

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
CATEDRA DE FISICOQUIMICA APLICADA

ESTUDIO ESPECTROFLUORIMETRICO DE LA RESERPINA.
CINETICA DE SU OXIDACION POR EL PEROXIDO DE
HIDROGENO.

Tesina de Licenciatura
presentada por:

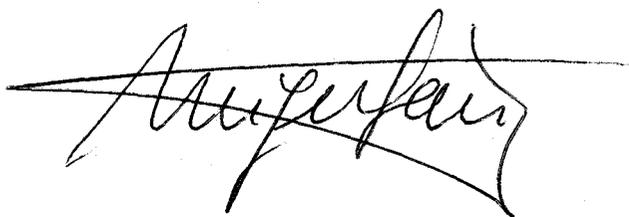
Maria Teresa Diaz Carmona

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 legisla---ción vigente.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel Sánchez González', written in a cursive style. The signature is enclosed within a simple, hand-drawn rectangular border.

Fdo. Miguel Sánchez González

Como Director de esta Tesina
declaro que ha sido leida y
revisada por mí en Junio de
1.984.



Fdo. Miguel Sánchez González

Como Co-director de esta Tesina
declaro que ha sido leida y re-
visada por mí en Junio de 1.984.



Fdo. José Hidalgo Toledo

Trabajo presentado como Tesina
para aspirar al grado de Licenci
atura en Farmacia.



Fdo. Ma Teresa Díaz Carmona

Sevilla, Junio 1.984.

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 por su colaboración y continua ayuda.

Asimismo, deseo hacer patente mi gratitud a los Drs. D. Emilio Roldán González y D. Domingo González Arjona por la elaboración de los programas de cálculo utilizados.

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

INDICE

1.- INTRODUCCION.....	1
2.- OBJETIVO.....	5
3.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	8
4.- PARTE EXPERIMENTAL.....	14
4.1.- Reactivos y aparatos.....	14
4.1.1.- Reactivos.....	15
4.1.2.- Aparatos.....	16
4.2.- Espectroscopía U.V.	18
4.3.- Fluorescencia.....	33
4.3.1.- Fluorescencia nativa o directa.....	34
4.3.2.- Efecto de la concentración en la in- tensidad de fluorescencia. Límite de detección.....	41
4.3.3.- Rendimientos cuánticos. Sensibili- dad absoluta de fluorescencia.....	41
4.4.- Cinética de la oxidación de la reserpina por el peróxido de hidrógeno.....	50
4.4.1.- Oxidantes ensayados.....	51
4.4.2.- Amortiguación de la fluorescencia de la reserpina por el peróxido de hi- drógeno.....	52
4.4.3.- Cinética de la oxidación.....	54
4.4.4.- Determinación de las constantes de velocidad.....	55
4.4.5.- Influencia de la temperatura.....	57
4.4.6.- Influencia de la concentración de reserpina.....	58

5.- DISCUSION.....	84
5.1.- Espectros U.V. y de fluorescencia.....	85
5.2.- Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia. Límite de detección.....	87
5.3.- Rendimientos cuánticos. Sensibilidad absoluta de fluorescencia.....	90
5.4.- Amortiguación de la fluorescencia por el peróxido de hidrógeno.....	92
5.5.- Cinética de la oxidación de la reserpina por el peróxido de hidrógeno.....	93
5.6.- Influencia de la temperatura.....	98
5.7.- Influencia de la concentración de reserpina.....	99
5.8.- Indicaciones adicionales.....	99
6.- CONCLUSIONES.....	102
7.- BIBLIOGRAFIA.....	106
8.- APENDICES.....	111
8.1.- Apendice 1.....	112
8.2.- Apendice 2.....	114

1.- INTRODUCCION

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

Estos alcaloides se han dividido (1) según su basicidad en los siguientes 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: aj-

malina, isoajmalina, rauwolfina, 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: β -yohimbina, reserpinina, reserpilina, etc..

3.2.- Alcaloides en los que este ciclo es carbocíclico, tales como reserpina, rescinamina, etc..

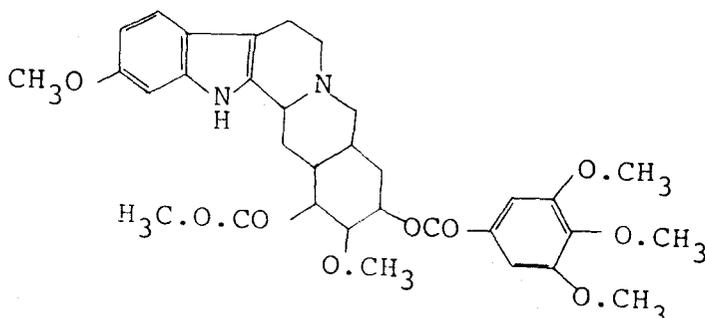
En lo que concierne al uso de los compuestos de esta familia en terapéutica, se pueden indicar algunas características fundamentales. En primer lugar el número y la variedad de los alcaloides, sus actividades, con frecuencia netamente diferentes, hacen que las preparaciones a base de Rauwolfia y los alcaloides purificados no puedan confundirse. 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 la hipertensión.

