

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
CATEDRA DE FISICOQUIMICA APLICADA

ESTUDIO ESPECTROFLUORIMETRICO DE LA SERPENTINA.  
EQUILIBRIO ACIDO-BASE

Tesina de Licenciatura  
presentada por:

Amalia Suárez Ramos

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
BIBLIOTECA

MIGUEL SANCHEZ GONZALEZ, Catedrático Numerario de Fisicoquímica Aplicada de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICO: Que el presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de esta Cátedra, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Y para que conste, expido y firmo el presente Certificado en Sevilla, Junio de mil novecientos ochenta y cinco.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel Sánchez González', written in a cursive style. The signature is enclosed within a large, sweeping, irregular loop that extends to the right and then curves back down and left.

Fdo: Miguel Sánchez González

Como Director de esta Tesina  
declaro que ha sido leida y  
revisada por mí en Junio de  
1.985.



Fdo: Miguel Sánchez González

Como Co-director de esta Tesina  
declaro que ha sido leida y revisa-  
da por mí en Junio de 1.985.



Fdo: José Hidalgo Toledo

Trabajo presentado como Tesina  
para aspirar al grado de Licencia-  
tura de Farmacia.



Fdo: Amalia Suárez Ramos

Sevilla, Junio de 1.985.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al profesor Dr. D. Miguel Sánchez González, Director de esta Tesina y a cuya orientación y estímulo se debe la realización de la misma.

Al Dr. D. José Hidalgo Toledo por su Co-dirección en esta Tesina así como su colaboración y continua ayuda.

Al Dr. D. Manuel Balón Almeida por las interesantes discusiones y sugerencias en relación con este trabajo, así como por su estímulo.

Y además a todos los restantes miembros del Departamento por su inestimable colaboración y ayuda en todo momento.

## INDICE

1.- INTRODUCCION.....	1
2.- OBJETIVO.....	6
3.- PARTE BIBLIOGRAFICA.....	9
3.1.-Antecedentes bibliográficos.....	10
3.2.-Propiedades ácido-base de los estados excitados.....	13
3.2.1.-Medidas de las inten- sidades de fluorescen- cia.....	17
3.2.2.-Método termodinámico. Ciclo de Förster.....	21
4.- PARTE EXPERIMENTAL.....	26
4.1.-Reactivos y aparatos.....	27
4.1.1.-Reactivos.....	28
4.1.2.-Aparatos.....	29
4.2.-Fluorescencia.....	31
4.2.1.-Fluorescencia nati- va o directa.....	32
4.2.2.-Efecto de la concen- tración en la intensi- dad de fluorescencia. Limite de detección....	34
4.2.3.-Rendimientos cuánti- cos. Sensibilidad ab- soluta de fluorescen- cia.....	35

4.3.-Equilibrio ácido-base.....	48
4.3.1.-Influencia del pH en las espectroscopias de absorción y de fluorescencia.....	49
4.3.2.-Determinación del pKa del estado fundamental y cálculo de los pKa del singlete excitado.....	52
4.3.2.1.-pK del estado fundamental.....	52
4.3.2.2.-Cálculo de los pKa del primer singlete excitado( $S_1$ ).....	54
 5.- RESULTADOS Y DISCUSION	
5.1.-Fluorescencia nativa o directa.....	66
5.2.-Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia. Límite de detección.....	68
5.3.-Rendimientos cuánticos. Sensibilidad absoluta de fluorescencia.....	71
5.4.-Influencia del pH en los espectros de absorción y fluorescencia. Equilibrio ácido-base.....	74
 6.-CONCLUSIONES.....	81
7.- BIBLIOGRAFIA.....	85
8.-APENDICE.....	91

## 1.-INTRODUCCION

Los alcaloides de la Rauwolfia son muy numerosos. Las Rauwolfias pertenecen a la familia de las Apocinaceas y contienen varias decenas de alcaloides.

Estos alcaloides se han dividido (1) según su basicidad en tres grupos:

1.-Bases de anhidronio cuaternarias, caracterizadas por su color amarillo y fuerte basicidad (pK 3,0 a 3,6). Ejemplos: esteroisómeros serpentina y alstonina.

2.-Bases de indolina terciarias, que son inodoras y de basicidad intermedia (pK 5,7 a 5,9). Ejemplos ajmalina, isoajmalina, raúwolfina, etc...

3.-Bases indólicas terciarias, incoloras y de basicidad moderadamente débiles ( pK 6,5 a 8,0). Este grupo se puede subdividir, ulteriormente, como sigue:

3.1.-Alcaloides que contienen un oxígeno heterocíclico, ejemplos:  $\beta$ -yohimbina, reserpinina, reserpilina, etc..

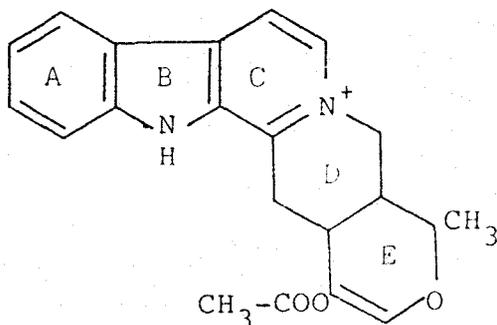
3.2.- Alcaloides en los que este ciclo es carbocíclico, ejemplos: reserpina, rescinamina, etc..

En lo que concierne al uso de los compuestos de esta familia en terapéutica, se pueden indicar algunas características fundamentales, ya que debido al gran número y variedad de estos alcaloides, con actividades frecuentemente diferentes, hace muy difícil una completa enumeración de las distintas propiedades.

Sin embargo, las dos propiedades esenciales de la mayoría de estos productos son las siguientes:

- 1.-Acción sedante y depresora.
- 2.-Acción espasmolítica y vasodilatadora, usada en los tratamientos de hipertensión.

La fórmula estructural de la serpentina es:



I.- Serpentina

Se trata del:

Oxoyohimba, 3, 4, 5, 6, 16, 17-hexadehidro-16(metoxicarbonil)-19-metil-(19  $\alpha$ ).

La fórmula empírica es  $C_{21}H_{20}N_2O_3$

y posee una masa molecular de 348,38.

La serpentina se obtiene de las raíces de ciertas especies de Rauwolfia, principalmente R. serpentina y R. vomitoria o por síntesis.

Se presenta en forma de polvo cristalino, debilmente amarillo, practicamente inodoro, ligeramente soluble en agua(bajo fuerte agitación), dificilmente soluble en etanol, cloroformo, metanol y acetónitrilo.

Presenta un punto de fusión comprendido entre 242° y 244°C.

Su poder rotatorio específico es:

$$[\alpha]_D^{20} = -135 \text{ a } -143^\circ\text{C}(\text{dimetil formamida}).$$

Se debe conservar protegido de la humedad y de la acción de la luz.

Además de las aplicaciones generales de los alcaloides de la Rauwolfia, muy recientemente se ha sugerido por Beljanski y col.(2) (3), que la serpentina inhibe selectivamente "in vitro" la síntesis de DNA en las células cancerosas.

## 2.- OBJETIVO

Como parte de un programa que se está realizando en este Departamento sobre luminiscencia, equilibrio ácido-base en estados fundamental y excitado y oxidación de distintos alcaloides de la Rauwolfia, se aborda en esta memoria:

1.-Estudio de la fluorescencia nativa o directa de la serpentina, obteniéndose espectros corregidos y no corregidos de este alcaloide en distintos disolventes determinando los máximos de excitación y de emisión.

Se estudia asimismo la influencia del pH en la fluorescencia de las disoluciones acuosas.

Se discute la posibilidad del uso de dicha fluorescencia directa en determinaciones analíticas, estudiándose la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración y determinándose el límite de detección en agua . Se calcula también el rendimiento cuántico de fluorescencia de la serpentina en etanol, ácido sulfúrico 0,05M y ácido acético 5N. Finalmente se calcula la sensibilidad absoluta de fluorescencia en etanol.

Previamente al estudio espectrofluorimétrico se hace un estudio espectrofotométrico.

2.-Las constantes de ionización de sustancias farmacológicamente activas son de extrema importancia en la determinación de la acción de las drogas. Por esta razón se ha realizado un estudio completo del equilibrio ácido-base en el estado fundamental y en el primer singlete excitado de esta sustancia.

### 3.-PARTE BIBLIOGRAFICA

3.1.-Antecedentes bibliográficos.

3.2.-Propiedades ácido-base de los  
estados excitados.

### 3.1.-Antecedentes bibliográficos.

La serpentina ha sido aislada a partir de la *Rauwolfia serpentina*, *R. hirsuta*, *R. fruticosa*, *R. heterophylla*, *R. ligustrina*, *R. sellowii*, *R. micrantha*, *R. sumatrana* (Apocinaceae), *Vinca minor* y *V. rosea* (4).

Se han indicado para este alcaloide algunas propiedades espectroscópicas en el UV, indicándose como máximos de absorción 252 nm. ( $\log \epsilon = 4,49$ ), 308 ( $\log \epsilon = 4,30$ ) y 370 ( $\log \epsilon = 3,61$ ) (5).

Schlitter y col. (6), han descrito diferentes transformaciones químicas para la serpentina tales como la hidrólisis en medio básico y diversas reducciones.

Este alcaloide se ha preparado a partir de la ajmalicina mediante la oxidación con tetraacetato de plomo, proceso que puede invertirse por reducción catalítica (7). La serpentina ha sido objeto también de diversos estudios biosintéticos (8-11).

Existe muy poca información sobre las características espectrofluorimétricas de este alcaloide. Undefriend y col. (12), se limitan a indicar los máximos de excitación y de emisión, sin corregir los espectros.

Jung y Jungová (13) indican también los máximos de excitación y de fluorescencia de una serie de alcaloides de la Rauwolfia, entre los que se encuentra la serpentina, en disoluciones de metanol, pero tampoco corrigen los espectros, ni calculan los rendimientos cuánticos. Radejová y col. (14) estudian asimismo la fluorescencia nativa de la serpentina y de otros alcaloides de la Rauwolfia en metanol, con objeto de obtener información sobre su estabilidad.

Como los autores anteriormente indicados, sólo registran los espectros no corregidos de excitación y de emisión.

Finalmente, Gürkan (15) estudia la fluorescencia de la serpentina, yohimbina y boldina en disoluciones acuosas a distintos pH y en etanol y cloroformo, y propone un método para la determinación analítica de estos alcaloides. Aunque este estudio es algo más completo que los anteriores, indicando incluso el límite de detección en disolución 0,1N

de ácido sulfúrico, tampoco corrige los espectros, ni determina el rendimiento cuántico ni la sensibilidad absoluta de fluorescencia.

En lo que respecta al equilibrio ácido-base de este alcaloide, la única reseña bibliográfica corresponde a Schwarz y Schlitter (16), que mediante titulación potenciométrica en disoluciones metanol-agua al 40% de metanol dan un valor de 10,49 para el pK en ese medio.

### 3.2.-Propiedades ácido-base de los estados excitados.

Desde hace más de tres décadas se admite, gracias a los trabajos de Förster (17), (18) y (19), que las diferencias entre la dependencia con el pH de los espectros de absorción y de fluorescencia se deben a la transferencia protónica en el estado fundamental para el caso de la absorción y en el primer singlete excitado ( $S_1$ ) para los espectros de fluorescencia. Weller (20), (21) y (22), efectuó un estudio detallado para diferentes com-

puestos acumulando una considerable cantidad de datos.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios de estas propiedades se han limitado a compuestos aromáticos que presentan bandas adecuadas de absorción en el visible y en el UV cercano y que, frecuentemente, presentan intensa fluorescencia.

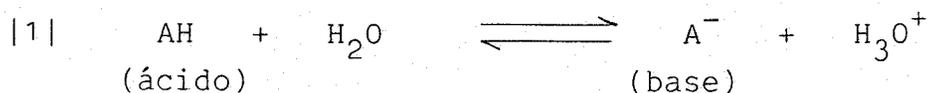
Lo mismo que ocurre con muchas propiedades químicas, las constantes de acidez dependen de las distribuciones electrónicas. Se ha demostrado mediante la medida de momentos dipolares, y sobre todo, mediante el estudio de la fluorescencia, que la excitación electrónica entraña profundas modificaciones de estas distribuciones. Puesto que las densidades de carga eléctrica se modifican frecuentemente mediante la excitación electrónica, es natural observar variaciones en la acidez entre el estado fundamental y los diferentes estados excitados (23) y (24).

Weller (25) ha publicado en 1.961 una excelente revisión relativa a reacciones rápidas de moléculas excitadas, examinando el intercambio protónico con gran detalle. Eigen y col. (26), han efectuado también una revisión relativa al mecanismo interno de la transferencia protónica y a la velocidad de las reacciones ácido-base. Donck (27), publica finalmente una revisión abordando

el estudio de las propiedades ácido-base de los estados excitados.

El conocimiento de las propiedades ácido-base de las moléculas en el estado excitado es de primordial importancia para la dilucidación de los mecanismos de fotorreacción. En el contexto complejo de la reactividad fotoquímica las constantes de acidez aparecen como magnitudes particularmente simples y claras tanto desde el punto de vista termodinámico como cinético (28) (29).

La acidez y la basicidad se pueden definir de diferentes maneras. En la presente discusión se empleará siempre la definición de Brönsted (30)(31). Un ácido es una molécula o un ión que bajo ciertas condiciones puede ceder un protón y una base es una especie que puede aceptarlo. Sólo se tratarán los equilibrios en disolución acuosa y por ello la reacción general que se considera es:



La constante de equilibrio es:

$$|2| \quad K_a = \frac{a_{\text{A}^-} a_{\text{H}_3\text{O}^+}}{a_{\text{AH}}} = \frac{|\text{A}^-| |\text{H}_3\text{O}^+|}{|\text{AH}|} \cdot \frac{\Psi_{\text{A}^-} \Psi_{\text{H}_3\text{O}^+}}{\Psi_{\text{AH}}}$$

donde  $a$  = actividades.

$| |$  = concentraciones.

$\psi$  = coeficientes de actividad.

Para disoluciones diluidas la expresión anterior equivale, aproximadamente a:

$$|3| \quad K_a = \frac{|A^-| \cdot |H_3O^+|}{|AH|}$$

En lo sucesivo, al pK del estado fundamental se le designará pK(S<sub>0</sub>) o simplemente pK, y al correspondiente pK del primer singlete excitado (S<sub>1</sub>), pK(S<sub>1</sub>), o simplemente pK\*. No consideraremos en esta memoria al pK del primer triplete excitado pK(T<sub>1</sub>).

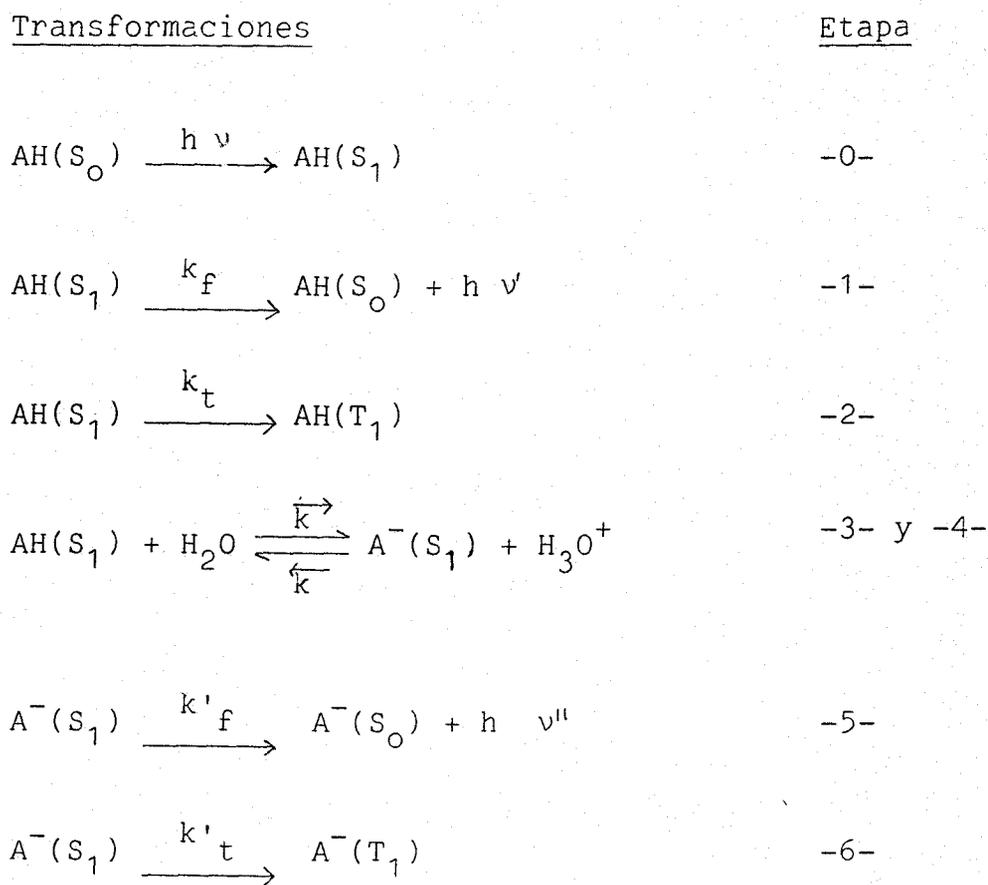
Para la determinación del pK del primer singlete excitado, pK(S<sub>1</sub>), se pueden considerar dos métodos generales:

1.-Medidas de las intensidades de fluorescencia.

