL ESPARZA ROBLES



TUTOR: Dra. M. Guadalupe Albarrán Sánchez AÑO: 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencias Nucleares (UNAM), por las facilidades brindadas para el desarrollo de éste trabajo.

A la Dra. Guadalupe Albarrán Sánchez por dirigir este Trabajo de Tesis.

A los Doctores Melania Jiménez Reyes, Luz Elena Vera Ávila, Juan Manuel Navarrete Tejero, Alma Luisa Revilla Vázquez y Epifanio Cruz Zaragoza, por la revisión de esta Tesis.

A CONACYT (Fondo SEP-CONACYT8853) y DGAPA (proyecto IN202308) por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Índice

I Introducción.....	1
1 Generalidades.....	1
1.1 Propiedades de los ácidos.....	1
1.1.1 Ácido orto-hidroxibenzoico (o-HB), 2-hidroxibenzoico.....	1
1.1.2 Ácido meta-hidroxibenzoico (m-HB), 3-hidroxibenzoico.....	1
1.1.3 Ácido para-hidroxibenzoico (p-HB), 4-hidroxibenzoico.....	2
1.2 Definiciones y Unidades.....	3
1.2.1 <u>Radiación ionizante</u>	3
1.2.2 <u>Química de Radiaciones</u>	3
1.2.3 <u>Radiólisis</u>	3
1.2.4 <u>Rendimiento Radioquímico</u>	4
1.2.5 <u>Gray</u>	4
1.3 Dosimetría.....	4
1.4 Radiólisis del agua.....	6
1.5 Radiólisis de compuestos orgánicos aromáticos relacionados con este estudio.....	8
1.5.1 Generalidades.....	8
1.5.2 Radiólisis del benceno.....	10
1.5.3 Radiólisis del fenol.....	12
1.5.4 Radiólisis del Ácido Benzoico.....	13
1.5.5 Radiólisis del o-hidroxibenzoico.....	15
1.6 Electroforesis Capilar.....	17
1.6.1 Electroósmosis.....	18
1.6.2 Modos de electroforesis capilar usados.....	20
1.7 Separaciones de los compuestos en estudio mediante EC.....	22
1.8 Separaciones de los compuestos en estudio mediante CLAR.....	25
II Objetivos.....	29
III Parte experimental.....	30
3.1 Reactivos y materiales.....	30
3.2 Preparación de las soluciones patrón.....	31
3.3 Dosímetro.....	31
3.4 Preparación de muestras para irradiar.....	32
3.5 Irradiación de las muestras en el “GAMMABEAM 651PT Atomoc Energy of Canada Limited”.....	32
3.6 Análisis.....	33
3.6.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	34
3.6.2 Electroforesis Capilar.....	35
IV Resultados y Análisis de Resultados.....	36
4.1 Dosimetría.....	36
4.2 Estudios de la radiólisis del ácido o-HB.....	37
4.2.1 Productos radiolíticos esperados para el ácido o-hidroxibenzoico.....	37

4.2.2	Separación mediante CLAR de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido o-hidroxibenzoico.....	39
4.2.3	Curvas patrón en CLAR de los productos radiolíticos esperados para el ácido o-hidroxibenzoico.....	41
4.2.4	Separación por EC de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido orto-hidroxibenzoico.....	43
4.2.5	Curvas patrón en EC de los productos radiolíticos esperados para el ácido orto-hidroxibenzoico.....	45
4.2.6	Análisis cromatográfico y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido o-hidroxibenzoico.....	46
4.2.7	Curvas de dependencia de la concentración en función de la dosis de los productos radiolíticos del ácido orto-hidroxibenzoico (CLAR).....	48
4.2.8	Análisis electroforético y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido orto-hidroxibenzoico.....	50
4.2.9	Curvas de dependencia de la concentración en función de la dosis de los productos radiolíticos del ácido orto-hidroxibenzoico (EC).....	52
4.2.10	Valores G del ácido o-HB.....	55
4.3	Estudios de la radiólisis del ácido m-HB.....	56
4.3.1	Productos radiolíticos esperados para el ácido m-hidroxibenzoico.....	56
4.3.2	Análisis cromatográfico de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido meta-hidroxibenzoico.....	57
4.3.3	Curvas patrón en CLAR de los productos radiolíticos esperados para el ácido meta-hidroxibenzoico.....	60
4.3.4	Análisis electroforético de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido m-hidroxibenzoico.....	61
4.3.5	Curvas patrón en EC de los productos radiolíticos esperados para el ácido m-hidroxibenzoico.....	63
4.3.6	Análisis cromatográfico y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido meta-hidroxibenzoico en solución acuosa.....	64
4.3.7	Curvas de concentración determinadas en CLAR de los productos radiolíticos obtenidos en la radiólisis del ácido m-HB en solución acuosa.....	66
4.3.8	Análisis electroforético y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido meta-hidroxibenzoico.....	69
4.3.9	Resultados obtenidos en EC de los compuestos radiolíticos observados en la radiólisis del ácido m-HB.....	70
4.3.10	Valores G del ácido m-HB.....	72
4.4	Estudios de la radiólisis del ácido p-HB.....	73
4.4.1	Productos radiolíticos esperados para el ácido para-hidroxibenzoico.....	73

4.4.2	Análisis cromatográfico de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido para-hidroxibenzoico.	74
4.4.3	Curvas patrón en CLAR de los productos radiolíticos esperados para el ácido p-hidroxibenzoico.....	76
4.4.4	Análisis electroforético de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido para-hidroxibenzoico.....	77
4.4.5	Curvas patrón en EC de los productos radiolíticos esperados para el ácido para-hidroxibenzoico.....	79
4.4.6	Análisis cromatográfico y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido para-hidroxibenzoico.....	80
4.4.7	Resultados obtenidos en CLAR de los compuestos radiolíticos del ácido p-HB.....	81
4.4.8	Análisis electroforético y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido para-hidroxibenzoico.....	84
4.4.9	Resultados obtenidos en EC de los compuestos radiolíticos del ácido p-HB.....	85
4.4.10	Valores G del ácido p-HB.....	87
4.5	Discusión sobre la proporción parcial relativa por posición de adición del radical $\cdot\text{OH}$ a las diferentes posiciones libres en el anillo aromático de los ácidos o-, m-, y p-HB.....	88
4.5.1	Proporción parcial relativa por posición de la reacción de oxidación del ácido o-HB.....	89
4.5.2	Proporción parcial relativa por posición de la reacción de oxidación del ácido m-HB.....	90
4.5.3	Proporción parcial relativa por posición de la reacción de oxidación del ácido p-HB.....	91
V	Conclusiones.....	93
Apéndice A	95
Apéndice B	98
Apéndice C	99
VI	Bibliografía.....	100

Índice de Tablas

1.1 Rendimientos radiolíticos de las especies primarias del agua.....	8
4.1 Parámetros cromatográficos para los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido o-HB.....	40
4.2 Parámetros electroforéticos para los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido o-HB.....	44
4.3 Muestra algunos ejemplos del rendimiento radioquímico de diferentes compuestos aromáticos determinados experimentalmente.....	56
4.4 Parámetros cromatográficos para los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido m-HB.....	59
4.5 Parámetros electroforéticos para los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido m-HB.....	62
4.6 Parámetros cromatográficos para los tres compuestos esperados en la radiólisis de ácido p-HB.....	75
4.7 Parámetros electroforéticos para los tres compuestos esperados en la radiólisis del ácido p-HB.....	78

Índice de Figuras

1.1 Esquema de los componentes esenciales en electroforesis capilar.....	17
1.2 Electroósmosis.....	18
1.3 Flujo electroosmótico.....	19
1.4 Electroforesis capilar de zona.....	20
1.5 Cromatografía micelar capilar electrocinética.....	21
3.1 Vial para irradiar.....	31
3.2 Posición de la muestras irradiadas.....	33
4.1 Gráfica de la dosis en función del tiempo de irradiación obtenida.....	36
4.2 Cromatograma de la separación de los compuestos auténticos esperados en la radiólisis del ácido o-HB determinadas a diferentes longitudes de onda.....	39
4.3 Espectros obtenidos en CLAR de los cinco productos radiolíticos de la radiólisis de una solución acuosa del ácido o-HB.....	41
4.4 Curvas patrón en CLAR para los cinco compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido o-HB.....	42
4.5 Electroferograma de la separación de los compuestos auténticos esperados en la radiólisis acuosa del ácido o-HB.....	43
4.6 Espectros obtenidos en EC de los productos radiolíticos de la radiólisis de una solución acuosa del ácido o-HB.....	45
4.7 Curvas patrón en EC de los cinco compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido o-HB.....	46
4.8 Cromatograma de la separación de los compuestos obtenidos en la radiólisis del ácido o-HB.....	47
4.9 Espectros obtenidos en CLAR de los dos compuestos adicionales a los esperados en la radiólisis del ácido o-HB en solución acuosa.....	48

4.10	Curvas de concentración determinadas en CLAR para los cinco productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido o-HB.....	49
4.11	Curva de concentración determinada en CLAR para el compuesto secundario (2,3,4-THB) obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido o-HB.....	50
4.12	Electroferograma de la separación de los productos radiolíticos del ácido o-HB.....	51
4.13	Espectro obtenido en EC de la carboxi-2,5 benzoquinona.....	52
4.14	Curvas de concentración determinadas por EC para los cuatro productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido o-HB.....	53
4.15	Cromatograma de la separación de los compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido m-HB.....	58
4.16	Espectros obtenidos en CLAR de los cinco productos radiolíticos esperados de la radiólisis de una solución acuosa del ácido m-HB.....	59
4.17	Curvas patrón en CLAR para los cinco compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido m-HB.....	60
4.18	Electroferograma de la separación de los compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido m-HB.....	61
4.19	Espectros obtenidos en el análisis electroforético de las muestras patrón de los productos esperados en la radiólisis del ácido m-HB.....	63
4.20	Curvas patrón en EC de los cinco compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido m-HB.....	64
4.21	Cromatograma de la separación de los compuestos obtenidos en la radiólisis de una solución acuosa del ácido m-HB.....	65
4.22	Espectros obtenidos en CLAR de los dos compuestos adicionales a los esperados en la radiólisis del ácido m-HB.....	66
4.23	Curvas de concentración determinadas en CLAR para los cuatro productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido m-HB.....	67

4.24	Curva de concentración en función de la dosis determinada en CLAR para el ácido 3,4,5 THB obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido m-HB.....	68
4.25	Curva cuadrática determinada en CLAR para el compuesto secundario desconocido obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido m-HB.....	69
4.26	Electroferograma de la separación de los productos radiolíticos del ácido m-HB.....	70
4.27	Curvas de concentración en función del tiempo de irradiación determinadas por EC, obtenidos en la radiólisis del ácido m-HB.....	71
4.28	Cromatograma de la separación de los compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido p-HB.....	74
4.29	Espectros obtenidos en CLAR del análisis de los productos auténticos esperados en la radiólisis de una solución acuosa del ácido p-HB.....	75
4.30	Curvas patrón en CLAR para los tres compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido p-HB.....	76
4.31	Electroferograma de la separación de los compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido p-HB.....	77
4.32	Espectros obtenidos en el análisis de los productos auténticos esperados en la radiólisis del ácido p-HB.....	78
4.33	Curvas patrón en EC de los tres compuestos puros en las concentraciones esperadas en la radiólisis del ácido o-HB.....	79
4.34	Cromatograma de la separación de los compuestos obtenidos en la radiólisis del ácido p-HB irradiado 2.22 kGy.....	80
4.35	Espectros obtenidos en CLAR de los dos compuestos adicionales a los esperados en la radiólisis del ácido p-HB.....	81
4.36	Curvas de concentración determinadas en CLAR para los tres productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido p-HB.....	82
4.37	Curva de concentración determinada en CLAR para el ácido 3,4,5-THB obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido p-HB.....	83

4.38	Curva de concentración determinada en CLAR para el compuesto secundario no identificado, obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido p-HB.....	84
4.39	Espectroferograma de la separación de los productos radiolíticos del ácido p-HB irradiado 2.22 kGy.....	85
4.40	Curvas de concentración determinadas por EC para los tres productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido p-HB.....	86

RESUMEN

En este trabajo se estudia el efecto director que producen los sustituyentes $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$ del anillo aromático de los ácidos o-, m- y p-HB en la reacción de oxidación radiolítica por el radical $\cdot\text{OH}$. Los productos radiolíticos obtenidos en la radiólisis de soluciones acuosas diluidas, de los ácidos con $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ como oxidante y saturadas con N_2O se identificaron, separaron y cuantificaron, mediante EC y CLAR. Se encontró que el sustituyente $-\text{OH}$ controla la adición del radical $\cdot\text{OH}$ y el sustituyente $-\text{COOH}$ sólo refuerza las posiciones 3 y 5 de los ácidos orto y para-HB, por lo que los principales productos radiolíticos obtenidos son resultado de la adición del radical $\cdot\text{OH}$ a posiciones ricas en población electrónica.

Los rendimientos radioquímicos expresados como valores G, que se obtuvieron para los productos radiolíticos se presentan en la siguiente tabla.

Ácido	Producto	Rendimiento Radioquímico valor G	
		CLAR	EC
o-HB	2,3-HB	1.46	1.52
	2,4-HB	0.069	0.064
	2,5-HB	0.97	0.94
	2,6-HB	0.004	0
	Catecol	0.69	0.64
m-HB	2,3-HB	1.41	1.46
	3,4-HB	1.65	1.66
	2,5-HB	1.44	1.45
	3,5-HB	0.15	0.16
p-HB	2,4-HB	0.09	0.09
	3,4-HB	1.82	1.82
	Hidroquinona	0.97	1.01

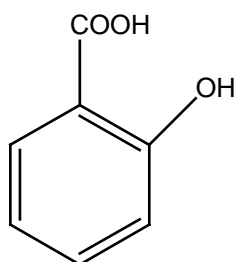
I INTRODUCCIÓN

1 Generalidades

1.1 Propiedades de los ácidos

1.1.1 Ácido orto-hidroxibenzoico (o-HB) ó 2-hidroxibenzoico, también conocido como ácido salicílico

Estructura:



Peso Molecular: 138.12 g/mol

Punto de fusión: 157-159 °C

Sublimación: 70 °C

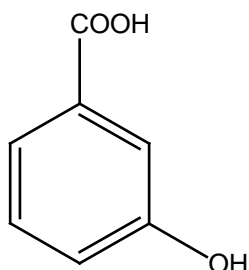
Punto de ebullición: 211 °C

Solubilidad 1 g: soluble en 460 mL de agua ó 15 mL de agua caliente, en 2.7 mL de alcohol, 42 mL de cloroformo y 135 mL de benceno.

Un polvo cristalino del ácido o-HB se obtiene de la corteza del sauce blanco y de las hojas de gaulteria, además es preparado sintéticamente. Este ácido tiene propiedades bacteriostáticas, fungicidas y queratolíticas, también es irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel (1,2).

1.1.2 Ácido meta-hidroxibenzoico (m-HB) ó 3-hidroxibenzoico, también conocido como ácido m-salicílico

Estructura:



Peso Molecular: 138.12 g/mol

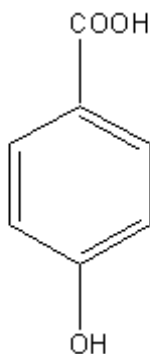
Punto de fusión: 198-200 °C

Punto de ebullición: 346.1±25 °C

Solubilidad: Muy soluble a pH 7-10 y ligeramente soluble a pH 4 (1,2)

1.1.3 Ácido para-hidroxibenzoico (p-HB) ó 4-hidroxibenzoico, también conocido como ácido p-salicílico

Estructura:



Formula: $C_7H_6O_3$

Peso Molecular: 138.12 g/mol

Punto de fusión: 213-214 °C

Solubilidad: soluble en 125 partes de agua, soluble en alcohol éter y acetona, ligeramente soluble en cloroformo, (1,2).

De los tres hidroxiacidos el más estudiado ha sido el o-hidroxibenzoico, ya que por sus propiedades farmacológicas, es empleado en numerosos productos farmacéuticos y cosméticos. Además de ser el producto de hidrólisis del ácido acetilsalicílico (aspirina). Dadas sus aplicaciones se han desarrollado métodos que permiten su detección y cuantificación en fluidos biológicos, con el empleo de la cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de gases (3) y espectrometría de masas (4). Métodos fluorométricos se han desarrollado para la cuantificación del ácido o-HB en el análisis de medicamentos (5, 6) y de quimioluminiscencia para su determinación en muestras de agua (7). El ácido p-HB se ha llegado a determinar como impureza en productos que contienen ácido o-HB como principio activo (8) y del ácido m-HB se tiene poca información.

1.2 Definiciones y Unidades

1.2.1 La radiación ionizante es la energía electromagnética de longitud de onda corta, que proviene de las transiciones nucleares como en el caso de la radiación gamma y también la radiación proveniente de partículas cargadas aceleradas, como (electrones, protones, deuterones, etc.) (9, 10).

1.2.2 La Química de Radiaciones estudia los cambios químicos inducidos por la radiación ionizante en la materia.

1.2.3 Radiólisis es el rompimiento de las moléculas, las cuales producen intermediarios muy reactivos que incluyen iones, moléculas excitadas y radicales libres los cuales reaccionan dando productos radiolíticos estables (11).

La radiólisis se realiza en las siguientes tres etapas:

En la primera etapa denominada física es donde la radiación ionizante interacciona con la materia, en un tiempo de 10^{-17} - 10^{-12} s produciendo ionización y excitación de las moléculas.

La segunda etapa (físico-química) se realiza en un tiempo de 10^{-12} a 10^{-8} s, en este tiempo las moléculas excitadas pierden su energía por rompimiento dando origen a iones y radicales libres (12, 13).

Una tercera, etapa química, es donde las especies reaccionan para formar productos estables.

1.2.4 Rendimiento Radioquímico también conocido como valor G, que es el número de especies (moléculas, iones o radicales libres) transformadas por cada 100 eV de energía absorbida (10, 14).

$$G = \frac{\text{Número de especies transformadas}}{\text{Dosis Absorbida}} \times 100$$

1.2.5 Gray. La cantidad de energía (Joule), que un material absorbe por unidad de masa, J/kg se llama dosis y su unidad es el Gray (Gy).

1Gy corresponde a 100 rad, que es la unidad ya en desuso, equivale a 6.241×10^{15} eV/g. La dosis cuantificada por unidad de tiempo, es llamada razón o tasa de dosis (Gy/min) (14, 15).

1.3 Dosimetría

La dosimetría es la medida de un cambio físico o químico, producido en un sistema por el paso de la radiación ionizante a través de éste y es dependiente de la cantidad de energía absorbida (9).

La dosimetría puede ser:

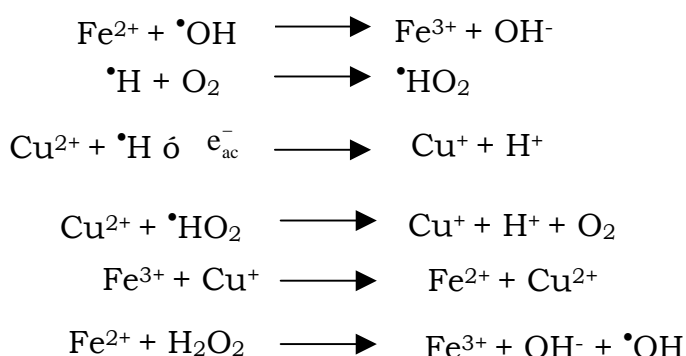
- Física (dosímetros absolutos o primarios)
- Química (dosímetros secundarios)

En la dosimetría Física, se realiza mediante mediciones directas que pueden ser por:

Calorimetría, que mide la energía proveniente de la radiación absorbida por un cuerpo que cambia su temperatura o con cámara de ionización, que mide la ionización producida en un gas como efecto de la absorción de la energía de la radiación.

En la dosimetría Química, se determina la dosis de radiación por el cambio químico producido en un sustrato estable. El cálculo de la dosis requiere del conocimiento del rendimiento radioquímico (valor G) del producto estimado en la reacción (13,16).

Un dosímetro de los más empleados, es la solución de Fricke en el cual la reacción fundamental es la oxidación de una solución ácida de sulfato ferroso a la sal férrica en presencia de oxígeno y bajo la influencia de la radiación ionizante. Éste puede ser modificado adicionado sulfato cúprico a la solución con un pH de 2, de esta forma el intervalo de dosis es de 1 a 100 kGy. El $G(\text{Fe}^{3+})$ cae de 15.6 para el dosímetro Fricke a 0.66 para el dosímetro de $\text{Fe}^{2+}\text{-Cu}^{2+}$. El oxígeno no se consume, así que la concentración de éste puede ser alta. Las reacciones representativas son las siguientes:



La dosis de irradiación se calcula con la siguiente ecuación:

$$D = \frac{N\Delta(\text{D.O.})100}{\epsilon 10^3 G(\text{Fe}^{+3})fpl}$$

Donde:

N= número de Avogadro 6.023×10^{23} moléculas/mol

$\Delta(\text{D.O.})$ = cambio de densidad óptica (adimensional)

ϵ = coeficiente de absortividad $2167 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$

ρ = densidad de la solución 1.024 g/cm^3

G (Fe^{+3})= rendimiento radioquímico $0.66 \text{ moléculas}/100 \text{ eV}$

f = factor de conversión de eV a Gy $6.242 \times 10^{15} \text{ eV/g}\cdot\text{Gy}$

l= longitud de la celda de cuarzo 1 cm

Substituyendo los valores en la ecuación se reduce a una constante que multiplica a el cambio de la densidad óptica

$$D = \frac{6.023 \times 10^{23} \Delta(\text{D.O.}) 100}{(2167 \times 10^3)(0.66)(6.242 \times 10^{15})(1.001)(1)}$$

$$D = 6740 \times \Delta(\text{D.O.}) = \text{Gy}$$

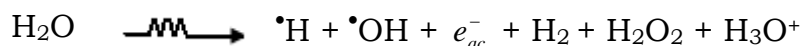
$\Delta(\text{D.O.})$ varia para este caso según el tiempo de irradiación del dosímetro; frecuentemente se irradia éste a diferentes tiempos y la razón de dosis se indica en función del tiempo (minutos, horas, etc.).

1.4 Radiólisis del agua

El agua por ser un líquido altamente polar y el disolvente universal juega un papel importante en los sistemas de Química de Radiaciones.

Cuando se trabaja con disoluciones acuosas diluidas, el efecto de la radiación ionizante es principalmente en la molécula del disolvente y la reacción con los solutos corresponde a un ataque secundario de los productos de la descomposición del agua.

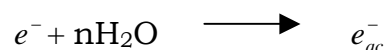
La siguiente reacción generaliza los productos principales en la radiólisis del agua (9, 16,17,18).



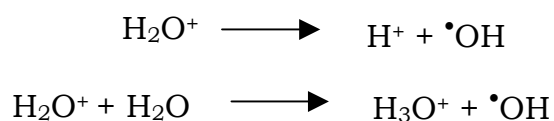
El paso de la radiación ionizante a través del agua inicialmente se representa en la siguiente reacción.



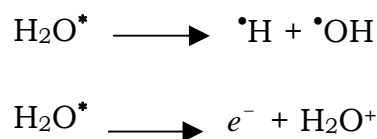
Seguido de los electrones que se termalizan y se solvatan.



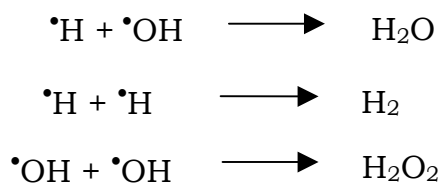
El agua ionizada puede disociarse o reaccionar con otra molécula de agua produciendo iones hidrógeno o hidronio y radical hidroxilo.



Las moléculas de agua excitadas se disocian de forma homolítica o heterolíticamente produciendo radicales libres e iones.



Una vez formados los radicales pueden reaccionar entre ellos dando nuevos radicales y productos moleculares.



Los valores del redimiento radioquímico, (valor G) de las especies primarias de la radiolisis del agua se presentan en la tabla 1.1 (9,10):

Tabla 1.1 Rendimientos radioquímicos de las especies primarias del agua

Especie	$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{H}$	e_{ac}^-	H_2O_2	H_2
Valor G	2.7	0.6	2.7	0.7	0.4

1.5 Radiólisis de compuestos orgánicos aromáticos relacionados con este estudio

1.5.1 Generalidades

En general, los procesos químicos que son causados por un tratamiento radiolítico en la materia, conducen a la formación de radicales libres con gran reactividad química los cuales atacan a las moléculas causando reacciones de oxidación y reducción.

La radiólisis de soluciones acuosas ha sido tema de numerosos estudios (19, 20, 21, 22, 23), en particular trataremos los radicales $\bullet\text{OH}$ (que provienen de la radiólisis del agua) que reaccionan principalmente como se indica abajo:

a) Transferencia electrónica

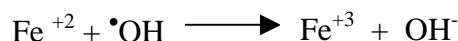
Los radicales $\bullet\text{OH}$ actúan como aceptores de electrones en estas reacciones siendo ésta la forma principal de interacción con los cationes y aniones inorgánicos (24, 25).

La forma general de estas reacciones es:



En el esquema de reacción anterior, el efecto de la transferencia electrónica al radical $\bullet\text{OH}$ es de aumentar en +1 la carga de la especie química.

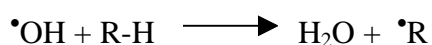
Una reacción típica de transferencia electrónica es la que ocurre en el dosímetro de Fricke.



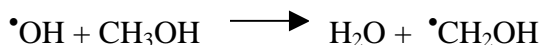
b) Abstracción de H-

El radical $\cdot\text{OH}$ es un radical de alta energía que puede abstraer átomos de H de una variedad de sustancias orgánicas (26, 27), dando como producto un radical con estructura básica del compuesto original.

El esquema de reacción es el siguiente:



Y un ejemplo es la reacción con metanol:

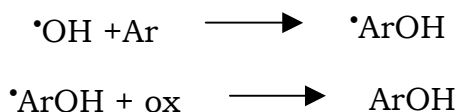


El radical orgánico $\cdot\text{R}$ suele reaccionar posteriormente con O_2 ó dimerizarse de tal forma que se obtienen dímeros y peróxidos del radical orgánico, como productos (28).

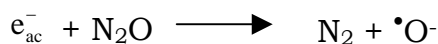
Una característica importante del radical $\cdot\text{OH}$ en este tipo de reacciones es que no es selectivo y es altamente reactivo (24).

c) Adición

Esta reacción se lleva a cabo principalmente con compuestos aromáticos (Ar) produciendo los radicales hidroxiciclohexadienilos como una especie intermediaria (19, 29), que en presencia de un oxidante (ox), es oxidada a su correspondiente fenol.



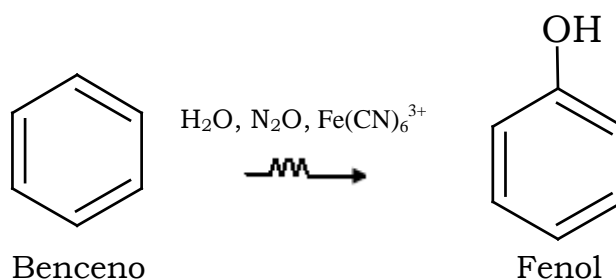
Por otro lado, para aumentar la formación de radicales $\cdot\text{OH}$, (29, 30) (valor G 2.7 en la radiólisis de agua pura) se han realizado estudios con la adición de óxido nitroso a la solución acuosa, lo que involucra la conversión de e_{ac}^- (provenientes de la radiólisis del agua con un valor G de 2.7) a radicales $\cdot\text{OH}$ mediante las siguientes reacciones (56):



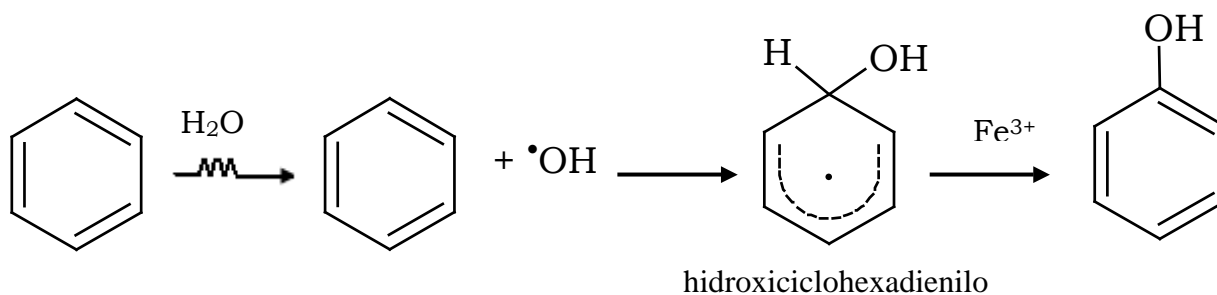
La determinación de los productos obtenidos, de la reacción del radical $\cdot\text{OH}$ con compuestos aromáticos que tienen diferentes sustituyentes, permite conocer los efectos de estos sustituyentes sobre la reacción.