La reserpina es el más importante dentro de los alcaloides de la Rauwolfia.

La fórmula estructural de la reserpina es:



Se trata del:

yohimban-16-ácido carboxílico, 11, 17-dimetoxi 18-|(3, 4, 5-trimetoxi benzoil)oxi|-metil ester ($3\beta, 16\beta, 17\alpha, 18\beta, 20\alpha$).

La fórmula empírica es $C_{33}H_{40}O_9N_2$, y posee una masa molecular de 608,7.

La reserpina se obtiene de las raíces de ciertas especies de Rauwolfia, principalmente R. serpentina y R. vomitoria, o por síntesis. Otros nombres dados a este alcaloide son: Bioserpina; Eskaserp; Reserpoide; Sandril; Serpasil; Serpi--loide; etc..

Se presenta en forma de cristales blancos, o polvo cristalino que se oscurece ligeramente por exposición a la luz. Es casi insoluble en agua y en éter; soluble 1 parte en 2000 de etanol y 1 en 6 de cloroformo.

El punto de fusión es de unos $270^{\circ}C$, con des--composición.

Es levo-rotatoria, siendo su poder rotatorio específico $[\alpha]_D^{23} = -117,5^{\circ} (CHCl_3)$.

Este alcaloide posee propiedades antihiper---tensivas y tranquilizantes, pero a dosis elevadas puede provocar un síndrome semejante al parkinson y una grave depresión que puede conducir al suicidio. Normalmente, los efectos colaterales son transitorios y rápidamente desaparecen por reducción de la dosis, o por tratamiento discontinuo. No se desarrolla tolerancia a la reserpina y tampoco aparece la formación de hábito (2).

2.- OBJETIVO

Como parte de un programa que se está realizando en este Departamento sobre fluorescencia y oxidación de diferentes alcaloides de la Rauwolfia, se aborda en esta memoria:

1.- Estudio de la fluorescencia nativa o directa de la reserpina, obteniéndose los espectros corregidos y no corregidos de este importante alcaloide de la Rauwolfia en diferentes disolventes; determinándose los máximos de excitación y de emisión. Así mismo, se discute la posibilidad del uso de dicha fluorescencia directa en determinaciones analíticas, estudiándose la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentrau

ción , y determinándose el límite de detección en etanol. Se calcula también el rendimiento cuántico de fluorescencia de la re--serpina en etanol y en disolución de ácido acético 5N. Finalmen--te se calcula la sensibilidad absoluta de fluorescencia en eta--nol.

Previamente al estudio fluorimétrico, se ha--ce un estudio espectrofotométrico.

2.- Se estudia también la cinética de la oxidación de la reserpina en disoluciones de ácido acético por el -peróxido de hidrógeno.

3.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

La reserpina fué aislada por primera vez por Mueller, Schlitter y Bein (3). Dorfman y col. (4) estudiaron la hidrólisis de la reserpina, encontrando como consecuencia de la misma ácido resérpico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico y metanol, y sugirieron una estructura para este alcaloide.

Furlenmeier y otros (5) determinan los espectros I.R. y U.V. de la reserpina. Neuss y col. (6) dan la estructura de la reserpina mediante el estudio de su hidrólisis y de su reducción.

Se han propuesto algunos métodos para la de-

terminación analítica de este importante alcaloide por espectrofotometría. Mc. Mullen et al. (7) determinan diferentes constantes físicas de la reserpina (punto de fusión, rotación óptica, I.R. y U.V.) y dan métodos de análisis de la reserpina mediante espectrofotometría U.V..

Szalkowski y Mader (8) trataron una disolución alcohólica de reserpina con ácido sulfúrico diluido y nitrato sódico, observando la aparición de un producto fluorescente amarillo verdoso que presenta un máximo de absorción a 390nm y que emplearon para su determinación espectrofotométrica. Un procedimiento parecido al anterior es sugerido por Banes (9).

La fluorescencia nativa de la reserpina ha sido estudiada por Udenfriend y col. (10) (11), pero se limitan a indicar como máximo de excitación 300nm y como máximo de emisión 375nm a pH=1, sin corregir los espectros.

Haycock, Sheth y Mader (12), estudian también los espectros no corregidos de excitación y de fluorescencia de una serie de alcaloides de la Rauwolfia en disoluciones de metanol, entre los cuales figura la reserpina.

Jung y Jungová (13) indican los máximos de excitación y de emisión de la reserpina en metanol y en ácido acético; sin embargo, no corrigen los espectros.

Radejová y col. (14) estudian, asimismo, la fluorescencia nativa de la reserpina y de otros alcaloides en metanol, con vistas a obtener información sobre su estabilidad. Como los anteriores autores indicados, sólo registran los espectros no corregidos de excitación y de emisión.