2.-Método termodinámico.

3.2.1.- Medidas de las intensidades de fluorescencia.

En el equilibrio ácido-base en el estado  $S_1$ , la transferencia protónica entra en competencia con la desactivación radiativa y no radiativa de acuerdo con el siguiente esquema cinético:



Donde  $\nu$  es la frecuencia de excitación, y  $\nu'$   $\nu''$  son las frecuencias de fluorescencia de las formas ácida y básica respectivamente.  $S_0$ ,  $S_1$  y  $T_1$  designan, respectivamente, los estados

electrónico fundamental y los singlete y triplete de más baja energía.

$k_f$  y  $k'_f$  = Constantes de velocidad unimolecular de fluorescencia.

$k_t$  y  $k'_t$  = Suma de las constantes de velocidad unimolecular de la desactivación no radiativa.

$\vec{k}$  = Constante de velocidad pseudounimolecular de la reacción directa.

$\overleftarrow{k}$  = Constante de velocidad bimolecular de la reacción inversa.

En el esquema anterior las condiciones de pH son tales que el equilibrio en el estado fundamental está desplazado hacia la forma ácida que es, pues, la única responsable de la absorción (etapa -0-). La deprotonación de la forma ácida (etapa -3-), entra en competición desde el punto de vista cinético con los procesos de desactivación por fluorescencia y por cruce inter-sistemas (etapas -1- y -2- respectivamente). Análogamente, la protonación de la forma básica está en competición con los procesos de desactivación indicados en las etapas -5- y -6-.

Para que el equilibrio ácido-base sea alcanzado mientras dura el estado excitado, es

necesario que el tiempo de relajación de este equilibrio sea corto frente a la duración de las especies excitadas, es decir:

$$|4| \quad \tau_{rel.} < \tau_{AH} \text{ y } \tau_{A^-}$$

donde  $\tau_{rel}$  es el tiempo de relajación del equilibrio prototrópico y  $\tau_{AH}$  y  $\tau_{A^-}$  los tiempos de vida media de las formas ácidas y básicas. Se puede demostrar (32) que

$$|5| \quad \tau_{rel} = \frac{1}{\bar{k} (K_a + |H_3O^+|)}$$

Los compuestos aromáticos en los que el estado  $S_1$  es del tipo  $\pi\pi^*$  tienen una vida media del orden de  $10^{-8}$  s. La protonación es frecuentemente un proceso controlado por la difusión y por ello el valor de  $\bar{k}$  es aproximadamente  $5 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Entonces, según la expresión |5|, el equilibrio en el estado excitado sólo será alcanzado para el caso de ácidos muy fuertes con valores del  $pK_a$  menores o iguales a 2. Raznando de idéntica manera, se demuestra que sólo las bases muy fuertes con  $pK_b$  menores o iguales a 2 pueden alcanzar el equilibrio prototrópico en el estado excitado.

Weller (20)(21)(33) ha aplicado la hipótesis del estado estacionario al esquema cinético

indicado anteriormente y ha podido relacionar la relación de los rendimientos cuánticos (o de las intensidades de fluorescencia) con las constantes cinéticas y con el pH:

$$|6| \left( \frac{Q}{Q_0} \right)_{AH} = \frac{1 + \overleftarrow{k} \tau_{A^-} |H_3O^+|}{1 + \overrightarrow{k} \tau_{AH} + \overleftarrow{k} \tau_{A^-} |H_3O^+|}$$

$$|7| \left( \frac{Q}{Q_0} \right)_{A^-} = \frac{\overrightarrow{k} \tau_{AH}}{1 + \overrightarrow{k} \tau_{AH} + \overleftarrow{k} \tau_{A^-} |H_3O^+|}$$

donde  $\left( \frac{Q}{Q_0} \right)_{AH}$  es el rendimiento cuántico de fluo-

rescencia de la forma ácida a un pH determinado con relación al rendimiento cuántico de la misma forma medido en condiciones tales de pH en los que exista

deprotonación.  $\left( \frac{Q}{Q_0} \right)_{A^-}$  es la misma relación re-

ferida a la forma básica. Obsérvese que las relaciones citadas de los rendimientos cuánticos equivalen a las relaciones de las intensidades de fluorescencia en las mismas condiciones.

Mediante las medidas de los tiempos de vida media  $\tau_{AH}$  y  $\tau_{A^-}$  y la determinación de la intensidad de fluorescencia frente al pH, se pueden obtener  $\overleftarrow{k}$  y  $\overrightarrow{k}$  y, en consecuencia, la constante de equilibrio ya que  $K_a = \frac{\overrightarrow{k}}{\overleftarrow{k}}$ .

En la determinación del  $pK_a$  del singlete excitado ( $S_1$ ), ( $pK_a^*$ ) mediante la titulación fluorimétrica frente al pH, es muy interesante desde el punto de vista práctico, el trabajo de Schulman y Capomacchia (34), donde se discuten los tres casos posibles: a) La transferencia protónica en el singlete excitado de menor energía, ocurre mucho más lentamente que la desactivación por fluorescencia del ácido o de la base conjugada. b) El intercambio protónico ocurre mucho más rápidamente que la citada fluorescencia y c) Las velocidades de la transferencia protónica y de la fluorescencia son comparables.

### 3.2.2.-Método termodinámico. Ciclo de Förster

Además del método de las intensidades de fluorescencia discutido anteriormente, los  $pK$  del singlete excitado ( $pK^*$ ) se pueden determinar por otro método más sencillo, desarrollado por Förster (18) y basado en un ciclo termodinámico, indicado en el esquema de la figura adjunta.

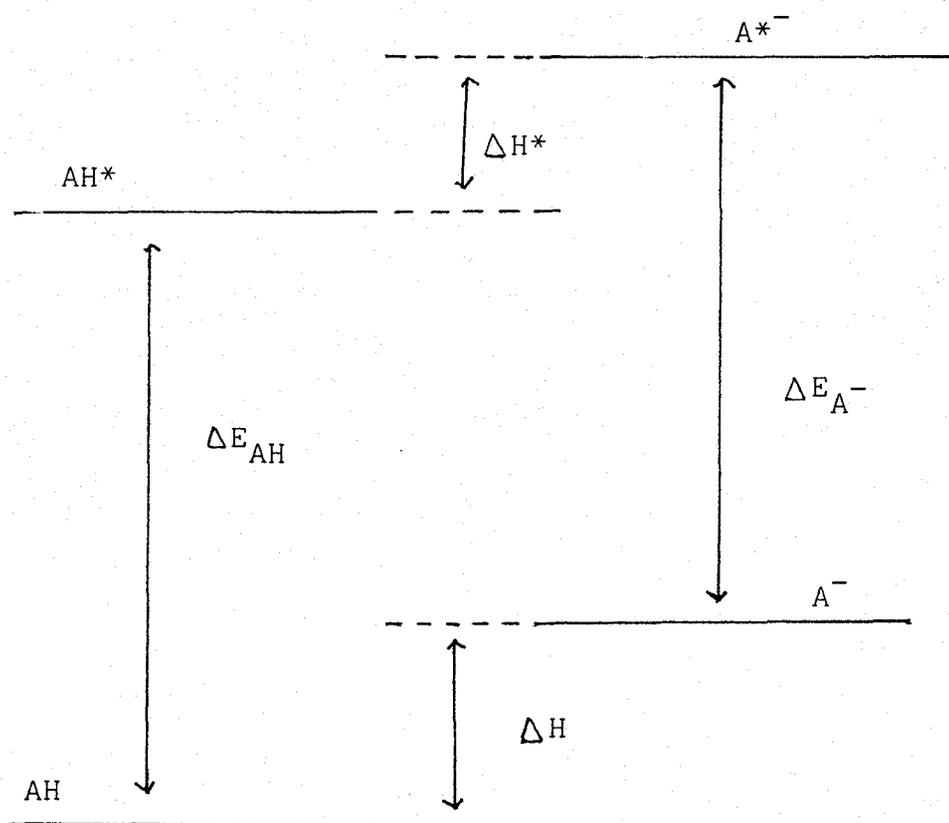


Diagrama esquemático de los niveles electrónicos del estado fundamental y excitado de un ácido (AH) y de su base conjugada (A<sup>-</sup>).

Existen dos vías alternativas de alcanzar el estado excitado de una base partiendo del estado fundamental del ácido conjugado, como indica el diagrama. Una consiste en la disociación del ácido en el estado fundamental (AH), originando el estado fundamental de la forma básica ( $A^-$ ), este proceso se alcanza mediante un cambio de energía,  $\Delta H$ , que es la entalpia de disociación en el estado fundamental. La forma básica  $A^-$  absorbe después la energía  $\Delta E_{A^-}$  de la radiación para llegar al estado excitado  $A^{-*}$ . La energía total intercambiada en el proceso es pues  $\Delta H + \Delta E_{A^-}$ . Alternativamente AH puede absorber la radiación de energía  $\Delta E_{AH}$  para ser excitado a  $AH^*$  y después se disocia a  $A^{-*}$  con un cambio de entalpia  $\Delta H^*$ . La energía total asociada a este proceso es  $\Delta H^* + \Delta E_{AH}$ .

Evidentemente se tendrá:

$$|\delta| \quad \Delta H + \Delta E_{A^-} = \Delta H^* + \Delta E_{AH}$$

$\Delta E_{AH}$  y  $\Delta E_{A^-}$  están relacionados con las longitudes de onda de absorción o número de onda por

$$\Delta E_{AH} = \frac{N h c}{\lambda_{AH}} = N h c \bar{\nu}_{AH} \quad \text{y}$$

$$\Delta E_{A^-} = N h c \bar{\nu}_{A^-}$$

donde N es el número de Avogadro, c es la velocidad de la luz, h la constante de Planck y  $\bar{\nu}_{AH}$  y  $\bar{\nu}_{A^-}$  son los números de onda de absorción de las

formas AH y A<sup>-</sup> respectivamente.

Si se supone que la estructura vibracional de AH, AH\*, A<sup>-</sup> y A<sup>-\*</sup> son similares,  $\bar{\nu}_{AH}$  y  $\bar{\nu}_{A^-}$  pueden tomarse como los máximos de absorción de la mayor longitud de onda del ácido y de la base conjugada respectivamente.

Entonces la ecuación [8] se transforma en:

$$[9] \quad \Delta H^* - \Delta H = N h c ( \bar{\nu}_{A^-} - \bar{\nu}_{AH} )$$

Por otra parte es sabido que:

$$\Delta H = \Delta G + T \Delta S = 2,3 R T pK_a + T \Delta S$$

$$\Delta H^* = \Delta G^* + T \Delta S^* = 2,3 R T pK_a^* + T \Delta S^*$$

donde  $\Delta G$  y  $\Delta S$  son respectivamente la energía libre de Gibbs y la entropía de disociación en el estado fundamental y  $\Delta G^*$  y  $\Delta S^*$  las correspondientes magnitudes del estado excitado.  $pK_a$  y  $pK_a^*$  serían, respectivamente, los  $pK_a$  del estado fundamental y del primer singlete excitado. Si se supone que las entropías de protonación en el estado fundamental y excitado son iguales (suposición razonable puesto que las entropías de protonación en los estados electrónicos respectivos son predominantemente configuracionales y por ello de diferencias de energía similares), resulta:

$$|10| \quad pK_a^* - pK_a = \frac{N h c}{2,3 R T} (\bar{\nu}_{A^-} - \bar{\nu}_{AH})$$

y a 25°C, usando el sistema c.g.s.

(  $\bar{\nu}_{A^-}$  y  $\bar{\nu}_{AH}$  en  $\text{cm}^{-1}$  ), resulta:

$$|11| \quad pK_a^* - pK_a = 2,10 \cdot 10^{-2} (\bar{\nu}_{A^-} - \bar{\nu}_{AH})$$

Esta ecuación indica que conociendo el pK del estado fundamental y los máximos de absorción para la mayor longitud de onda del ácido y de la base conjugada, se puede calcular el  $pK_a^*$  del estado excitado.

Jaffe y Jones (35) han discutido ampliamente las condiciones para la aplicabilidad del ciclo de Förster. El ciclo es a priori aplicable solamente a transiciones electrónicas puras. Sin embargo, para moléculas aromáticas en disolución, es frecuentemente difícil e incluso imposible el saber las transiciones 0-0. Para evitar esta dificultad,  $\bar{\nu}_{AH}$  y  $\bar{\nu}_{A^-}$  se calculan promediando las frecuencias de los máximos de absorción y de fluorescencia de las formas ácidas y básicas respectivamente.

#### 4.-PARTE EXPERIMENTAL

4.1.-Reactivos y aparatos.

4.2.-Fluorescencia.

4.3.-Equilibrio ácido-base.

#### 4.1.-REACTIVOS Y APARATOS

4.1.1.-Reactivos.

4.1.2.-Aparatos.

#### 4.1.1.-Reactivos

La serpentina empleada fué de un alto grado de pureza\*.

Los disolventes utilizados fueron los siguientes: metanol y etanol Merck de grado de pureza para "fluorimetría", acetonitrilo Merck de grado de pureza para "espectroscopia", ácido acético glacial Merck p.a..

Otros reactivos fueron: peróxido de hidrógeno 30% Merck, bisulfato de quinina U.S.P. y antraceno purísimo, cloruro potásico, ácido clorhídrico, hidróxido potásico, dihidrogenofosfato potásico, hidrógenofosfato disódico, ácido bórico, tetraborato sódico, ácido sulfúrico, carbonato sódico, bicarbonato sódico y ácido acético, Merck p. a.

\*La serpentina fué suministrada por C.H. Boeringer Söhn Ingelheim, S.A.E.. Les expresamos nuestro agradecimiento.

#### 4.1.2.- Aparatos

Fué utilizado un espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo Lambda 5 U.V.-Vis.. Este aparato es de doble haz, con rango de longitud de onda de 190 a 900 nm. La precisión en la selección de la longitud de onda es de  $\pm 0,3$  nm, la reproducibilidad de  $\pm 0,1$  nm., y la precisión fotométrica de  $\pm 0,003A$  para 1A. Además dicho aparato posee un Printer/Plotter para recogida de espectros.

La fuorimetria se ha realizado en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer Modelo 650-40. Este aparato utiliza una lámpara de xenon de 150w. Los monocromadores, tanto de excitación como de emisión, tienen una selección de paso de banda de 1,5 a 20 nm.. El monocromador de excitación selecciona la radiación en un intervalo de 200 a 830 nm., el de emisión entre 200 y 830 nm. El detector es un R 928 detector fotomultiplicador que se usa en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm.. Como registrador se ha utilizado un Hitachi Modelo 057 XY. Para la obtención de los espectros corregidos, tanto de excitación como de emisión, el espectrofluorímetro está provisto de un procesador de datos Perkin-Elmer Modelo 650-0178.

La sensibilidad y la estabilidad del espectrofluorímetro se comprobó mediante la banda Raman del agua destilada. Las longitudes de onda de excitación y de emisión se comprobaron usando las líneas de la lámpara de

xenon a 450,1 nm, así como mediante disoluciones de bisulfato de quinina ( 36 ).

La termostatación se realizó mediante un termostato auxiliar Tectron Modelo 473-100 en el cual se consigue una temperatura de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .

Para la determinación de los Rendimientos cuánticos se ha diseñado un sistema de adquisición de datos basado en un microprocesador ATOM de Acorn. Comp., que permite el registro del espectro y su tratamiento posterior. Las areas se han calculado mediante integración numérica de la curva experimental. El programa completo se recoge en el apéndice 1.

Los valores de pH se han obtenido usando un Radiometer 82 Phmetro con una precisión de 0,01 unidades de pH.