1.5.2 Radiólisis del benceno

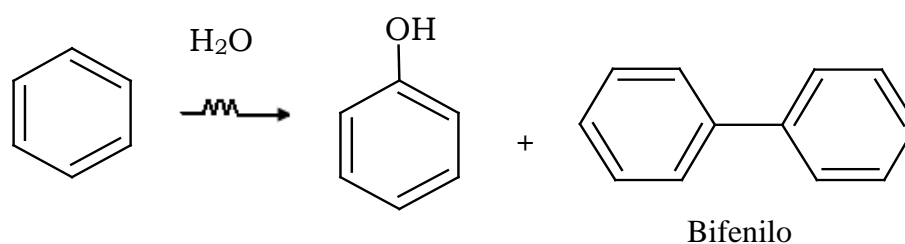
En la radiólisis de soluciones acuosas saturadas con benceno y N_2O adicionadas con ferricianuro ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3+}$) como oxidante, se forma el fenol como principal producto radiolítico con un valor G de 6.0 moléculas por cada 100 eV de energía absorbida (19, 31).



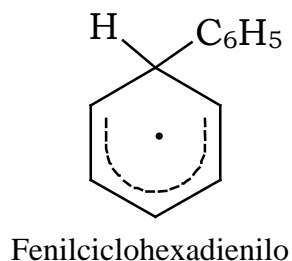
La formación del fenol se debe a la oxidación de los radicales hidroxiciclohexadienilo (producto intermediario) los cuales son producidos inicialmente por la adición de los radicales $\cdot\text{OH}$ al benceno (19, 23, 31).



Si la radiólisis de soluciones acuosas de benceno se lleva a cabo en ausencia de un oxidante y de oxígeno, además del fenol como producto de la radiólisis se obtiene también el bifenilo.



Como ya se mencionó, en presencia de Fe^{3+} los radicales son oxidados, el fenilciclohexadienilo es oxidado a bifenilo y el hidroxiciclohexadienilo a fenol respectivamente (32).

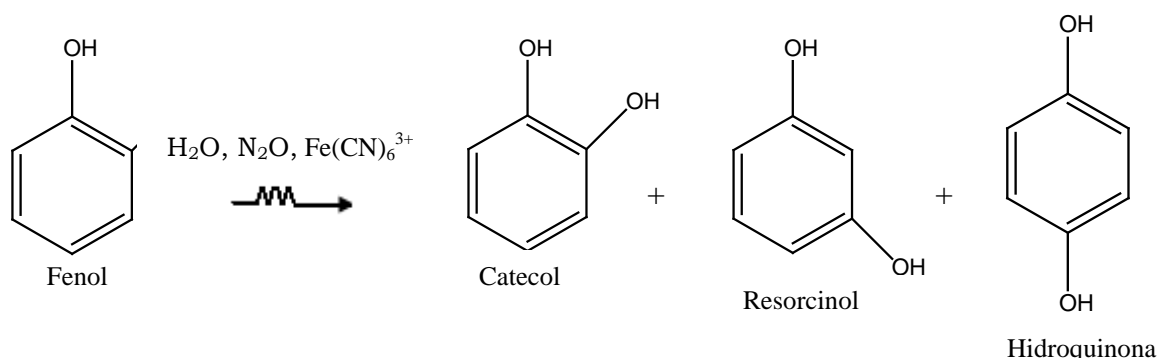


Además de fenol y bifenilo, otros compuestos como el β -hidroximucondialdehído, dicitclohexadienos, fenil-2,5-ciclohexadieno y fenil-2,4-ciclohexadieno, se han identificado como productos radiolíticos en estudios de la radiólisis acuosa de soluciones de benceno (32).

1.5.3 Radiólisis del fenol

El estudio de la radiólisis de soluciones acuosas de compuestos aromáticos, permite conocer el control que tienen los diferentes sustituyentes, en los rendimientos radioquímicos principales.

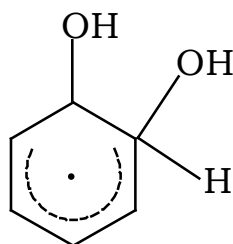
Albarrán y Schuler (20), en un estudio de radiólisis de soluciones acuosas de fenol conteniendo ferricianuro, han demostrado que se obtienen como productos radiolíticos primarios, catecol, resorcinol e hidroquinona, resultado de la adición del radical $\cdot\text{OH}$ a las posiciones orto, meta y para al radical OH del fenol, con un rendimiento radioquímico de 1.48, 0.24 y 2.01 moléculas por cada 100 eV de energía absorbida, respectivamente. Como producto radiolítico secundario se identifico a la hidroxihidroquinona.



Por el carácter electrofilico del radical $\cdot\text{OH}$ se espera que las adiciones se realicen preferentemente en las posiciones del anillo aromático más ricas en electrones (29).

Con este estudio se tiene la evidencia del exceso de carga negativa en las posiciones orto y para del fenol y la evidente deficiencia de esta carga en la posición meta.

En la obtención de los productos radiolíticos de soluciones acuosas de fenol, se ven involucrados productos intermediarios como el dihidroxiciclohexadienilo (29, 33).



dihidroxiciclohexadienilo

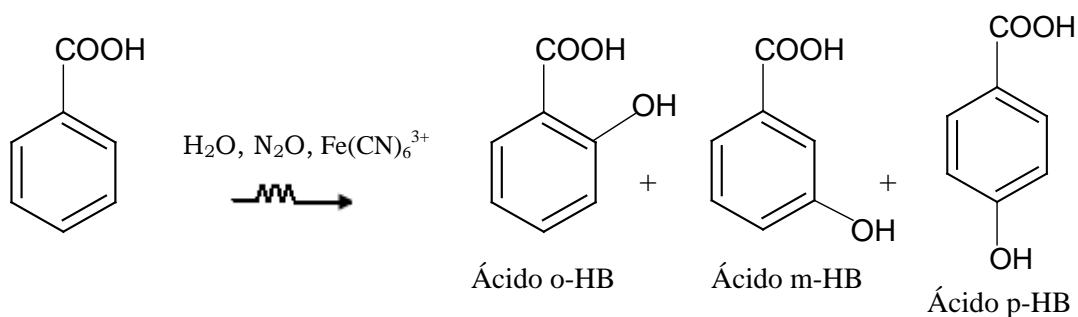
Las adiciones más favorecidas a las posiciones orto y para, se deben a la afinidad electrónica que posee el radical $\cdot\text{OH}$ y a la propiedad orientadora del sustituyente OH del fenol (20).

Estos estudios de la radiólisis de soluciones acuosas de compuestos aromáticos, han permitido obtener mayor información, del mecanismo de reacción del radical $\cdot\text{OH}$.

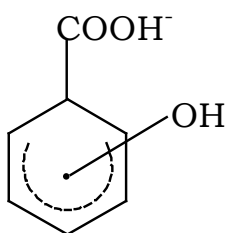
1.5.4 Radiólisis del Ácido Benzoico

El estudio de las reacciones del radical $\cdot\text{OH}$ con compuestos aromáticos que tienen diferentes sustituyentes, permite conocer los efectos que éstos producen en la distribución de la carga electrónica dentro del anillo aromático (19).

Klein y Bhatia (34) estudiaron la radiólisis de soluciones acuosas de ácido benzoico saturadas con N_2O y adicionadas con ferricianuro, en la cual obtuvieron como productos radiolíticos primarios a los ácidos orto-hidroxibenzoico (o-HB), meta-hidroxibenzoico (m-HB) y para-hidroxibenzoico (p-HB) con un rendimiento de 1.7, 2.3 y 1.2 respectivamente.



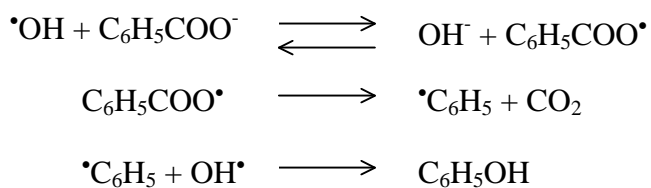
Estos productos se obtienen por la adición del radical $\cdot\text{OH}$ a una especie intermediaria que es el radical carboxihidroxiciclohexadienilo, el cual es oxidado al correspondiente ácido hidroxibenzoico.



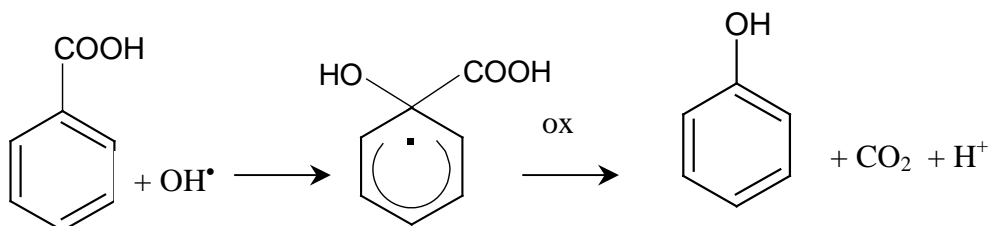
Carboxihidroxiciclohexadienilo

En la radiólisis del ácido benzoico se obtiene fenol como producto radiolítico primario y para explicar su formación se han propuesto los siguientes mecanismos:

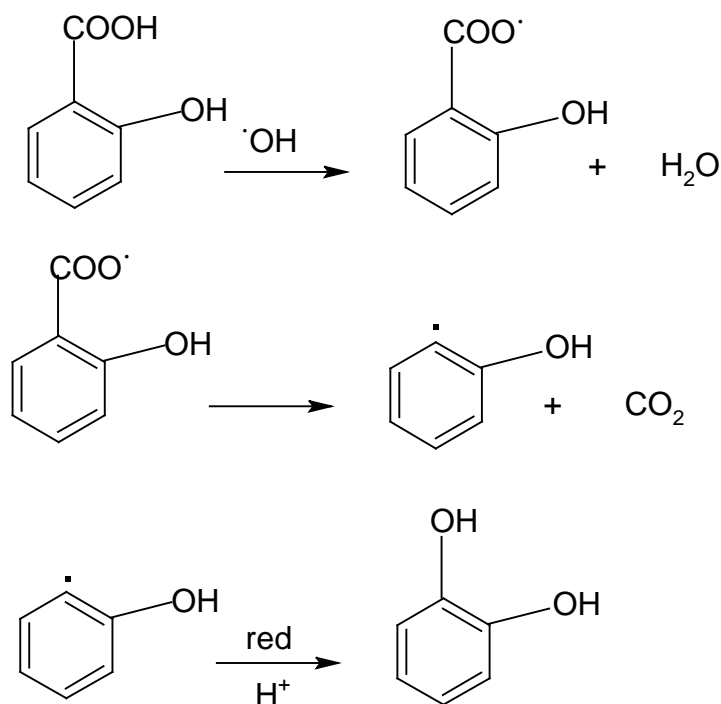
1) La oxidación del benzoato por el radical



2) La adición del $\cdot\text{OH}$ en la posición ipso del ácido benzoico



3) La descarboxilación del ácido benzoico (35).



1.5.5 Radiólisis del ácido o-hidroxibenzoico

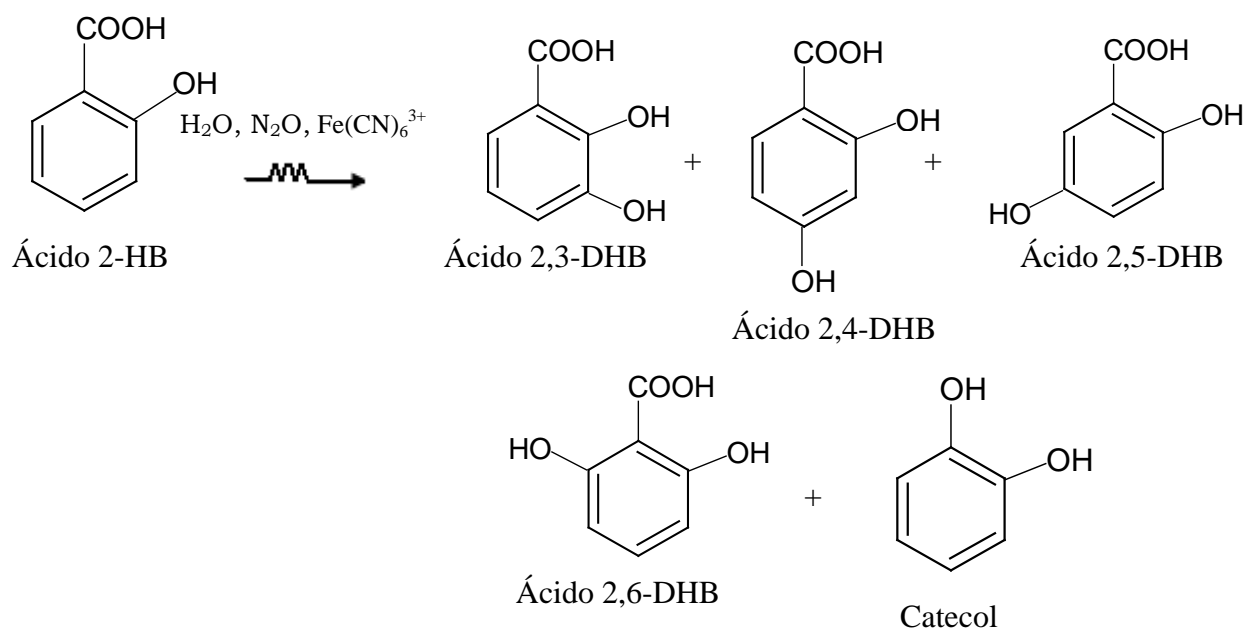
Albarrán y Schuler (21) estudiaron la radiólisis de soluciones acuosas del ácido o-hidroxibenzoico, saturadas con N_2O y adicionadas con ferricianuro, en la cual observaron la formación de los ácidos 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB), 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHB), 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB), 2,6-dihidroxibenzoico (2,6-DHB) y el catecol como productos radiolíticos primarios.

Obteniendo un rendimiento radioquímico de 1.46 y 1.49 para el ácido 2,3-DHB cuantificado por CLAR y EC respectivamente, y de 0.090 en CLAR y 0.084 en EC para el ácido 2,4-DHB. En el caso del ácido 2,5-DHB, el rendimiento en CLAR fue de 1.29 y 0.96 en EC. Para el catecol 0.53 en CLAR y 0.51 en EC.

El ácido 2,3-DHB y el 2,5-DHB se forman con el mayor rendimiento radioquímico debido a la adición del radical $\cdot\text{OH}$ a las posiciones orto y para al sustituyente OH en el ácido o-HB. La principal adición, se realiza en la posición orto debido a la propiedad electrofílica del radical $\cdot\text{OH}$ ya que la población electrónica en esta posición es mayor.

La descarboxilación del ácido o-HB se forma con un rendimiento radioquímico menor a los ácidos mencionados anteriormente con lo cual se obtiene el catecol.

Los ácidos 2,4-DHB y 2,6-DHB se forman en menor proporción ya que el grupo carboxi contribuye en menor proporción a dirigir las adiciones.



Todos estos estudios referentes a la adición del radical $\cdot\text{OH}$ a diferentes compuestos aromáticos, han permitido predecir los productos esperados en la radiólisis de los ácidos m- y p-hidroxibenzoicos y comparar los productos obtenidos en la radiólisis del ácido o-hidroxibenzoico.

1.6 Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar (EC) es una técnica que emplea capilares con diámetro interno de 50-200 μm , para realizar separaciones con alta eficiencia de moléculas de cualquier tamaño, estas separaciones son favorecidas por el empleo de altos voltajes (36).

Los instrumentos de EC son relativamente simples, requieren de un capilar con una ventana óptica, un control de alto voltaje, dos electrodos, dos recipientes de solución amortiguadora y un detector, Figura 1.1 (37).

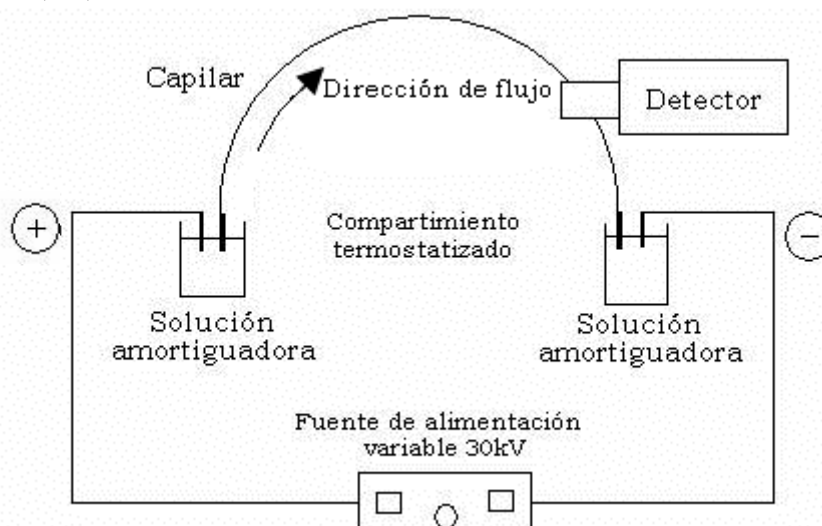


Figura 1.1. Esquema de los componentes esenciales en electroforesis capilar.

La terminología en electroforesis capilar presenta diferencias significativas con la terminología empleada en cromatografía, en EC no existe un tiempo de retención, bajo condiciones ideales nada es retenido, por lo cual a este tiempo se le llama tiempo de migración (t_m), que es el tiempo que le toma a un soluto moverse desde que entra al capilar hasta que pasa por la ventana del detector (38, 39).

Otros términos fundamentales son la movilidad electroforética μ_{ef} (cm^2/Vs), la velocidad electroforética o de migración v_{ef} (cm/s) y la fuerza del campo eléctrico E (V/cm).

Con la relación entre estos factores se obtiene:

$$\mu_{ef} = \frac{v_{ef}}{E} = \frac{L_d/t_m}{V/L_t}$$

Donde:

L_d = longitud de la columna desde el punto de la inyección al detector

L_t = longitud total de la columna de un extremo a otro

V = voltaje aplicado entre los dos extremos

t_m = tiempo de migración

1.6.1 Electroósmosis

Uno de los procesos fundamentales que maneja la EC es la electroósmosis, fenómeno que es consecuencia de la carga de la superficie de la pared capilar, por tener grupos silanoles que se ionizan al contacto con la solución amortiguadora (Figura 1.2). Una capa móvil fuertemente adsorbida de cationes adyacente a la superficie negativa neutraliza parcialmente la carga negativa. El resto de carga negativa se neutraliza por un exceso de cationes solvatados por la solución amortiguadora en la parte difusa de la doble capa de la disolución próxima a la pared (37, 40).

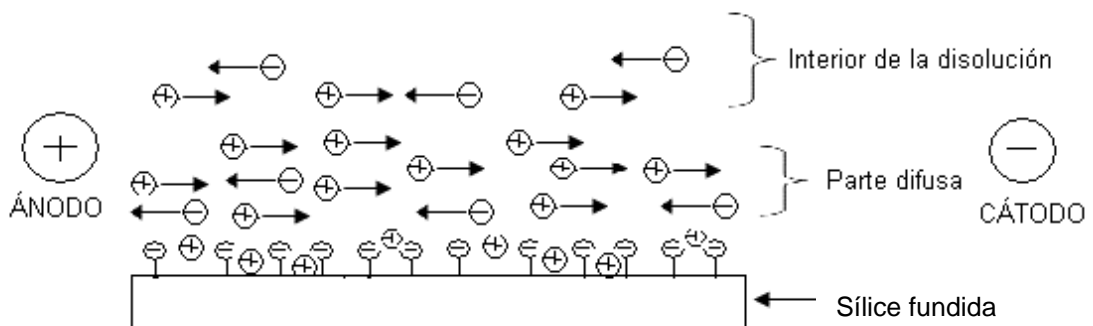


Figura 1.2 Electroósmosis

En un campo eléctrico, los cationes son atraídos por el cátodo y los aniones por el ánodo. El exceso de cationes en la parte difusa de la doble capa confiere un momento neto hacia el cátodo. Esta acción de bombeo, llamada electroósmosis, es impulsada por los cationes solvatados que se encuentran en una franja cerca de las paredes y crea una especie de frente uniforme de flujo electroosmótico (FEO) de toda la disolución hacia el cátodo (Figura 1.3) (37, 41).

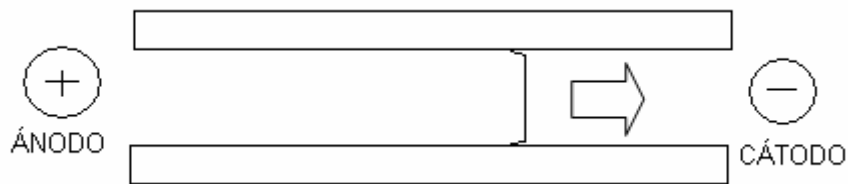


Figura 1.3 Flujo electroosmótico.

El flujo electroosmótico es definido por:

$$v_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta} E$$

Donde:

ϵ = constante dieléctrica

η = viscosidad de la solución amortiguadora

ζ = potencial Z

Con el FEO es posible el análisis simultáneo de cationes, aniones y especies neutras; a pH neutro o alcalino, el FEO es mucho mayor que la migración electroforética, todas las especies son acarreadas hacia el cátodo, el orden de migración son cationes, compuestos neutros y aniones.

El flujo electroosmótico uniforme contribuye a la gran resolución de la electroforesis capilar (41).

1.6.2 Modos de electroforesis capilar usados

En la EC se llevan a cabo diferentes mecanismos de separación de los cuales se mencionan los siguientes:

a) Electroforesis capilar de zona

De la EC la electroforesis capilar de zona (ECZ) es la forma más simple. El mecanismo de separación está basado en las diferencias de la relación carga-masa. Si la pared del capilar es negativa, el flujo electroosmótico se dirige al cátodo.

Lo fundamental en la ECZ son la homogeneidad de la solución amortiguadora y la intensidad del campo a través del capilar.

En seguida de la inyección y aplicación del voltaje los componentes de una mezcla son separados dentro de zonas discretas (Figura 1.4) (37, 41, 42).



Figura 1.4 Electroforesis capilar de zona

Moléculas pequeñas y grandes pueden ser separadas con ECZ.

b) Cromatografía micelar electrocinética (CMEC)

Esta técnica separa moléculas neutras. En este caso se encuentra presente un surfactante por encima de su concentración micelar crítica, formando micelas cargadas. Como se ve en la Figura 1.5, el flujo electroosmótico se dirige al cátodo. La migración electroforética de las

micelas cargadas negativamente es hacia la izquierda, pero el movimiento neto se dirige a la derecha porque domina el flujo electroosmótico (38, 43).

En ausencia de micelas todas las moléculas neutras llegarían al detector en un tiempo t_0 . Las micelas con la muestra llegan al detector al cabo de t_{mc} , que es mayor que t_0 porque las micelas migran contracorriente. Si una molécula neutra alcanza el equilibrio entre la disolución libre y el interior de las micelas, su tiempo de migración aumenta, porque migra en parte a la velocidad menor que tiene la micela. En este caso las moléculas neutras llegan al detector en un tiempo entre t_0 y t_{mc} . Cuanto más tiempo pasa la molécula dentro de la micela, mayor es su tiempo de migración. Los tiempos de migración de los cationes y de los aniones también están afectados por las micelas, debido a la distribución de los iones entre la disolución y las micelas y a su interacción electrostática con éstas.

La cromatografía micelar electrocinética es una forma de cromatografía porque las micelas se comportan como una fase pseudoestacionaria. La separación de las moléculas neutras se basa en el reparto entre la disolución y la fase “estacionaria” (37, 39, 41).

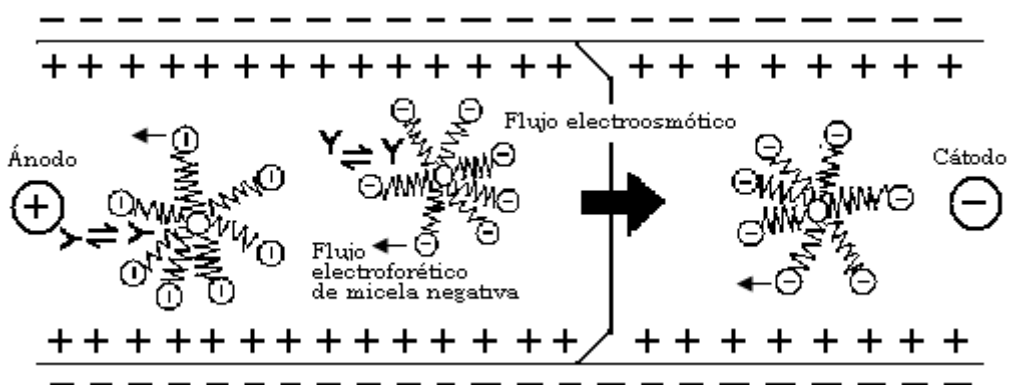


Figura 1.5 Cromatografía micelar electrocinética (37).

1.7 Separaciones de los compuestos en estudio mediante electroforesis capilar (EC)

Numerosos trabajos de identificación y cuantificación de mezclas de hidroxiácidos y dihidroxiácidos han empleado la EC.

La determinación del ácido o-HB en formulaciones anti-acné ha sido desarrollada mediante electroforesis capilar de zona, con la cual se obtuvieron óptimos resultados, empleando una solución amortiguadora compuesta por tetraborato de sodio 50 mM y fosfato de sodio 50 mM, alcanzando una buena resolución, linealidad y precisión intermedia. Como método de rutina para el análisis de formulaciones farmacéuticas, resultó ser barato y rápido (44).

La ECZ también se a empleado en el análisis de aguas naturales que contiene al ácido o-HB como producto de degradación de plantas, esta técnica involucra una detección ultravioleta, inyección hidrodinámica de la muestra, el empleo de una columna de sílica fundida de 57 cm x 75 μm de diámetro interno, con lo que se logra una linealidad en el intervalo de 5-100 μM para este método, que en combinación con extracción en fase sólida es simple y puede ser empleado en la determinación de ácidos aromáticos (45). Este modo de electroforesis con el empleo de una columna capilar de cuarzo y una solución amortiguadora de tris 25 mmol/L y Bromuro de cetiltrimetilamonio 0.5 mmol/L de pH 8, permitió la determinación del ácido o-HB, con un límite de detección de 8.0×10^{-7} mol/L, un intervalo lineal entre 5.8×10^{-6} y 1.0×10^{-4} mol/L (46).

También el monitoreo de fármacos anti-inflamatorios se hace necesario para la identificación de los agentes que producen efectos tóxicos y para la toma de decisiones en el tratamiento de una intoxicación. Mediante electroforesis capilar de zona, se determinaron simultáneamente algunos analgésicos anti-inflamatorios, entre los que se incluye el ibuprofeno, acetaminofen, indometacin y el ácido o-HB en muestras de

suero humano. Se utilizó un detector de arreglo de diodos, una columna capilar de sílica fundida de 64.5 cm x 50 µm de diámetro interno, la solución amortiguadora fue de ácido bórico. Con esta metodología se obtienen determinaciones del ácido o-HB en concentraciones del orden de µg/mL. Se obtuvieron resoluciones excelentes entre los picos y es de bajo costo, siendo un análisis rápido (47).

La caracterización de aguas residuales con electroforesis capilar y un detector de fluorescencia inducida, permite determinar por ejemplo al ácido o-HB que es un metabolito en varios analgésicos, el cual es relativamente estable en el ambiente acuático. Este compuesto fue extraído de muestras acuosas de aguas residuales y concentrado por extracción líquido-líquido, se obtienen niveles de detección de 100 ng/L del ácido o-HB. El análisis por electroforesis reveló más de 50 picos en la extracción de los analitos, por lo que se sugiere realizar técnicas complementarias para identificar los compuestos en este tipo de muestras (48).

En plantas como *Radix isatidis*, el ácido o-HB y los ácidos antranílico, benzoico y siríngico se encuentran presentes. Mediante electroforesis capilar se realizó la separación y determinación de estos compuestos con un método que emplea como solución amortiguadora tetraboratos 50 mmol/L y metanol; este método requiere un tiempo de análisis de 10 minutos (49). Por otro lado, el ácido o-HB es un componente que le da resistencia a las plantas contra las enfermedades y es asociado a señales de transducción. Un método basado en electroforesis capilar permitió la cuantificación del ácido o-HB total en plantas de *Arabidopsis*; para este estudio se empleó una columna de sílica fundida, el tiempo de análisis electroforético fue de 15 minutos (50).

Con un sistema de inyección en flujo acoplado a electroforesis capilar, el ácido o-HB se determinó como producto de hidrólisis del ácido acetilsalicílico, mediante el tratamiento en línea, en medio alcalino, este

análisis se aplicó a cuatro formas farmacéuticas comerciales. El tratamiento en línea del ácido acetilsalicílico hace de este acoplamiento un análisis rápido y simple que permite la hidrólisis, inyección y análisis de la muestra (51).

Los productos y metabolitos de la reacción con radicales libres del o-HB (ácido salicílico) se determinaron mediante ECZ y CMEC. Estos productos hidroxilados de este ácido son frecuentemente usados como medida relativa en investigaciones de radicales libres. En ECZ se empleó un voltaje de -20 kV, la solución amortiguadora que se usó fue de Tris 10 mM ajustada a pH de 2.78 y en el caso de CMEC, la solución amortiguadora empleada fue tetraborato de sodio 10 mM que contenía SDS 50 mM y ajustada a un pH de 8.4. Con ambos métodos se determinaron como productos de la reacción de radicales libres los ácidos 2,3- y 2,5-DHB. Pero mediante CMEC se logró determinar un metabolito natural del ácido o-HB que es el catecol. Ambas técnicas alcanzan un límite de detección de 2×10^{-7} M (52).