Para la determinación analítica de la reser-

pina, se han desarrollado numerosos métodos basados, casi todos ellos, en la oxidación de la misma, obteniéndose así productos fluorescentes de mayor intensidad y con la ventaja adicional de que el máximo de emisión ocurre a mayor longitud de onda, eliminándose de esta forma las interferencias con otros indoles que son excitados a 280 nm aproximadamente y emiten hacia los 350 nm. Así Haycock y Mader (15) estudian la reacción de la reserpina con el nitrito sódico en medio ácido señalada anteriormente (8) (9) y demuestran que tal reacción es privativa de los indoles con el grupo 11-Metoxi. Esta reacción fué más tarde aprobada como el método oficial (16) para determinación en preparaciones farmacéuticas, pero ésta se hace espectrofotométricamente. Debido a la gran sensibilidad de los métodos fluorimétricos, se han empleado técnicas basadas en esta reacción para la microdeterminación de reserpina en alimentos (17) (18) (19).

Posteriormente, Haycock y otros (20) estudian la cinética de esta reacción de la reserpina con el ácido nitroso, indicando que el proceso transcurre en dos etapas. En primer lugar el ácido nitroso reacciona con la reserpina protonada para formar un complejo intermedio, que posteriormente bajo la influencia de los iones hidrógeno forma la 3,4-dehidroreserpina, que es el producto fluorescente. Proponen una expresión para la velocidad de reacción.

La reacción con el ácido nitroso ha sido utilizada ulteriormente con algunas modificaciones para la determinación analítica de la reserpina y otros alcaloides en métodos semiautomáticos (21) (22) (23).

La reacción de oxidación con el ácido ni--

troso se ha estudiado, desde el punto de vista cinético con otros alcaloides de la Rauwolfia (24) (25) .

Stainier (26) (27) propone como oxidante el ácido sulfovanádico y determina la reserpina y la rescinamina espectrofotométricamente .

Urbanyi y Stober (28), modifican el método de Stainier (26) (27) y emplean como oxidante un reactivo que contiene pentóxido de vanadio en ácido fosfórico. Hacen un estudio cinético de esta reacción e indican que el efecto del pentóxido de vanadio es el mismo que el del ácido nitroso (20). Finalmente proponen la determinación fluorimétrica de la reserpina y de compuestos relacionados con este reactivo. Este método ligeramente modificado (29) (30) se ha empleado para el análisis fluorimétrico automático de la reserpina.

Posteriormente, Stainier (31) aplica la oxidación con el ácido sulfovanádico a otros alcaloides de estructura parecida a la reserpina. Asimismo, Stainier y col. (32), identifican el producto de oxidación sulfovanádica de los alcaloides de la serie de la reserpina como el 3,4-dehidro derivado. Finalmente, Kreienbaum (33) y Smith (34) , aplican la oxidación con pentóxido de vanadio en ácido fosfórico, ligeramente modificada, a la determinación analítica de la reserpina y de un grupo de alcaloides de la Rauwolfia .

Wright y Tang (35) estudian la fotooxidación de la reserpina . Indican que el producto final de la irradiación de la reserpina en disolución de cloroformo es la 3,4,5,6-tetrahidroreserpina y que la 3,4-dehidroreserpina es un intermediato de esta fotooxidación .

Jakovljevic (36) propone como método de determinación la reacción de la reserpina con ácido p-toluensulfónico en ácido acético glacial y la medida de la fluorescencia del producto resultante pero no identifica al producto de esta reacción. Jung y Jungová (13) , indican que mientras que el ácido nitroso origina el dehidroderivado, el ácido p-toluensulfónico inicia la formación de tetrahydroderivado .

Además de los oxidantes indicados hasta ahora, se han ensayado otros compuestos tales como sales céricas, dióxido de selenio, permanganato , peróxidos , peryodatos, etc. (28), indicándose que no son adecuados para producir fluorescencia significativa .

Dechene (37), indica que la fluorescencia de disoluciones de reserpina en ácido acético 5N se incrementa notablemente mediante calentamiento con peróxido de hidrógeno y basándose en este hecho propone un método para la determinación analítica de la reserpina. Sin embargo , no indica los productos que se obtienen en la reacción, ni siquiera la longitud de onda a la que mide la fluorescencia . Tampoco efectúa ningún estudio cinético .

Chiang y Chen (38), aplican la misma reacción de oxidación con peróxido de hidrógeno a la determinación de la yohimbina.

4.- PARTE EXPERIMENTAL

4.1.- Reactivos y aparatos.

4.2.- Espectroscopía U.V.

4.3.- Fluorescencia.

4.4.- Cinética de la oxidación de la re
serpina por el peróxido de hidró-
geno.

4.1.- REACTIVOS Y APARATOS

4.1.1.- Reactivos .

4.1.2.- Aparatos .

4.1.1.- Reactivos

La reserpina empleada fue 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 "espec--

* La reserpina fue suministrada por C.H. Boeringer Söhn Ingelheim, S.A.E. . Les expresamos nuestro agradecimiento .

troscopía", ácido acético glacial Merck p.a. .