## 4.2.-FLUORESCENCIA

4.2.1.- Fluorescencia nativa o directa.

4.2.2.- Efecto de la concentración en  
la intensidad de fluorescencia.

Límite de detección.

4.2.3.- Rendimientos cuánticos. Sensibi-  
lidad de fluorescencia absoluta.

#### 4.2.1.- Fluorescencia nativa o directa

Se han estudiado las características espectrofluorimétricas de la serpentina en agua, metanol, etanol, acetonitrilo y ácido acético 5N.

Se hicieron pruebas de estabilidad de la serpentina en estos medios y las disoluciones resultaron suficientemente estables durante el transcurso de las experiencias, manteniendo siempre las disoluciones en matraces topacio.

En primer lugar se obtuvieron los espectros no corregidos de excitación y de emisión, la concentración de serpentina en los disolventes utilizados fué de  $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

Las medidas se efectuaron con disoluciones preparadas inmediatamente antes de su utilización y se les burbujeó nitrógeno para evitar la amortiguación ("Quenching") del oxígeno del aire.

Las rendijas de excitación y de emisión usadas para la obtención de los espectros no corregidos fueron de 2 y 6 nm. respectivamente.

Seguidamente se obtuvieron los espectros corregidos de excitación y de emisión, que se registraron en cuantos relativos frente a la longitud de onda. Se empleó como patrón para tales correcciones la rodamina B.

El rango de longitudes de onda corregido fué 280-600 nm. para la emisión. El intervalo entre puntos vecinos corregidos fué de 0,8 nm.. Las rendijas de excitación y de emisión utilizadas para la obtención de los espectros corregidos fueron 2 y 6 nm. respectivamente.

En las figuras ( 1,2,3,4,5 ) se presentan los espectros no corregidos (.....) y corregidos (\_\_\_\_\_) de excitación y la fluorescencia de la serpentina en agua, metanol, etanol, acetonitrilo y ácido acético 5N.

En la tabla ( I ) se recogen las longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión de la serpentina en los disolventes antes mencionados.

#### 4.2.2.-Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia. Límite de detección.

Se estudió también la relación entre la intensidad relativa de fluorescencia en el máximo de emisión y la concentración para disoluciones de serpentina en agua (  $\lambda_{exc.}$  a 307 nm, 365 nm y  $\lambda_{em.}$  de 445 nm ).

La figura ( 6 ) indica una dependencia lineal en el rango de concentraciones de  $0,01 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  hasta  $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  para  $\lambda_{exc.}$  de 305 nm y de  $0,01 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  hasta  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . para una  $\lambda_{exc.}$  de 365 nm.

Se determinó el límite de detección en agua. La tabla ( II ) indica los valores de emisión para cada una de las longitudes de onda de excitación.

De la pendiente de las curvas de calibración, figura ( 6 ), se obtienen los valores de la sensibilidad en intensidad relativa.  $\mu\text{g}^{-1}\text{ml}$ .

Para un nivel de confianza del 90% el límite de detección se calcula mediante la fórmula:

$$C_L = \frac{S_{\overline{BI}}}{\text{Sensibilidad}}$$

Donde  $S_{\overline{BI}}$  es el valor standar de las medidas del blanco. Los valores de la sensibilidad y los límites de detección se pueden ver en la tabla ( II ).

#### 4.2.3.-Rendimientos cuánticos. Sensibilidad absoluta de fluorescencia.

Se han determinado los rendimientos cuánticos (Q) a 25°C de disoluciones de serpentina en etanol, ácido acético 5 N y ácido sulfúrico 0,05 M. Para ello se han comparado los espectros corregidos de emisión de las disoluciones de serpentina con el correspondiente al del bisulfato de quinina en ácido sulfúrico 1 N, que se tomó como sustancia de referencia.

Los espectros se obtuvieron a partir de disoluciones diluidas recientemente preparadas a las que se les burbujeó nitrógeno, excitando a una longitud de onda de 350 nm. Las rendijas de excitación y de emisión fueron de 5 y de 6 respectivamente. Asimismo se midieron las absorbancias de las citadas disoluciones. Las areas bajo los espectros se calcularon mediante la conexión de un microprocesador de datos al espectrofluorímetro y haciendo uso de un programa especialmente preparado para este fin ( véase apéndice 1 ). Como rendimiento cuántico del sulfato de quinina, sustancia de referncia, se tomó el valor de 0,546(37).

Los rendimientos cuánticos se calcularon haciendo uso de la fórmula:

$$Q = 0,546 \frac{\text{Area bajo espectro serpentina.} \quad \text{Ab bis.quinina}}{\text{Area bajo espectro bis.quinina} \quad \text{Ab serpentina}}$$

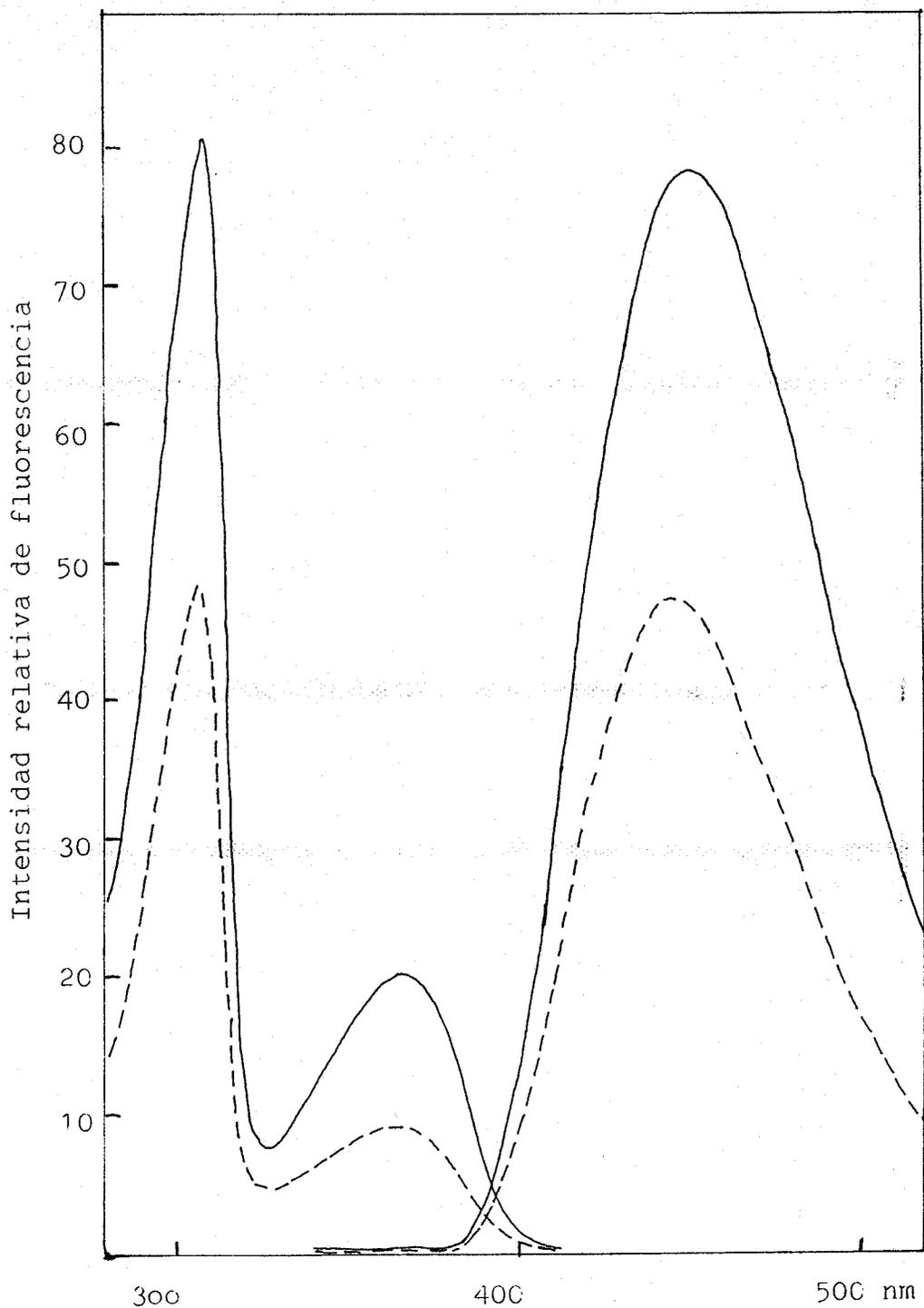
En la tabla ( III ) se indican los valores de los parámetros antes indicados necesarios para tal cálculo, y los valores de los rendimientos cuánticos.

En la figura ( 7 ) se pueden comparar los espectros corregidos de emisión de la serpentina en etanol y el bisulfato de quinina en ácido sulfúrico 0,1 N a 25°C.

Con el valor del rendimiento cuántico para etanol se puede obtener la sensibilidad de fluorescencia para la banda completa de emisión, determinando previamente la absorbancia por centímetro para una concentración de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  a una longitud de onda correspondiente al máximo de absorción ( 365 nm). Asimismo, conociendo la anchura espectral de banda del espectro de fluorescencia, se obtiene la sensibilidad de fluorescencia para el pico de emisión.

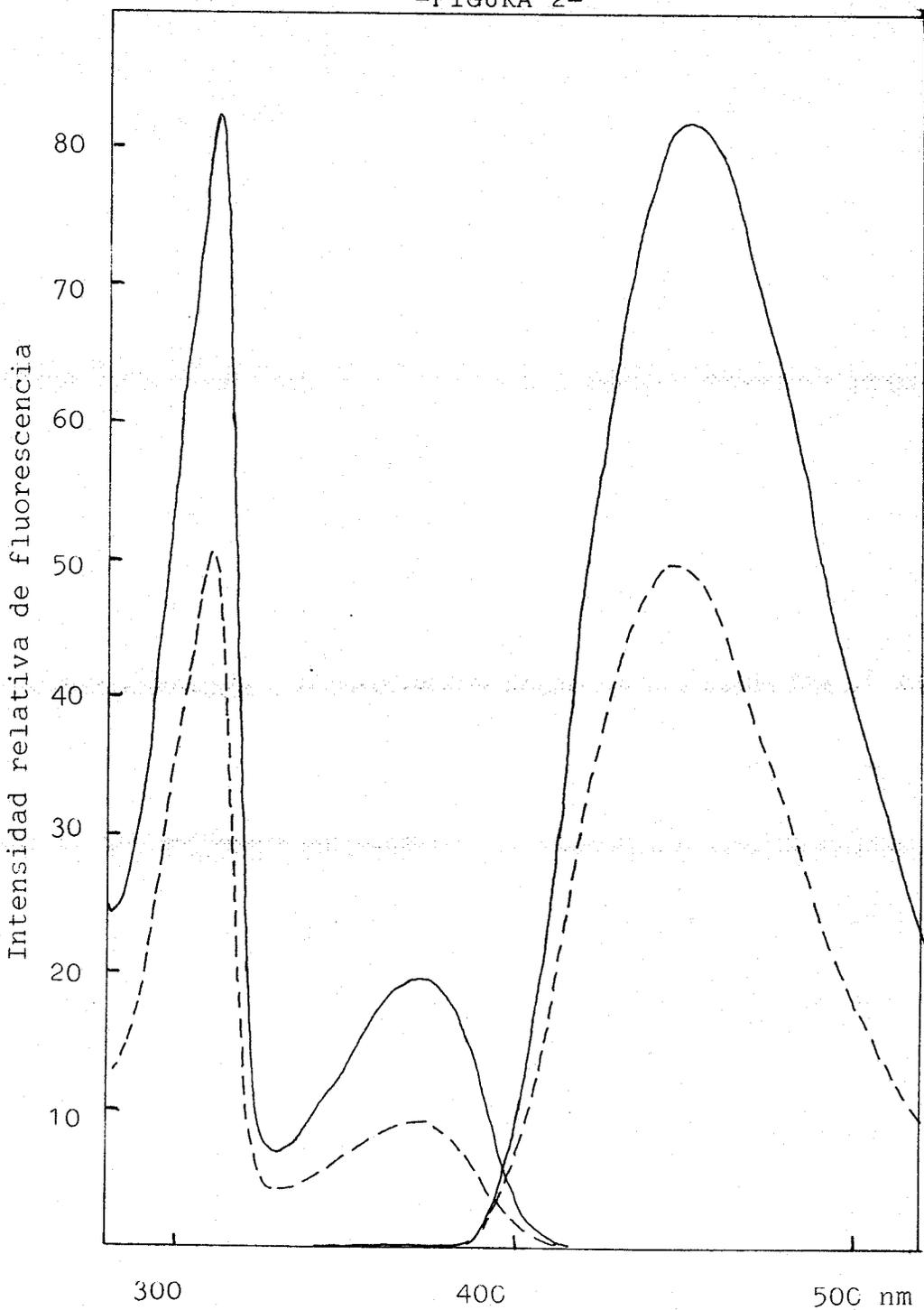
En la tabla ( IV ) se indican los resultados.

-FIGURA 1-



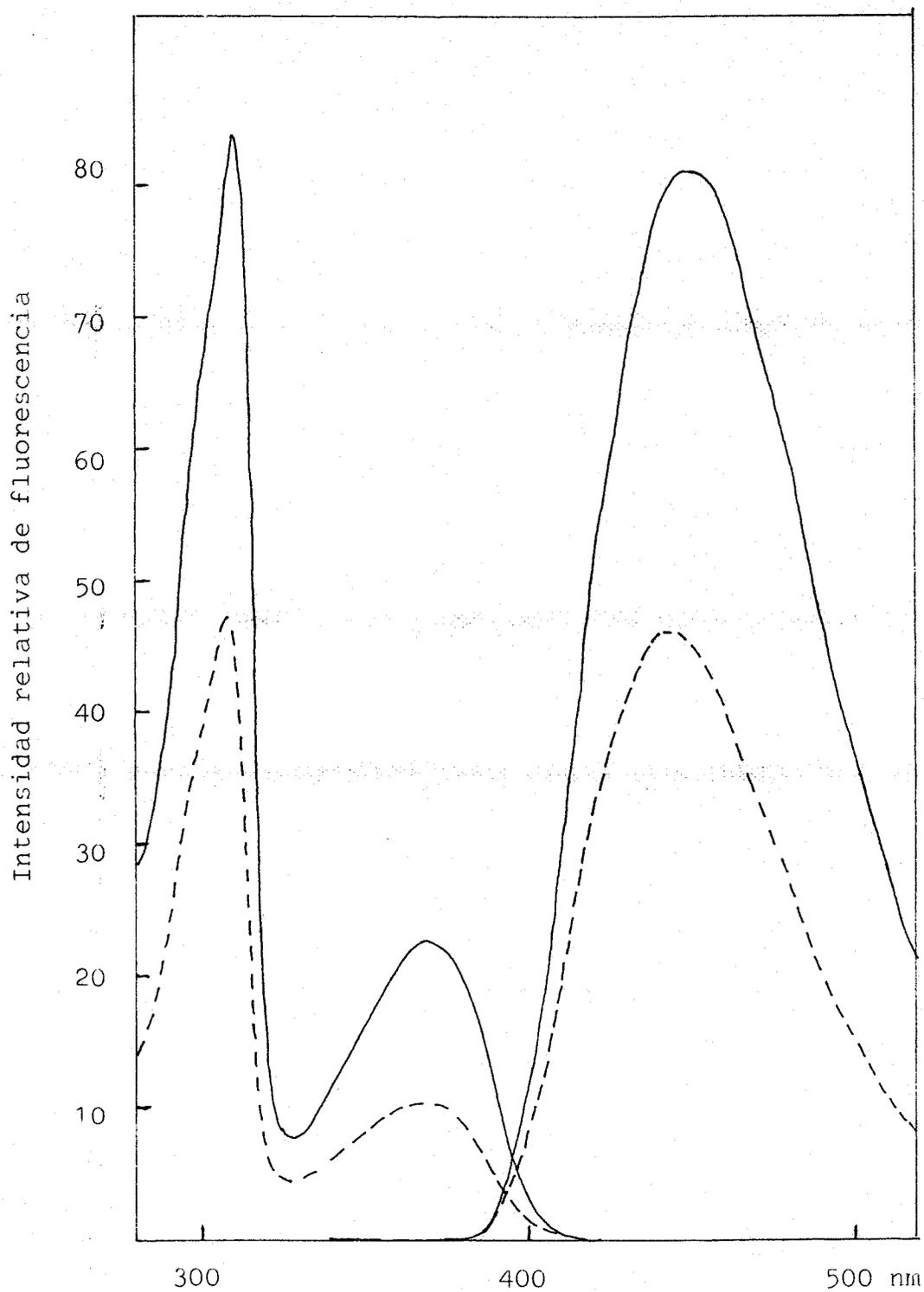
Espectros corregidos(—) y no corregidos(- - -)  
de la serpentina en agua.  $\lambda_{exc.} = 306 \text{ nm}$  y  
 $\lambda_{em.} = 446 \text{ nm}$