El empleo de nuevas columnas para EC preparadas incorporando grupos imidazol mediante organosilanización, ha permitido la separación de una mezcla de los ácidos piromelítico, trimelítico, tereftálico, isoftálico, o-HB, ftálico, mandélico, benzoico, anísico, p-HB y gálico, la separación de estos ácidos se efectuó, empleando una solución amortiguadora de acetatos 25 mM de pH 5.5, y un voltaje de -25 kV. La adición de nitrato de plata o B-ciclodextrina mejoró significativamente la resolución de los ácidos carboxílicos con carga mayor. Esto hace que la separación por EC sea resuelta para los ácidos aromáticos mono, di y tetra carboxilados, obteniendo para la columna un promedio de 3×10^5 número de platos teóricos. Adicional a esta separación se pueden realizar reacciones de complejación adicionando iones metálicos y se puede obtener la separación de ácidos que son isómeros geométricos (53).

La electroforesis capilar de zona, permitió la separación del fenol, ácido benzoico y el ácido 2,4-DHB, el método emplea una solución amortiguadora de boratos 50 mM de pH 8.3 presentándose buena precisión (54).

1.8 Separaciones de los compuestos en estudio mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La determinación del ácido o-HB por CLAR se ha empleado en el desarrollo de numerosos trabajos como en el caso de la determinación simultánea del ácido o-HB y el ácido acetilsalicílico, en tabletas de aspirina. En este trabajo se analizaron cinco formulaciones de tabletas empleando una fase móvil de acetonitrilo-ácido fórmico (99:1) y se utilizó una columna de fase reversa Nucleosil C18; este método puede ser empleado en la determinación de impurezas del ácido acetilsalicílico y puede considerarse como un análisis de rutina para el control de calidad de algunos fármacos (55). Continuando con el mecanismo de fase reversa, empleando una columna Zorbax C8 y una fase móvil metanol-agua-ácido fosfórico (1 M) (59:36:5), el ácido o-HB fue determinado como impureza principal del ácido acetilsalicílico, aunque también se determinaron algunos oligómeros y el anhídrido acetilsalicílico como impurezas menores (56).

En compuestos herbales fue posible analizar el ácido o-HB en CLAR usando mecanismo de fase reversa aunado a una extracción líquido-líquido, además se analizaron los ácidos gálico, clorogénico, 2,5-DHB, vainillínico, cafeico, siríngico, sinapico, p-cumárico, felúrico, anísico, rosmarínico y cinámico. La concentración de los cuales, puede tomarse como criterio de control de calidad de este tipo de formulaciones herbales. Con este método se alcanzaron límites de detección en el intervalo 60-210 ng (57).

El ácido o-HB fue extraído de plantas y analizado ya que se le atribuyen importantes funciones regulatorias en éstas. Sus precursores los ácidos

trans-cinámico, o-cumarínico y el ácido benzoico también fueron identificados, así como sus derivados los ácidos 2,3-DHB, 2,5-DHB en el análisis de *Catharanthus roseus* (58).

Mediante CLAR, empleando una columna de intercambio iónico y una detector de fluorescencia, se lograron separar los ácidos 2,3-DHB, 2,5-DHB y el o-HB como compuestos de un material vegetal (59). Usando como fase móvil agua-metanol (65:35) e hidróxido de tetra-n-butilamonio adicional a una extracción en fase sólida, los ácidos o-HB, dihidroacético, benzoico y sórbico se lograron determinar en productos cosméticos y se alcanzaron límites de detección del ácido o-HB de 5.5 ng (60). Con la misma técnica y el empleo de metanol-acetonitrilo-ácido acético 25 mM, se determinaron el ácido o-HB, salicilacilglucoronida y los ácidos salicílico y 2,5-DHB en muestras de plasma y orina de pacientes después de la administración de salicilatos en donde se observó una linealidad de 0.1-200 µg/mL del ácido o-HB en muestras de plasma y de 5-200 µg/mL en muestras de orina (61).

También empleando una columna sephadex G-10 y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo, agua, ácido sulfúrico y lauril sulfato de sodio, se lograron determinar los ácidos o-HB, p-HB, 2,5-DHB y 3,4-DHB en muestras de orina de 8 h después de haber administrado a los pacientes una tableta de 500 mg de ácido acetilsalicílico (62). En muestras de sangre, plasma, eritrocitos y en formulaciones farmacéuticas se determinaron de forma cuantitativa y cualitativa, anti-inflamatorios no esteroideos como el o-HB, tenoxicam, ketorolac, piroxicam, tolmetin, naproxen, flurbiprofeno, diclofenaco e ibuprofeno con límites de detección de ng empleando CLAR con fase reversa (63).

Una metodología por CLAR que emplea ácido acético-metanol (4:6) fue comparada con una de electroforesis capilar para separar y determinar dihidrato de zinc 5-aminosalicilato (ZASA) y sustancias relacionadas. Se obtuvieron resultados similares por ambas técnicas, encontrando como principal impureza a los ácidos 5-aminosalicílico y al o-HB, como productos de descomposición bajo condiciones ácidas y al ácido

5-aminosalicílico, p-aminofenol y al ácido benzenazosalicílico, como productos de descomposición al someter al ZASA a calentamiento (64). Empleando CLAR en fase reversa, como fase móvil ácido cítrico 30 mM, bromuro de tetrabutilamonio 5 mM y 2.5 mM del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se lograron determinar los ácidos 2,3-DHB, 2,5-DHB y el catecol como productos de reacción del ácido o-HB en un experimento in Vitro que involucra quelatos de EDTA y iones férricos (65). Ren y Shao (66) determinaron usando un detector fluorométrico los ácidos 2,3-DHB y 2,5-DHB que fueron encontrados como productos de la hidroxilación del ácido o-HB. Se alcanzaron límites de detección de 10 nmol/L del ácido 2,3-DHB, 0.6 nmol/L del ácido 2,5-DHB y 1.0 nmol/L del ácido o-HB en muestras de sangre y órganos de animales de experimentación Mc Cabe y col. (67) determinaron estos mismos ácidos, con una detección electroquímica obteniendo límites de detección de 1 pg para los ácidos dihidroxibenzoicos y de 100 pg para el ácido o-HB.

El catecol, la hidroquinona y el fenol se han determinado en CLAR con detección fluorométrica en muestras de orina de personas fumadoras y trabajadores de refineries expuestas a bajas concentraciones de benceno, este método fue validado (68).

En CLAR con fase reversa, una fase móvil de metanol y ácido fosfórico 0.05 M, el catecol, hidroquinona, fenol, resorcinol, pirogalico y orcinol, fueron separados mediante un método desarrollado para determinación de impurezas, en el fenol grado reactivo, el cual permitió la identificación y separación de la hidroquinona y el catecol como principales contaminantes de este reactivo (69).

La concentración atmosférica de los radicales hidroxilo fue calculada al determinar la concentración de los ácidos o-HB y 2,5-DHB en cartuchos con filtros impregnados de ácido o-HB, que fueron expuestos al medioambiente y la determinación se realizó por CLAR (70).

Los ácidos m-HB y 3,5-DHB se lograron separar y cuantificar por CLAR con una columna de fase reversa Shim-pack CLC-ODS, una fase móvil

de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfatos (fosfato de potasio, 1-heptilsulfonato de sodio y ácido acético) con detección ultravioleta, obteniendo resultados satisfactorios (71).

II OBJETIVOS

General

Determinar el efecto director que producen los sustituyentes $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$ del anillo aromático de los ácidos o-, m- y p-HB en la reacción de oxidación radiolítica por el radical $\cdot\text{OH}$.

De la Química Analítica

- Separar los productos radiolíticos primarios obtenidos en la radiólisis de soluciones acuosas diluidas de los ácidos en estudio mediante EC Y CLAR
- Identificar todos los productos radiolíticos primarios mediante EC y CLAR.
- Cuantificar cada uno de los compuestos primarios identificados
- Identificar los productos radiolíticos secundarios

De la Química de Radiaciones

- Determinar el rendimiento radioquímico por posición y total expresado como valor G para cada uno de los productos radiolíticos primarios obtenidos.
- Identificar el comportamiento radiolítico de los compuestos secundarios formados

III PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos y materiales

Los reactivos que se emplearon en la realización de este trabajo como son los ácidos o-, m- y p-hidroxibenzoicos, 2,3-, 2,4-, 2-5-, 3,4-, 3-5-dihidroxibenzoicos (DHB), 2,3,4-trihidroxibenzoico (THB) y el ácido hexansulfónico (sal de sodio), así como el catecol, el dodecil sulfato de sodio (SDS) y el ferricianuro de potasio fueron de la marca Aldrich Chemical Company Inc. Todos ellos de grado analítico, el resorcinol y la hidroquinona empleados fueron, de la marca Sigma Chemical Co. Po. El ácido 3,4,5-THB fue grado cromatográfico de la marca Fluka. Los gases como helio comprimido grado 5.0 de ultra alta pureza y el óxido nitroso grado absorción atómica, fueron de la marca Praxair. Para la cromatografía CLAR, el ácido acético glacial fue de la marca Merck y el metanol grado cromatográfico de J.T Baker. Para la EC, la solución amortiguadora de pH 9.3 de boratos utilizada fue de Agilent Technologies.

Agua desionizada

El agua usada en este trabajo fue desionizada, obtenida de un equipo Simplicity, Millipore.

La limpieza del material utilizado en este trabajo fue minuciosa; se empleó detergente, se enjuagó con abundante agua potable, después con agua bidestilada y para el enjuague final del material se utilizó agua desionizada. En el caso de los viales que se emplearon para la irradiación de las muestras (Figura 3.1) en su limpieza se omitió el detergente y después de su enjuague con agua desionizada y previo escurrimiento se sometieron a un calentamiento en mufla por 1.5 h a 250 °C.

Frecuentemente se realizó una limpieza especial a los viales usados para la irradiación con mezcla crómica por 2 h previo a su limpieza usual.

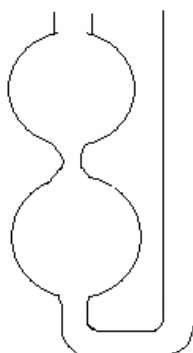


Figura 3.1 Vial para irradiar

3.2 Preparación de las soluciones patrón

Se elaboraron curvas patrón de los isómeros; ácidos 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4-, 3,5-DHB, catecol, hidroquinona y resorcinol, en concentraciones micromolares (μM), disolviendo una cantidad del compuesto puro en agua desionizada y realizando las diluciones pertinentes, para construir curvas de calibración en intervalos que incluyeran las concentraciones de los productos radiolíticos esperados. Las soluciones patrón se prepararon cada día que se realizó un análisis de las muestras irradiadas.

La solución amortiguadora de pH 9.3 utilizada en el análisis de EC fue de 10 mM de boratos y 50 mM de SDS la cual fue burbujeada durante 10 min. con helio para desplazar el aire y así evitar burbujas en el análisis.

3.3 Dosímetro

En este estudio se empleó el dosímetro ferroso-cúprico, el cual consiste de una solución acuosa de sulfato ferroso amoniacal 0.001 M, sulfato cúprico 0.01 M y ácido sulfúrico 0.005 M. Un volumen de esta solución se sometió a irradiación.

Las fuentes de radiación de ^{60}Co del irradiador Gammabeam 651 PT, permite obtener diversas razones de dosis, por lo cual se realizó un

mapeo del sitio para determinar la posición adecuada para la dosis requerida. Se estableció una posición de 35 cm del vértice y 45 cm de altura obteniéndose para la dosis de 37.2 Gy/min al 10 de agosto del 2005.

La dosis absorbida se cuantificó al conocer la concentración de los iones férricos formados que son proporcionales a la disminución de los iones cúpricos por el efecto de la radiación ionizante. La concentración de los iones férricos se determinó en un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 304 nm.

El valor de $\Delta(\text{D.O.})$ se obtuvo de las concentraciones de Fe^{+3} a los distintos tiempos de irradiación del dosímetro.

3.4 Preparación de muestras para irradiar

Las muestras para irradiar, se prepararon disolviendo en agua desionizada una cantidad del ácido o-, m- ó p-HB para obtener una concentración de 5 mM, a esta solución se le adicionó ferricianuro de potasio para obtener una concentración de 2.5 mM.

Una alícuota de 3 mL de la muestra, fue colocada en viales para irradiación (Figura 3.1) con tapones “thermogreen LB-1” de Supelco y la solución fue saturada con N_2O burbujeando la solución con este gas durante 10 minutos de tal forma que además de saturar la solución con dicho gas, se eliminó así el O_2 .

Las muestras fueron irradiadas a una dosis dada, en base a los resultados obtenidos con el dosímetro.

3.5 Irradiación de las muestras en el “GAMMABEAM 651PT Atomic Energy of Canada Limited”

Las muestras se irradiaron inmediatamente después de desgasificar la solución y saturarla con N_2O , colocando éstas en una posición a 45 cm

de altura del suelo a la base de la muestra y 35 cm del vértice de las fuentes (Figura 3.2), para obtener una dosis de 37.2 Gy/min (10 de agosto del 2005).

Por lo menos 10 soluciones de cada uno de los isómeros del ácido hidroxibenzoico se irradiaron, de las cuales se tomaron dos alícuotas para su análisis por CLAR y EC.

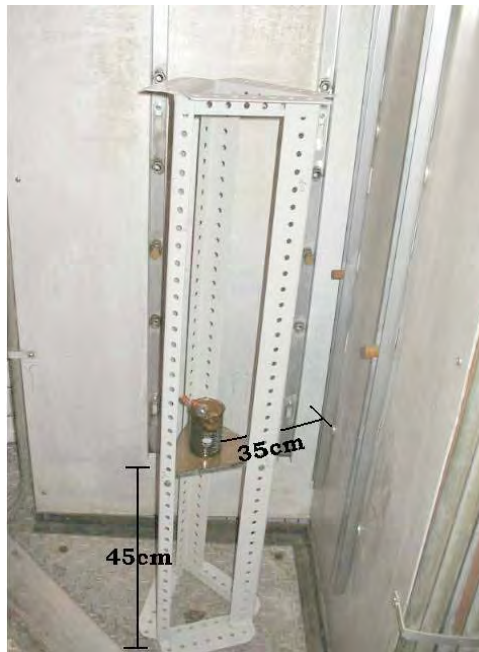


Figura 3.2 Posición de las muestras irradiadas en el irradiador

3.6 Análisis

Las soluciones patrón sin irradiar, se analizaron por electroforesis capilar y por cromatografía de líquidos en las mismas condiciones que las muestras irradiadas, las cuales se analizaron inmediatamente después de la irradiación.

3.6.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución

Para el análisis de las soluciones patrón y de las muestras irradiadas se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Agilent 1100 LC, el cual está equipado con un detector de arreglo de diodos, un automuestreador de 0.1-100 μL , desgasificador, una bomba cuaternaria y un sistema de cómputo para manejar el equipo, almacenar y procesar los datos cromatográficos.

En todos los análisis se usó una columna Alltima C18 de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 3 μm .

a) Ácido o-hidroxibenzoico

En el análisis del ácido o-HB y sus productos radiolíticos se utilizó como fase móvil 5 % de metanol, 20 % de una solución 5 mM del ácido hexansulfónico y 75 % de una solución acuosa de ácido acético al 1% usando un flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de 50 μL de la muestra irradiada y de las soluciones patrón. La presión obtenida fue de 8.0 MPa, siendo el tiempo de separación de los productos esperados de 30 min.

b) Ácido m-hidroxibenzoico

En el análisis del ácido m-HB y sus productos radiolíticos se utilizó como fase móvil 20 % de una solución 5 mM del ácido hexansulfónico y 80 % de una solución acuosa de ácido acético al 1 %. Los demás parámetros fueron iguales a los usados en la determinación del ácido o-HB. El tiempo de análisis fue de 45 min para la separación de los productos radiolíticos.

c) Ácido p-hidroxibenzoico

El análisis del ácido p-HB y sus productos radiolíticos, fue similar al del ácido o-HB excepto que se inyectaron 100 μL de la muestra irradiada y

de las soluciones patrón y el tiempo de análisis fue de 45 min para los productos radiolíticos.

Nota: Los ácidos o-, y m-HB requerían de mayor tiempo para su elución, por lo que se limpió la columna con 100 % de MeOH después de eluir el último producto radiolítico separado.

3.6.2 Electroforesis Capilar

El sistema de Electroforesis Capilar es un equipo Agilent 1600-3D equipado con celda y columna de alta sensibilidad con un capilar de 72 cm de longitud efectiva, 8.5 cm de la salida del detector (80.5 cm en total de la columna) y 75 μm de diámetro interno.

Los parámetros utilizados del equipo de electroforesis capilar, para la determinación y cuantificación de los productos radiolíticos de los tres ácidos, fueron la aplicación de un voltaje de 25 kV, con un tiempo de inyección de 4 segundos, mediante inyección hidrodinámica con vacío y se empleó una solución amortiguadora de pH 9.3 de boratos 10 mM y 50 mM de SDS, lo que permitió un tiempo de análisis de alrededor de 25 minutos.

IV RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Dosimetría

Para la determinación de la dosis se realizaron tres mediciones, para cada tiempo de irradiación. La Figura 4.1 muestra la gráfica del resultado obtenido en una de las determinaciones de dosimetría, realizada a 35 cm del vértice y 45 cm de altura de la fuente (ver figura 3.2).

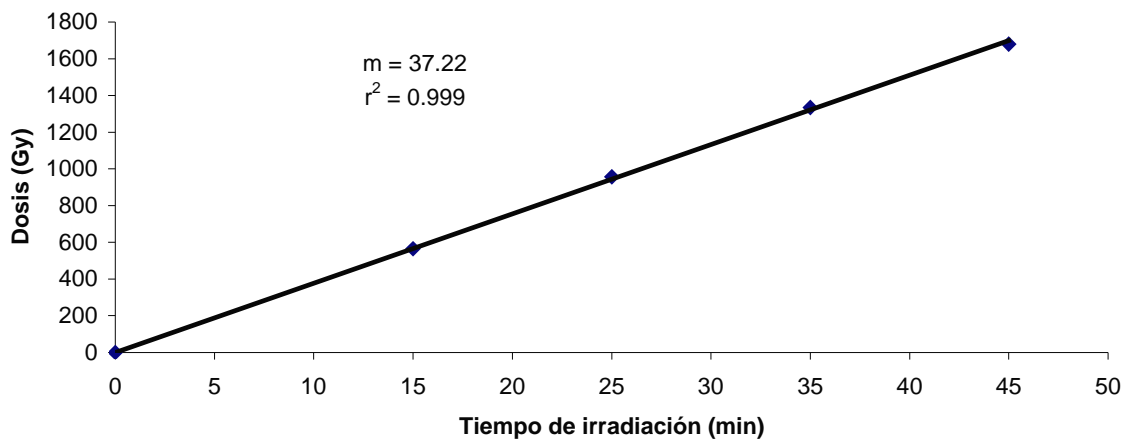


Figura 4.1 Gráfica de la dosis en función del tiempo de irradiación obtenida.

La gráfica de la figura 4.1 muestra la dosis recibida por dosímetro, la cual fue determinada usando la ecuación indicada en el punto 1.4 referente a la dosimetría química del dosímetro ferroso-cúprico descrito en el punto 3.3.

Dado que el ^{60}Co continuamente está decayendo, todos los cálculos donde se requería la dosis se relacionaron con el valor obtenido en la pendiente. Tomando en cuenta que los resultados obtenidos con anterioridad y referidos a este valor de 37.2 Gy/min para el 10 de agosto 2005, fueron congruentes usando el factor de decaimiento que se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$D = D_0 e^{-\lambda t}$$

Donde:

$$\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

D_0 = dosis inicial del día que se realizó la dosimetría

D = dosis a la fecha deseada

t = tiempo transcurrido después de la determinación de la D_0

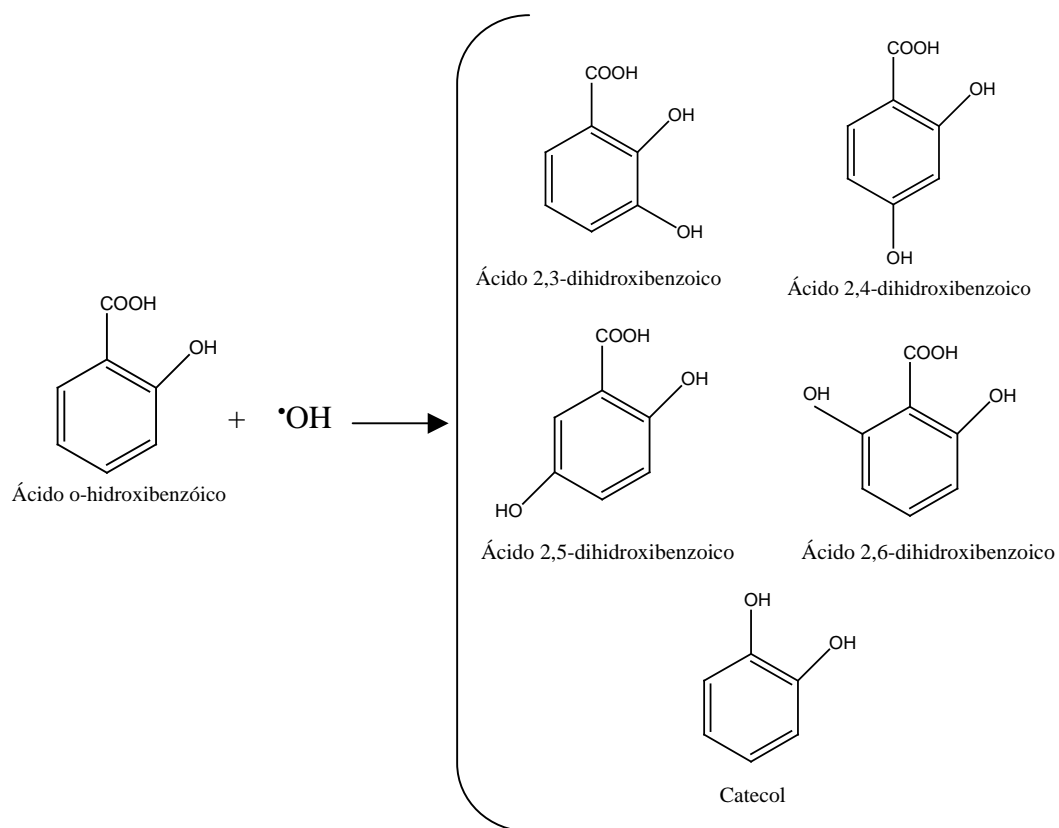
$t_{1/2}$ = tiempo de vida media del ^{60}Co (5.271 años) (16).

Inicialmente se discutirá la parte analítica del estudio, como es la separación e identificación por CLAR y EC de los compuestos esperados en la radiólisis de soluciones acuosas diluidas de los ácidos, o-, m- y p-hidroxibenzoicos.

4.2 Estudios de la radiólisis del ácido o-HB

4.2.1 Productos radiolíticos esperados para el ácido o-hidroxibenzoico

El esquema 4.1 muestra los productos esperados por el ataque del radical $\cdot\text{OH}$ al ácido o-HB en la radiólisis de soluciones acuosas.



Esquema 4.1 Productos radiolíticos esperados para el ácido o-HB.

Como se puede ver en el esquema 4.1 los diferentes compuestos esperados son principalmente dihidroxiácidos y la descarboxilación del ácido o-HB.

Los compuestos primarios esperados son formados por la oxidación del radical formado por el ferricianuro de potasio, siendo que el radical es producido por la adición del radical $\cdot\text{OH}$ a las posiciones 3, 4, 5 y 6 libres del anillo bencénico. El catecol es también esperado como resultado de la descarboxilación.

4.2.2 Separación mediante CLAR de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido o-hidroxibenzoico

Se muestra inicialmente la separación de los compuestos esperados en la radiólisis del ácido o-HB, así como su identificación mediante el tiempo de retención y su espectro UV.

La Figura 4.2 muestra el cromatograma de la separación de los compuestos auténticos esperados en la radiólisis del ácido o-HB, como lo indica el esquema 4.1. (miliunidades de absorbancia (mUA) en función del tiempo en minutos (min)).

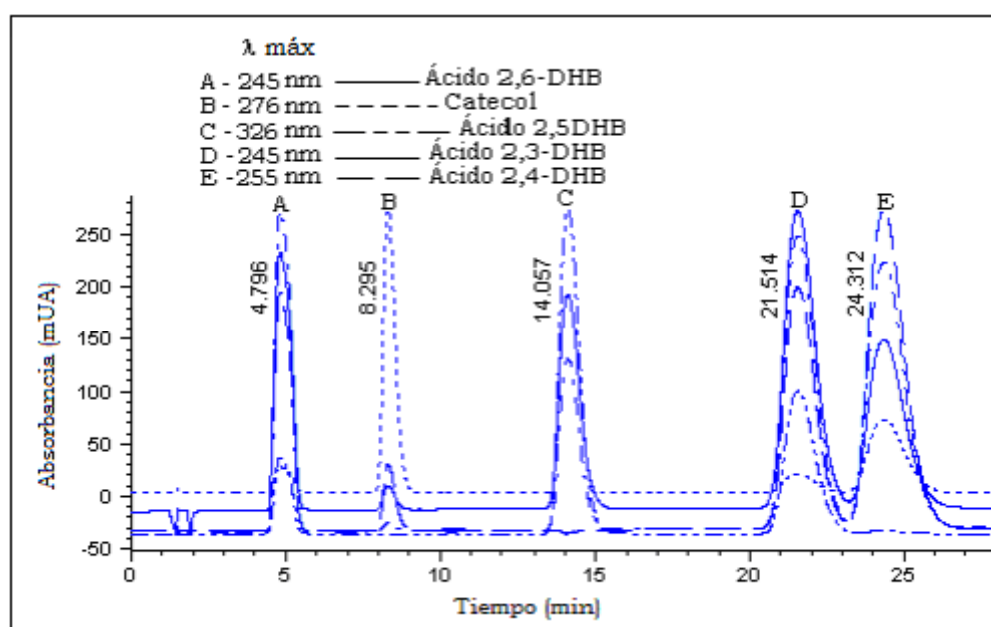


Figura 4.2 Cromatograma de la separación de los compuestos auténticos esperados en la radiólisis del ácido o-HB determinados a diferentes longitudes de onda.

Los parámetros de separación se muestran en la tabla 4.1 (ver apéndice C) donde se usó una columna Alltima C18 de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 3 μ m y como

fase móvil 5% de metanol, 20 % de una solución de ácido hexansulfónico 5 mM y 75 % de una solución acuosa de ácido acético al 1 %.

Tabla 4.1 Parámetros cromatográficos para los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido o-HB.

Compuesto	t _r (min)	Eficiencia*	Resolución
Ácido 2,6-DHB	4.8	730	4.5
Catecol	8.3	2050	
Ácido 2,5-DHB	14	2350	5.8
Ácido 2,3-DHB	22	1850	3.7
Ácido 2,4-DHB	24.3	2400	2.5

*Número de platos teóricos

Mediante CLAR se lograron separar los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido o-HB (ver esquema 4.1), con resolución en la separación siempre mayor a 1.

En la Figura 4.3 se presentan los espectros de UV que se obtuvieron en el análisis de las soluciones que contenían concentraciones del orden de μM de cada uno de los compuestos puros, y semejantes a las concentraciones esperadas de los productos radiolíticos primarios.

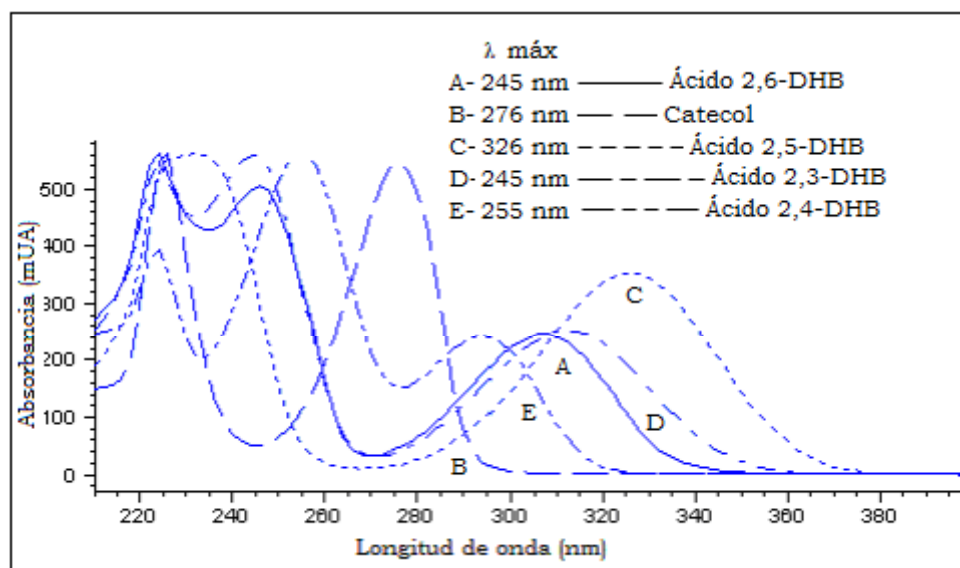


Figura 4.3 Espectros obtenidos en CLAR de los cinco productos de la radiólisis de una solución acuosa del ácido o-HB.