Otros reactivos empleados fueron: peróxido de hidrógeno 30% Merck p.a., bisulfato de quinina U.S.P. y antraceno purísimo .

4.1.2.- Aparatos

Fue 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 fluorimetría se ha realizado en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer Modelo 650-40 . Este aparato utiliza una lámpara de xenon de 150 w . 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 y 467,1 nm, así como mediante disoluciones de bisulfato de quinina (39) .

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 microordenador ATOM de Acorn. Comp., que permite el registro del espectro y su tratamiento posterior . Las áreas se han calculado mediante integración numérica de la curva experimental . El programa completo se recoge en el apéndice 1 .

Las constantes de transformación de la 3,4-dehidroreserpina en 3,4,5,6-tetradehidroreserpina se han determinado a partir de los máximos de intensidad relativa de fluorescencia frente al tiempo . A tal fin se ha realizado un ajuste polinómico por el método de los mínimos cuadrados de los puntos experimentales, obteniéndose el máximo de la curva por derivación analítica de ésta . El listado del programa de ajuste se encuentra en el apéndice 2 .

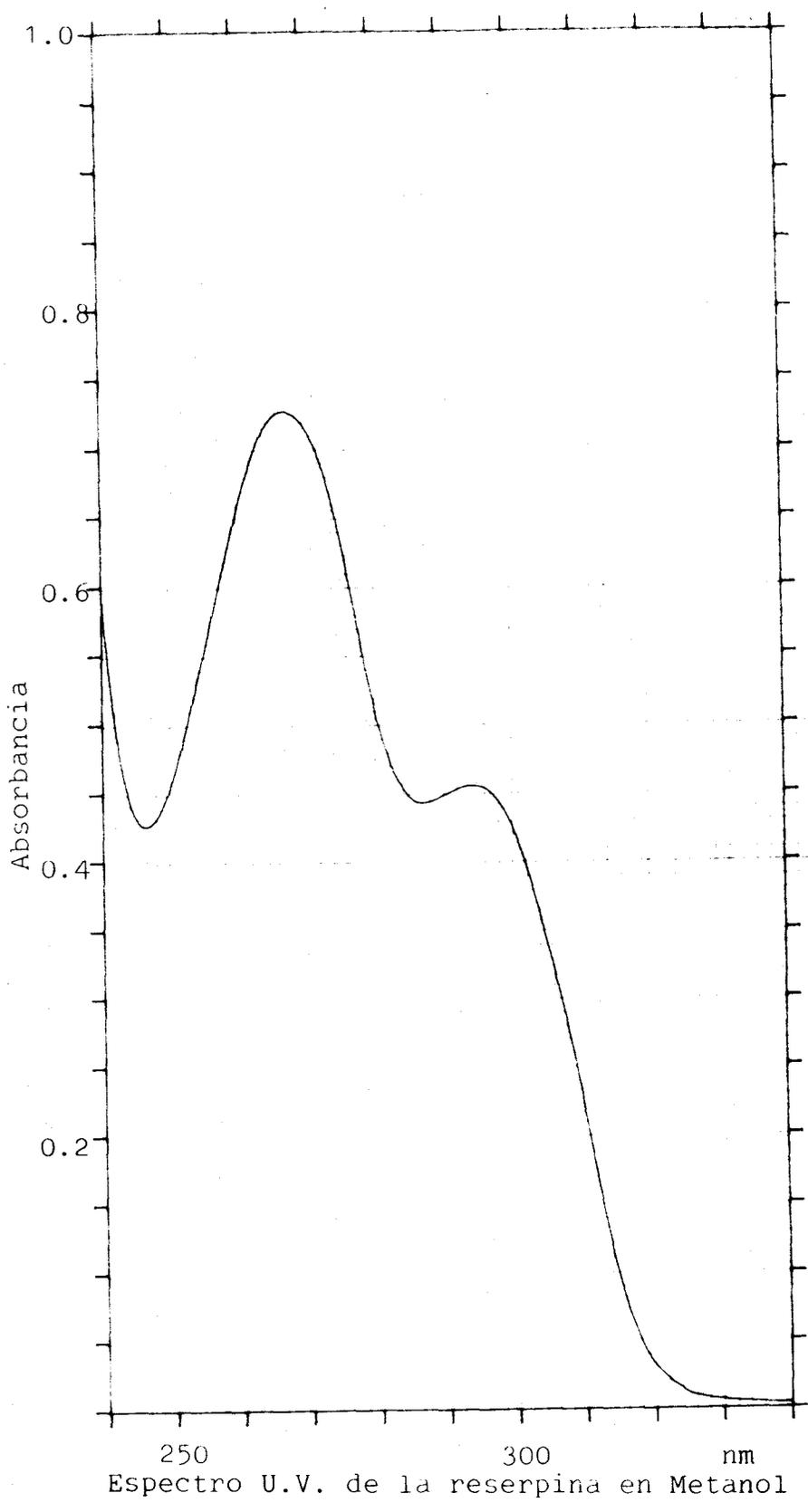
4.2.- Espectroscopía U.V.