-FIGURA 2-



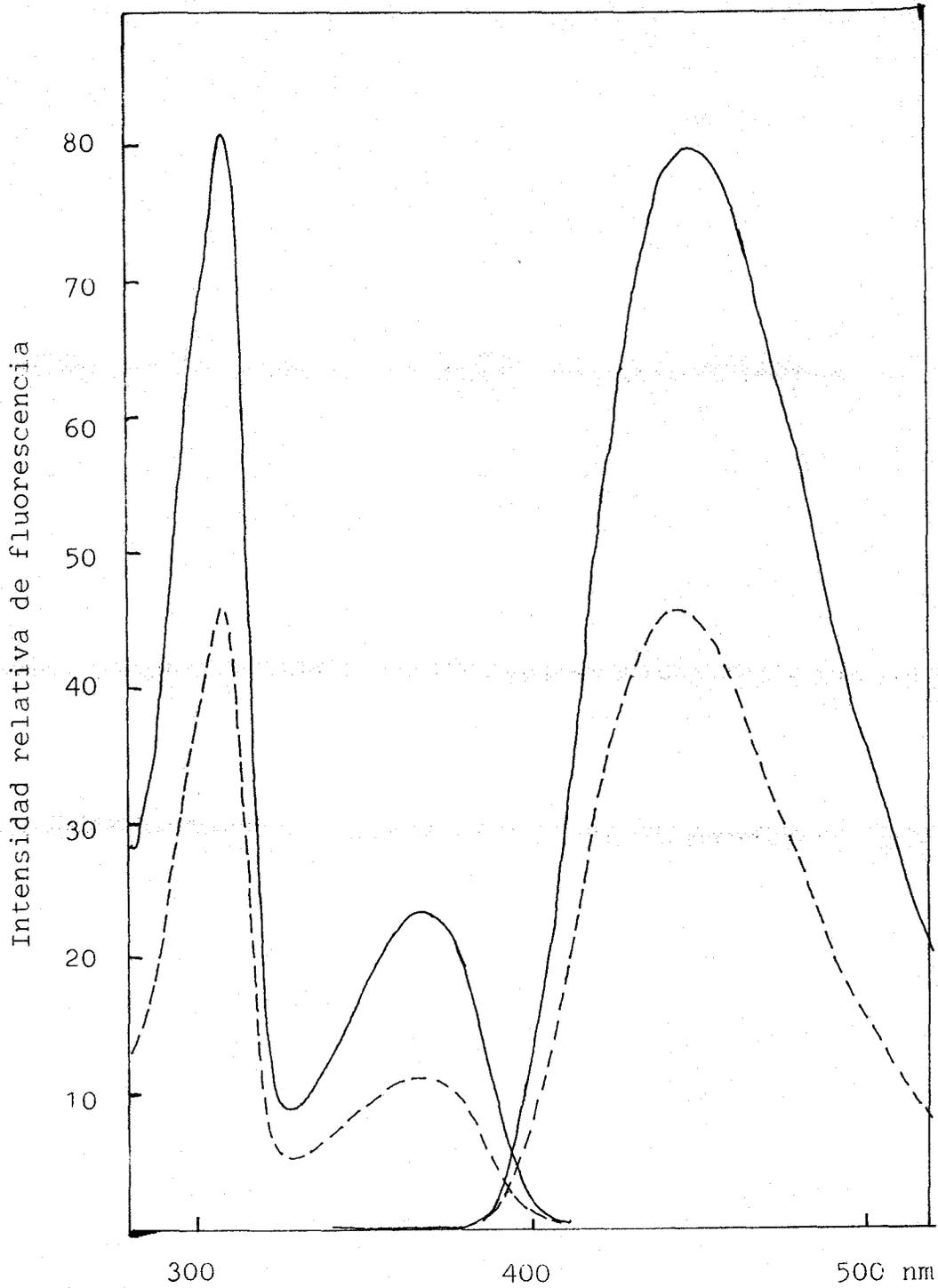
Espectros corregidos(—) y no corregidos(- - -) de la serpentina en metanol.  $\lambda_{exc} = 308 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em.} = 445 \text{ nm}$

-FIGURA 3-



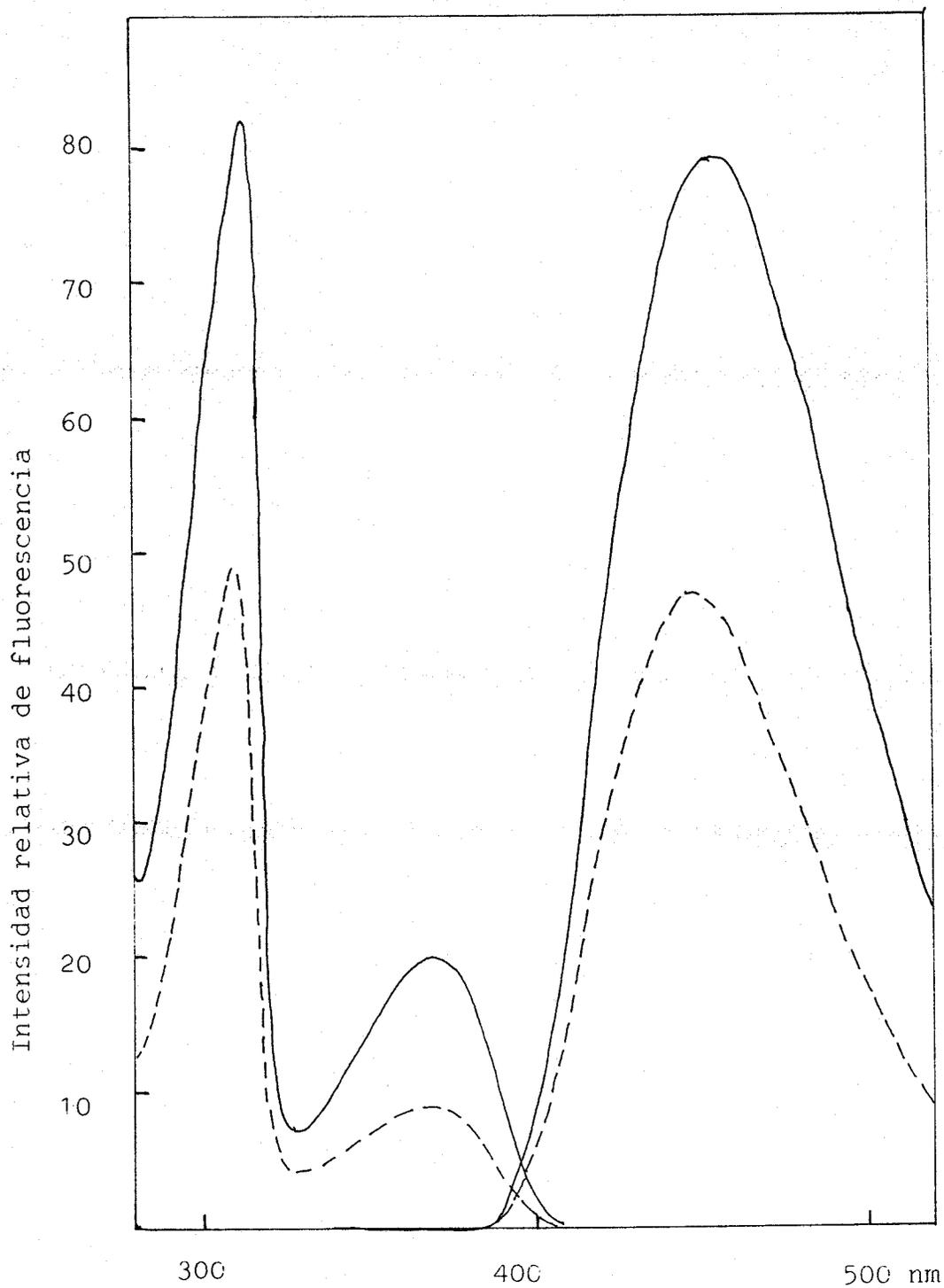
Espectros corregidos(—) y no corregidos(- - -)  
de la serpentina en etanol.  $\lambda_{exc.} = 309 \text{ nm}$  y  
 $\lambda_{em.} = 445 \text{ nm}$

-FIGURA 4-



Espectros corregidos(—) y no corregidos(- - -)  
de la serpentina en acetonitrilo.  $\lambda_{exc.} = 306 \text{ nm}$   
y  $\lambda_{em.} = 442 \text{ nm}$

-FIGURA 5-



Espectros corregidos(—) y no corregidos(- - -) de la serpentina en ácido acético 5N.  $\lambda_{exc.} = 308$  nm y  $\lambda_{em.} = 444$  nm

TABLA I

Valores de las longitudes de onda de los máximos de excitación y de emisión de la serpentina en agua, metanol, etanol, acetonitrilo y ácido acético 5N.

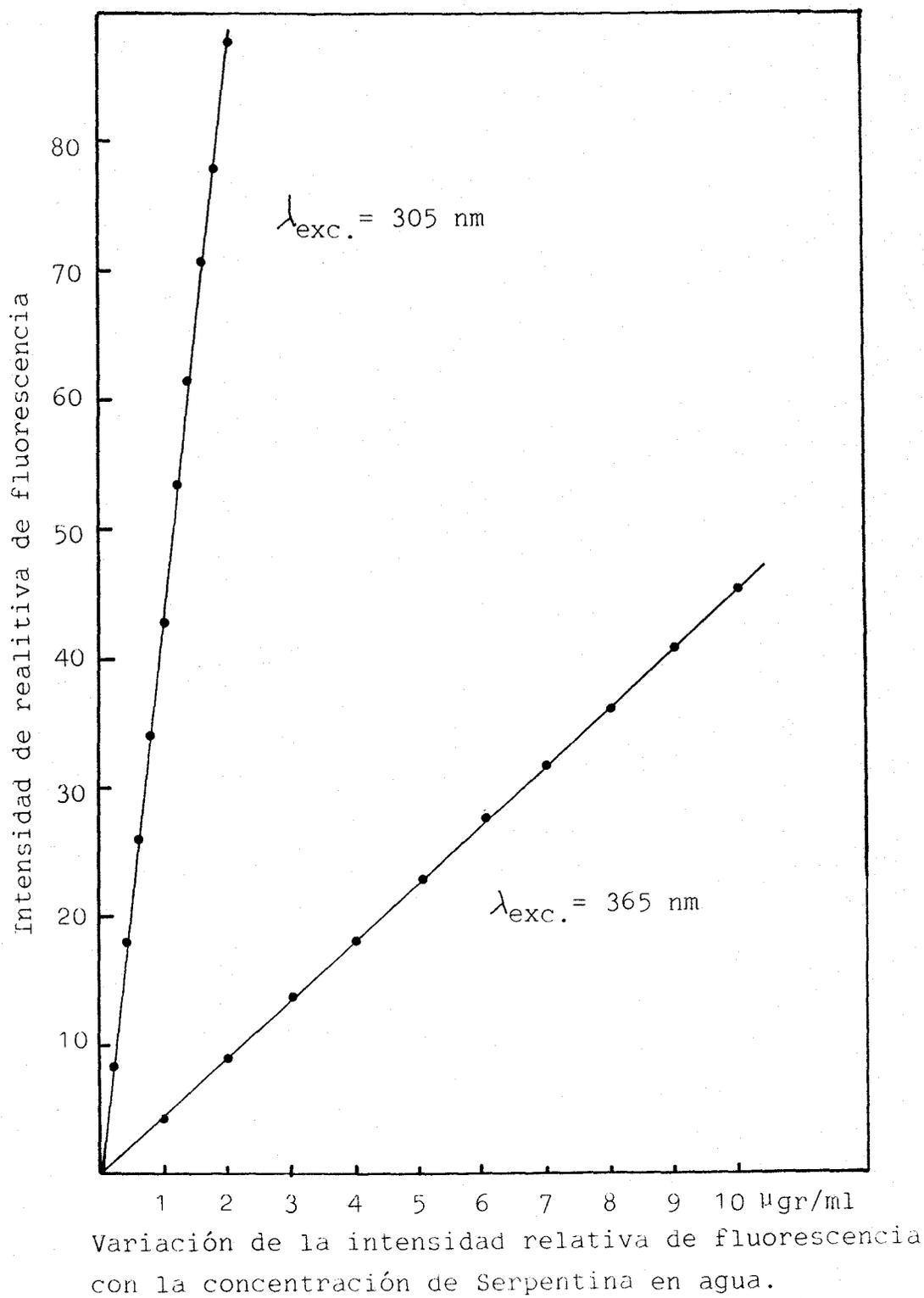
<u>Disolvente</u>	<u><math>\lambda_{exc.}(nm)</math></u>	<u><math>\lambda_{emis.}(nm)</math></u>
Agua	248	445
	306	
	365	
Metanol	252	445
	308	
	368	
Etanol	252	445
	308	
	368	
Acetonitrilo	250	442
	306	
	365	
Ac. acético 5N	260	444
	308	
	268	

TABLA II

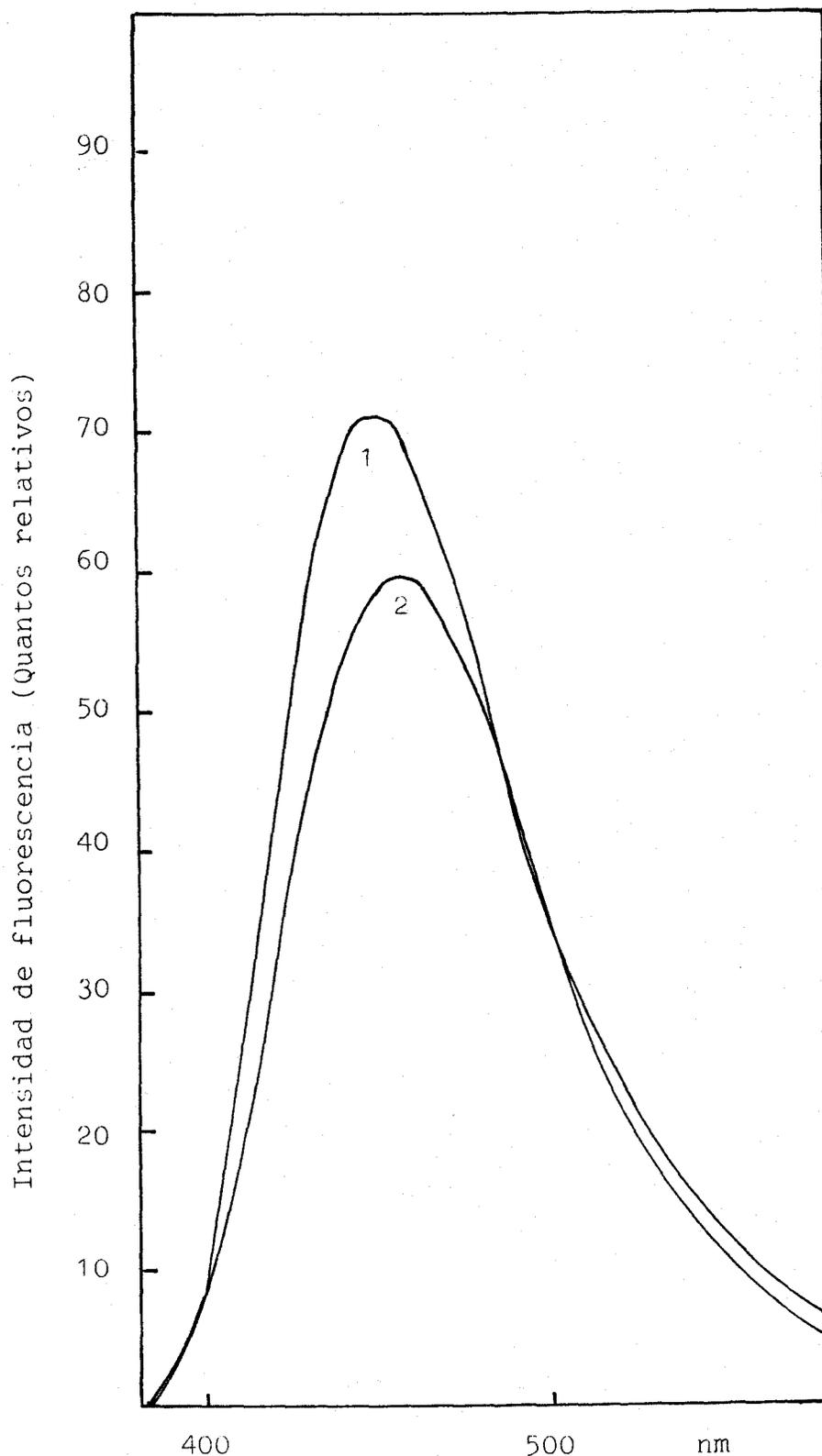
Valores de emisión de la serpentina a una  $\lambda_{em.}$  de 445 nm frente a la concentración en agua. Límite de detección.