Como se puede observar cada uno de los compuestos tiene espectros muy diferentes lo que permite una identificación con facilidad. Cada espectro presenta máximos de absorción bien definidos por lo que éstos fueron seleccionados para la cuantificación de los compuestos obtenidos.

La longitud de onda máxima donde se tomó la lectura se utilizó para integrar el área bajo la curva del pico obtenido de cada compuesto separado.

4.2.3 Curvas patrón en CLAR de los productos radiolíticos esperados para el ácido o-hidroxibenzoico

Los resultados de las curvas patrón para CLAR fueron obtenidos mediante la determinación del área bajo la curva de los picos cromatográficos obtenidos.

Cada una de las curvas patrón son un ejemplo de los resultados obtenidos para cada día que se irradió una muestra. Cada inyección contenía una mezcla de los compuestos radiolíticos esperados en la radiólisis del ácido o-HB en solución acuosa.

Estos resultados se obtuvieron intercalando inyecciones de muestras irradiadas y alícuotas de la solución inicial que contenía una concentración conocida de cada compuesto puro, en el intervalo de concentración que se observó en pruebas iniciales a muestras irradiadas.

La figura 4.4 muestra un ejemplo de las curvas patrón que se obtuvieron un día que se irradió el ácido o-hidroxibenzoico.

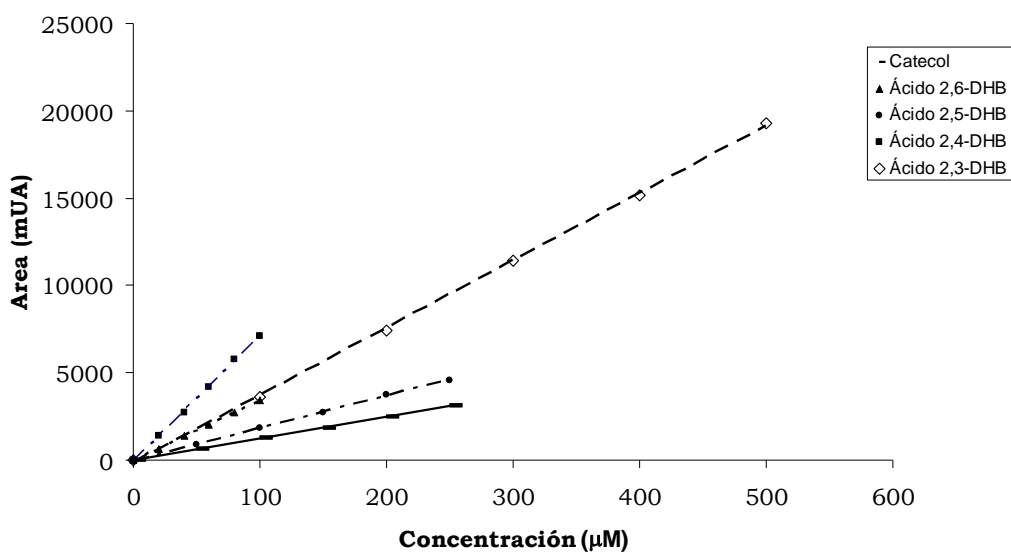


Figura 4.4 Curvas patrón en CLAR para los cinco compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido o-HB. Columna Alltima C18 de 50 mm x 4.6 mm, 3 µm, fase móvil 5:20:75 de MeOH al 5%, sal del ácido hexansulfónico (5 mM) y ácido acético al 1 %.

Las rectas obtenidas se ajustaron según la ecuación lineal indicada abajo, en el intervalo de la concentración de interés. Los resultados fueron tratados mediante el programa OriginPro7 y la ecuación

$$y = Px.$$

donde: P es la pendiente de la recta.

4.2.4 Separación por EC de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido orto-hidroxibenzoico

Como se observa en el esquema 4.1 los compuestos esperados en la radiólisis del ácido o-HB son cinco, los cuales fueron separados en EC usando el modo de cromatografía micelar electrocinética como se muestran los resultados en la figura 4.5.

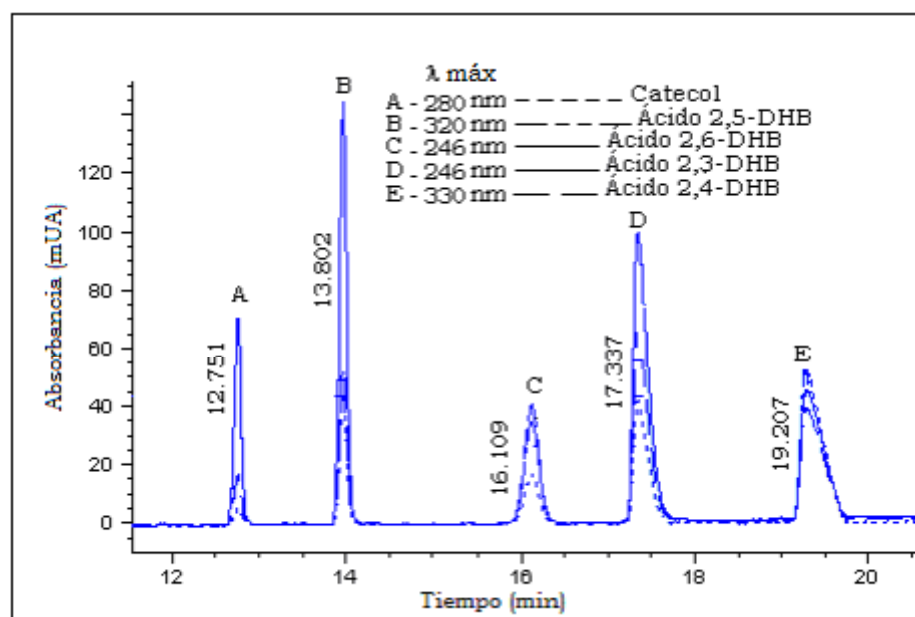


Figura 4.5 Electroferograma de la separación de los compuestos auténticos esperados en la radiólisis acuosa del ácido o-HB.

Los parámetros de separación se muestran en la tabla 4.2 usando una celda y columna de alta sensibilidad con un capilar 80.5 cm de longitud total de la columna y 75 μm de diámetro interno, se empleó una solución amortiguadora de pH 9.3 de boratos 10 mM conteniendo 50 mM de SDS.

Tabla 4.2 Parámetros electroforéticos para los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido o-HB.

Compuesto	t_m (min)	Eficiencia*	Resolución
Catecol	12.8	78450	5.8
Ácido 2,5-DHB	14	141650	
Ácido 2,6-DHB	16.1	38050	7.2
Ácido 2,3-DHB	17.3	64950	3.0
Ácido 2,4-DHB	19.3	23550	3.9

*Número de platos teóricos

Los parámetros electroforéticos resultaron buenos.

Mediante EC se lograron separar los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido o-HB con una resolución mayor a 1 (ver esquema 4.1). La Figura 4.6 muestra los espectros obtenidos en el análisis de las soluciones que contenían una concentración del orden de μM de cada uno de los compuestos puros esperados como productos radiolíticos del ácido o-HB.

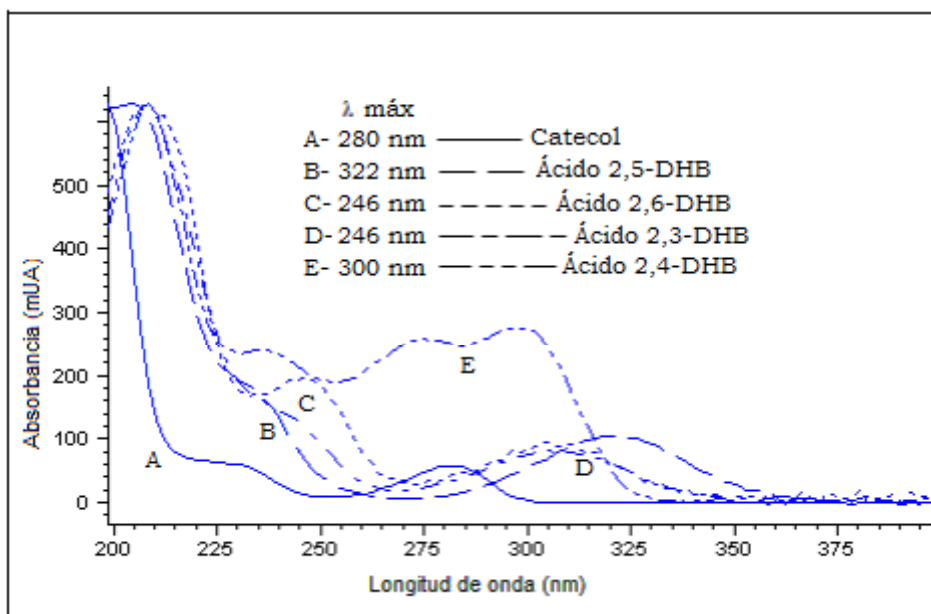


Figura 4.6 Espectros obtenidos en EC de los productos de la radiólisis de una solución acuosa del ácido o-HB.

Los espectros obtenidos en EC también presentan picos máximos de absorción a longitudes de onda definida que hacen posible su identificación y cuantificar su producción en la radiólisis de soluciones acuosas del ácido o-HB.

Por otro lado, usando las áreas bajo la curva de los picos del electroferograma obtenido, a las diferentes longitudes de onda máxima de los espectros, se lograron cuantificar los productos radiolíticos obtenidos en la radiólisis del ácido o-HB.

4.2.5 Curvas patrón en EC de los productos radiolíticos esperados para el ácido orto-hidroxibenzoico.

La figura 4.7 muestra las curvas patrón de los productos auténticos esperados en la radiólisis del ácido o-HB determinadas en electroforesis capilar.

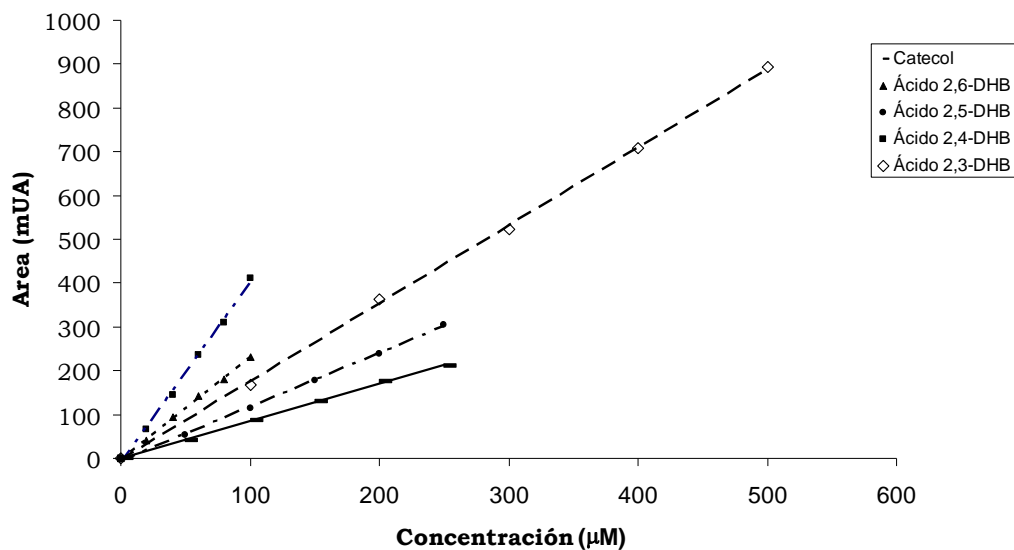


Figura 4.7 Curvas patrón en EC de los cinco compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido o-HB. Columna y celda de alta sensibilidad (72 cm + 8.5 cm x 75 µm), voltaje 25 kV y como solución amortiguadora de boratos 10 mM de pH 9.3 con 50 mM de SDS.

El tratamiento de los datos se realizó de manera similar que los obtenidos en CLAR. Así como también se utilizó el programa OriginPro7.

4.2.6 Análisis cromatográfico y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido o-hidroxibenzoico

Se muestra inicialmente la separación de los compuestos radiolíticos del ácido o-HB, así como su identificación mediante el t_r y su espectro UV.

La Figura 4.8 muestra el cromatograma de la separación de los productos obtenidos en la radiólisis del ácido o-HB. Este ácido eluye a los 38 minutos y no se presenta en el cromatograma.

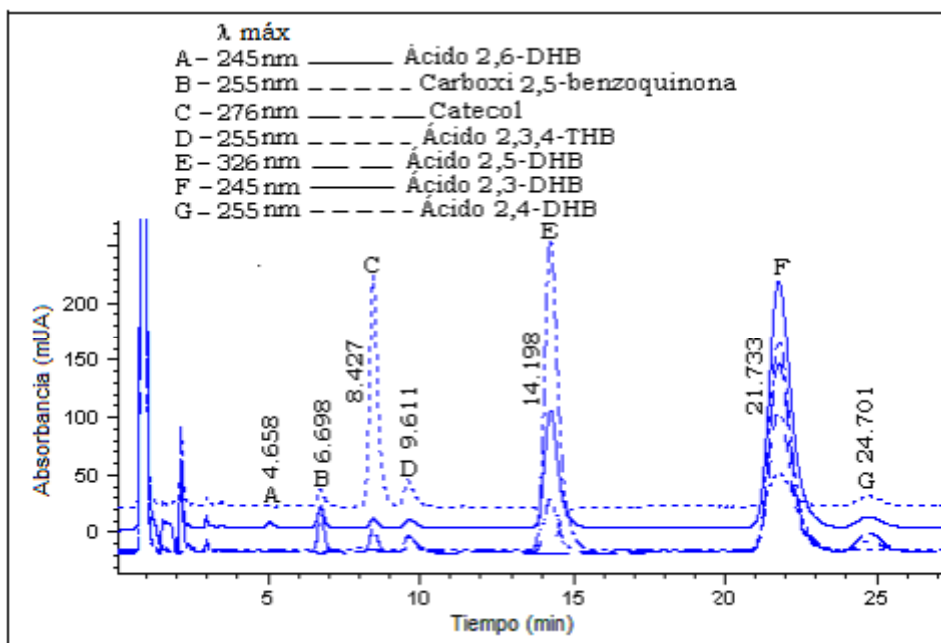


Figura 4.8 Cromatograma de la separación de los compuestos obtenidos en la radiólisis del ácido o-HB 5 mM + 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ saturado de N_2O irradiado 2.22 kGy.

Mediante CLAR se lograron separar adecuadamente los siete compuestos, como productos radiolíticos del ácido o-HB. En la figura 4.9 se presentan los espectros de los dos compuestos adicionales a los que se esperaban como productos en la radiólisis de este ácido.

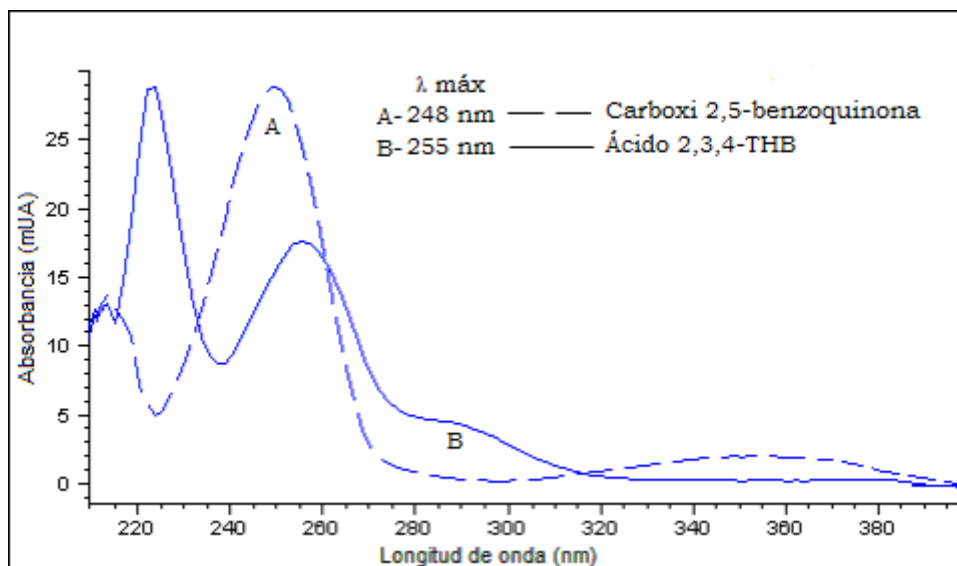


Figura 4.9 Espectros obtenidos en CLAR de los dos compuestos adicionales a los esperados en la radiólisis del ácido o-HB en solución acuosa.

Como puede observarse, estos productos presentan espectros diferentes al de los productos auténticos que se muestran en la figura 4.3, estos nuevos compuestos también presentan máximos de absorción definidos.

4.2.7 Curvas de dependencia de la concentración en función de la dosis de los productos radiolíticos del ácido orto-hidroxibenzoico (CLAR)

Las curvas que se presentan enseguida fueron obtenidas mediante la integración del área bajo la curva de los picos cromatográficos que presentó cada producto radiolítico. Estas áreas se interpolaron en las curvas patrón para calcular la concentración a la cual se obtuvieron cada uno de los compuestos.

Se presentan ejemplos de las curvas para un día determinado, en el que se irradió a diferentes dosis una solución acuosa 5 mM del ácido o-HB

conteniendo una concentración 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ y saturada con N_2O .

Los datos empleados para la construcción de estas curvas se obtuvieron a la longitud de onda máxima del espectro UV que presenta cada compuesto.

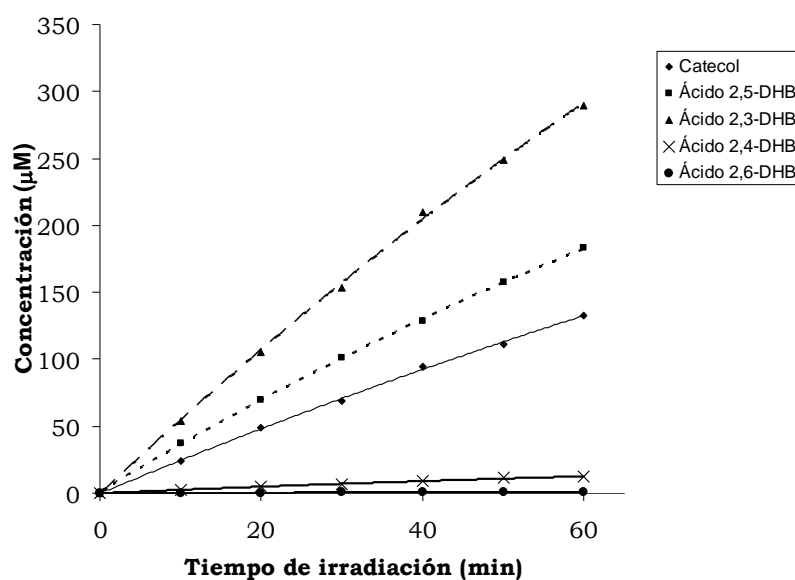


Figura 4.10 Curvas de concentración determinadas en CLAR para los cinco productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido o-HB. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las empleadas para la determinación de los productos puros.

En la figura 4.11 se muestra una curva de concentración donde se observa el comportamiento cuadrático con la dosis del compuesto secundario 2,3,4-THB.

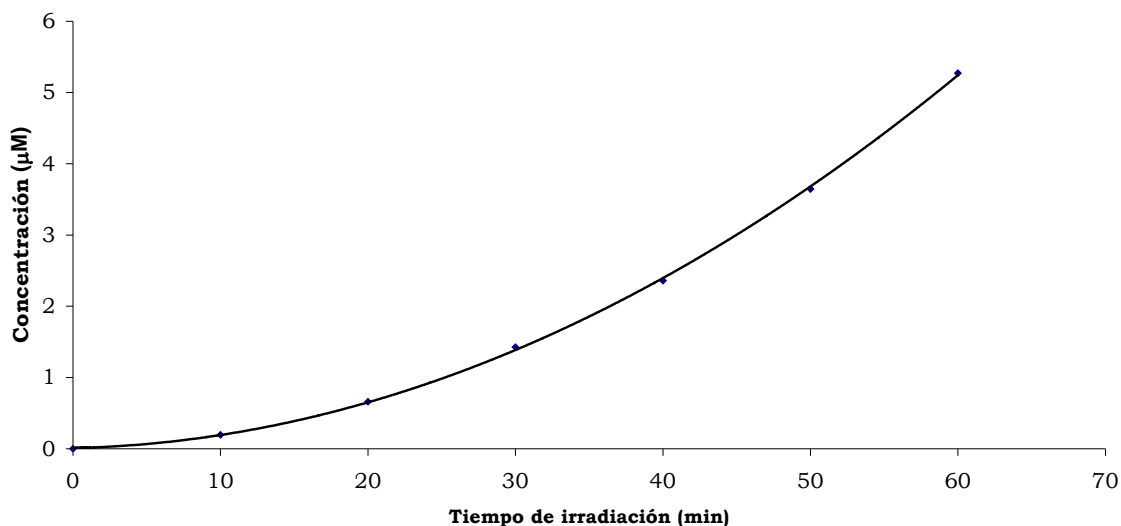


Figura 4.11 Curva de concentración determinada en CLAR para el compuesto secundario (2,3,4-THB) obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido o-HB.

Las condiciones cromatográficas para este producto secundario fueron las mismas que las empleadas para la determinación de los productos puros.

Los resultados de las curvas obtenidas en la figura 4.9 para cada uno de los productos primarios radiolíticos fueron tratados mediante el programa OriginPro7 usando la ecuación 10 del apéndice A.

4.2.8 Análisis electroforético y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido orto-hidroxibenzoico

Como se observa en la figura 4.12 en la radiólisis del ácido o-HB y analizado por el método de CMEC, se lograron separar cinco productos radiolíticos, cuatro productos de los esperados que se encuentran en el esquema 1 y uno más que es la carboxi-2,5-benzoquinona, que no es un producto de la radiólisis del ácido o-HB, éste compuesto es la forma oxidada del ácido 2,5-DHB. Como el ácido 2,6-DHB se forma en muy

pequeña concentración, está abajo del límite de detección así como también sucede con el producto radiolítico secundario. Sin embargo, la carboxiquinona a pH básico se forma en mayor cantidad por lo que se alcanza a observar bien en este tipo de análisis además de que su absorptividad es grande.

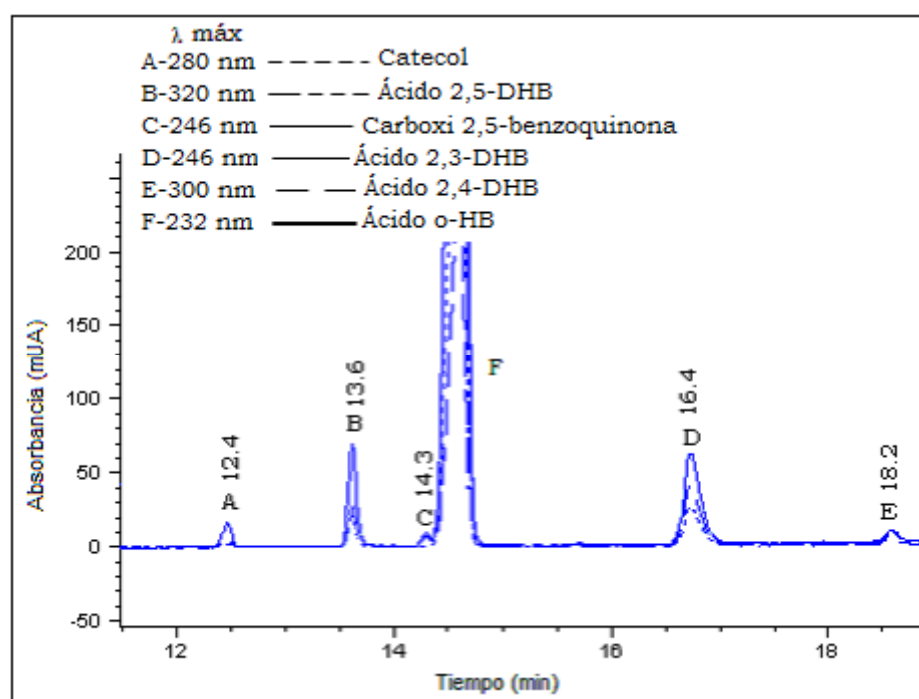


Figura 4.12 Electroferograma de la separación de los productos radiolíticos del ácido o-HB. (Las condiciones de la muestra irradiada son las mismas de la figura 4.8 y las condiciones del electroferograma son los mismos de la figura 4.5).

El pico F del electroferograma corresponde al ácido o-HB.

En la figura 4.13 se muestra el espectro UV del producto adicional a los esperados en la radiólisis del ácido o-HB que es la carboxi-2,5 benzoquinona.

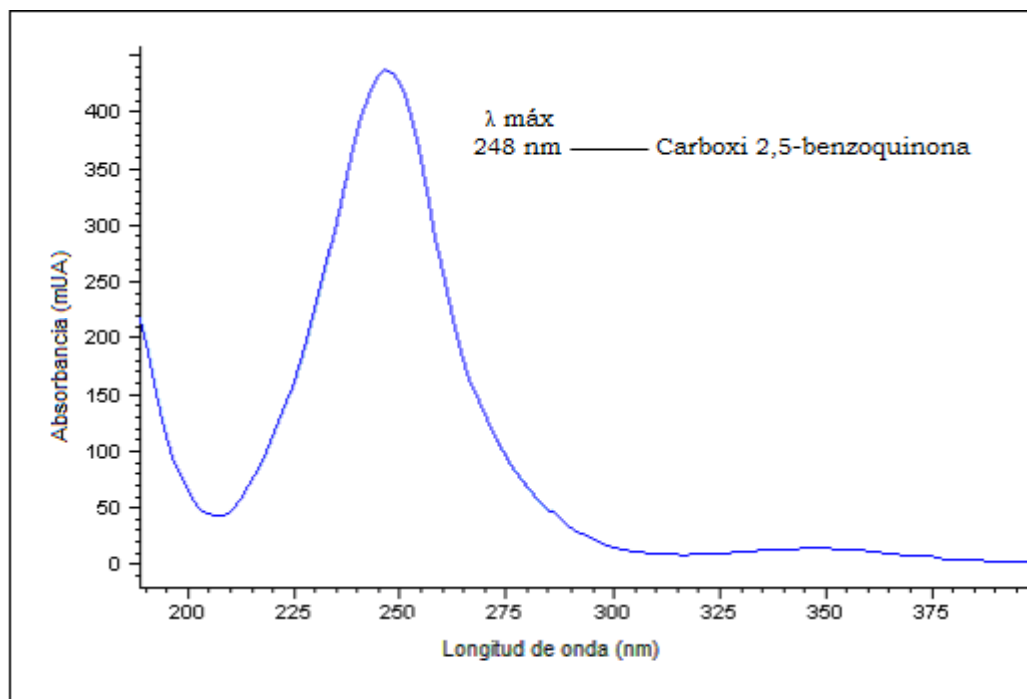


Figura 4.13 Espectro obtenido en EC de la carboxi-2,5 benzoquinona.

Como se observa en la figura 4.6 sobre los espectros de los compuestos auténticos, este espectro no es idéntico a ninguno de los productos auténticos que se esperaban.

La longitud de onda máxima que presenta este compuesto es a 246 nm, aunque la forma del espectro es similar al observado en CLAR ($\lambda = 255$ nm), este compuesto presenta un corrimiento en su máximo de absorbancia debido al pH básico que se usó en el análisis de CMEC.

4.2.9 Curvas de dependencia de la concentración en función de la dosis de los productos radiolíticos del ácido orto-hidroxibenzoico (EC)

Las curvas de concentración, fueron obtenidas mediante la determinación del área bajo la curva de los picos electroforéticos que presentó cada compuesto. Estas áreas se interpolaron en las curvas

patrón para calcular la concentración a la cual se obtuvieron cada uno de ellos.

Los datos empleados para la construcción de estas curvas se obtuvieron a la longitud de onda máxima del espectro UV que presenta cada compuesto.

La figura 4.14 muestra un ejemplo de las curvas de concentración en función del tiempo de irradiación que se obtuvieron en EC (un día en que se irradió el ácido o-hidroxibenzoico 5 mM más una concentración 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ y saturada con N_2O).