Se han registrado los espectros de absorción del U.V. de la reserpina en metanol, etanol, acetonitrilo y en disoluciones de ácido acético 5N . Se hicieron pruebas de estabilidad de la reserpina en estos medios y las disoluciones resultaron suficientemente estables durante el transcurso de las experien---cias; se emplearon siempre matraces topacio durante el proceso de disolución y de medida para evitar la fotoxidación .

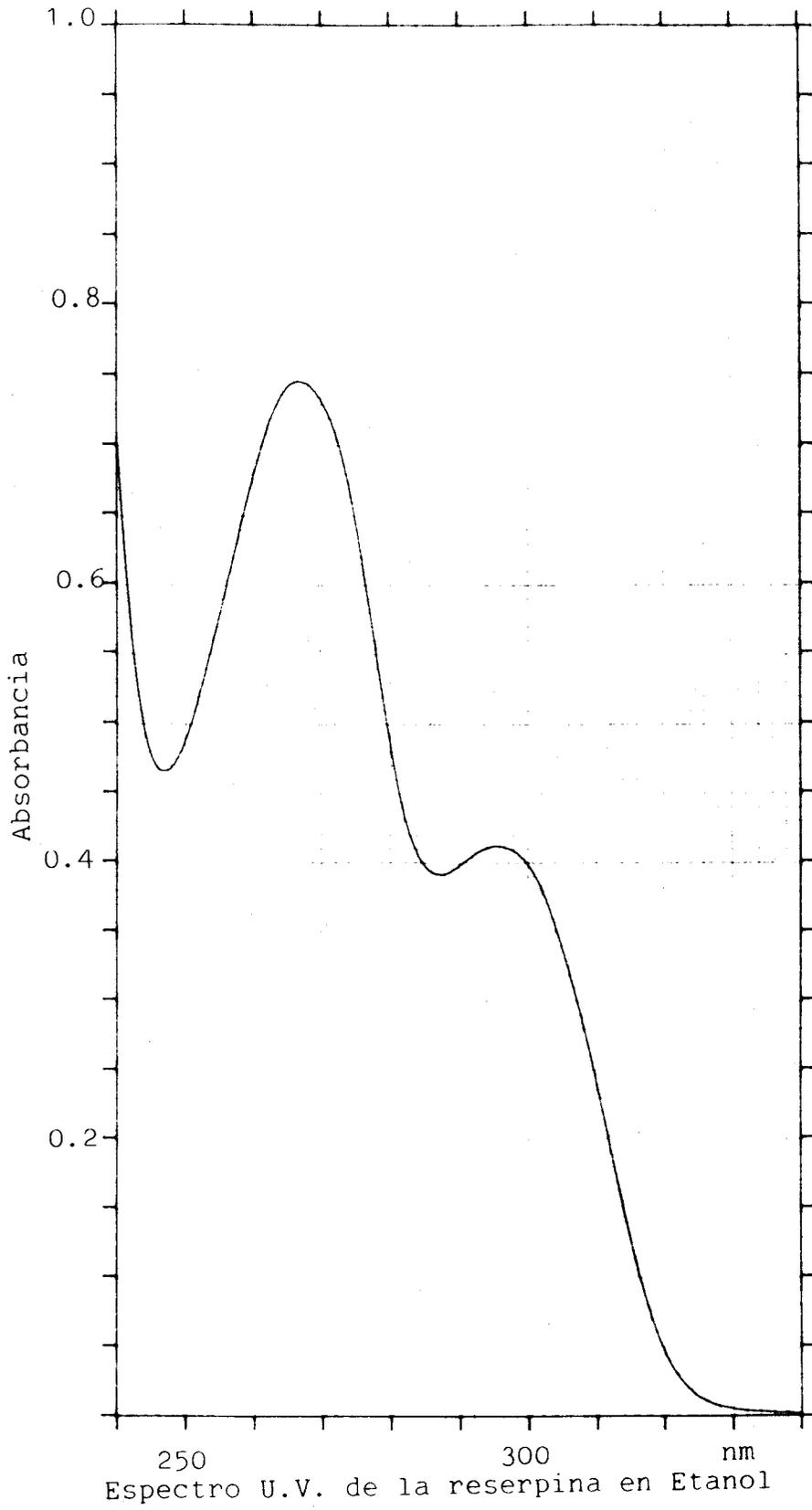
La concentración de reserpina para la obtención de los espectros de U.V. fué de $4 \cdot 10^{-5}$ M en todos los casos,

Ésta es suficiente para alcanzar una buena resolución de los máximos de absorción . En las figuras 1-4 se presentan los citados espectros y en la tabla (I) se indican las longitudes de onda de los máximos en los disolventes utilizados .