<u>C( <math>\mu\text{g ml}^{-1}</math> )</u>	<u>I( <math>\lambda_{exc.} = 305 \text{ nm}</math> )</u>	<u>I( <math>\lambda_{exc.} = 365 \text{ nm}</math> )</u>
0,2	8,6	
0,4	18,1	
0,6	25,9	
0,8	34,1	
1,0	44,8	4,56
1,2	53,5	
1,4	61,8	
1,6	70,8	
1,8	78,0	
2	87,0	9,1
3		14,0
4		18,4
5		23,1
6		27,8
7		32,3
8		36,2
9		41,0
10		45,2
<u>Sensibilidad</u>	437,2	45,2
(intensidad. $\mu\text{g}^{-1} \cdot \text{ml}$ )		
<u>Límite de detección</u>	0,45	0,05
( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )		

- FIGURA 6 -



- FIGURA 7 -



Espectros de fluorescencia corregidos de  
1.- Serpentina, 2.- Bisulfato de Quinina  
en  $H_2SO_4$  0.1N , excitación 350nm y 25°C

TABLA III

Rendimientos cuánticos de la serpentina en etanol, ácido acético 5N y ácido sulfúrico 0,05M a 25°C.

<u>Disolvente</u>	<u><math>\lambda_{exc.}</math></u>	<u>Q</u>
Etanol	350	0,63 <sup>±</sup> 0,02
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 0,05M	350	0,65 <sup>±</sup> 0,02
Ac. acético 5N	350	0,66 <sup>±</sup> 0,02
Bisulfato quin.	350	0,546

TABLA IV

Sensibilidad absoluta de fluorescencia de la serpentina en etanol.

$D_{\text{máx.}}$  = Absorbancia por cm. para una concentración de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  al máximo de absorbancia,  $365 \text{ nm} = 0,012$ .

$Q D_{\text{máx.}}$  = Sensibilidad de fluorescencia para la banda completa de emisión =  $7,56 \cdot 10^{-3}$

$H$  = Anchura espectral de banda del espectro de fluorescencia ( $\mu\text{m}^{-1}$ ) =  $0,41$

$\frac{Q \cdot D_{\text{máx.}}}{H}$  = Sensibilidad de fluorescencia para el pico  
=  $0,0184 \mu\text{m}$ .

#### 4.3.-EQUILIBRIO ACIDO-BASE

4.3.1.-Influencia del pH en las espectroscopias de absorción y de fluorescencia.

4.3.2.-Determinación de los  $pK_a$  del estado fundamental y cálculo de los  $pK_a$  del estado excitado.

4.3.1.-Influencia del pH en las espectroscopias de absorción y de fluorescencia.

Se han registrado los espectros de absorción UV-visible de disoluciones acuosas de serpentina en un intervalo de pH comprendido entre 1 y 13. Asimismo se estudió la absorción en disoluciones de ácido sulfúrico concentrado. La concentración del ácido sulfúrico se varió entre concentración de 4 M hasta 18 M.

Previamente a este estudio espectroscópico, se hicieron pruebas de la estabilidad de la serpentina. En el intervalo de pH antes indicado, las disoluciones fueron suficientemente estables durante el transcurso de las experiencias, en cambio, para las disoluciones de ácido sulfúrico concentrado, la estabilidad fué menor, se observó un ligero aumento de las absorancias con el tiempo, particularmente para las concentraciones desde 4 M hasta 14 M.

La concentración de la serpentina para la obtención de los espectros de absorción fué de  $5 \cdot 10^{-5}$  M en todos los casos, esta concentración resultó ser suficiente para alcanzar una buena resolución de los máximos de absorción.

Los pH se fijaron mediante disoluciones tampones, especialmente preparadas para estudios espectroscópicos(38). La composición de los mismos fué la siguiente:

<u>pH</u>	
1,8	12,5 ml de KCl 0,2 M + 10,5 ml de HCl 0,2 M enrasando hasta 50 ml.
4,6	10,3 ml de $\text{CH}_3\text{COOH}$ 0,1 M + 5 ml de KOH 0,1 M enrasando hasta 50 ml.
7,0	7 ml de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,02 M + 12 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,01 M enrasando hasta 50 ml.
8,5	0,3 ml de $\text{H}_3\text{BO}_3$ 0,1 M + 10 ml de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,025 M enrasando hasta 50 ml.

- 9,2      17,3 ml de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,1 M + 10 ml de  
 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,025 M enrasando hasta 50 ml.
- 10,0      11 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,01 M + 8,7 ml de  
 $\text{NaHCO}_3$  0,02 M enrasando hasta 50 ml.
- 10,6      16 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,01 M + 2 ml de  
 $\text{NaHCO}_3$  enrasando hasta 50 ml.
- 12,7      0,5611 g de KOH + 0,07456 g de ClK  
+ 10 ml de serpentina enrasando hasta  
100 ml.

En la figura ( 8 ) se presentan como ejemplos los espectros de absorción a unos pH seleccionados entre el intervalo antes citado. Asimismo, se indica en la citada figura el espectro correspondiente a la disolución en ácido sulfúrico 18 M. Las longitudes de los máximos de absorción se han recogido en la tabla( V ).

Asimismo se ha efectuado un estudio espectrofluorimétrico en el mismo intervalo de pH antes citado y para las diferentes disoluciones de ácido sulfúrico concentrado. En todos los casos se corrigieron los espectros.

La concentración de serpentina fué de  $1 \cdot 10^{-8}$  M.

Las rendijas de excitación y de emisión fueron de 2 y de 6 nm respectivamente.

En la figura( 9 ) se presentan los espectros corregidos de fluorescencia para los pH 1,8, 7 y 12,7 y en ácido sulfúrico 18 M.

Las longitudes de onda de los máximos de emisión se indican en la tabla( V ).

Asimismo, se han determinado las intensidades relativas de fluorescencia correspondientes al máximo de emisión de 445 nm para las longitudes de onda de excitación de 305 y 365 nm, frente al pH.

En la figura( 10 ) y en la tabla ( VI ) se presentan los resultados.

La concentración de alcaloide fué en todos los casos la ya citada  $1 \cdot 10^{-8}$  M. Las rendijas de excitación y de emisión fueron también las ya indicadas 2 y 6 nm respectivamente.

#### 4.3.2.-Determinación de los $pK_a$ del estado fundamental y cálculo de los $pK_a$ del singlete excitado.

##### 4.3.2.1.- $pK$ del estado fundamental.

Los espectros de absorción en el UV y visible y de fluorescencia indican la existencia de tres especies en equilibrio en las disoluciones de serpentina, y por consiguiente, de dos constantes de equilibrio.

Los  $pK_a$  correspondientes a los equilibrios citados se evaluaron por el método de Maroni y Calmon (39).

Para el  $pK_a$  de la especie más ácida se eligieron, a la vista de los espectros de absorción, fi-

gura( 8 ), las longitudes de onda 405 nm y 322 nm para la forma básica y 365 y 305 nm para la correspondiente forma ácida. La concentración de serpentina fué siempre  $5 \cdot 10^{-5}$  M. El intervalo de pH utilizado fué de 10-12.

La figura( 11 ) indica la variación de las absorbancias en el intervalo de pH citado a fuerza iónica 0,02M. En la figura( 12 ) se presentan los valores de  $1/D-D_B$  frente a la concentración protónica para las longitudes de onda indicadas.

D y  $D_B$  son respectivamente las absorbancias de las formas ácida y de mezclas de las especies ácida y básica. Las rectas de la figura se cortan en el punto  $(-K_a, 0)$ , a partir del cual se determina el  $pK_a$ . En la tabla( VII) se presentan los valores de las absorbancias a las longitudes de onda citadas para las diferentes concentraciones protónicas utilizadas en el cálculo. Los valores de los  $pK_a$  encontrados figuran también en dicha tabla. El valor promedio fué de  $pK_a = 11,46 \pm 0,04$ .

El  $pK_a$  de la especie más ácida se calculó de manera similar. La longitud de onda elegida fué de 257 nm. La concentración de serpentina fué la misma que anteriormente.

En la figura( 13 ) se presentan los valores de  $1/D-D_B$  frente a la inversa a la función de  $h_I$  ( $h_I = \text{antilog.}(-H_I)$ ), y  $H_I$  es una función de acidez para

la protonación de indoles(53).  $D_B$  y  $D$  son respectivamente las absorbancias de la forma básica y de mezclas de las especies ácida y básica. La recta corta al eje de las abscisas en el punto  $(-1/K_a, 0)$ , a partir de esta intersección se obtiene el  $pK_a$ , el valor resulta ser de  $-11 \pm 1$ .

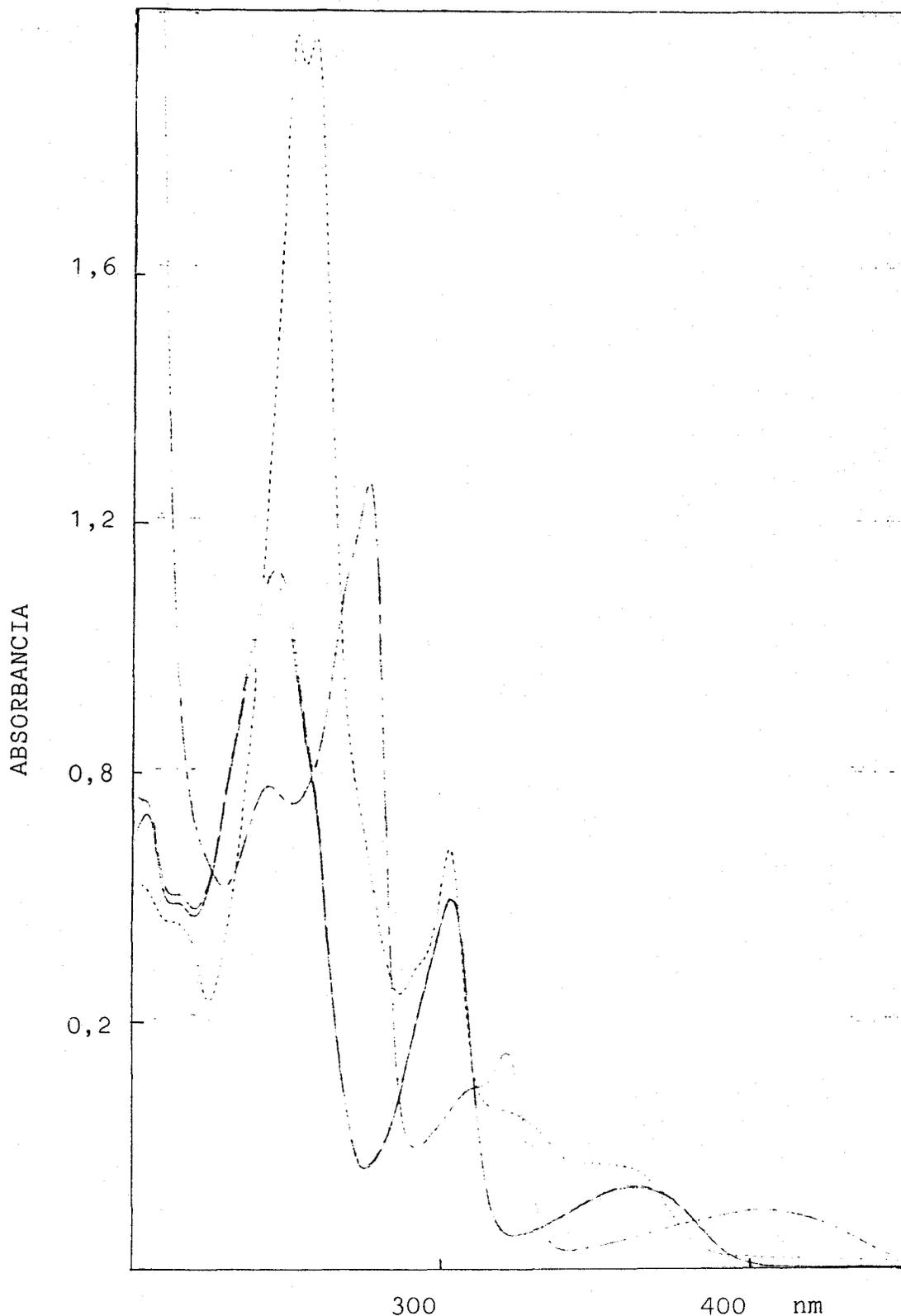
#### 4.3.2.2.-Cálculo de los $pK_a$ del primer singlete excitado( $S_1$ )

A partir de la ecuación |11| del apartado 3.2 de esta memoria, ecuación de Förster-Weller:

$$pK_a^* - pK_a = 2,10 \cdot 10^{-2} (\bar{\nu}_{Ba} - \bar{\nu}_{Ac})$$

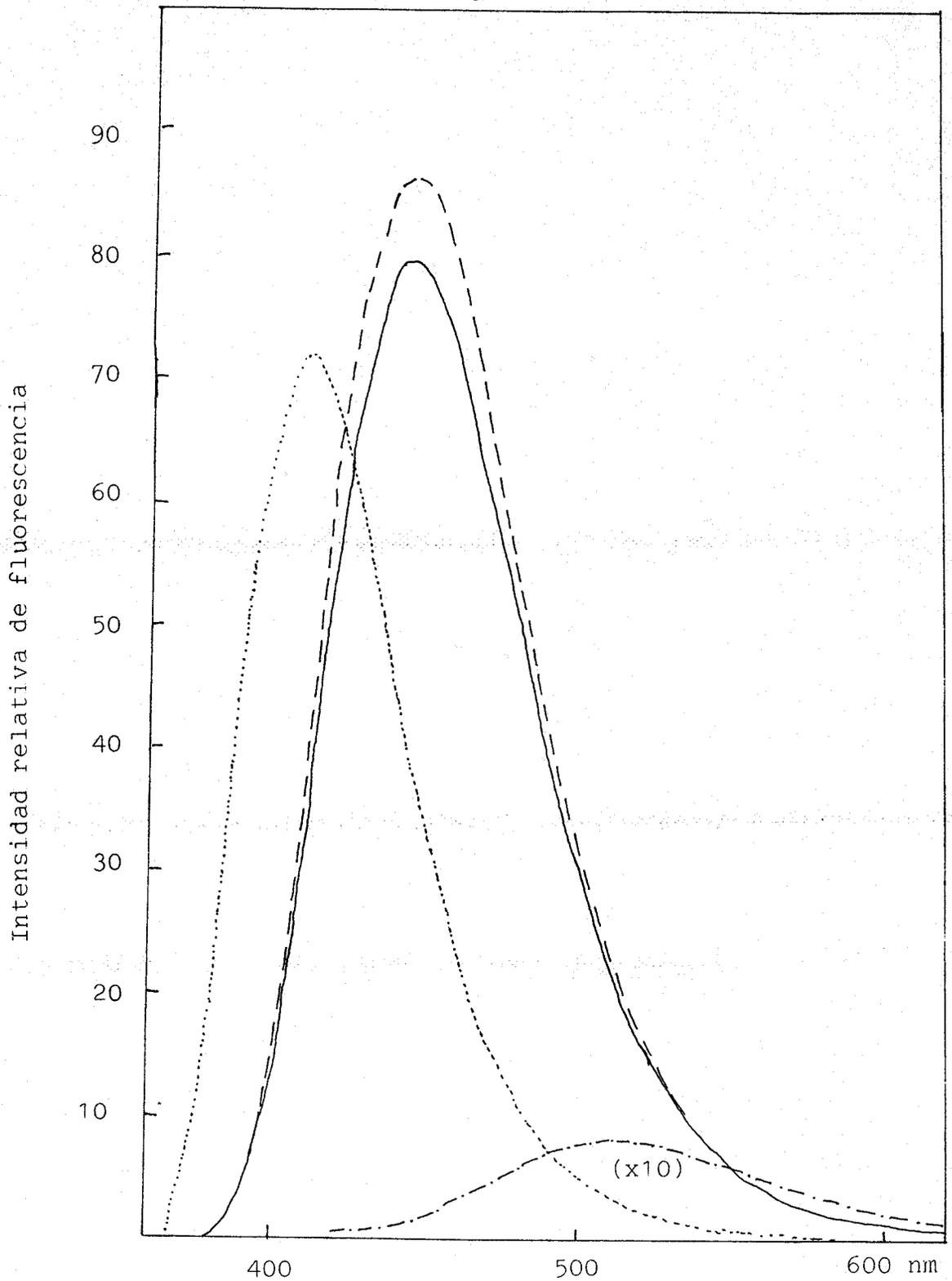
donde  $\bar{\nu}_{Ac}$  y  $\bar{\nu}_{Ba}$  son los promedios de los máximos de absorción y de fluorescencia en  $cm^{-1}$  de las especies ácida y básica respectivamente, se calcularon a  $25^\circ C$  los  $pK_a(S_1)$ . Los resultados aparecen en la tabla (VIII), donde figuran también los  $pK$  del estado fundamental, las frecuencias de absorción y de fluorescencia y las frecuencias correspondientes a la transición 0-0, expresados en  $cm^{-1}$ .