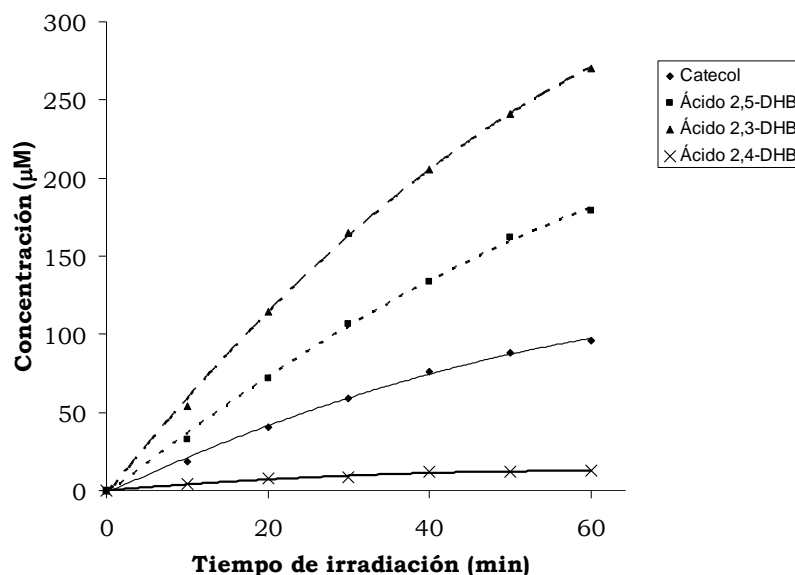


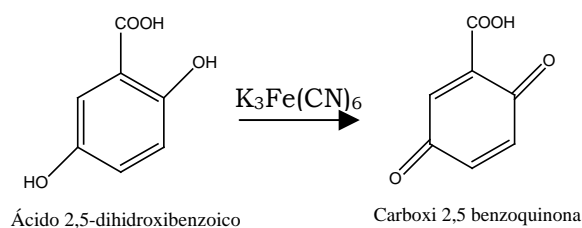
Figura 4.14 Curvas de concentración determinadas por EC para los cuatro productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido o-HB. Las condiciones electroforéticas fueron las mismas que las empleadas para la determinación de los productos puros.

Los resultados fueron tratados de la misma manera que los obtenidos en CLAR usando el programa OriginPro7 y la ecuación 10 del apéndice A.

Es importante mencionar que al irradiar una solución del ácido o-hidroxibenzoico a una concentración 5 mM más una concentración de 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ y saturada con N_2O , se obtuvieron siete compuestos de los cuales cinco de ellos son los ácidos 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-DHB y el catecol que son los compuestos que se esperaban (ver esquema 4.1).

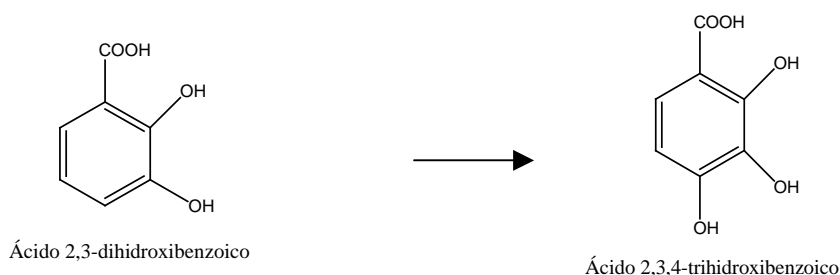
Uno de los otros dos compuestos se identificó como producto secundario y el otro como la forma oxidada del ácido 2,5-DHB (carboxi 2,5-benzoquinona) al ser analizados por HPLC. En el caso de EC se identificaron cuatro de los productos radiolíticos esperados excepto el ácido 2,6-DHB, porque al ser el producto esperado en la posición orto al grupo $-COOH$ y meta al grupo $-OH$ éste se obtuvo en concentraciones muy bajas. Además de estos se identificó a la carboxi 2,5-benzoquinona.

La carboxi-2,5-benzoquinona se identificó oxidando al ácido 2,5 DHB con una cantidad adecuada de $K_3Fe(CN)_6$. Así que este compuesto no es un producto radiolítico del ácido o-HB, ya que existe $K_3Fe(CN)_6$ suficiente en la solución irradiada para que reaccione con el ácido 2,5-DHB (producto primario) para dar a la carboxi-2,5-benzoquinona.

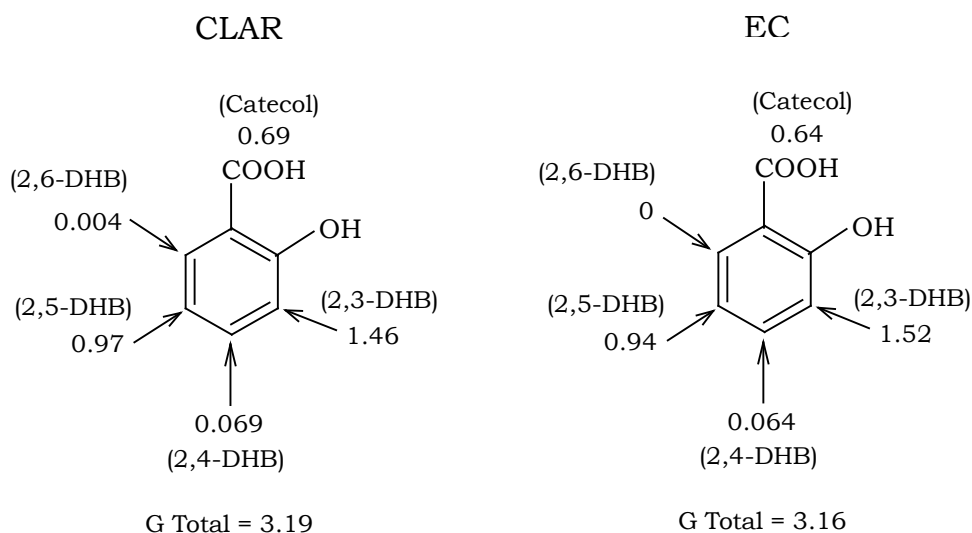


El compuesto radiolítico secundario fue identificado por su tiempo de retención y su espectro de UV del compuesto auténtico, analizado bajo las mismas condiciones que la muestra irradiada. Este compuesto identificado fue el ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico (2,3,4-THB). El comportamiento de dependencia cuadrática que presenta con la dosis (ver figura 4.11), indica que es un producto secundario que muy

probablemente se forma a partir del ácido 2,3-DHB, ya que este compuesto es el que se encuentra en mayor concentración, por ser el principal producto radiolítico primario del ácido o-HB.



4.2.10 Valores G del ácido o-HB



En el caso del ácido o-HB el valor G fue un poco menor a los valores obtenidos para los otros dos ácidos HB ya que en este caso se obtiene con rendimiento de alrededor de 1 para el ácido 2,5-DHB el cual con la presencia del ferricianuro se oxida y forma la Carboxi 2,5-benzoquinona y este compuesto se descompone fácilmente lo cual no permite su cuantificación.

La determinación del valor G esperado para una solución 5 mM de ácido o-HB en solución acuosa y conteniendo N₂O y ferricianuro (como

oxidante) se estimó que es de ~4.5 moléculas/100 eV de energía absorbida (57).

Tabla 4.3 Muestra algunos ejemplos del rendimiento radioquímico de diferentes compuestos aromáticos determinados experimentalmente.

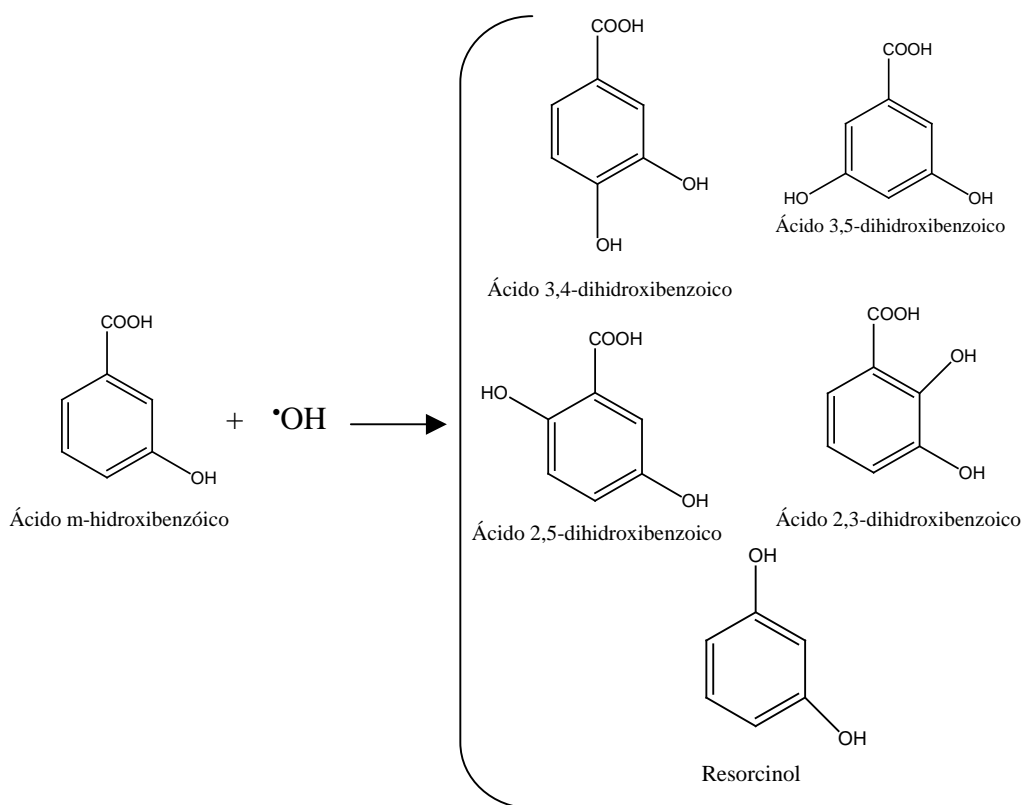
Compuesto aromático	Valor G	Productos
Benceno	6.0	Fenol
Fenol	5.45	Catecol, resorcinol e hidroquinona
Ácido benzoico	5.2	Ácido o-, m- y p-HB
Tolueno	5.79	o-, m- y p-cresoles

Este valor G del ácido o-HB es relativamente bajo comparado con el benceno que se ha estimado y determinado experimentalmente con un valor G de 6 moléculas/100 eV de energía absorbida.

4.3 Estudios de la radiólisis del ácido m-HB

4.3.1 Productos radiolíticos esperados para el ácido m-hidroxibenzoico

En el esquema 4.2 se muestran los productos esperados en la radiólisis de una solución acuosa diluida del ácido m-hidroxibenzoico.



Esquema 4.2 Productos esperados en la radiólisis del ácido m-HB.

Como se muestra en el esquema 4.2 de manera similar al ácido o-HB los compuestos esperados son principalmente dihidroxiácidos y la descarboxilación del ácido m-HB.

Los cinco productos esperados son porque el radical $\cdot\text{OH}$ mediante una reacción de adición ataca a las posiciones libres del anillo bencénico y el quinto compuesto es porque se espera una descarboxilación del grupo ácido.

4.3.2 Análisis cromatográfico de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido meta-hidroxibenzoico.

En la figura 4.15 se presenta un cromatograma de la separación de los compuestos auténticos esperados en la radiólisis del ácido m-HB.

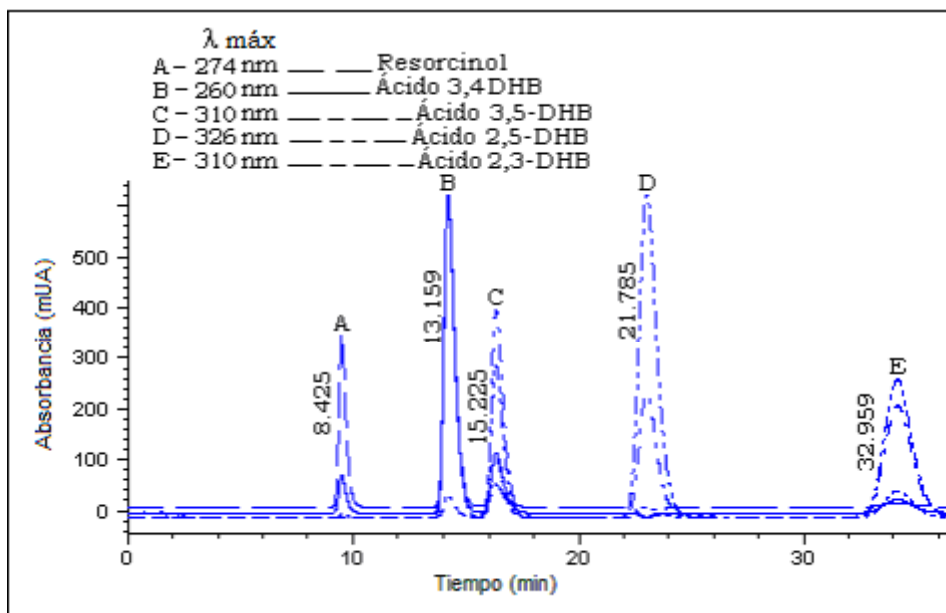


Figura 4.15 Cromatograma de la separación de los compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido m-HB.

Los parámetros de separación se muestran en la tabla 4.4 donde se usó una columna Alltima C18 de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 3 μm y como fase móvil 20% de la sal sódica del ácido 1-hexansulfónico (5 mM) y 80 % de una solución acuosa de ácido acético al 1 %.

Tabla 4.4 Parámetros cromatográficos para los cinco compuestos esperados en la radiólisis del ácido m-HB.

Compuesto	t _r (min)	Eficiencia*	Resolución
Resorcinol	8.4	2850	5.5
Ácido 3,4-DHB	13.1	2450	
Ácido 3,5-DHB	15.2	3400	1.8
Ácido 2,5-DHB	21.8	3350	4.4
Ácido 2,3-DHB	33	2650	5.2

*Número de platos teóricos

La resolución en este caso fue muy buena, siendo que en todos los casos fue mayor a 1.

En la Figura 4.16 se presentan los espectros que se obtuvieron en el análisis de las soluciones patrón, las cuales contenían a los compuestos auténticos en una concentración del orden de μM para cada uno de ellos.

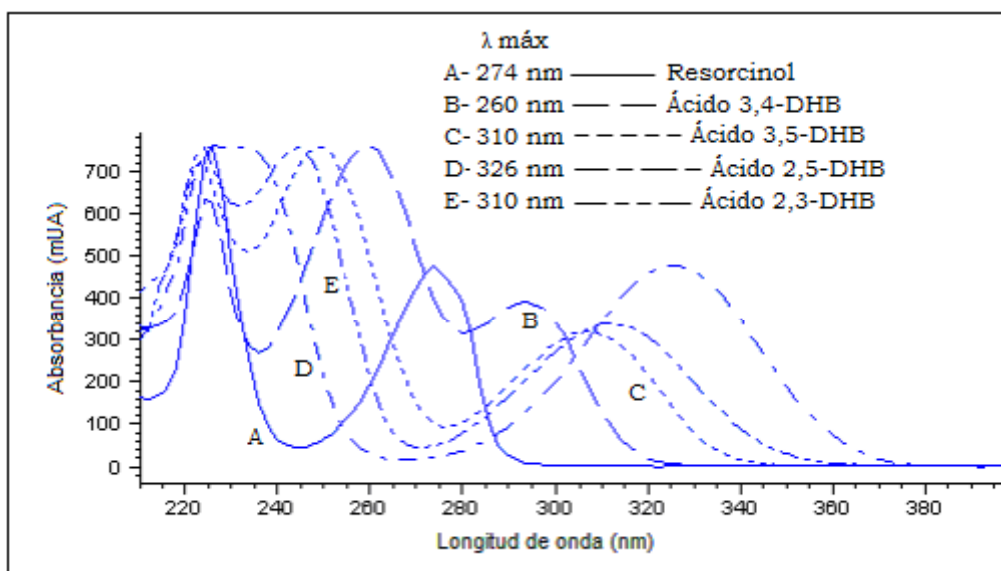


Figura 4.16 Espectros obtenidos en CLAR de los cinco productos radiolíticos esperados de la radiólisis de una solución acuosa del ácido m-HB.

Los espectros obtenidos permiten la identificación de cada compuesto y el pico máximo de absorción sirvió para obtener los cromatogramas y cuantificar a los productos radiolíticos.

4.3.3 Curvas patrón en CLAR de los productos radiolíticos esperados para el ácido meta-hidroxibenzoico

La figura 4.17 muestra un ejemplo de las curvas patrón para los productos radiolíticos esperados para el ácido m-HB.

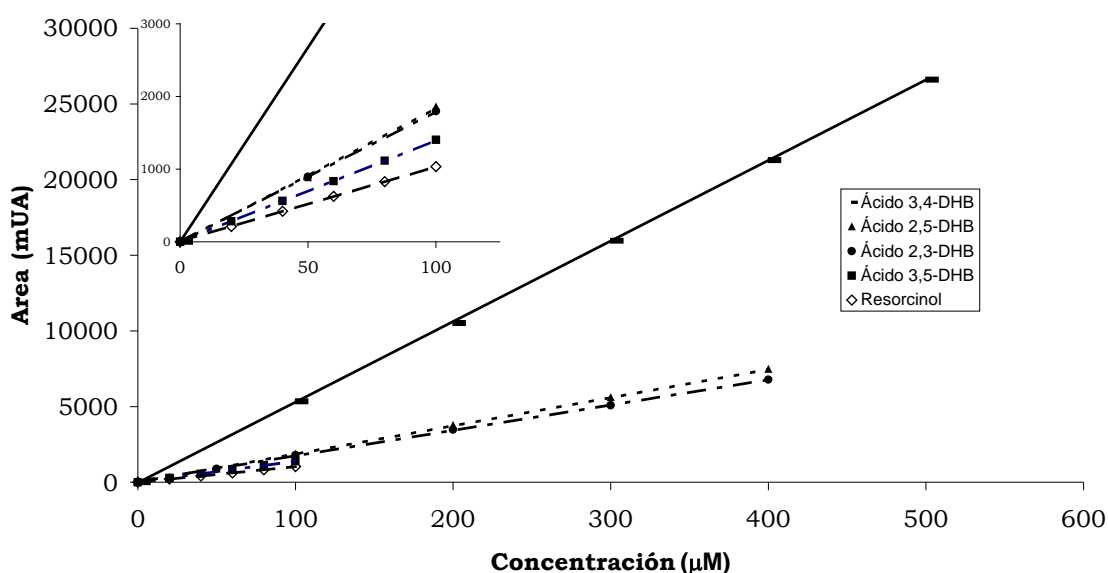


Figura 4.17 Curvas patrón en CLAR para los cinco compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido m-HB. Columna Alltima C18 de 50 mm x 4.6 mm, 3 µm, fase móvil 20:80 del ácido hexansulfónico (5mM) y ácido acético al 1 %.

Las rectas obtenidas se ajustan a un modelo lineal en el intervalo de concentración usada. Los resultados fueron tratados de forma similar al ácido o-HB usando el programa OriginPro7.

4.3.4 Análisis electroforético de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido m-hidroxibenzoico

Como puede observarse en el esquema 4.2, los cinco productos esperados en la radiólisis del ácido m-HB, fueron bien separados como se observa en la figura 4.18.

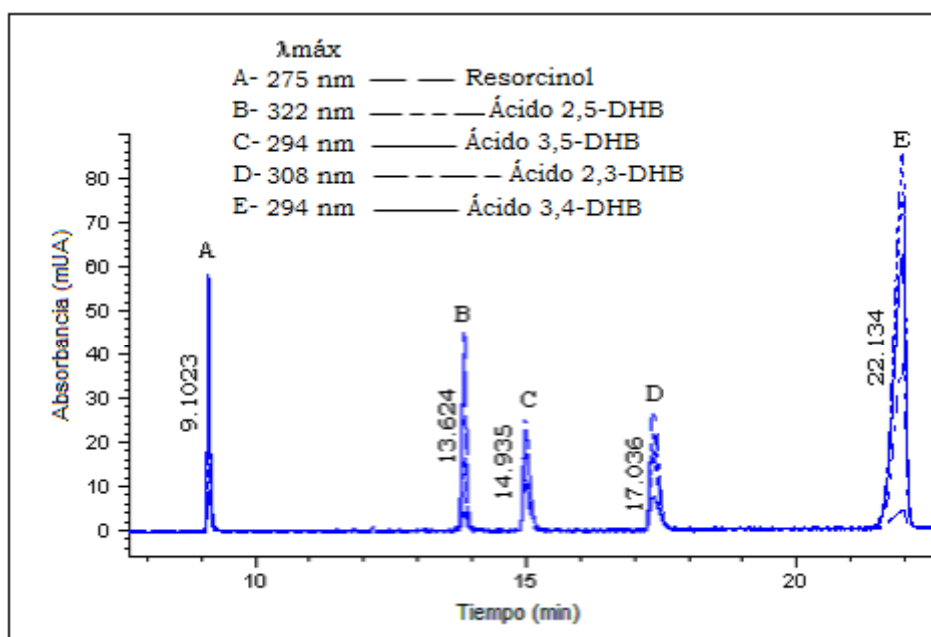


Figura 4.18 Electroferograma de la separación de los compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido m-HB.

Los parámetros de separación se muestran en la tabla 4.5 las condiciones de separación fueron similares a las empleadas en la separación del ácido o-HB.

Tabla 4.5 Parámetros electroforéticos para los cinco compuestos

Compuesto	t _m (min)	Eficiencia*	Resolución
Resorcinol	9.1	92100	21.5
Ácido 2,5-DHB	14	109550	
Ácido 3,5-DHB	14.9	76000	5.4
Ácido 2,3-DHB	17.3	65800	8.1
Ácido 3,4-DHB	21.9	62500	11.8

*Número de platos teóricos

La eficiencia es el resultado del ancho de los picos en el análisis, al obtener picos estrechos se obtiene una buena eficiencia como fue en este análisis.

En cuanto a la resolución siempre fue mayor que 1 para todos los compuestos analizados.

En el análisis electroforético de los compuestos esperados en la radiólisis del ácido m-HB se lograron separar los cinco compuestos esperados (ver esquema 4.2). La Figura 4.19 muestra los espectros obtenidos en el análisis de las soluciones patrón, las cuales contenían a los compuestos auténticos en una concentración del orden de μM para cada uno de ellos.

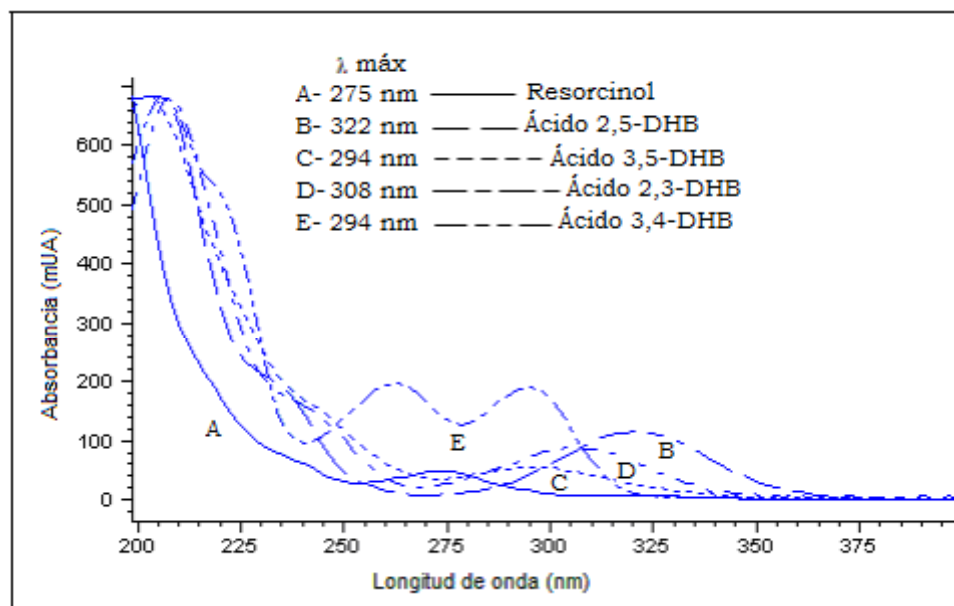


Figura 4.19 Espectros obtenidos en el análisis electroforético de las muestras patrón de los productos esperados en la radiólisis del ácido m-HB.

4.3.5 Curvas patrón en EC de los productos radiolíticos esperados para el ácido m-hidroxibenzoico

La figura 4.20 muestra las curvas patrón de los productos auténticos esperados en la radiólisis del ácido m-HB determinadas por electroforesis capilar usando el modo de cromatografía micelar electrocinética.

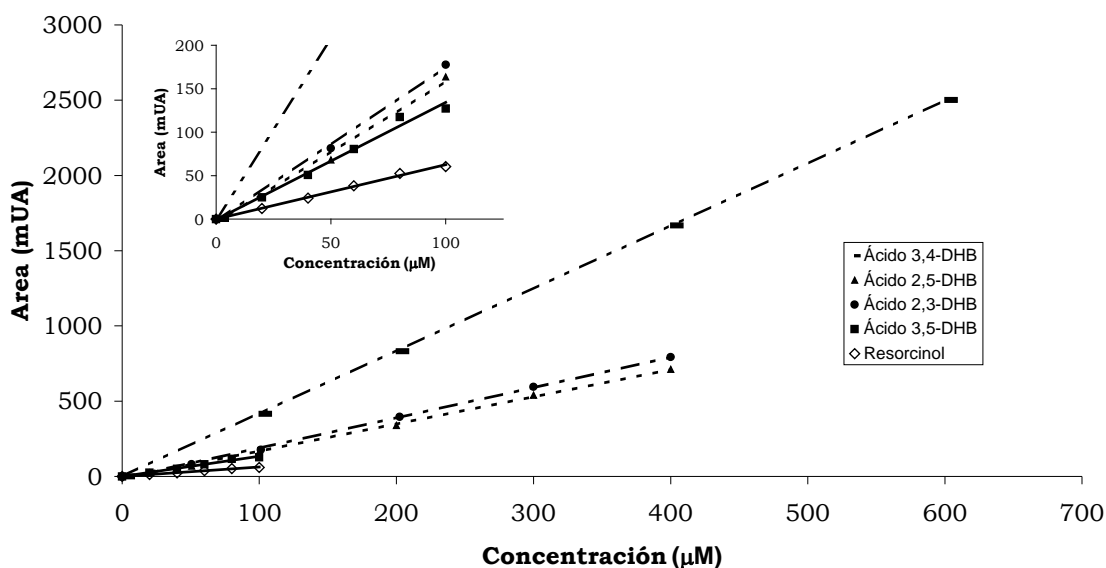


Figura 4.20 Curvas patrón en EC de los cinco compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido m-HB. Columna y celda de alta sensibilidad (72 cm + 8.5 cm x 75 µm), voltaje 25 kV y como solución amortiguadora de boratos 10 mM de pH 9.3 con 50 mM de SDS.

El tratamiento de los datos se realizó de manera similar que los obtenidos en CLAR. Así como también se utilizó el programa OriginPro7.

Usando estas curvas patrón se obtuvieron las diferentes concentraciones producidas para cada uno de los productos radiolíticos esperados.

4.3.6 Análisis cromatográfico y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido meta-hidroxibenzoico en solución acuosa

Se muestra inicialmente la separación de los compuestos radiolíticos del ácido m-HB, así como la identificación de cada uno de ellos por su t_r y su espectro UV.

La Figura 4.21 muestra el cromatograma de la separación de los compuestos obtenidos en la radiólisis del ácido m-HB.

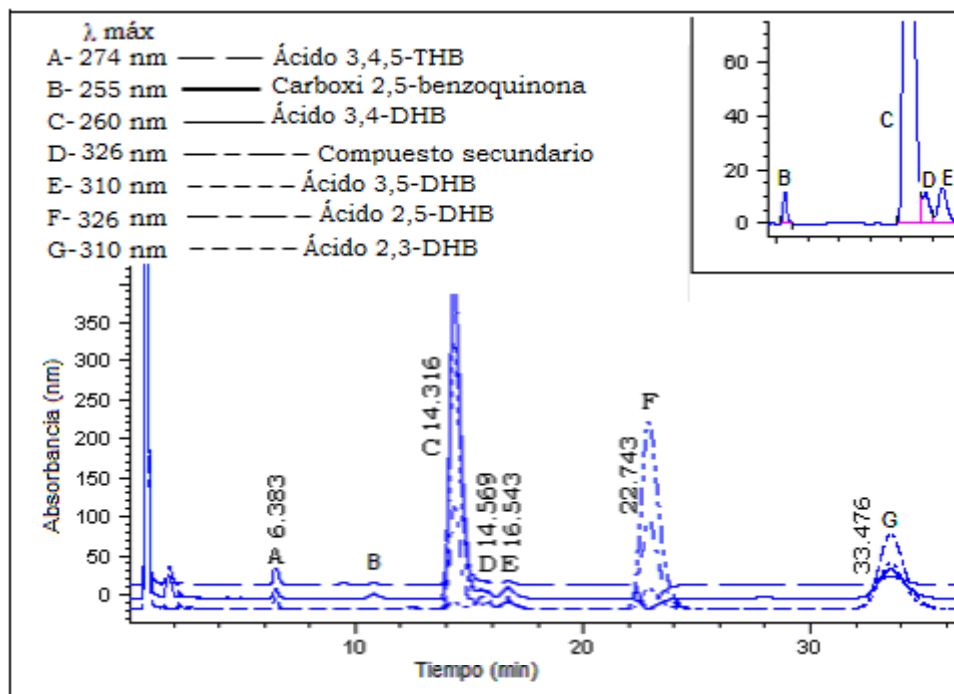


Figura 4.21 Cromatograma de la separación de los compuestos obtenidos en la radiólisis de una solución acuosa del ácido m-HB.

La separación de los siete compuestos encontrados fue bajo las condiciones cromatográficas utilizadas en la separación de los compuestos auténticos del ácido m-HB (párrafo 4.3.2).

En la figura 4.22 se presentan los espectros de los dos compuestos secundarios adicionales a los que se esperaban en la radiólisis del ácido m-HB obtenidos en la separación por CLAR.