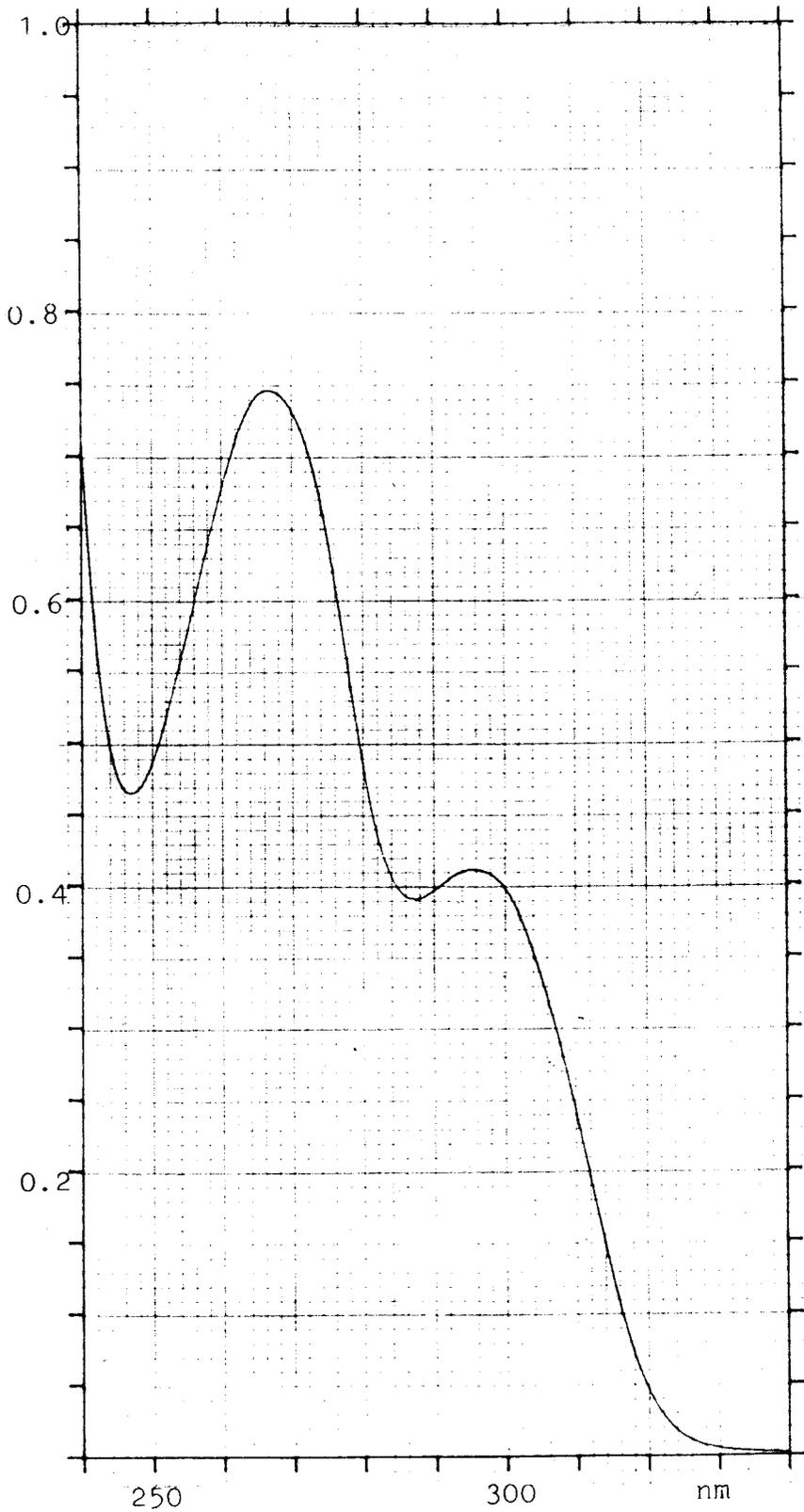
- Figura 1 -



- Figura 2 -



- Figura 3 -



Espectro U.V. de la reserpina en Acetonitrilo

- Figura 4 -

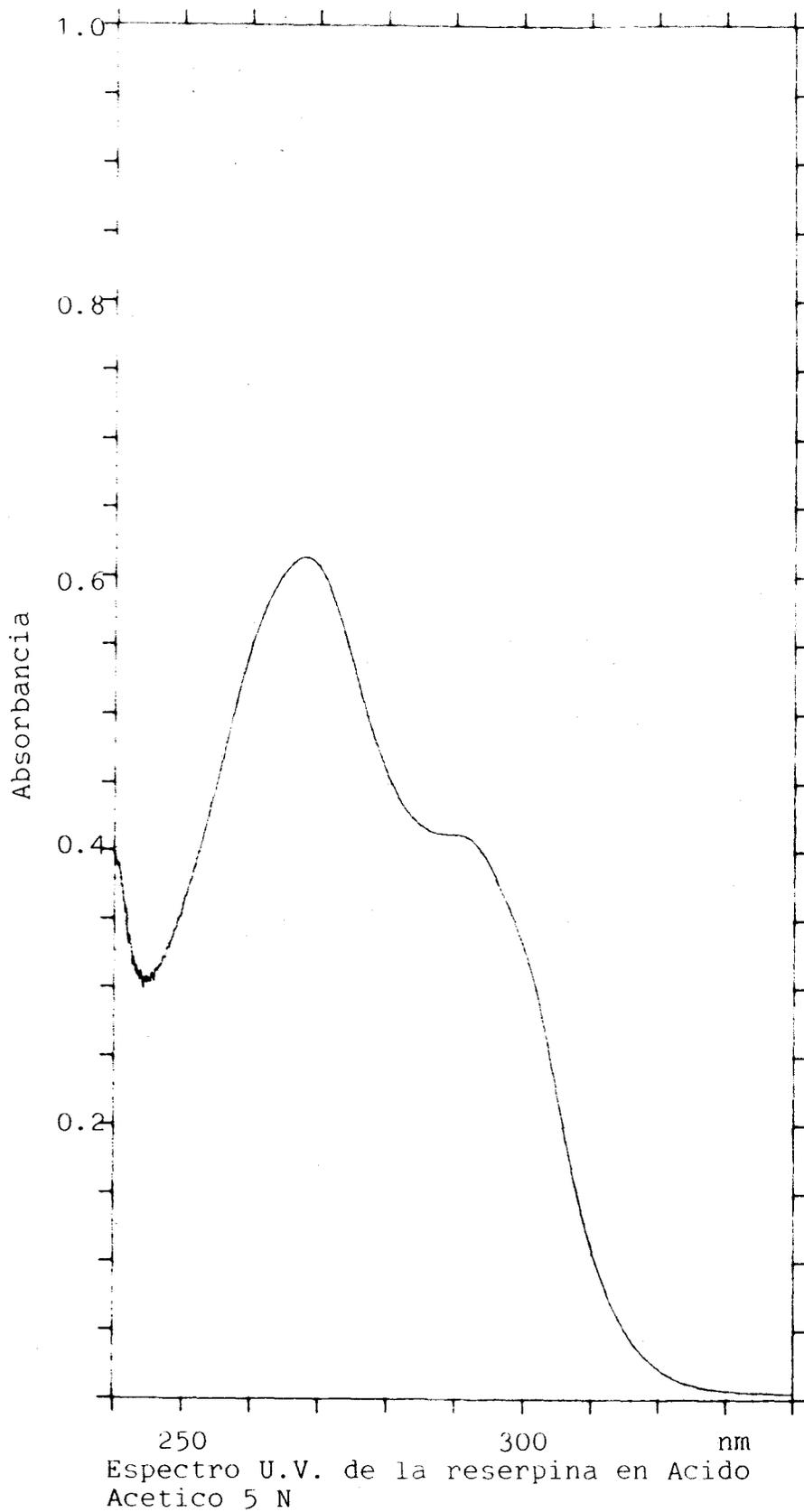


TABLA I

Longitudes de onda de los máximos de absorbanca en el U.V.
de la reserpina en los distintos disolventes.

<u>Disolventes</u>	<u>λ (nm)</u>
Metanol	268
	295
Etanol	268
	295
Acetonitrilo	267
	295
Ac. acético 5N	268
	295 (h)

Asimismo, se ha calculado la absorptividad molar de la reserpina en cada uno de los diferentes medios a las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción a partir de la ley de Lambert-Beer :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

donde A es la absorbancia, ϵ la absorptividad molar ($\text{l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l el espesor de la cubeta en cm, y c la concentración en moles. l^{-1} . Para ello, se han medido las absorbancias a los citados máximos y a diferentes concentraciones . En las tablas (II,III,IV,V) se recogen los resultados . En todos los casos se observó una buena linealidad, como queda reflejado en las figuras 5-8 .

En la tabla (VI) se recogen los valores de absorptividad molar calculados a partir de los datos precedentes para cada uno de los disolventes a las diferentes longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción . Se indica así mismo en dicha tabla los coeficientes de determinación y las ordenadas en el origen .

TABLA II

Absorbancias de disoluciones de reserpina en metanol a diferentes concentraciones medidas a $\lambda = 268\text{nm}$ y a $\lambda = 295\text{nm}$.

<u>Concentración (mol.l⁻¹)</u>	<u>Absorbancia (268nm)</u>	<u>Absorbancia (295nm)</u>
1,05.10 ⁻⁵	0,187	0,118
3,15.10 ⁻⁵	0,537	0,337
4,21.10 ⁻⁵	0,726	0,455
5,26.10 ⁻⁵	0,885	0,555
6,31.10 ⁻⁵	1,073	0,670
7,36.10 ⁻⁵	1,241	0,779

TABLA III

Absorbancias de disoluciones de reserpina en etanol a diferentes concentraciones medidas a $\lambda = 268\text{nm}$ y a $\lambda = 295\text{nm}$.