- FIGURA 8 -



- (\_\_\_) Espectro de absorción serpentina a pH = 7
- (---) Espectro absorción serpentina a pH = 1,8
- (...) Espectro absorción serpentina en SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 18M
- (. . .) Espectro absorción serpentina a pH = 12,7

- FIGURA 9 -



Espectros corregidos de fluorescencia de la serpentina a pH = 7 (—), a pH = 1,8 (-----), ácido sulfúrico 18 M (.....), y a pH = 12,7 (.-.-.-.), este último multiplicado por 10.

TABLA V

Valores de las longitudes de onda de los máximos de excitación y de emisión de la serpentina a varios valores de pH y  $\text{SO}_4\text{H}_2$  18 M

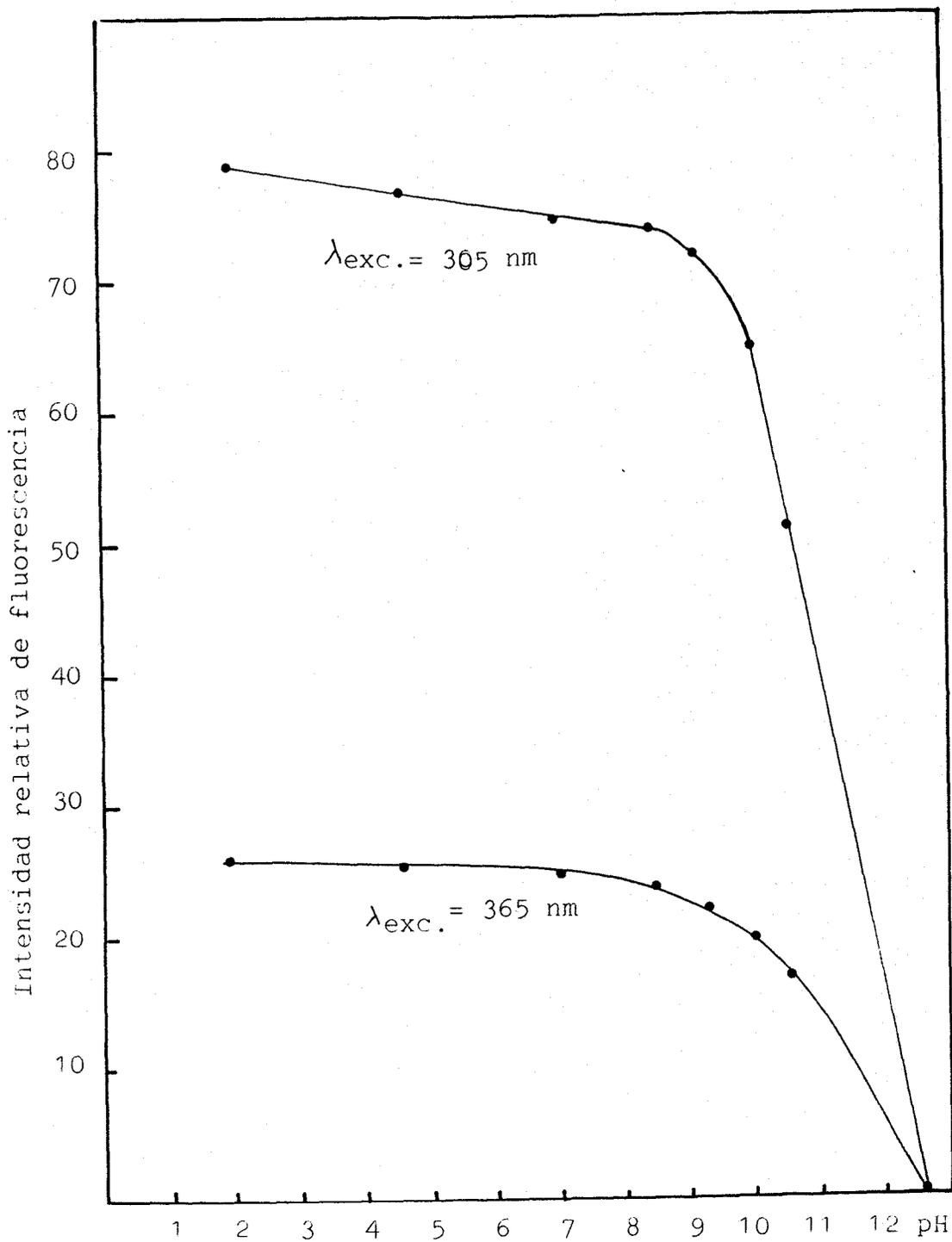
<u>pH</u>	<u><math>\lambda</math> abs. máx</u>	<u><math>\lambda</math> fluor. máx.</u>
1.8	365	445
	305	
	248	
7,0	365	445
	306	
	248	
12,7	405	520
	322	
	276	
	244	
$\text{H}_2\text{SO}_4$ 18 M	363(sh)	415
	303	
	259	
	253	

TABLA VI

Valores de intensidad relativa de fluorescencia de la serpentina frente a la variación del pH, para la longitud de onda de emisión de 445 nm

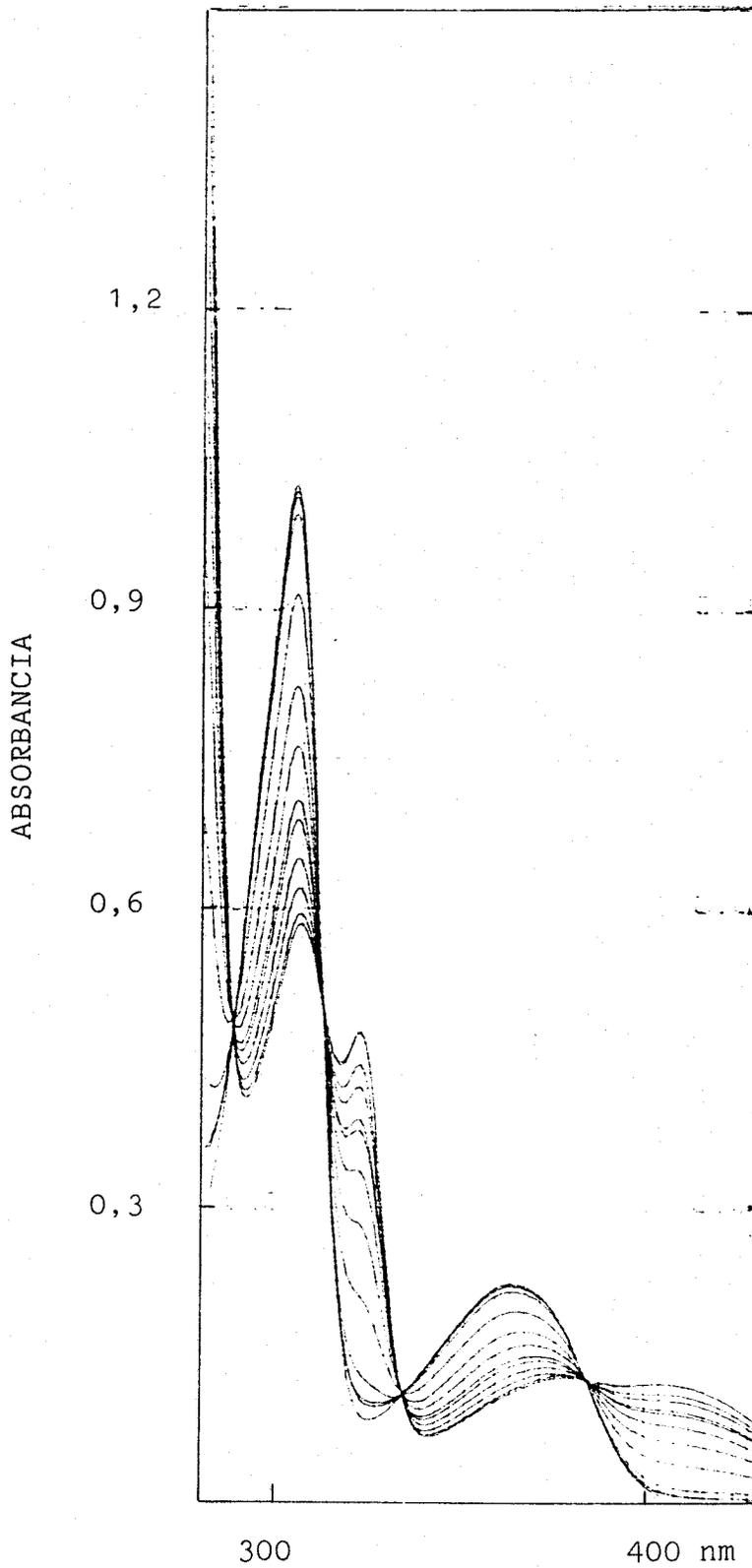
<u>pH</u>	<u><math>I_r(\lambda_{exc.} = 305 \text{ nm})</math></u>	<u><math>I_r(\lambda_{exc} = 365 \text{ nm})</math></u>
1,8	78,8	26,2
4,6	76,6	25,0
7,0	74,3	24,2
8,5	73,9	24,3
9,2	72,0	23,4
10,0	64,7	20,9
10,6	50,8	16,1
12,7	0,3	0,09

- FIGURA 10 -



Variación de la intensidad relativa de fluorescencia con el pH.  $\lambda_{em.} = 445 \text{ nm}$

- FIGURA 11 -



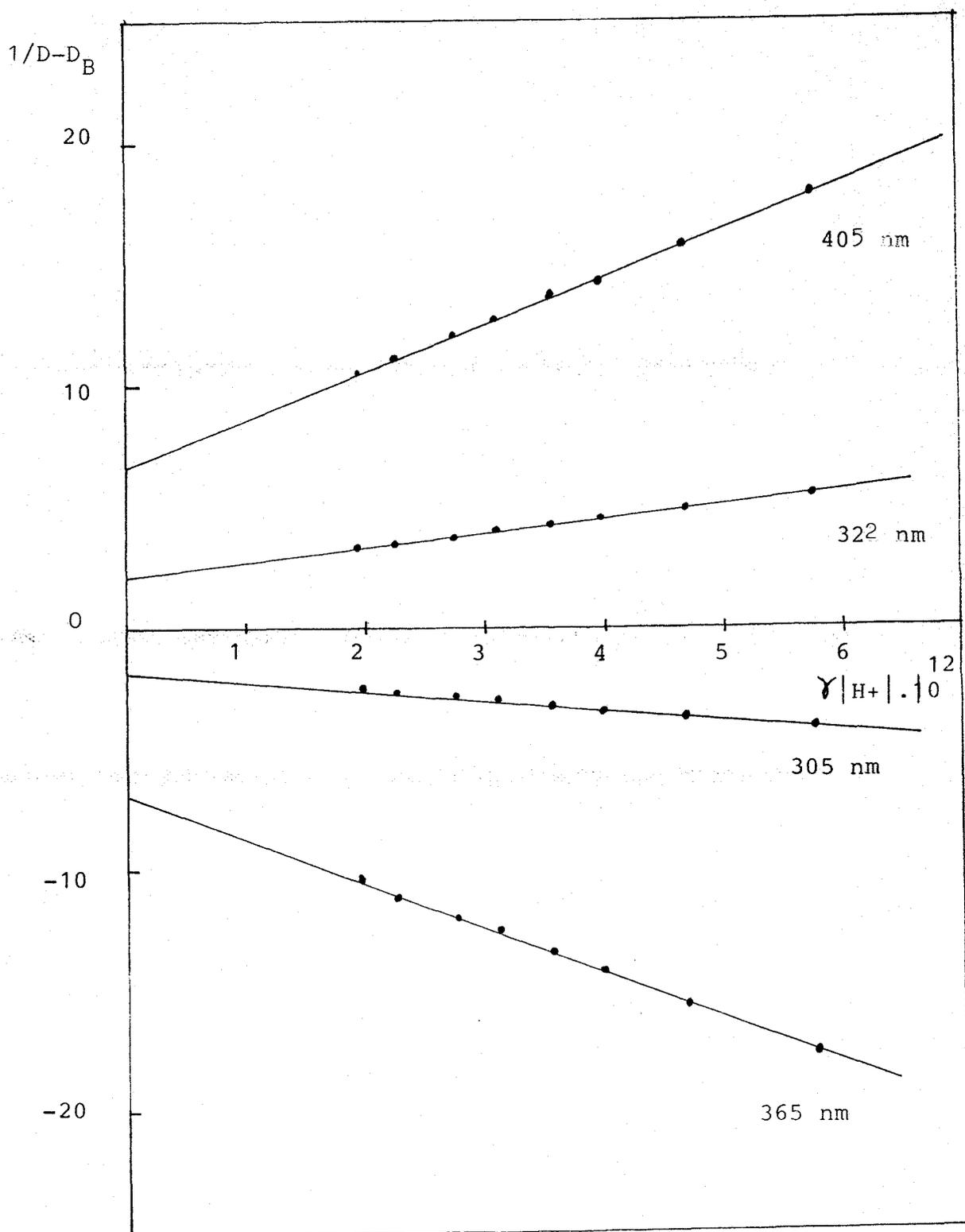
Espectros de absorción de la serpentina a pH comprendidos entre 10-12 a fuerza iónica de 0,02 M

TABLA VII

Variaciones de absorbancia, frente a pH, cálculo de los  $pK_a$ .