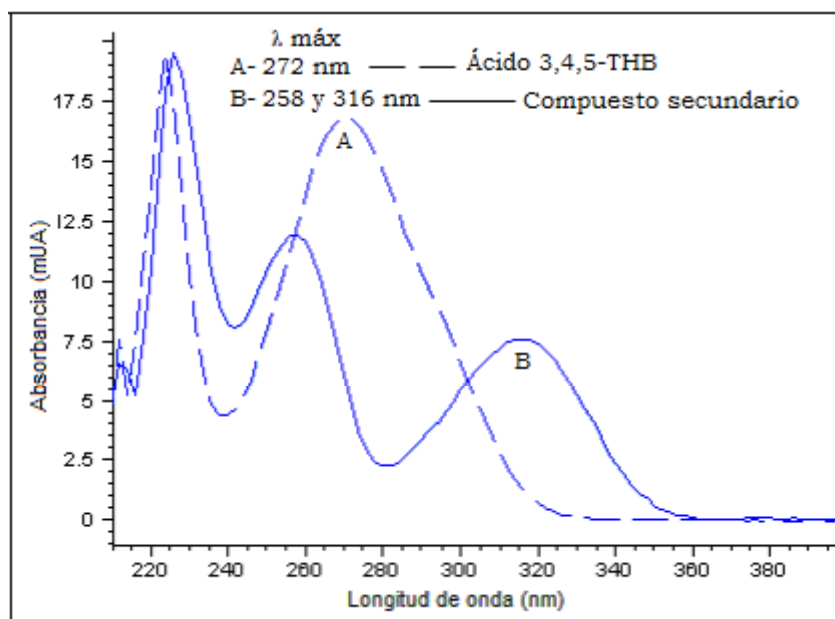


Figura 4.22 Espectros obtenidos en CLAR de los dos compuestos adicionales a los esperados en la radiólisis del ácido m-HB.

Como puede observarse, estos productos presentan espectros diferentes al de los productos auténticos de los cinco compuestos esperados, que se muestran en la figura 4.16, lo cual indica que se trata de otros compuestos, estos espectros también presentan máximos de absorción definidos. Un espectro es idéntico al que presenta el ácido 3,4,5-THB y el otro producto no fue identificado. Sin embargo como los principales productos radiolíticos primarios son el 3,4 y 2,5-DHB, lo más probable sería la producción del 2,4,5-THB, del cual no contamos con una muestra auténtica para su identificación.

4.3.7 Curvas de concentración determinadas en CLAR de los productos radiolíticos obtenidos en la radiólisis del ácido m-HB en solución acuosa.

La concentración de los productos radiolíticos se determinó usando el área bajo la curva de los picos correspondientes a cada compuesto identificado y esta área se interpoló en las curvas patrón.

Las curvas son un ejemplo de un día en que se irradió la solución acuosa del ácido m-HB a diferentes dosis.

Los datos empleados para la construcción de estas curvas se obtuvieron a la longitud de onda máxima del espectro UV que presenta cada compuesto.

La figura 4.23 muestra las curvas de concentración en función de la dosis recibida por la solución acuosa del ácido meta-hidroxibenzoico con concentración 5 mM y 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ y saturada con N_2O .

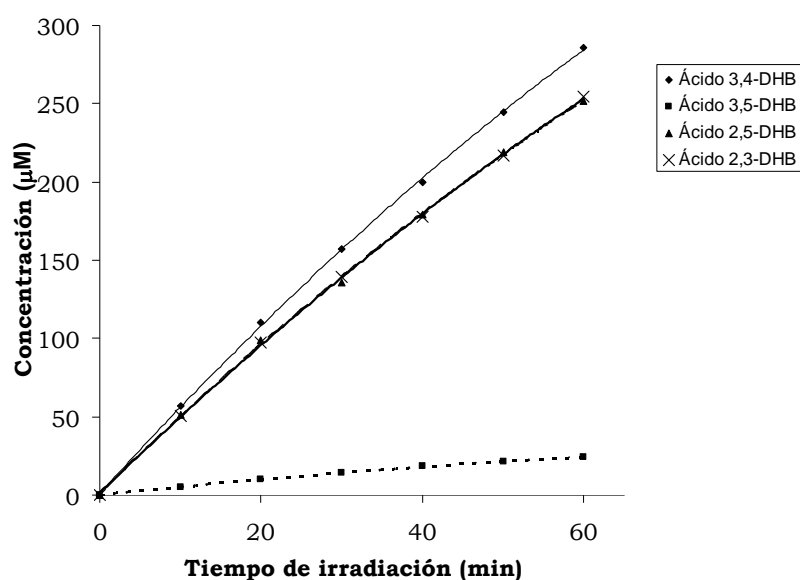


Figura 4.23 Curvas de concentración determinadas en CLAR para los cuatro productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido m-HB. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las empleadas para la determinación de los productos puros.

Los resultados fueron tratados mediante el programa OriginPro7 usando la misma ecuación para el análisis de los productos radiolíticos del ácido o-HB.

En la figura 4.24 se muestra la curva de concentración en función del tiempo de irradiación donde se observa el comportamiento cuadrático de producción del ácido 3,4,5-THB.

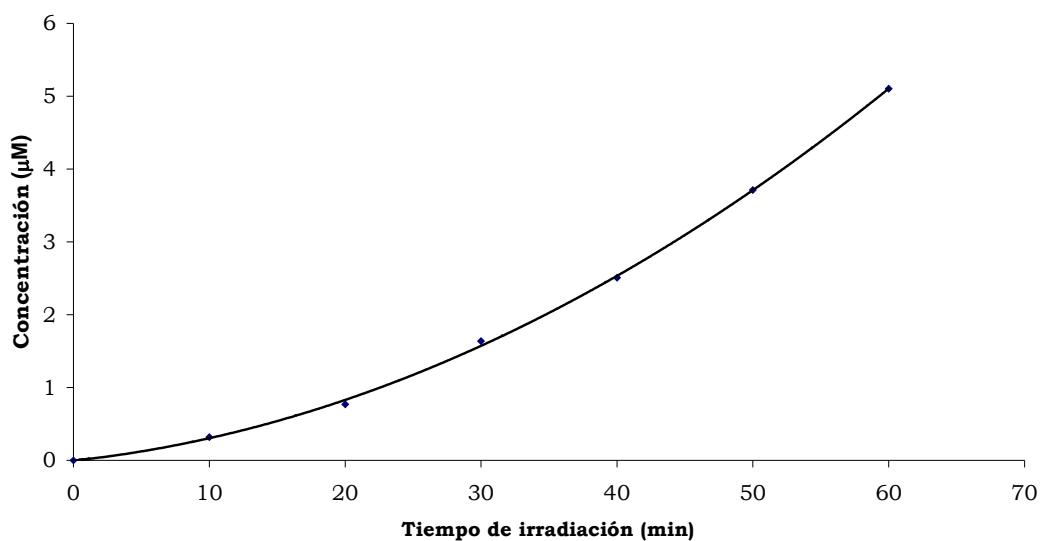


Figura 4.24 Curva de concentración en función del tiempo de irradiación determinada en CLAR para el ácido 3,4,5 THB obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido m-HB. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las empleadas para la determinación de los productos puros.

En la figura 4.25 se muestra la curva cuadrática al graficar el área bajo el pico cromatográfico en función del tiempo de irradiación del compuesto secundario no identificado.

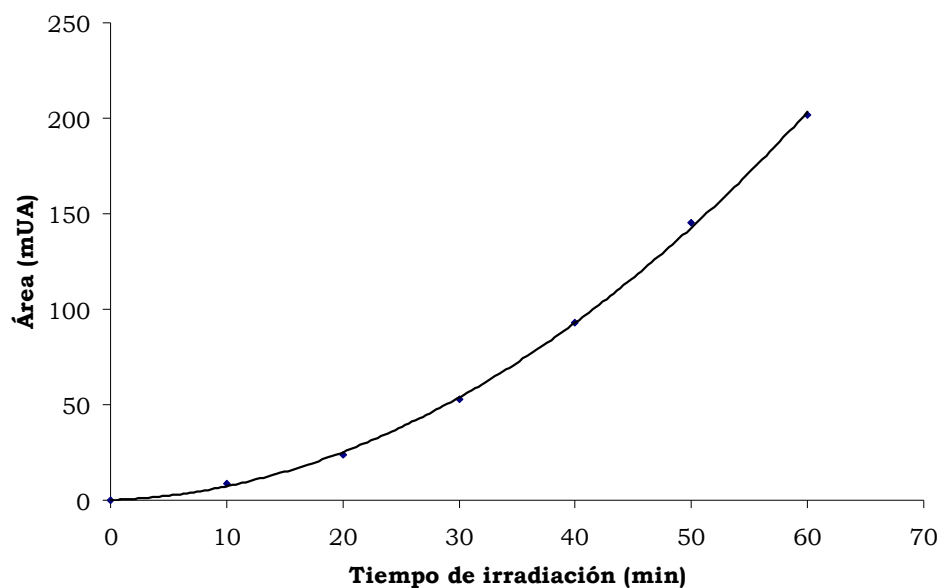


Figura 4.25 Curva cuadrática determinada en CLAR para el compuesto secundario desconocido obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido m-HB. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las empleadas para la determinación de los productos puros.

4.3.8 Análisis electroforético y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido meta-hidroxibenzoico

Como se puede ver en la figura 4.26, la radiólisis del ácido meta-hidroxibenzoico, de la misma forma que en CLAR se observaron únicamente cuatro de los productos esperados que se encuentran en el esquema 4.2. Los productos secundarios ya que se formaron en muy poca concentración en este análisis no se observaron, sin embargo el ácido 3-HB (B) se presenta en el electroferograma.

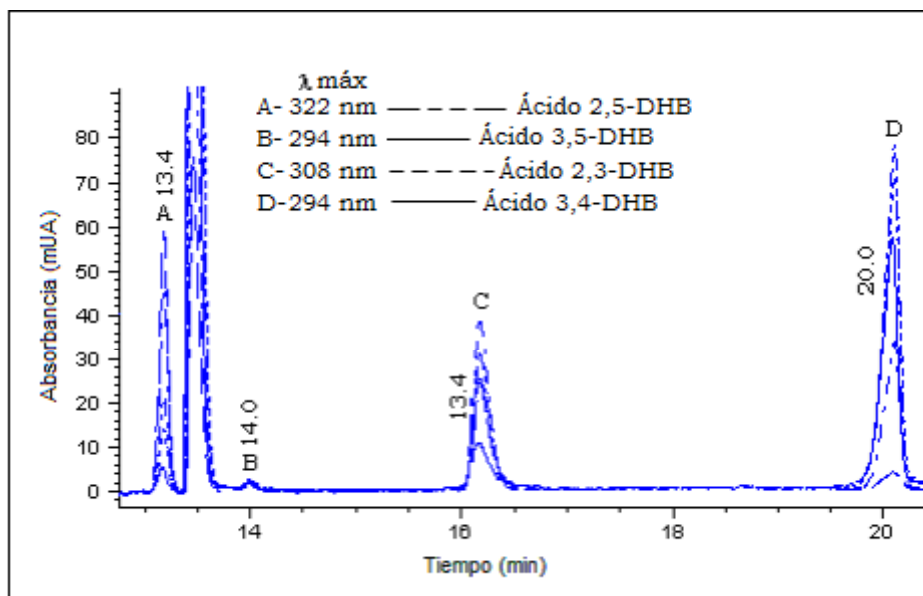


Figura 4.26 Electroferograma de la separación de los productos radiolíticos del ácido m-HB.

4.3.9 Resultados obtenidos en EC de los compuestos radiolíticos observados en la radiólisis del ácido m-HB

Alicuotas de la solución irradiada un día se analizaron y se presentan los resultados en la figura 4.27.

Las determinación de la concentración de cada producto radiolítico primario se calculó de manera similar al o-HB.

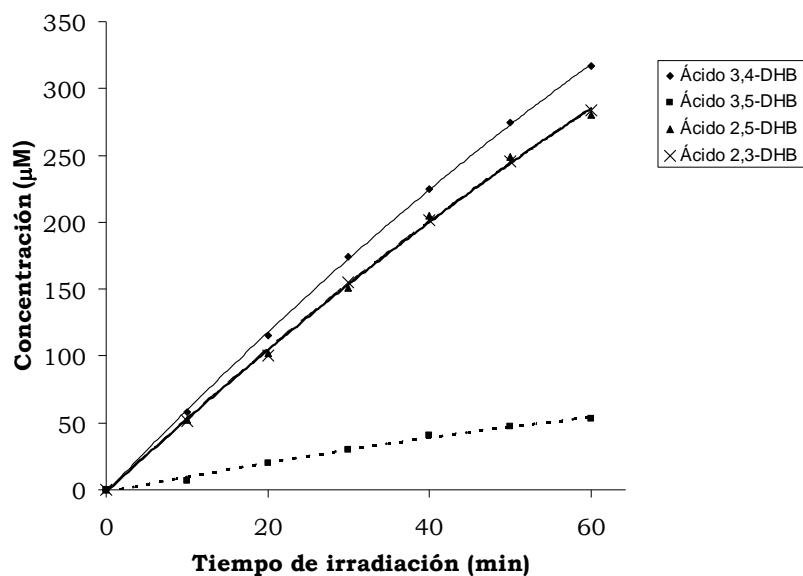
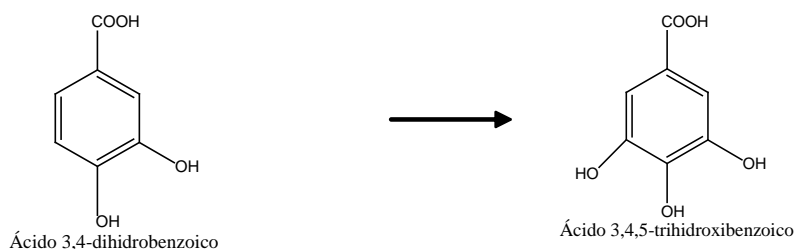


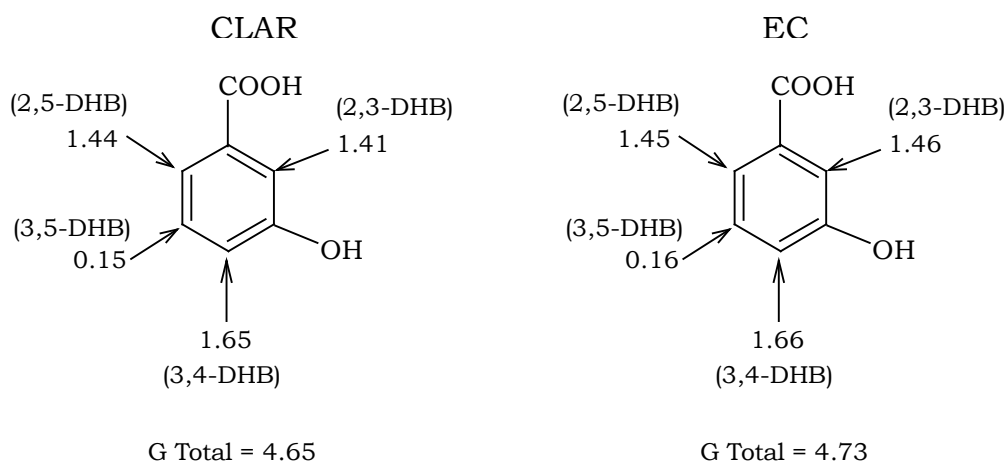
Figura 4.27 Curvas de concentración en función del tiempo de irradiación determinadas por EC, obtenidos en la radiólisis del ácido m-HB.

Cabe mencionar que al irradiar una solución acuosa del ácido meta-hidroxibenzoico de concentración 5 mM conteniendo 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ y saturada con N_2O se obtuvieron siete picos cromatográficos que corresponden a compuestos radiolíticos, de los cuales cuatro de ellos son de los que se esperaban (ver esquema 4.2) y los otros dos compuestos más se identificaron como productos radiolíticos secundarios por su comportamiento cuadrático al graficar el área bajo la curva en función del tiempo de irradiación. Además se observó la formación de la carboxi-2,5-benzoquinona, de la cual ya se expuso en el ácido o-HB. El quinto producto radiolítico primario, el resorcinol probablemente se formó en concentraciones menores al límite de detección ya que el grupo -OH que es un director orto, para fuerte no favorece la formación de este compuesto. Todos estos compuestos se detectaron en CLAR y por EC únicamente se identificaron y cuantificaron a los cuatro siguientes ácidos 2,5-, 3,5-, 2,3- y 3,4-DHB.

De los dos compuestos radiolíticos secundarios, sólo uno se logró identificar, siendo éste el ácido 3,4,5-THB lo cual se realizó comparando su espectro y tiempo de retención con el del compuesto auténtico. Éste se forma a partir del ácido 3,4-DHB el cual se encuentra en mayor concentración por ser el principal producto radiolítico del ácido m-HB.



4.3.10 Valores G del ácido m-HB

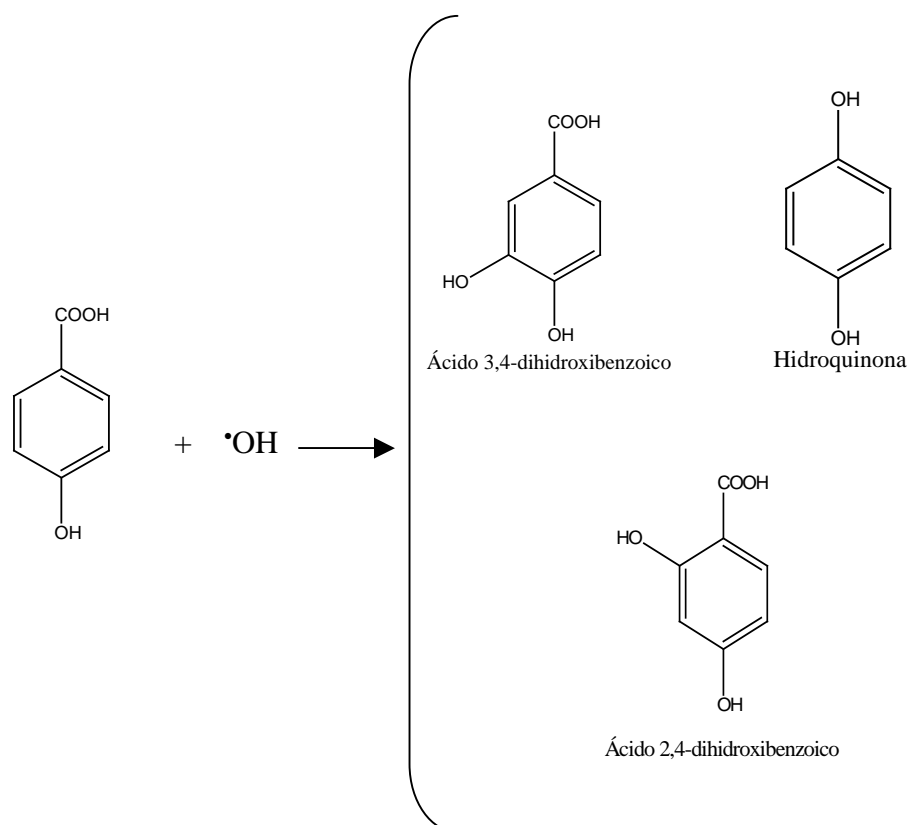


Los resultados obtenidos del valor G son mayores que el esperado para el caso del ácido o-HB (Ácido salicílico) que era de 4.5 moléculas formadas por cada 100 eV de energía absorbida. Esto se puede atribuir a que en el ácido m-HB existe una posición para y dos orto para el grupo OH orientador orto, para comparado con el ácido o-HB que únicamente tiene una posición orto y una para.

4.4 Estudios de la radiólisis del ácido p-HB

4.4.1 Productos radiolíticos esperados para el ácido para-hidroxibenzoico

El esquema 4.3 muestra los productos radiolíticos esperados en la radiólisis de una solución acuosa diluida del ácido para-hidroxibenzoico.



Esquema 4.3 Productos esperados en la radiólisis de soluciones acuosas del ácido p-HB en presencia de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y saturado con N_2O .

Como se muestra en el esquema 4.3 de manera similar a los ácidos o- y m-HB los compuestos esperados son principalmente dihidroxiácidos y la descarboxilación para este caso del ácido p-HB.

Los tres productos esperados se deben a que el radical $\cdot\text{OH}$ se adiciona a las dos posiciones libres del anillo bencénico y el tercer compuesto es producto de la descarboxilación del grupo ácido.

4.4.2 Análisis cromatográfico de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido para-hidroxibenzoico

La figura 4.28 muestra el cromatograma de la separación de los compuestos auténticos esperados en la radiólisis del ácido p-HB.

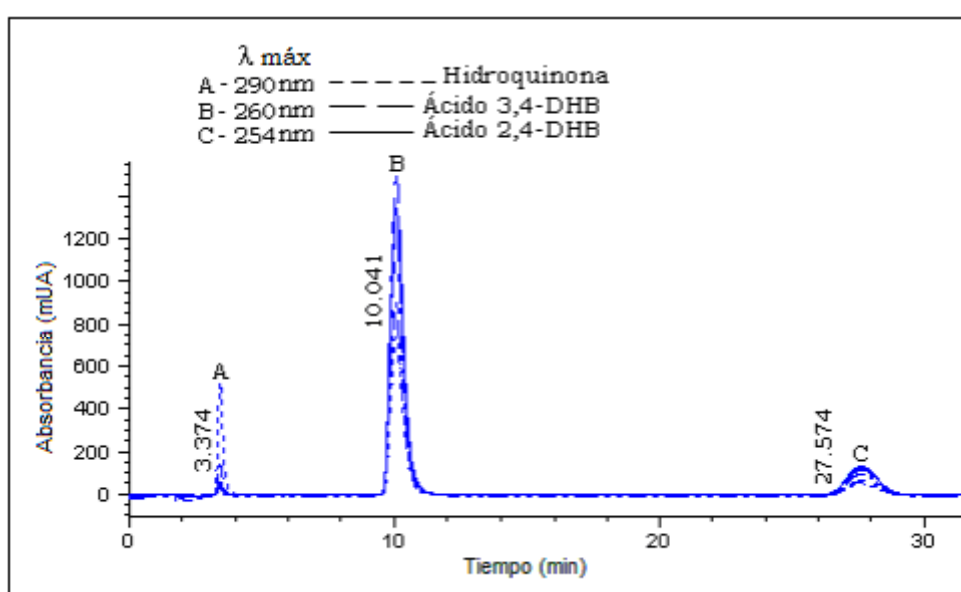


Figura 4.28 Cromatograma de la separación de los compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido p-HB.

Los parámetros de separación se muestran en la tabla 4.6 usando una columna Alltima C18 de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 3 μm y como fase móvil 5 % de metanol, 20 % del ácido hexansulfónico 5 mM y 75 % de una solución acuosa de ácido acético al 1 %.

Tabla 4.6 Parámetros cromatográficos para los tres compuestos esperados en la radiólisis de ácido p-HB.

Compuesto	t _r (min)	Eficiencia*	Resolución
Hidroquinona	7.9	1600	10.2
Ácido 3,4-DHB	21.9	3050	
Ácido 2,4-DHB	19.3	2850	11.6

*Número de platos teóricos

La resolución para este análisis fue muy bueno, siendo mucho mayor a 1 entre los tres compuestos.

En la Figura 4.29 se muestran los espectros obtenidos en el análisis de las soluciones patrón, las cuales contenían una concentración del orden de μM de cada uno de los compuestos auténticos.

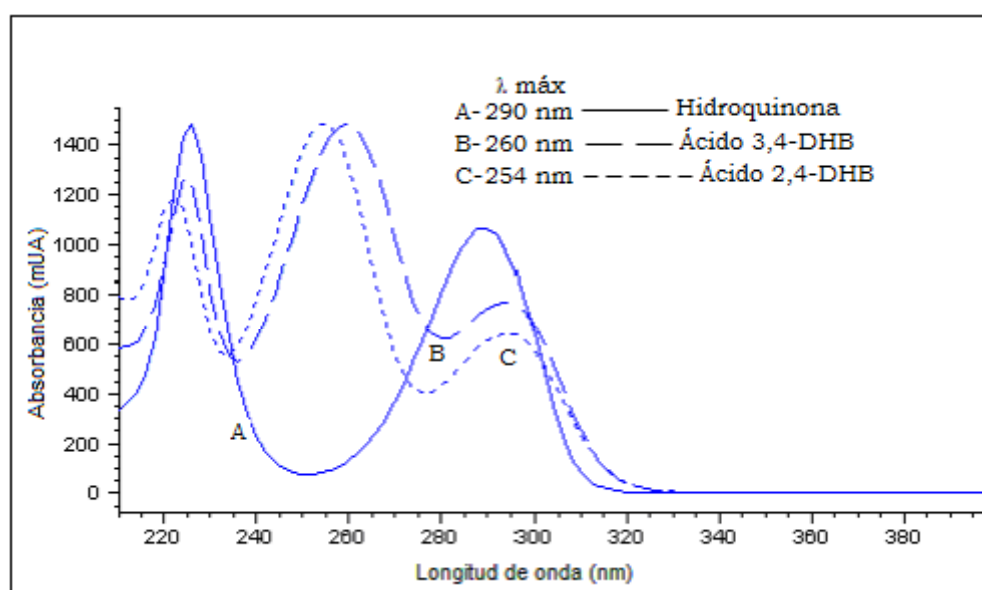


Figura 4.29 Espectros obtenidos en CLAR del análisis de los productos auténticos esperados en la radiólisis de una solución acuosa del ácido p-HB

Los espectros obtenidos permitieron la identificación de cada compuesto y el pico máximo de absorción sirvió para obtener los cromatogramas y cuantificar a los productos radiolíticos.

4.4.3 Curvas patrón en CLAR de los productos radiolíticos esperados para el ácido p-hidroxibenzoico

La figura 4.30 muestra un ejemplo de las curvas patrón que se obtuvieron por CLAR para los productos radiolíticos esperados del ácido para-hidroxibenzoico.

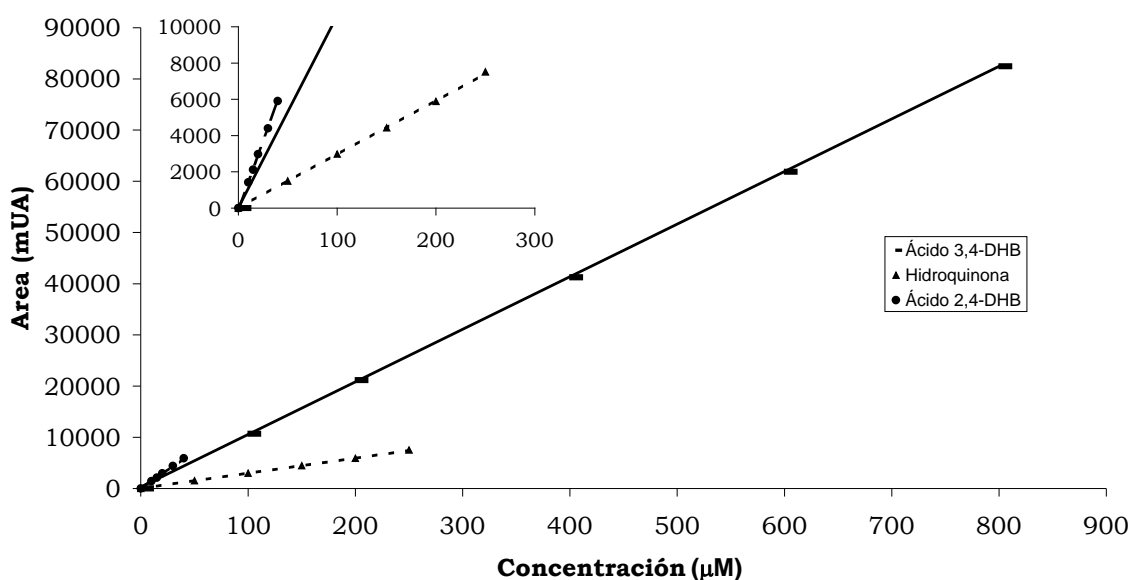


Figura 4.30 Curvas patrón en CLAR para los tres compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido p-HB. Columna Alltima C18 de 50 mm x 4.6 mm, 3 µm, fase móvil 5:20:75 de MeOH al 5 %, CH₃(CH₂)₅SO₃Na (5 mM) y ácido acético al 1 %.

Las concentraciones usadas fueron muy diferentes, sin embargo, se realizaron de manera similar a la cantidad de producto radiolítico que se esperaba.

Las rectas obtenidas se ajustan a un modelo lineal en el intervalo de concentración usada (programa OriginPro7).

4.4.4 Análisis electroforético de las muestras patrón de los productos radiolíticos esperados para el ácido para-hidroxibenzoico

Fueron bien separados, los tres productos esperados (ver esquema 4.3) en la radiólisis del ácido p-HB como se observa en la figura 4.31.

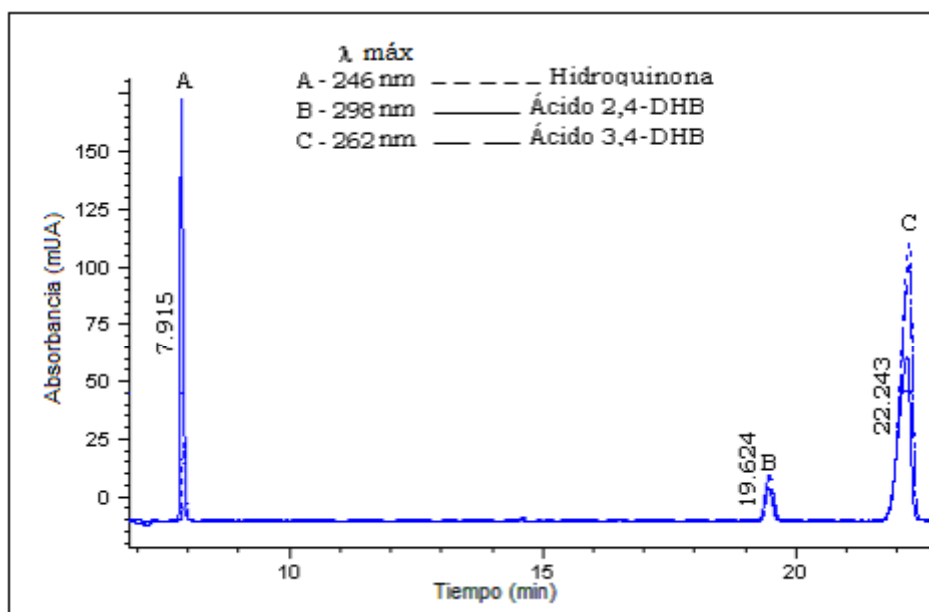


Figura 4.31 Electroferograma de la separación de los compuestos puros esperados en la radiólisis del ácido p-HB.

Los parámetros de separación se muestran en la tabla 4.7 la columna y la solución amortiguadora fueron las empleadas en el análisis electroforético del ácido o-HB.

Tabla 4.7 Parámetros electroforéticos para los tres compuestos esperados en la radiólisis del ácido p-HB.

Compuesto	t_m (min)	Eficiencia*	Resolución
Hidroquinona	7.9	55900	43.1
Ácido 2,4-DHB	19.3	67350	
Ácido 3,4-DHB	21.9	36330	6.4

*Número de platos teóricos

Al igual que en el análisis electroforético de los ácidos o- y m-HB se obtuvo una resolución muy buena para todos los compuestos mayor a uno lo que refleja la obtención de picos estrechos, ventaja característica de esta técnica.

La Figura 4.32 muestra los espectros obtenidos en el análisis de las soluciones patrón, las cuales contenían a los compuestos auténticos en una concentración del orden de μM para cada uno de ellos.

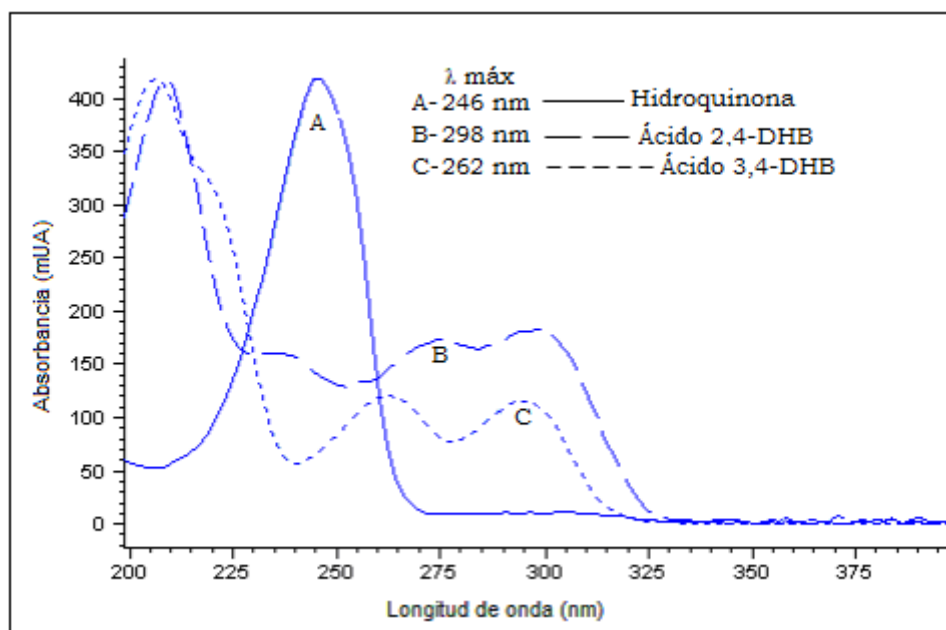


Figura 4.32 Espectros obtenidos en el análisis de los productos auténticos esperados en la radiólisis del ácido p-HB

Si comparamos los espectros obtenidos en ambas técnicas analíticas, parecería que son compuestos diferentes ya que sus máximos de absorción cambian. Este hecho se debe a la diferencia de pH de las soluciones usadas (CLAR medio ácido y EC medio básico). Así por ejemplo la hidroquinona que presenta un máximo de absorción a 290 nm en CLAR, para el caso de EC se obtiene el espectro de la quinona con un máximo en 247 nm.

4.4.5 Curvas patrón en EC de los productos radiolíticos esperados para el ácido para-hidroxibenzoico

La figura 4.33 muestra las curvas patrón de los productos auténticos esperados en la radiólisis del ácido p-HB determinadas por electroforesis capilar.

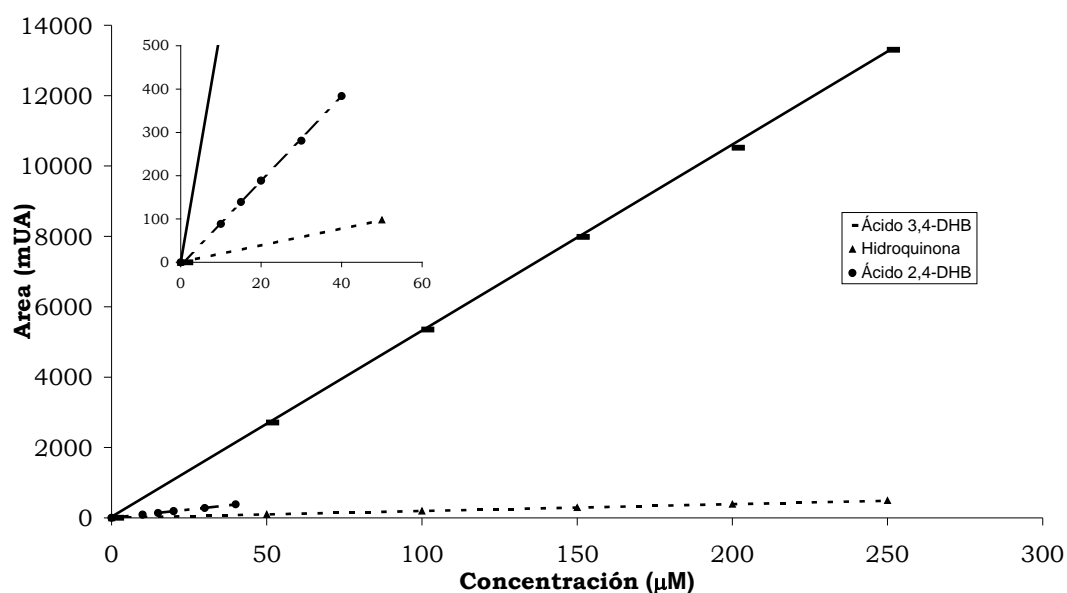


Figura 4.33 Curvas patrón en EC de los tres compuestos puros en las concentraciones esperadas en la radiólisis del ácido p-HB. Columna y celda de alta sensibilidad (72 + 8.5 cm x 75 µm), voltaje 25 kV y como solución amortiguadora de boratos 10 mM de pH 9.3 con 50 mM de SDS.

Usando estas curvas patrón se obtuvieron las diferentes concentraciones producidas para cada uno de los productos radiolíticos esperados.

4.4.6 Análisis cromatográfico y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido para-hidroxibenzoico.

Se muestra inicialmente las separación de los compuestos radiolíticos del ácido p-HB, así como su identificación mediante el t_r y su espectro UV.

La figura 4.34 muestra el cromatograma de la separación de los compuestos obtenidos.

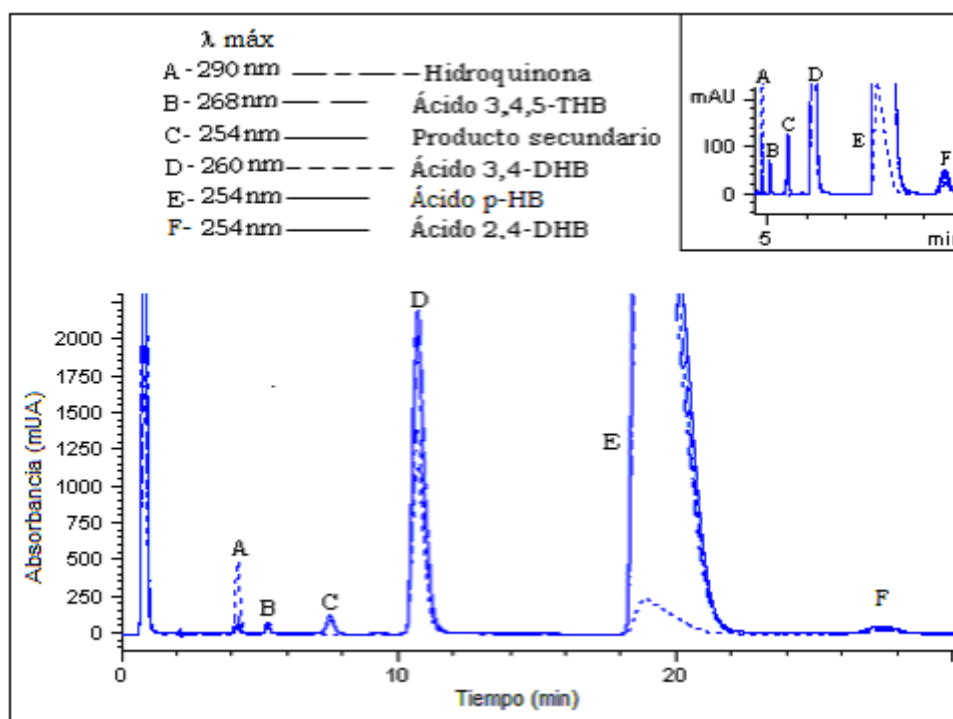


Figura 4.34 Cromatograma de la separación de los compuestos obtenidos en la radiólisis del ácido p-HB irradiado a 2.22 kGy.

Mediante CLAR se lograron separar cinco compuestos, en la figura 4.35 se presentan los espectros de los dos compuestos adicionales a los que se esperaban en la radiólisis del ácido p-HB.

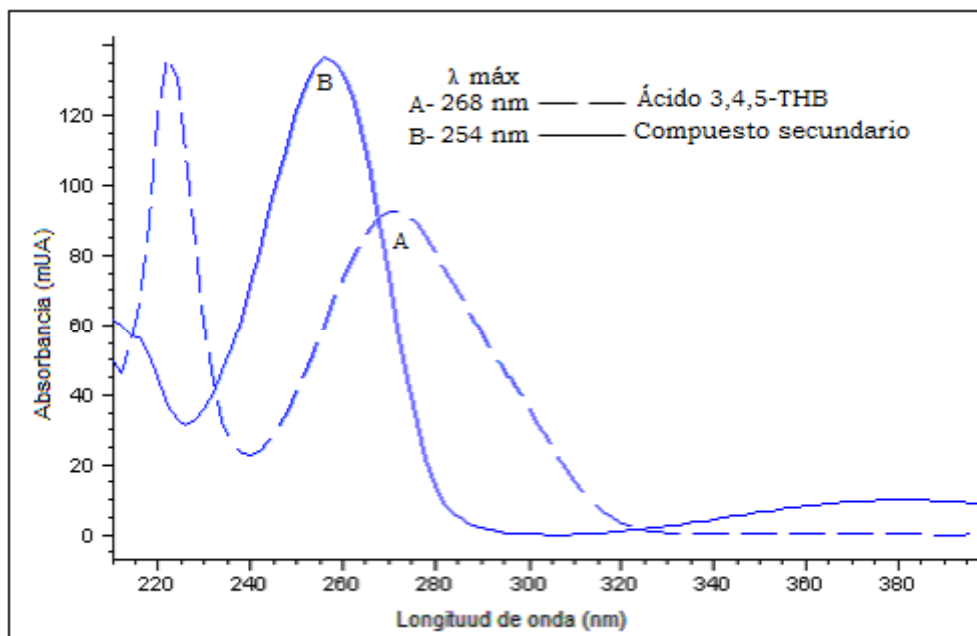


Figura 4.35 Espectros obtenidos en CLAR de los dos compuestos adicionales a los esperados en la radiólisis del ácido p-HB.

Como puede observarse, estos productos presentan espectros diferentes al de los productos auténticos que se muestran en la figura 4.29 (que son aquellos que se esperaban) lo cual indica que se trata de otros compuestos, estos espectros también presentan máximos de absorción definidos.

4.4.7 Resultados obtenidos en CLAR de los compuestos radiolíticos del ácido p-HB

Las curvas son un ejemplo (Figura 4.36) de un día en que se irradió el ácido p-HB a diferentes dosis.

Los datos empleados para la construcción de estas curvas se obtuvieron a la longitud de onda máxima del espectro UV que presenta cada compuesto.

La figura 4.36 presenta los resultados obtenidos al irradiar una solución acuosa del ácido p-HB y la concentración se determinó de manera similar a la realizada con el ácido o-HB.

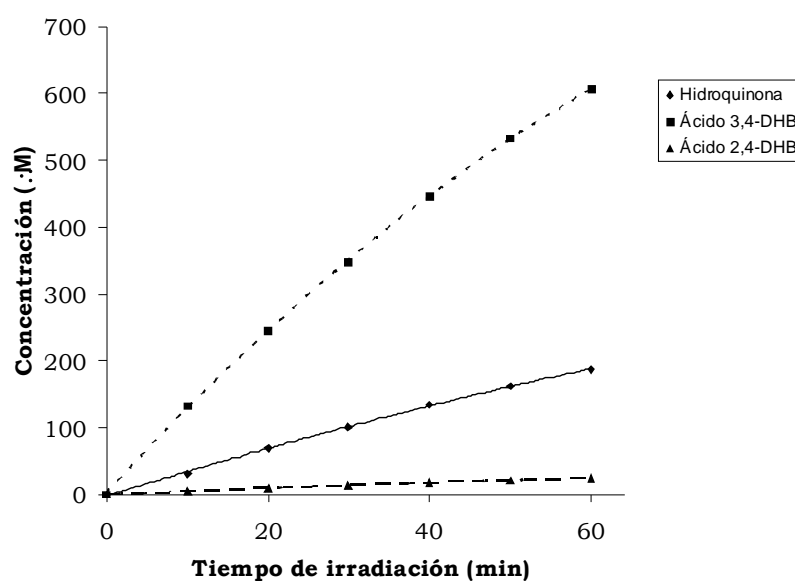


Figura 4.36 Curvas de concentración determinadas en CLAR para los tres productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido p-HB.

La pendiente de las curvas y su curvatura se obtuvo usando la ecuación 10 del Apéndice A y el programa OriginPro7.

En la figura 4.37 se muestra una curva de concentración donde se observa el comportamiento cuadrático con la dosis del ácido 3,4,5-THB.

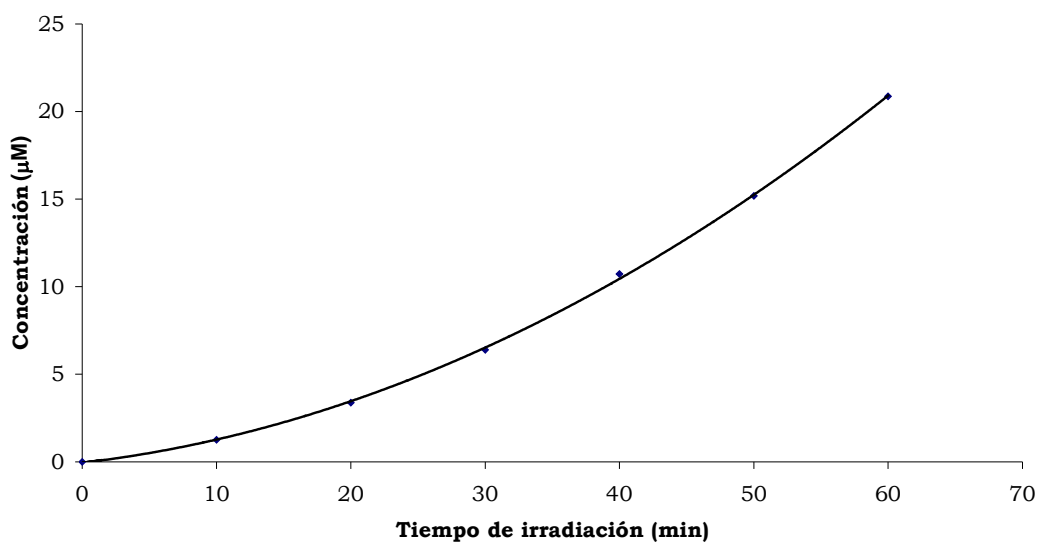


Figura 4.37 Curva de concentración determinada en CLAR para el ácido 3,4,5-THB obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido p-HB. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las empleadas para la determinación de los productos puros.

En la figura 4.38 se muestra el comportamiento cuadrático del compuesto secundario desconocido donde se grafica el área bajo la curva del pico en función del tiempo de irradiación.

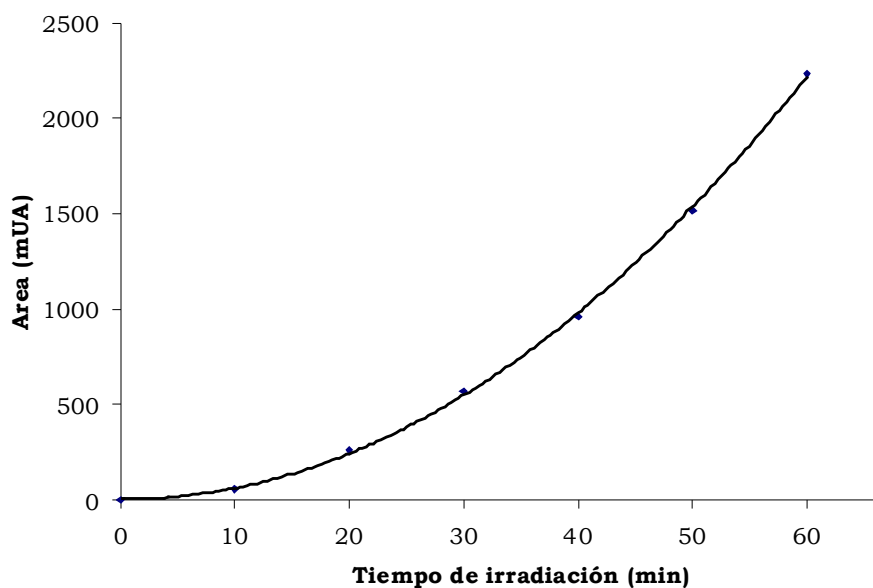


Figura 4.38 Curva de concentración determinada en CLAR para el compuesto secundario no identificado, obtenido en la radiólisis de una muestra acuosa del ácido p-HB.

4.4.8 Análisis electroforético y espectrofotométrico de las muestras irradiadas del ácido para-hidroxibenzoico.

Como se puede ver en la figura 4.39 en la radiólisis del ácido para-hidroxibenzoico se obtuvieron los tres productos que se esperaban y los cuales se presentan en el esquema 4.3. Además de estos productos radiolíticos se puede ver también, el pico correspondiente al ácido p-HB.

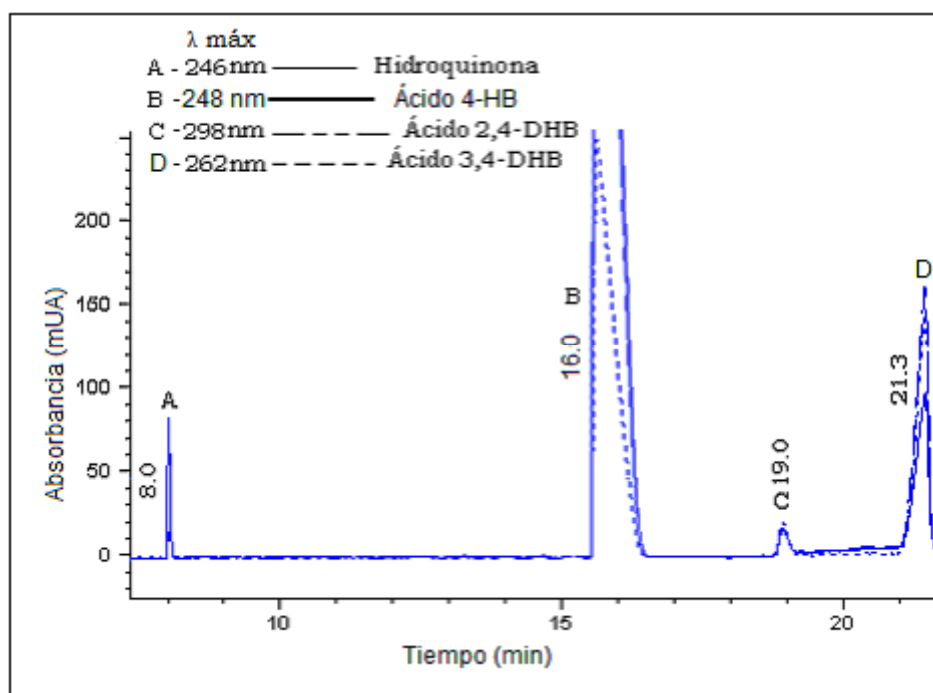


Figura 4.39 Electroferograma de la separación de los productos radiolíticos del ácido p-HB irradiado a 2.22 kGy.

4.4.9 Resultados obtenidos en EC de los compuestos radiolíticos del ácido p-HB

La concentración de cada producto radiolítico primario, obtenida a diferentes tiempos de irradiación se determinó interpolando las áreas en las curvas patrón.

En la figura 4.40 se muestran las curvas de concentración de los productos radiolíticos primarios obtenidos, en la irradiación de una solución del ácido p-HB a diferentes tiempos.

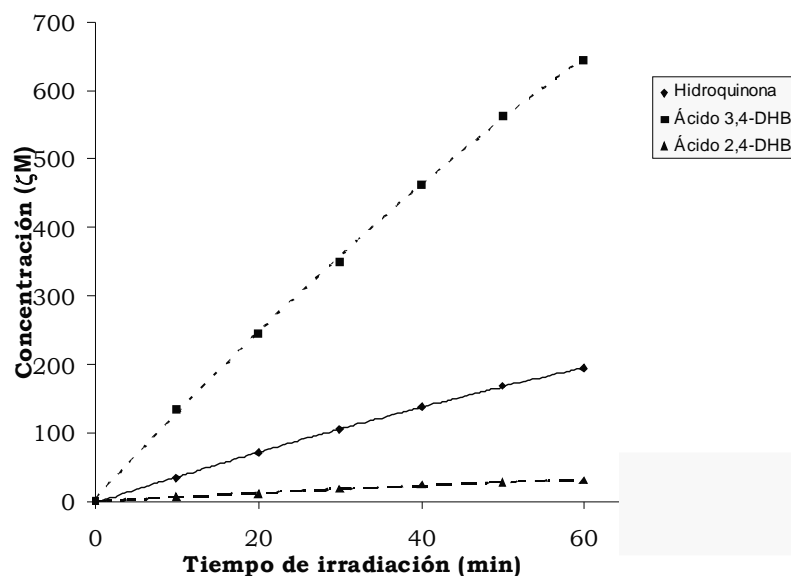


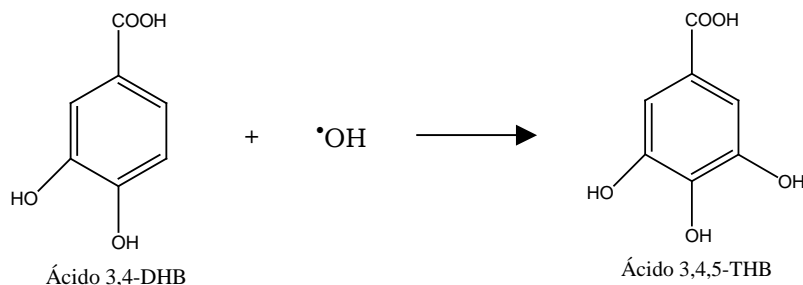
Figura 4.40 Curvas de concentración determinadas por EC para los tres productos radiolíticos primarios, obtenidos en la radiólisis del ácido p-HB. Las condiciones electroforéticas fueron las mismas que las empleadas para la determinación de los productos puros.

Los resultados fueron tratados de la misma manera que los obtenidos en CLAR usando el programa OriginPro7 y la misma ecuación.

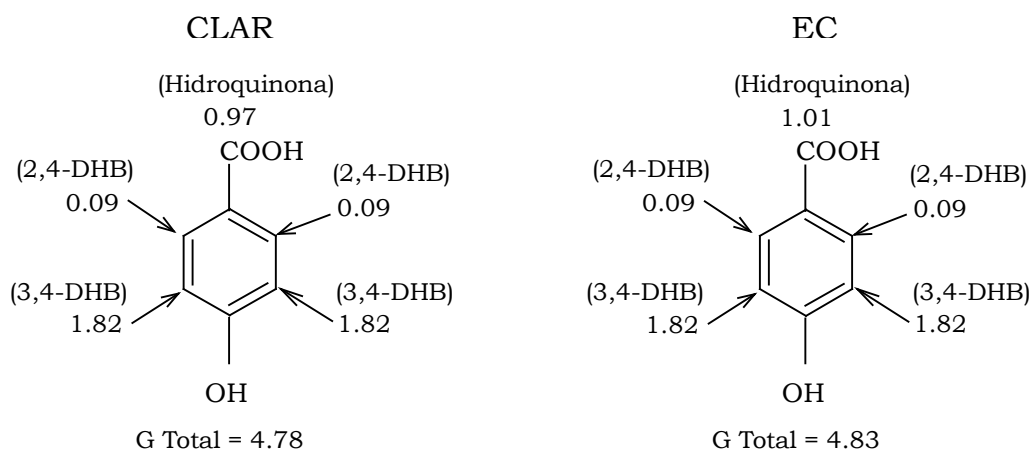
Debe mencionarse que cuando se usó la metodología de CLAR y se analizó una muestra acuosa de ácido para-hidroxibenzoico a una concentración 5 mM más 2.5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y la solución saturada con N_2O e irradiada, se obtuvieron cinco compuestos de los cuales tres de ellos son los que se esperaban (ver esquema 4.3) los otros dos compuestos se identificaron como productos secundarios. En el caso de la metodología de EC únicamente se identificaron los tres productos radiolíticos que se esperaban.

El ácido 3,4,5-THB se identificó como producto secundario y se confirmó su producción con una muestra del compuesto auténtico.

El ácido 3,4-DHB al ser el principal producto en la radiólisis del ácido p-HB se encuentra en la solución acuosa en una concentración tal, que el radical $\cdot\text{OH}$ reacciona con él para dar origen a la formación del ácido 3,4,5-THB como producto secundario.



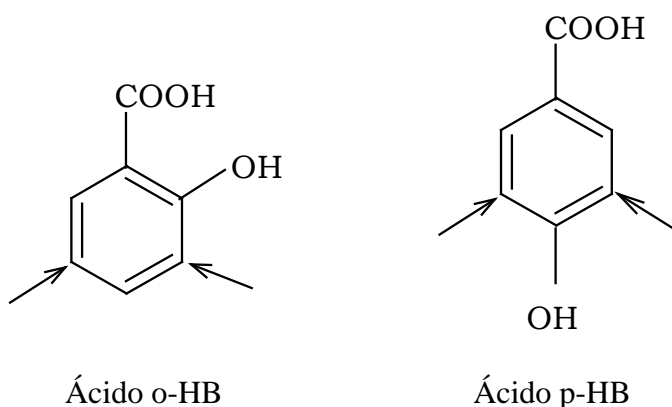
4.4.10 Valores G del ácido p-HB



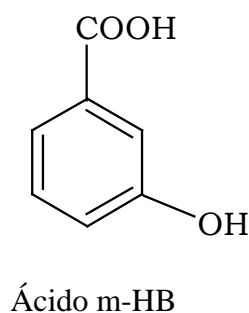
El rendimiento radioquímico obtenido es similar al valor esperado ya que en este caso la cuantificación de los productos radiolíticos no presentan descomposición o formación de otros productos por la presencia del oxidante, aunque se obtiene en muy bajo rendimiento un producto secundario.

4.5 Discusión sobre la proporción parcial relativa por posición de adición del radical $\bullet\text{OH}$ a las diferentes posiciones libres en el anillo aromático de los ácidos o-, m-, y p-HB.