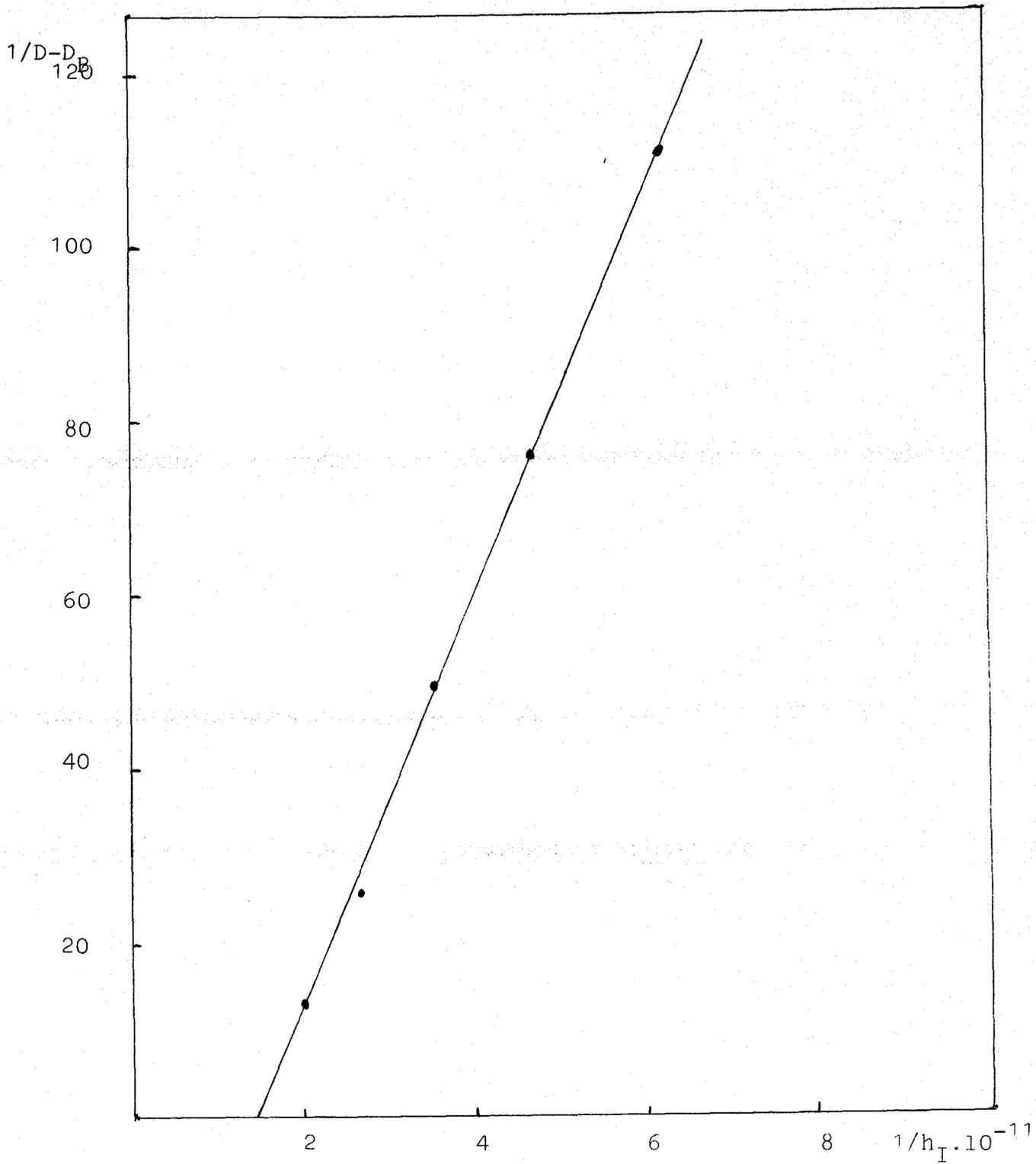
pH	$A_{405}$	$A_{322}$	$A_{365}$	$A_{305}$
2,25	0,007	0,091	0,218	0,996
4,67	0,007	0,091	0,219	0,996
11,24	0,062	0,275	0,160	0,757
11,33	0,069	0,295	0,156	0,735
11,40	0,076	0,315	0,150	0,712
11,45	0,079	0,328	0,146	0,693
11,51	0,085	0,345	0,140	0,667
11,56	0,089	0,360	0,137	0,657
11,65	0,096	0,381	0,131	0,628
11,71	0,102	0,400	0,124	0,603
11,74	0,107	0,418	0,121	0,587
$pK_{a1}$	11,5	11,45	11,42	11,43

- FIGURA 12 -



Determinación de  $pK_{a1}$  por el método de las rectas concurrentes.

- FIGURA 13 -



Determinación de  $pK_{a2}$  por el método de las rectas concurrentes.

TABLA VIII

$pK_{as}$  del estado fundamental y del singlete excitado de la serpentina a 25°C.

<u>Especie</u>	<u><math>pK_a(S_0)</math></u>	<u>abs.(<math>cm^{-1}</math>)</u>	<u>fluor.(<math>cm^{-1}</math>)</u>	<u>0-0 transición</u>	<u><math>pK_a^*(S_1)</math></u>
A	$-11 \pm 1$	27548	24096	25822	-12,9
B	$11,51 \pm 0,05$	27393	22472	24935	5,3
C	_____	24691	19231	21961	_____

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSION

- 5.1.-Fluorescencia nativa o directa.
- 5.2.-Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia. Límite de detección.
- 5.3.-Rendimientos cuánticos. Sensibilidad absoluta de fluorescencia.
- 5.4.-Influencia del pH en los espectros de absorción y de fluorescencia. Equilibrio ácido-base.

### 5.1.-Fluorescencia nativa o directa

Como ya se ha indicado en el apartado 3.1, la fluorescencia nativa o directa ha sido estudiada por algunos autores(12)(13)(14)(15), pero todos ellos se limitan a señalar los máximos de excitación o de emisión o todo lo más, a registrar los espectros no corregidos en algunos disolventes como metanol, etanol y disoluciones acuosas. Cuando se estudia la

fluorescencia de disoluciones es de gran interés corregir los espectros. Los espectros no corregidos tanto de excitación como de emisión son frecuentemente, en algunos intervalos de longitudes de onda, regiones fuertemente distorsionadas de los verdaderos espectros y pueden diferir considerablemente de los obtenidos en otros laboratorios con un instrumento diferente.

En las figuras (1,2,3,4,5) se presentan los espectros corregidos y no corregidos de excitación y de fluorescencia de la serpentina en los disolventes utilizados. En todos los casos los espectros corregidos de excitación coinciden bien con los de absorción. Los espectros de emisión presentan en todos los casos un notable desplazamiento de Stokes y una pérdida en la estructura de banda, esto se debe a que todos los disolventes empleados son muy polares. Debido a la insolubilidad de la serpentina en disolventes no polares, como por ejemplo el ciclohexano, no se pudo hacer el espectro en disolventes de este tipo para una comparación. Este efecto se puede explicar(40)(41) debido a interacciones de la molécula excitada con las moléculas de disolvente. Es así mismo muy destacable que la serpentina emite a una longitud de onda notablemente superior a otros alcaloides de la Rauwolfia como reserpina, yohimbina, ajmalicina etc..(42).

Sin duda, este efecto se debe al carácter

aromático del anillo C de la molécula de la serpiente (vean esquema del apartado 1), mientras que el resto de los citados alcaloides de la Rauwolfia carecen de aromaticidad en el anillo C.

5.2.-Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia. Límite de detección.

Se ha podido observar en la parte experimental que para concentraciones bajas de alcaloide (aproximadamente  $2 \mu\text{gml}^{-1}$ ), existe una proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración. Esto se puede explicar, a partir de la ley de Lamber-Beer; para radiaciones monocromáticas se cumple:

$$|12| \quad I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon bc}$$

donde  $I_0$  es la intensidad incidente,  $I_t$  es la intensidad transmitida,  $\epsilon$  es la absorptividad molar,  $b$  el espesor en cms. de la célula y  $c$  la concentración molar.

Es evidente que la intensidad absorbida,  $I_a$ , será  $I_a = I_0 - I_t = I_0 (1 - 10^{-\epsilon bc})$ . Además, por definición, el rendimiento cuántico  $Q$  vale:

$$|13| \quad Q = I / I_a$$

donde  $I$  es la intensidad de fluorescencia, por lo que:

$$|14| \quad I = I_a Q = Q I_0 (1 - 10^{-\epsilon bc})$$

desarrollando en serie el segundo sumando del término entre paréntesis y para valores bajos de  $\epsilon bc = A$ , aproximadamente igual a 0,05, queda para la expresión anterior:

$$|15| \quad I = 2,3 Q I_0 \epsilon b c = \text{cte.}$$

Que nos dice que para concentraciones bajas la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración. La figura ( 6 ) lo confirma.

Esta proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración es la base para las determinaciones analíticas mediante fluorimetría. Otro parámetro esencial para tales determinaciones es el límite de detección, que como se sabe, se deriva de la medida más pequeña,  $I_1$ , intensidad de fluorescencia en este caso, que se puede detectar con certeza razonable. El valor de  $I_1$  es(43)

$$|16| \quad I_1 = I_{\overline{bl}} + k S_{\overline{bl}}$$

donde  $I_{\overline{bl}}$  es la media de las medidas del blanco,  $S_{\overline{bl}}$  es la desviación standard de las medidas del blanco y  $k$  es un factor numérico elegido de acuerdo con el nivel de confianza deseado. Entonces el límite de detección,  $C_1$ ,

expresado en términos de concentración vale(43):

$$|17| \quad C_1 = \frac{I_1 - I_{bl}}{S}$$

donde S es la sensibilidad. Por otra parte es sabido que la sensibilidad S vale:

$$|18| \quad S = \frac{dI}{dC}$$

y para concentraciones pequeñas, figura( 6 ), este valor es constante y equivale a la pendiente de la curva de calibración.

Para una distribución gaussiana un valor de 3 para k implica un nivel de confianza de 99,6% (43); sin embargo a concentraciones bajas no son probables tales distribuciones gaussianas y en la práctica el valor 3, que se suele recomendar, corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente el 90%.

Los valores obtenidos para el límite de detección se pueden observar en la tabla( II ), son notablemente pequeños e indican la clara posibilidad de la determinación de este alcaloide por fluorimetría directa.

### 5.3.-Rendimientos cuánticos. Sensibilidad absoluta de fluorescencia.

El rendimiento cuántico absoluto de fluorescencia de un compuesto, definido como la razón entre el número de fotones emitidos y el absorbido, es la magnitud que indica con más claridad la capacidad de fluorescencia de una sustancia determinada. Tiene, por ello, una enorme importancia teórica y práctica para estudio de procesos no radiativos en moléculas, para la correlación entre los tiempos de vida media observados y teóricos, para la evaluación de la pureza de una sustancia, para el cálculo de la sensibilidad absoluta de fluorescencia etc..

Existen diferentes métodos para la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia, una excelente revisión de los mismos la hacen Demos y Crosby(44). Uno de los métodos más empleados(44)(45)(46), consiste en la comparación del espectro corregido de emisión con el correspondiente al de una sustancia de referencia de rendimiento cuántico conocido, usando disoluciones ópticamente diluidas. En efecto, el rendimiento cuántico se puede determinar por la expresión(44) (45) siguiente:

$$|19| \quad Q_x = Q_r \frac{A_r(\lambda_r)}{A_x(\lambda_x)} \cdot \frac{I(\lambda_r)}{I(\lambda_x)} \cdot \frac{D_x}{D_r} \cdot \frac{n_x^2}{n_r^2}$$

donde los subíndices  $r$  y  $x$  se refieren a la sustancia de referencia y a la sustancia problema respectivamente.  $Q$  es el rendimiento cuántico.  $A(\lambda)$  es la absorbancia por centímetro de la disolución a la longitud de onda de excitación,  $I(\lambda)$  es la intensidad de la radiación de excitación a la longitud de onda.  $D$  es el área bajo el espectro corregido de emisión y  $n$  es el valor medio del índice de refracción de la disolución en la emisión.

Los espectros de fluorescencia corregidos para la sustancia de referencia y para la serpentina se midieron con las mismas anchuras de rendijas y a la misma longitud de onda (350 nm), por esta razón,  $I(\lambda)$  es la misma para ambas disoluciones. Para evitar errores debido a la reabsorción y reemisión, se emplearon disoluciones diluidas y con absorbancias  $A(\lambda)$  comparables del orden de 0,01(44). Las áreas,  $D$ , bajo los espectros se calcularon de la forma indicada en la parte experimental. Los valores de los índices de refracción fueron tomados de las Internacional Critical Tables(47).

El sulfato o el bisulfato de quinina en ácido sulfúrico 0,1 N ó 1,0 N se han descrito como un standard muy adecuado(44) y su rendimiento cuántico es prácticamente constante en la región de 200 a 400 nm(44)(48). Se tomó el valor propuesto por Melhuish(37).

Para evitar la amortiguación ("Quenching") debida al oxígeno disuelto y una posible oxidación inducible fotoquímicamente, se burbujeó nitrógeno a los disolventes.

Para comprobar este método de calculo del rendimiento cuántico, se determinó de modo similar, el rendimiento cuántico del antraceno en etanol, obteniéndose un valor de 0,27, que concuerda muy bien con los valores de la literatura(45).

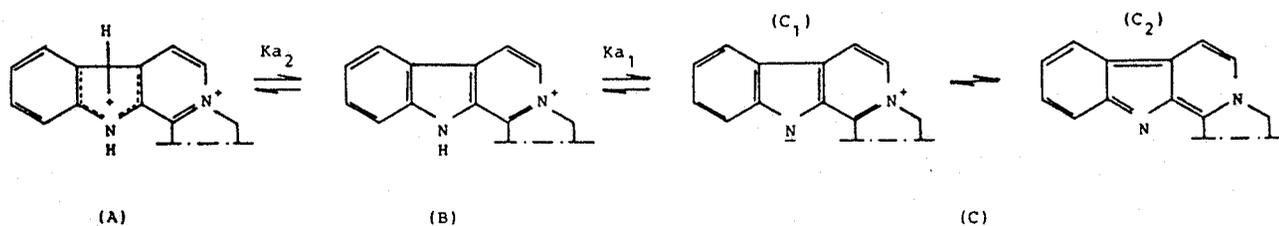
Es destacable que los rendimientos cuánticos de la serpentina en los disolventes utilizados son muy superiores a los correspondientes del resto de los alcaloides de la Rauwolfia investigados en este departamento(42). Sin duda, la razón radica en el hecho apuntado anteriormente de que el anillo C de esta molécula posee un mayor carácter aromático, cosa que no ocurre en los otros alcaloides estudiados.

La sensibilidad absoluta de fluorescencia indicada en la tabla( IV ) se calculó de acuerdo a como fué definida por Parker y Rees(45). El producto  $Q \cdot \epsilon$ , donde Q es el rendimiento cuántico y  $\epsilon$  la absortividad molar, es una medida de la sensibilidad de fluorescencia de una sustancia. La máxima sensibilidad tiene lugar, evidentemente, a la longitud de onda del máximo de absorción. De acuerdo con Parker y Rees (45), una unidad práctica para  $\epsilon$  es la absorbancia por centímetro para una concentración de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Cuando se selecciona una banda estrecha de frecuencias para aislar la fluorescencia, la sensibilidad depende también de la anchura espectral de banda,  $H$ , del espectro de fluorescencia. Los valores obtenidos, tabla ( IV ), son superiores al resto de los alcaloides de la Rauwolfia estudiados(42), por la misma razón indicada anteriormente de que la serpentina es más aromática.

5.4.-Influencia del pH en los espectros de absorción y de fluorescencia. Equilibrios ácido-base.

Los espectros de absorción y de fluorescencia, figuras ( 8 y 9 ) indican claramente que en disolución acuosa la serpentina puede existir como tres especies diferentes.



En el esquema adjunto se indican las tres especies en equilibrio con sus correspondientes constantes  $K_{a1}$  y  $K_{a2}$ . Estas especies serían:

Especie A, catión resultante de la protonación del núcleo indólico, especie B, catión de la sal cuaternaria y especie C la anhidrobase.

Para el catión de la sal cuaternaria( especie B) el máximo de la más larga longitud de onda tiene lugar a 365 nm. Esta especie muestra un máximo de fluorescencia a 445 nm. Este catión está presente para valores de pH menores de 10. En disoluciones más alcalinas, se pone de manifiesto la absorción y emisión de la anhidrobase( especie C), con máximos a 405 nm y 520 nm respectivamente.  $C_1$  y  $C_2$  son formas canónicas de un híbrido de resonancia(49).

Estas estructuras no son formas tautoméricas. La forma  $C_2$  explicaría el desplazamiento de los máximos de absorción y emisión a longitudes de onda más largas( desplazamiento batocrómico). Se observa en la figura( 9 ) que la intensidad de fluorescencia de las disoluciones alcalinas es muy débil, lo cual se debe probablemente a la amortiguación("Quenching") del ión  $OH^-$ , obsérvese que el espectro de emisión de la figura citada está multiplicado por 10.

En disoluciones fuertemente alcalinas aparece un precipitado, por ello, es imposible desplazar el equilibrio  $B \rightleftharpoons C$  lo suficiente hacia la derecha para que toda la serpentina esté prácticamente en forma de anhidrobase. Por esta razón, el coeficiente de extinción molar de la especie C no se puede calcular

directamente mediante la ley de Beer. Para obviar esta dificultad y poder calcular el  $pK_{a1}$  de este equilibrio, se ha empleado el método propuesto por Maroni y Calmon(39), que a su vez se basa en un procedimiento propuesto originalmente por Stearn y Wheland (50). Este método de Maroni se conoce con el nombre de "Método de las rectas concurrentes", que consiste en representar a distintas longitudes de onda  $1/(D-D_B)$  frente a la concentración protónica  $|H^+|$ .

Se obtiene un haz de rectas que cortan al eje de las abscisas en el punto  $(-K_a, 0)$ , y a partir de este corte se determina el correspondiente  $pK_a$ . En la figura ( 12 ) se indican los resultados. En la parte experimental( ~~apartado~~ 4.3.2.1 ) se ha indicado también el significado de  $D$  y  $D_B$ . En la tabla( VII ) de la parte experimental se recopilan los  $pK_a$  calculados a las diferentes longitudes de onda empleadas. Teniendo en cuenta que la fuerza iónica de la disolución fué 0,02 M, el valor del  $pK_{a1}$  termodinámico fué  $11,51 \pm 0,05$  a  $25^\circ C$ . Este valor concuerda bien con el obtenido por Wolfbeis y col.(51) para un derivado N-metil del catión del harmano.