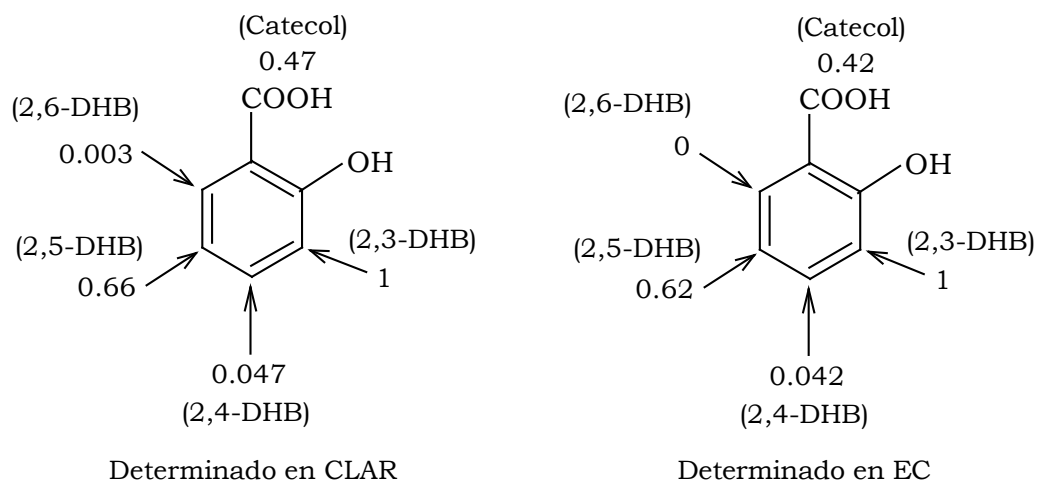
La presencia de dos sustituyentes en el anillo complica la orientación de la reacción de adición del radical $\bullet\text{OH}$ a los compuestos en estudio, así que la reacción se ve influenciada por uno de los sustituyentes y en algunos casos se ve reforzada por el otro sustituyente. En este caso, se indica con flechas las posiciones donde el radical $\bullet\text{OH}$ se adiciona.



Por otro lado cuando el efecto director de un grupo sustituyente es opuesto al otro, se dificulta la predicción del producto que se obtiene en mayor proporción. Como el caso del ácido m-HB donde los dos sustituyentes son directores opuestos.



4.5.1 Proporción parcial relativa por posición de la reacción de oxidación del ácido o-HB



La adición del radical $\cdot\text{OH}$ en la posición orto al sustituyente $-\text{OH}$ y meta al grupo $-\text{COOH}$ en el ácido o-HB genera uno de los compuestos primarios que es el ácido 2,3-DHB, el cual es el producto principal en la radiólisis del ácido o-HB debido a la afinidad electrónica del radical, ya que este hecho nos indica que existe una mayor población electrónica en la posición orto al sustituyente $-\text{OH}$, además de que el grupo carboxílico es un orientador meta y la adición se efectuó en la posición meta de este grupo.

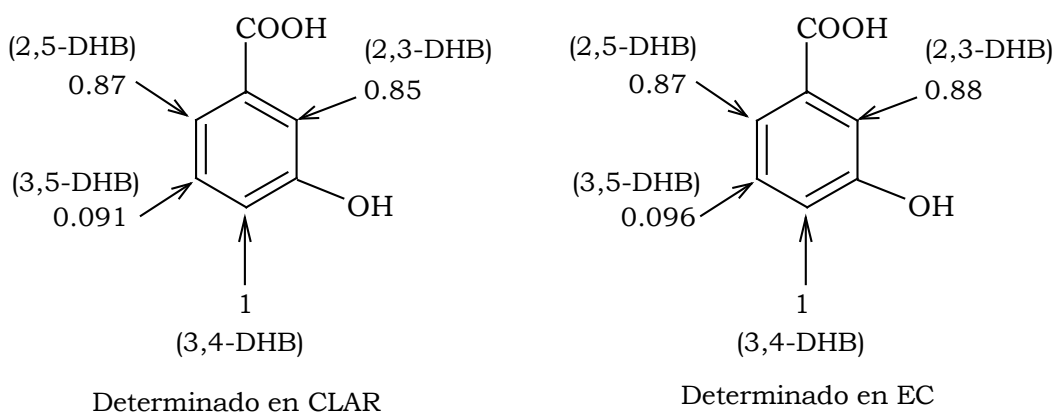
Una adición del radical $\cdot\text{OH}$ en la posición para al sustituyente OH y posición meta al grupo $-\text{COOH}$, da lugar a la formación del ácido 2,5-DHB. En este caso se encontró una diferencia al comportamiento que presenta el fenol y que en la literatura Albarrán y Schuler (20) nos indican una mayor adición del radical $\cdot\text{OH}$ a la posición para. Por otro lado, en el caso del ácido benzoico la mayor cantidad de producto radiolítico fue la del m-hidroxibenzoico en la posición meta (34).

El catecol es producido por la descarboxilación del ácido o-HB.

La adición del radical $\cdot\text{OH}$ en la posición meta al sustituyente $-\text{OH}$ y para al grupo $-\text{COOH}$ es menos favorecida sin embargo se lleva a cabo, ya que se observa la formación del ácido 2,4-DHB en bajas concentraciones.

Por último la formación del ácido 2,6-DHB que se efectúa al adicionarse el radical $\cdot\text{OH}$ en la otra posición meta al sustituyente $-\text{OH}$ y orto al grupo $-\text{COOH}$, es la posición menos favorecida probablemente porque el grupo carboxi produce impedimento estérico además de que el grupo $-\text{COOH}$ es un director meta y el grupo $-\text{OH}$ es un grupo director orto y para fuerte.

4.5.2 Proporción parcial relativa por posición de la reacción de oxidación del ácido m-HB



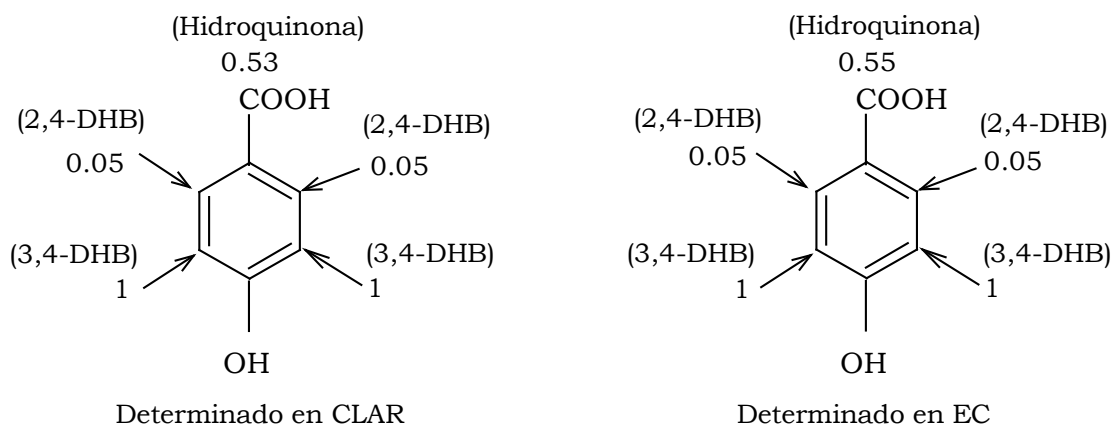
La adición del radical $\cdot\text{OH}$ en la posición orto al sustituyente $-\text{OH}$ y para al sustituyente $-\text{COOH}$ en el ácido m-HB genera al compuesto primario, ácido 3,4-DHB, el cual es el producto principal en la radiólisis de este ácido.

Seguida a la adición en la posición 4, se lleva a cabo una adición del radical $\cdot\text{OH}$ tanto en para, como en orto al sustituyente $-\text{OH}$, dando lugar a la formación de los ácidos 2,3-DHB y 2,5-DHB. Debido a que el grupo $-\text{OH}$ es un orientador fuerte a las posiciones orto y para en el

anillo bencénico, en este caso el grupo carboxílico es un grupo desactivante director meta en una reacción de sustitución electrofílica como es el ataque del radical $\cdot\text{OH}$ al anillo aromático.

La adición del radical $\cdot\text{OH}$ en la posición meta al sustituyente $-\text{OH}$ da origen a la formación del ácido 3,5-DHB en muy baja concentración debido a que el grupo $-\text{OH}$ es un fuerte director orto, para y aunque el grupo carboxílico es orientador meta, la reacción no se ve favorecida.

4.5.3 Proporción parcial relativa por posición de la reacción de oxidación del ácido p-HB



Cuando se usó la metodología de CLAR y se analizó una muestra acuosa de ácido para-hidroxibenzoico a una concentración 5 mM más 2.5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y la solución saturada con N_2O e irradiada, se obtuvieron cinco compuestos de los cuales tres de ellos son los que se esperaban (ver esquema 4.3) los otros dos compuestos se identificaron como productos secundarios. En el caso de la metodología en EC se identificaron sólo los tres productos que se esperaban.

Siendo que el ácido p-HB tiene una cierta simetría se tienen dos posiciones orto al grupo -OH los cuales son posiciones meta al grupo -COOH, así que el radical $\cdot\text{OH}$ siendo una especie electrofílica, se adiciona a estas dos posiciones ricas en electrones del anillo aromático, dando como producto radiolítico principal al 3,4-DHB. En las posiciones restantes meta al grupo -OH y orto al grupo -COOH se ven desfavorecidos ya que son contrarios a sus propiedades orientadoras por lo que se obtiene el compuesto 2,4-DHB en una proporción de únicamente 0.05.

La descarboxilación del sustituyente carboxilo da lugar a la formación de la hidroquinona. La reacción de descarboxilación se ve favorecida por la posición del sustituyente -OH en posición para.

V Conclusiones

De la Química Analítica

Las condiciones electroforéticas y cromatograficas permitieron la separación de los productos radiolíticos primarios y secundarios obtenidos en la radiólisis de soluciones acuosas de los ácidos o-, m- y p-HB con una resolución siempre mayor que uno, siendo que en EC se obtuvo una resolución mayor.

Utilizando los dos métodos de análisis con detector de arreglo de diodos, se lograron identificar todos los productos primarios esperados mediante sus espectros (UV) y sus tiempos de retención y migración de los ácidos en estudio, con excepción del ácido 2,6-DHB en EC y el Resorcinol en los dos métodos.

Ambos métodos usados permitieron la cuantificación en el orden de μM de los productos radiolíticos primarios obtenidos en la radiólisis de soluciones acuosas de los tres isómeros en estudio. Así cinco productos para el ácido o-HB, cuatro para el ácido m-HB y tres para el ácido p-HB.

Los análisis mediante EC se realizaron en un tiempo menor que en CLAR.

Se identificaron los productos radiolíticos secundarios, el 2,3,4-THB en el ácido o-HB y el 3,4,5-THB en los ácidos m- y p-HB.

De la Química de Radiaciones

Este estudio provee una prueba sensible de que el sustituyente -OH es quien controla la adición del radical $\cdot\text{OH}$, el cual es un grupo electrófilo fuerte en reacciones de adición en la radiólisis de soluciones acuosas de los ácidos o-, m- ó p-HB, por lo que los principales productos radiolíticos obtenidos, son el resultado de la adición del radical $\cdot\text{OH}$ a posiciones ricas en población electrónica. En el caso del grupo -COOH refuerza las posiciones 3 y 5 de los ácidos orto y para hidroxibenzoicos únicamente.

La carboxiquinona que se obtiene en la radiólisis de los ácidos o- y m-HB se considera un producto radiolítico primario, sin embargo, su formación requiere de la oxidación por el ferricianuro del ácido 2,5-DHB. Su cuantificación se dificulta por su fácil descomposición en función del tiempo.

Conociendo que el sustituyente -OH es un orientador orto, para fuerte y sabiendo que la reacción de oxidación radiolítica continúa, se identificaron los ácidos 2,3,4- y 3,4,5-THB como productos radiolíticos secundarios, los cuales presentan un comportamiento cuadrático en función de la dosis de irradiación.

APÉNDICE A

El tratamiento de datos surge de consideraciones cinéticas, ya que en la radiólisis del ácido hidroxibenzoico, los productos de interés (P) son formados mediante la siguiente reacción.



$$[\text{P}_1]_{\text{D}} = G(\text{P}_1)_0 * F * D$$

Donde:

$[\text{P}_1]_{\text{D}}$ = dependencia de dosis de la formación de los productos iniciales a una dosis D

$G(\text{P}_1)_0$ = rendimiento inicial de P_1

F = factor de corrección de la competencia entre las reacciones 1 y 2

Asumiendo que k_{P_1} es similar para todos los productos y despreciable para las reacciones terciarias, F puede estar dado por la ecuación siguiente:

$$F = \frac{k_{\text{HB}}[\text{HB}]}{k_{\text{HB}}[\text{HB}] + k_{\text{P}_1}[\text{P}_1]_{\text{D}}} - \frac{k_{\text{P}_1}[\text{P}_1]_{\text{D}}}{k_{\text{HB}}[\text{HB}] + k_{\text{P}_1}[\text{P}_1]_{\text{D}}} \quad (3)$$

Donde:

$[\text{HB}]$ = es la concentración de anión del ácido

Durante las etapas iniciales de la radiólisis hay una pequeña pérdida del ácido, así que la formación de los productos pueden ser aproximadamente proporcionales a la dosis.

$$[P_1]_D \approx G(P_1)_0 * D$$

La ecuación 3 puede ser aproximada a:

$$F = \frac{1 - Q * D}{1 + QD * D} \quad (4)$$

Donde:

$$Q = \frac{k_{P_1}}{k_{HB}} \frac{G(P_1)_0}{[HB]} \quad (5)$$

El parámetro Q proporciona la medida de la curvatura de la gráfica rendimiento vs dosis, así que los productos formados podrían ser inversamente proporcional a la concentración del ácido. Con la suposición indicada arriba la concentración de productos total en la dosis D esta dada por la integral desde dosis cero a una dosis dada.

$$\begin{aligned} [P_1] &= G(P_1)_0 \int_0^D \frac{1 - Q * D}{1 + Q * D} dD \\ &= G(P_1)_0 * \{2 * (\ln(1 + Q * D)/Q) - D\} \end{aligned} \quad (6)$$

A dosis bajas la pérdida de los productos debido a reacciones secundarias es mínima y la ecuación (6) se reduce a

$$[P_1]_D \approx G(P_1)_0 * \{\ln(1 + Q * D)/Q\} \quad (7)$$

En muy bajas dosis, además la ecuación 7 puede reducirse a

$$[P_1]_D \approx G(P_1)_0 * D \quad (8)$$

Si todos los productos reaccionan con los radicales $\cdot\text{OH}$ a velocidades similares el parámetro Q debe ser similar para todos los productos como es aproximadamente observado, indicando que hay poca diferenciación en las reacciones secundarias. La formación de productos específicos podría representarse por :

$$f_i \cdot [P_1]_D = f_i \cdot G(P1)_0 \cdot \{2 \cdot (\ln(1 + Q \cdot D)/Q) - D\} \quad (9)$$

Donde:

f_i = es la fracción de radicales $\cdot\text{OH}$ que dan origen a un producto particular.

La ecuación 9 se usará para determinar la curvatura y posteriormente este valor se usa para determinar el valor G de cada uno de los productos radiolíticos.

Siendo que esta ecuación

$$P_1 \cdot \{2 \cdot [\ln(1 + Q \cdot D)/Q] - D\} \quad (10)$$

P_1 da la pendiente de la curvatura y Q es el grado de curvatura con estos datos se pueden calcular el rendimiento radiolítico (G) para cada uno de los productos radiolíticos (21).

APÉNDICE B

Utilizando la ecuación $y = Px$, se presenta en la tabla siguiente los resultados de las pendientes (m) y los coeficientes de correlación (r) de las curvas patrón obtenidas en CLAR y EC de cada uno de los productos auténticos esperados en la radiólisis de los ácidos o-, m- y p-HB.

o-HB				
Producto esperado	CLAR		EC	
	m	r	m	R
Catecol	12.519	0.999	0.856	0.999
Ácido 2,6-DHB	34.222	0.999	2.313	0.998
Ácido 2,5-DHB	18.468	0.999	1.227	0.999
Ácido 2,4-DHB	71.357	0.999	4.110	0.997
Ácido 2,3-DHB	38.635	0.999	1.784	0.999
m-HB				
Producto esperado	CLAR		EC	
	m	r	m	R
Ácido 3,4-DHB	53.212	0.999	4.169	0.999
Ácido 2,5-DHB	18.731	0.999	1.812	0.999
Ácido 2,3-DHB	16.854	0.999	2.016	0.999
Ácido 3,5-DHB	13.980	0.999	1.348	0.987
Resorcinol	10.316	0.999	0.625	0.996
p-HB				
Producto esperado	CLAR		EC	
	m	r	m	R
Ácido 3,4-DHB	102.719	0.999	52.905	0.999
Hidroquinona	29.817	0.999	1.956	0.999
Ácido 2,4-DHB	148.272	0.999	9.607	0.999

APÉNDICE C

Ecuaciones para la evaluación de la eficiencia y resolución en el presente trabajo.

$$N = 5.54 \left(\frac{tr}{w_{1/2}} \right)^2$$

Donde:

N = número de platos teóricos

tr = Tiempo de retención o tm (tiempo de migración) en el caso de electroforesis

w_{1/2} = Anchura medida a una altura igual a la mitad de la altura del pico

$$R_s = \frac{(tr_2 - tr_1)}{1/2(wb_1 + wb_2)}$$

Donde:

R_s = Resolución

tr₁ = Tiempo de retención o tm₁ (tiempo de migración en el caso de electroforesis) del pico 1

tr₂ = Tiempo de retención o tm₂ (tiempo de migración en el caso de electroforesis) del pico 2

wb₁ = Anchura medida de la base del pico 1

wb₂ = Anchura medida de la base del pico 2

VI Bibliografía

- 1 The Merck Index. Enciclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 10^a edición, USA, Merck & Co.,Inc. 1983: 700, 1200.
- 2 Varagnat J. Encyclopedia of chemical Technology Vol 13, USA, Wiley interscience 1981: 39-69.
- 3 Kakkar T. Mayersohn M. Simultaneous quantitative analysis of methyl salicylate, ethyl salicylate and salicylic acid from biological fluids using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B 1998; 718: 69-75.
- 4 Bandu M. Watkins K. Prediction of MS/MS Data. 1. A Focus on Pharmaceuticals Containing Carboxylic Acids. Anal. Chem. 2004; 76: 1746-1753.
- 5 Wei. Y. Li X. Simultaneous determination of aspirin and salicylic acid by synchronous fluorescent spectrometry. Yuguangpu Fenxi. 2005; 25: 588-590.
- 6 Qi. Lei. Fluorescent spectrometric determination of salicylic acid in aspirin enteric-coated tablets by extraction in aqueous double-phase system with PEG800-PVP. Guangpu Shiyanshi. 2005; 22: 103-105.
- 7 Xie C. Li H. Chemiluminescent assay using flow injection for detection of salicylic acid in water of black ringworm medicine. Zhongguo weisheng Jianyan Zazhi. 2004; 14: 422-423.
- 8 Goss J. Improved liquid chromatography of salicylic acid and some related compounds on a phenyl column. Journal of chromatography A 1998; 828: 267-271.
- 9 Spinks J. Woods R. An Introduction to Radiation Chemistry, New York, Wiley Interscience 1990
- 10 Draganic G. Radiation and Radioactivity On Earth and Beyond. Florida USA. CRC Press, 1990 : 55-57, 74-75.
- 11 Guillaumont R. Fundamentals of Radiochemistry. USA. CRC Press.1993; 106-111.
- 12 Albarrán G. Estudios de química de radiaciones del $\cdot\text{OH}$ en reacción de oxidación de compuestos aromáticos por electroforesis capilar XXV

congreso latinoamericano de química y XXXVII congreso mexicano de química división química nuclear. Cancún, 22-26 septiembre 2002; 1.

13 Grafton D. Principles of radioisotope methodology. Minneapolis. Burgess Publishing Company, 1967: 442-447.

14 Burton M. Advances in Radiation chemistry. New York, Wiley Interscience 1969: 9-12.

15 Lide D R. CRC Hand Book of chemistry and physics. Washington D.C, CRC Press, 2002: 11-65.

16 McLaughlin W, Boyd A. Dosimetry for radiation processing. Tailor & Francis, London, 1989;144-146.

17 Getoff N. Kammerer C. Cytostatic action of aspirin and its effect on mitomycin C activity. A study in vitro under irradiation. Radiation Physics and Chemistry 2001; 61: 35-40.

18 Allen A. The Radiation Chemistry of Water and Aqueous Solutions. USA. D. Van Nostrand Company, Inc. 1961.

19 Shuler R. Albarrán G. The rate constants for reaction of $\cdot\text{OH}$ radicals with benzene and toluene. Radiation Physics and Chemistry. 2002; 64: 189-195.

20 Albarrán G. Schuler R. Hydroxyl Radical as a probe of the Charge Distribution in Aromatics: Phenol. J. Phys. Chem. A. 2007;111: 2507-2510.

21 Albarrán G. Schuler R. Concerted effects in the reaction of $\cdot\text{OH}$ radicals with aromatics: radiolytic oxidation of salicylic acid. Radiation Physics and Chemistry. 2003; 67: 279-285.

22 Zegota H. Kolodziejczyk K. o-tyrosine hydroxylation by $\cdot\text{OH}$ radicals. 2,3-DOPA and 2,5-DOPA formation in γ -irradiated aqueous solution. Radiation Physics and Chemistry. 2005; 72: 25-33.

23 Albarrán G. Electroforesis capilar en el estudio de la oxidación radiolítica del benceno en solución acuosa. Journal of the Mexican Chemical Society. 2000; 44: 194-199.

24 Perkins J. Radical Chemistry. Oxford, Science, 2000.

25 IUPAC. Free Radicals in Solution, Butterworths Scientific Publications, 1966.

-
- 26 Fahrataziz Rodgers. Radiation Chemistry, principles and application. UCH Publisher, 1987.
- 27 Hay J M. Reactive Free Radicals in Solution. Butterworths Scientific Publications, 1966.
- 28 Fahrataziz, Dyne. P. Studies in Chemical Radiation. Atomic Energy Centre, Pakistan, Lahora, 1963.
- 29 By E. Land J. Ebert M. Pulse radiolysis studies of aqueous phenol Water Elimination from dihydroxycyclohexadienyl radicals to form phenoxil. 1967; 1181-1190.
- 30 Foley S. Roteau P. Pin S. Radiolysis of Confined Water: Production and Reactivity Hydroxyl Radicals. Angew. Chem. Int. 2005; 44: 110-112.
- 31 Bhatia K. Schuler R. Oxidation of Hydroxycyclohexadienyl Radical by Metal Ions. The Journal of Physical Chemistry. 1974; 78, 2335-2338.
- 32 Manfred K. Radiation Induced Homolytic Aromatic Substitution. II. Hydroxylation and Phenylation of Benzene. The Journal of physical Chemistry. 1974; 78, 1795-1797.
- 33 Schuler R. Albarran G. On the Addition of $\cdot\text{OH}$ Radicals to the Ipso Position of Alkyl-Substituted Aromatics: Production of 4-Hydroxy-4-methyl-2,5-ciclohexadien-1-one in the Radiolytic Oxidation of p-Cresol. J Phys. Chem. A. 2002; 106, 12178-12183.
- 34 Klein G. Bhatia K. Reaction of $\cdot\text{OH}$ with Benzoic Acid. Isomer Distribution in the Radical Intermediates. The Journal Physical Chemistry. 1975; 79, 1769-1774.
- 35 Oturan M. Pinson J. Hydroxylation by Electrochemically Generated $\cdot\text{OH}$ Radicals, Mono- and Polyhydroxylation of Benzoic Acid: Products and Isomers Distribution. The Journal Physical Chemistry. 1995; 99, 13948-13954.
- 36 Weston A. HPLC and CE Principles and practice, San Diego, Academic Press, 1997.
- 37 Harris D. Métodos Instrumentales de Análisis, España, Reverte, 1991:364-372
- 38 Grossman P. Capillary Electrophoresis Theory and Practice, San Diego, Academic Press, 1992.
-

-
- 39 Weinberger R. Practical capillary Electrophoresis, San Diego, Second Edition, Academic Press, 2000
- 40 Guzman N. Capillary Electrophoresis Technology, Chromatographic Science Series Volumen 64, New York, Marcel Dekker, Inc. 1993.
- 41 Beckman. Introduction to Capillary Electrophoresis, California, Beckman Instrumets, Inc. 1994.
- 42 Rubinson K. Análisis Instrumental. México, Prentice Hall, 2001. 718-746.
- 43 Rubinson J. Química Analítica contemporánea. México, Pearson Educación, 2000. 459-481.
- 44 Gomez M. Olsina R. Martínez L. Silva M. Simultaneous determination of cloramphenicol, salicylic acid and resorcinol by capillary zone electrophoresis and its application to pharmaceutical dosage forms. *Talanta* 2003; 61: 233-238.
- 45 Deg Y. Fan X. Separation and determination of aromatic acid in natural water with preconcentration by capillary zone electrophoresis. 1998; *A817*: 145-152.
- 46 Qiang Z. Li Zhang. Determination of salicylic acid in phenolic resin by high performance capillary zone electrophoresis. 2001; 20: 76-77.
- 47 Makino K. Itoh Y. Teshima D. Oishi R. Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human specimens by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. 2004; 25: 1488-1495.
- 48 Flaherty S. Wark S. StreetG. Investigation of capillary electrophoresis-laser induced fluorescence as a tool in the characterization of sewage effluent for fluorescent acid: Determination of salicylic acid. *Electrophoresis* 2002; 23: 2327-2332.
- 49 Li X. Lu H. Separation and determination of four organic acid in *Radix isatidis* by capillary electrophoresis. *Huaxi Yaoxue Zazhi*. 2004; 19: 114-117.
- 50 Shapiro A. Gutsche A. Capillary electrophoresis-based profiling and quantitation of total salicylic acid and related phenolics for analysis of early signaling in *Arabidopsis* disease resistance. *Analytical Biochemistry* 2003; 320: 223-233.
-

51 Li H. Yin L. De Z. On-line conversion and determination of aspirin using a flow injection-capillary electrophoresis system. *J. Sep. Sci.* 2003; 26: 863-868.

52 Coolen S. Huf F. Reijenga J. Determination of free radical reaction products and metabolites of salicylic acid using capillary electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography B* 1998; 717: 119-124.

53 Liu Ch. Ho Y. Pai Y. Preparation and evaluation of an imidazole-coated capillary column for the electrophoretic separation of aromatic acids. *Journal of Chromatography A* 2000; 897: 383-392.

54 Church W. Chiang H. Characterization and quantification of organic anions with capillary zone electrophoresis using direct and indirect detection. *Journal Capillary Electrophor.* 2000; 4: 261-268.

55 Kokot Z. Burda K. Simultaneous determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid in aspirin delayed-release tablet formulations by second-derivative UV spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998; 18: 871-875.

56 Verstraeten A. Roets E. Hoogmartens J. Quantitative determination by high-performance liquid chromatography of acetylsalicylic acid and related substances in tablets. *J. Chromatography* 1987; 388: 201-216.

57 Wen D. Li C. A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acid in Compound Herbal Medicines. *Journal Agric. Food Chem.* 2005; 53: 6624-6629.

58 Retno A. Budi M. Farida L. Assay of 2,3-dihydroxybenzoic acid and related compounds in plant materials by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.* 2001; 927: 39-45.

59 Rozhon W. Petutschnig E. Quantification of free and total salicylic acid in plants by solid-phase extraction and isocratic high-performance anion-exchange chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2005; 382: 1620-1627.

60 Mikami E. Goto T. Ohno T. Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 28: 261-267.

61 Liu J. Smith P. Direct analysis of salicylic acid, salicyl acyl glucuronide, salicyluric acid and gentisic acid in human plasma and urine by high-

performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1996; 675: 61-70.

62 Fornstedt N. A method for high-performance liquid chromatographic screening of uv-positive components in urine eluate from sephadex G-10 and modifications for determination of urinary salicylic, salicyluric and gentisic acids. *Journal of Chromatography*. 1982; 230: 253-261.

63 Steche G. Stoggl W. Sample pretreatment and determination of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical formulations and biological samples (blood, plasma, erythrocytes) by HPLC-UV-MS and micro-HPLC. *Current medicinal chemistry*. 2005; 12: 573-588.

64 Zhang S. Liu H. Comparison of high-performance capillary electrophoresis and liquid chromatography on analysis of zinc 5-aminosalicylate dehydrate and related materials. *Journal of chromatography B*. 1998; 705: 165-170.

65 Diez L. Livertoux M. Stark A. Rousseau M. High-performance liquid chromatographic assay of hydroxyl free radical using salicylic acid hydroxylation during in vitro experiments involving thiols. *Journal of Chromatography B*. 2001; 763: 185-193.

66 Ren X. Shao K. Determination of salicylic acid and its hydroxylated products using high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Sepu*. 2001; 19: 191-192.

67 Mc Cabe R. Mather J. Acworth I. Improved method for the estimation of hydroxyl free radical levels in vivo based on liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* 1997; 691: 23-32.

68 Lee B. Ong H. Shi Y. Ong C. Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and phenol in urine using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of chromatography* 1993; 619: 259-266.

69 Masoud A. Identification of hydroquinone and Catechol as impurities in Reagent-Grade Phenol Using High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Electrochemical Detectors. *Journal of HRC & CC*. 1980; 3: 133-142.

70 Ren X. Shao K. Determination of hydroxyl radical concentration in atmosphere. *Zhongguo Huanjing Kexue*. 2001; 21: 115-118.

71 Pan F. Liang H. Reverse phase-high performance liquid chromatographic determination of 3,5-dihydroxybenzoic acid and 3-hydroxybenzoic acid. Fénix Huaxue. 1998; 26: 1522.