Schwarz y Schlitter(16) dan el valor de 10,49 en 40% de metanol obtenido mediante titulación potenciométrica.

En disoluciones fuertemente ácidas de ácido sulfúrico, tiene lugar una nueva modificación del espectro UV, figura ( 8 ), aparecen dos nuevos máximos a 253 nm y 259 nm, lo cual demuestra la existencia de una nueva especie ( especie A ). El espectro de fluorescencia de esta especie se indica en la figura( 9 ) y presenta un máximo de emisión a 415 nm. Estas modificaciones se pueden explicar considerando que el anillo indólico se protona. Se ha descrito el débil carácter básico del anillo indólico(52)(53), puesto que la serpentina tiene el núcleo indólico en su estructura, la protonación solamente puede ocurrir en medio fuertemente ácido de ácido sulfúrico.

El  $pK_{a2}$  de esta protonación se determinó espectrofotométricamente mediante la medida de los cambios en las absorbancias de la serpentina en ácido sulfúrico concentrado a 257 nm. La figura ( 8 ) indica claramente que esta es la longitud de onda más conveniente debido a que a ella se producen, mediante protonación, cambios más acentuados en la absorbancia.

La serpentina protonada es inestable en disolución de ácido sulfúrico muy concentrada, como se puso en evidencia por los cambios en la absorbancia con el tiempo( estos resultados no se recogen en la memoria). Por ello, las absorbancias se determinaron mediante una extrapolación lineal. Sin embargo, a

altas acideces, del orden de 16 M en ácido sulfúrico, es muy difícil la citada extrapolación. Por esta razón, se ha usado para la citada determinación del  $pK_a$  el método antes mencionado de Maroni y Calmon(39).

Puesto que la protonación tiene lugar sólomente en medio ácido muy fuerte, se debe utilizar la función de acidez de Hammett o una de sus variantes para el cálculo del  $pK_a$ . En este método es interesante resaltar que el modelo de protonación de indoles no es consistente con el uso de la función de acidez de Hammett. Los espectros UV y de RMN(52)(53) demuestran que la protonación ocurre principalemtno en el C-3 del anillo indólico.

Hinman y Lang(53) han establecido una función para la protonación de indoles,  $H_I$ .

De acuerdo con el "Método de las rectas concurrentes" antes citado, se representaron los valores de  $1/(D-D_B)$  frente a  $1/h_I$ , donde  $h_I = \text{antilog}(-H_I)$ .

Los significados de  $D_B$  y  $D$  se han indicado ya en la parte experimental. Esta representación dió una buena relación lineal, figura(13) y la intersección con el eje de las abscisas es  $(-1/K_{a2}, 0)$ .

A partir de esta intersección el valor del  $pK_{a2}$  fué de  $-11 \pm 1$ .

Los desplazamientos de las longitudes de onda de las bandas de absorción y de fluorescencia de las especies ácidas y básicas, debido a la protonación o diso-

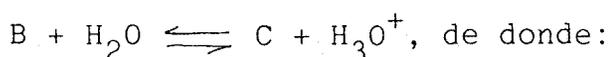
ciación se pueden relacionar a la diferencia entre el pKa del singlete excitado de más baja energía,  $pK_a^*$ , y el pKa del estado fundamental,  $pK_a$ , mediante la fórmula [11], conocida como ecuación de Förster-Weller, deducida y discutida en el apartado 3.2 de esta memoria.

En la tabla ( VIII ) figuran los resultados.

A 25°C  $pK_a^* - pK_{a1} = - 6,2$  para la especie B y  $pK_a^* - pK_{a2} = - 1,9$  para la especie A ( esquema ). Esto demuestra que ambas especies son ácidos más fuertes en el estado  $S_1$ .

Podría pensarse, como se ha discutido ampliamente en el apartado 3.2 de esta memoria, que estos pKa del singlete excitado se podría determinar experimentalmente mediante titulación fluorimétrica. Para la especie B, se han determinado las intensidades relativas de fluorescencia para las longitudes de onda de emisión de 445 nm y con  $\lambda$  de excitación de 305 y 365 nm para diferentes pH. Los resultados se indican en la figura ( 10 ) y en la tabla ( VI ) de la parte experimental. Como las concentraciones de serpentina empleadas fueron siempre muy bajas, del orden de  $10^{-8}$  M, es evidente según se ha discutido en el apartado 5.2., que estas intensidades serán proporcionales a las concentraciones.

Para esta especie B, el equilibrio sería:



$$pK_{a_1} = \log. \frac{I}{I_0 - I} + pH$$

Por lo que  $pK_{a_1} = pH$  cuando  $I = \frac{I_0}{2}$

( punto de inflexión de las curvas de la figura(10) ).

Los valores así obtenidos son aproximadamente de  $11,3 \pm 0,2$ . Estos valores son muy próximos al valor del pKa del estado fundamental para este equilibrio que ya han sido discutidos. Esto indica que estamos en el caso a) indicado en el apartado 3.2.1. La transferencia protónica en el primer singlete excitado ocurre más lentamente que la desactivación por fluorescencia del ácido ( especie B en este caso ) (34), debido a que en esta región de pH las concentraciones de  $H_3O^+$  y  $OH^-$  son bajas y como consecuencia las velocidades de protonación y desprotonación también lo son. ( Etapas -3- y -4- del apartado 3.2.1.). Para la especie A, cuya desprotonación ocurre a acideces extremadamente altas y en consecuencia podría pensarse que se alcanzara fácilmente el equilibrio en el estado excitado, y fuera detectable mediante la titulación fluorimétrica, ocurre que la intensidad de fluorescencia, no son estables en este medio, como ya se ha indicado, y, además las máximas acideces de las disoluciones utilizadas no permiten la obtención de la curva de titulación completa. Por esta razón, no se ha podido determinar experimentalmente el pKa correspondiente al estado excitado.

## 6.-CONCLUSIONES

1.-Se han determinado los espectros corregidos de excitación y de fluorescencia de la serpentina en agua, metanol, etanol, acetonitrilo y ácido acético 5 N.

A partir de estos espectros se han determinado los máximos de excitación y de emisión en los disolventes citados. Se encuentra una buena correlación entre los espectros corregidos de excitación y los espectros de absorción.

2.- Se ha encontrado una dependencia lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de serpentina en agua, hasta  $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  para una longitud de onda de excitación de 305 nm y hasta  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  para  $\lambda_{\text{exc.}} = 365 \text{ nm}$ . A partir de las rectas de calibración, se determinarán los límites de detección, encontrándose los valores de  $0,45 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$  y  $0,05 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$ .

3.- Se han calculado los rendimientos cuánticos de fluorescencia de la serpentina en etanol, ácido sulfúrico 0,05M y ácido acético 5 N. Los valores encontrados fueron de 0,63, 0,65 y 0,66 respectivamente. Asimismo, se ha evaluado la sensibilidad absoluta de fluorescencia de la serpentina en etanol. Los valores encontrados son  $7,56.10^{-3}$  para la sensibilidad de fluorescencia de la banda completa y  $0,0184 \mu\text{m}$  para la sensibilidad de fluorescencia del pico de emisión.

4.- Los espectros de absorción y fluorescencia indican claramente que en disoluciones acuosas de serpentina pueden existir tres especies diferentes ( ver esquema ): catión de la sal cuaternaria (B), anhidro base (C) y la forma protonada del núcleo indólico (A).

5.- Se han determinado los pKa del estado fundamental de los equilibrios ácido-base presente en las disoluciones acuosas de serpentina encontrándose los siguientes valores:

$$\text{pKa}_1 = 11,51 \pm 0,05$$

$$\text{pka}_2 = -11 \pm 1$$

6.- Se han calculado por medio de la ecuación de Förster-Weller los pKa del estado excitado( $S_1$ ) de los equilibrios antes mencionados, obteniéndose los siguientes valores:

$$\text{pK}_{a1}^* = 5,3$$

$$\text{pK}_{a2}^* = -12,9$$

7.- Las especies A y B ( ver esquema ) son ácidos más fuertes en el estado  $S_1$  ( primer singlete excitado ) que en el estado  $S_0$  ( estado fundamental ), como indican los valores de los pKa correspondientes.

7.-BIBLIOGRAFIA

(1).-Woodson, R.E., Younken, H.W., Schlitter, E. y Schneider, J.A., Little, Brow, Boston (1.957).

Ref.: Takern Higuchi y einar Brochmann-Hansen (Ed.), Interscience, Nueva York (1.961).

(2).-M.Beljanski and M.S. Beljanski, Expl. Cell.Biol., 50 ( 1.982) 79.

(3).-M. Beljanski and M. S. Beljanski. IRCS Med. Sci., 12 (1.984) 587.

- (4).-M.Hesse, "Indolalkaloide in Tabellen",  
Shringeriverlag, Berlin, 1.964, 1.968.
- (5).-K. Stuart y R. Woo-Ming, Heterocycles,  
3, 223 (1.975).
- (6).-E. Schlitter, H.U. Huber, F.E. Bader y  
H. Zahn, Helv. Chim. Acfa., 37, 1.912  
(1.954).
- (7).-F.L. Weisenborn, M. Mcore y P.A. Diassi,  
Chem. and Ind., 375 (1.954).
- (8).-A.R. Battersby, Quart. Rev., 15, 259 (1.961).
- (9).-E. Leete, Tetrahedron, 14, 35 (1.961).
- (10).-E. Leete, J. Amer. Chem. Soc. , 82,  
6338 (1.960).
- (11).-E. Leete y G. Ghosal, Tetrahedron Le-  
tters, 1179, (1.962).
- (12).-Undefriend, D.E. Duggan, B.M. Vasta y  
B.B. Brodie, J. Pharmacol.Exptl. Therap.  
120, 26 (1.958).
- (13).-Z. Jung y M. Jungová, Cesk. Farm., 22  
195, (1.973).
- (14).-E. Radejová, V. Parrak y O. Ciranová,  
Farm. Obz., 46, 369 (1.977).
- (15).-T. Gürkan, Mikrochim. Acta (wien), 1,  
173 (1.976).
- (16).-H. Schwarz y E. Slitter, Helv. Chim. Acta  
, 34, 629 (1.951).
- (17).-T. Förste, Naturwiss., 36, 186, (1.949).

- (18).-T. Förster, Z. Elektrochem., 54, 42, (1.950)
- (19).-T. Förster, Z. Elektrochem., 54, 531 (1.950)
- (20).-A. Weller., Z. Physik.Chem., 3, 238(1.955).
- (21).-A. Weller, Z. Elektrochem., 56, 662(1.952).
- (22).-A. Weller, Z. Physik.Chem., 15, 438 (1.958).
- (23).-E. Lippert, Z. Naturforsch. 109, 541(1.955).
- (24).-E. Lippert, Z.Elektrochem., 61,962(1.957).
- (25).-A. Weller, "Progress in reaction Kinetics". 1, 187 (1.961).
- (26).-M. Eigen, W. Kruse, G. Maas y L. de Maeyer, "Progress in reactions Kinetics", 2, 285 (1.964).
- (27).-E. V. Donckt, " Progress in reactions Kinetics", 5, 273, (1.970).
- (28).-T.S. Godfrey, G. Porter y P. Suppan. Disc. Faraday Soc. 39, 194, (1.965).
- (29).-J. Faure, y J. Jousot-Dubien, J. Chim.Physic. 63, 621, (1.966).
- (30).-J.N. Brönsted, Rec. Trav. Chim., 42, 718 (1.923).
- (31).-J.N. Brönsted, Z. Physic.Chem., A 169, 52 (1.934).
- (32).-E.V. Doncht, "Elements de photochimie avancée" (Edi. p. Courtot), pág. 84, Hermann, Paris (1.972).
- (33).-A. Weller, Z. Physik.Chem., 17, 224,(1.958)
- (34).-S.G. Schulman y A.C. Capomacchia, J. Phys.Chem., 79, 1337, (1.975).

- (35).-H.H. Jaffé y H. L. Jones, J. Org.Chem.,  
30, 964, (1.965).
- (36).-Sprince, H. y Rowly, G. R., Science,  
125, 25, (1.957).
- (37).- Melhuish, W. H., J. Physic.Chem., 65,  
229, (1.961).
- (38).-"Buffers for pH and Metal ion control",  
D.D. Penin and Boyd Dempsey, Ed. Chapman  
and Hall, Londres (1.974).
- (39).-Maroni, P. y Calmon, J.P., Bull. Soc.  
Chim. France, 519, (1.964).
- (40).-Berlman, I.B., Academic Press, Nueva York  
(1.971).
- (41).-Eisinger, J. y Navar, G. J. Chem.Physic.  
50, 2069, (1.969).
- (42).-Hidalgo, J. Tejada, P.P., Muñoz, M.A.  
Maestre, A., Balón M. y Sánchez, M. Pharm.  
Acta Helv., en prensa.
- (43).-"International Union of Pure and Applied  
chemistry" , Anal. Chem., 48, 2294,(1.976).
- (44).-Demos, J.N. y Crosby, G.A., J. Phys.Chem.,  
75, 99, (1.971).
- (45).-Parker, C.A. y Ress, W. T., analyst.,  
85, 587, (1.960).
- (46).-Torra Vinyals, C., Afinidad, XXX, 613,  
(1.973).
- (47).-"International Critical Tables", Magraw  
Hill Book Company Inc., Nueva York, Vol.  
VII, (1.926).

- (48).-Gill, J.E., Photochem. Photobiol.,  
9, 313, (1.969).
- (49).-Spenser I.D., J. Chem. Soc., 3659,  
(1.956).
- (50).-Stearns, R.S. y Wheland G.W., J. Am.  
Chem. soc., 69, 2025, (1.947).
- (51).-Wolfbeis O.S., Furlinger, E. y Wintero-  
teiger, R., Monatsh. Chem., 113, 509, (1.982).
- (52).-Himman R.L. y Whipple E.B., J. am. Chem.  
Soc. 84, 2534, (1.962).
- (53).-Himman R.L. y Lang L., J. Am. Chem.  
Soc., 86, 3796, (1.964).

8.-APENDICE

### 8.1.-Apéndice 1

Programa para el cálculo de las áreas  
realizado por los Dres. D. Emilio Roldán Gonzá-  
lea y D. Domingo González Arjona.

FLUORINT

AL

```

2REM REGISTRO DE ESPECTROS DE FLUORESCENCIA E INTEGRACION
3P.#12;B=#B800;?#B800=#50;H=#B809;D=#B800
5IN."INICIO DE BARRIDO (NM) "L;P.
6IN."AMPL. BARRIDO (NM) "N;DIM MM(N),KC(1);FDIM%MM(N)
7?#80=N
10DIMVV9;P.#21
15F.I=0TO1;P=#2800
20C
21LDY00
22:VV0 LD%00
23:VV1 LD%0C3;STA#
24CP%00;BEQVV4
25:VV2 LD%0#20
26:VV3 BITD;BEQ VV3
27IN%;CP%020;BNEVV1
28INY;CPY#80;BNEVV0
29RTS
30:VV4LDAB;AND%#70;CMP%#60;BNE VV4
31LDAB;AND%#0F;STA#3900,Y
40:VV5 LDAB;AND%#70;CMP%#50;BNE VV5
41LDAB;AND%#0F;STA#3A00,Y
50:VV6 LDAB;AND%#70;CMP%#30;BNE VV6
51LDAB;AND%#0F;STA#3B00,Y
60JMPVV2;]
61N.
70P.#6
75LINK#2800
80P.#7
90F.I=0TON;MM(I)=I?#3900*100+I?#3B00*10+I?#3A00
95%MM(I)=MM(I)/6;N.
98CLEAR4;F.I=1TON
100PLOT13,I,%MM(I);N.
105F.I=0TON S.25;PLOT13,I,0;PLOT5,I,191;N. LINK#FFE3;P.#12
115P."INICIO DE INTEGRACION (NM)";IN.A;C=A-L
120P." FINAL DE INTEGRACION (NM)";IN. B;D=B-L S=0
130F.I=C TO D-1;S=S+(MM(I)+MM(I+1))/2;N.;P.#12
140P."";P."AREA = ";S
150LINK#FFE3
160P.#12
170FOR I=C TO D;J=I+L;P.J,MM(I);LINK#FFE3;N. LINK#FFE3
180P.#12;P."DESEA VOLVER A INTEGRAR(S/N) "
185IN.#K;IFK?0=CH"3";G.98
190END

```