<u>Concentración (mol.l⁻¹)</u>	<u>Absorbancia (268nm)</u>	<u>Absorbancia (295nm)</u>
1,00.10 ⁻⁵	0,177	0,113
3,00.10 ⁻⁵	0,514	0,326
3,50.10 ⁻⁵	0,604	0,383
4,00.10 ⁻⁵	0,699	0,444
4,5.10 ⁻⁵	0,763	0,485
5,00.10 ⁻⁵	0,860	0,546

TABLA IV

Absorbancias de disoluciones de reserpina en acetonitrilo a diferentes concentraciones medidas a $\lambda=267\text{nm}$ y a $\lambda=295\text{nm}$.

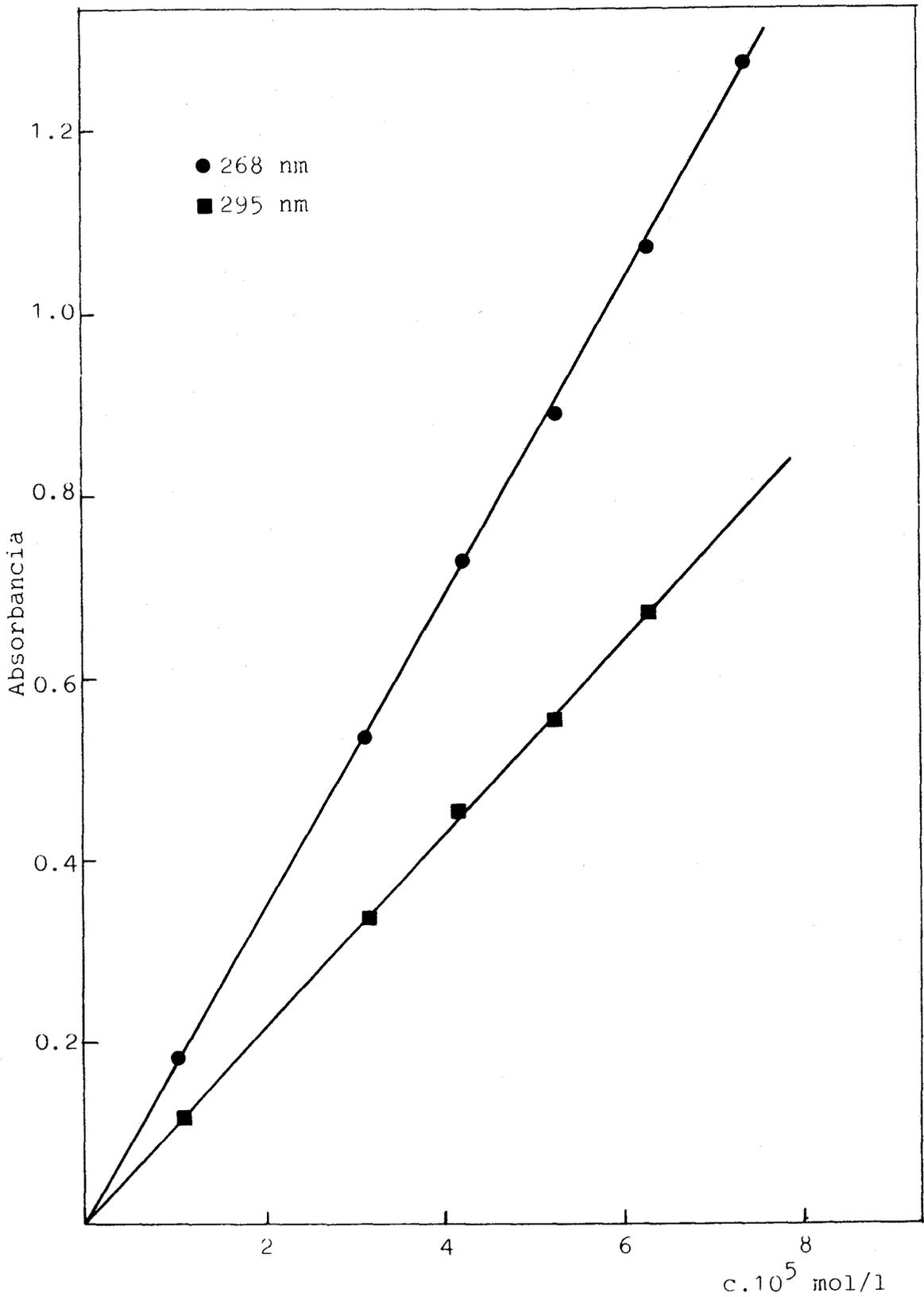
<u>Concentración (mol.l⁻¹)</u>	<u>Absorbancia (267nm)</u>	<u>Absorbancia (295nm)</u>
1,05.10 ⁻⁵	0,187	0,103
4,21.10 ⁻⁵	0,747	0,412
5,26.10 ⁻⁵	0,932	0,515
6,31.10 ⁻⁵	1,125	0,618
7,36.10 ⁻⁵	1,319	0,730

TABLA V

Absorbancias de disoluciones de reserpina en ácido acético 5N a diferentes concentraciones medidas a $\lambda=268\text{nm}$ y a $\lambda=295\text{nm}$.

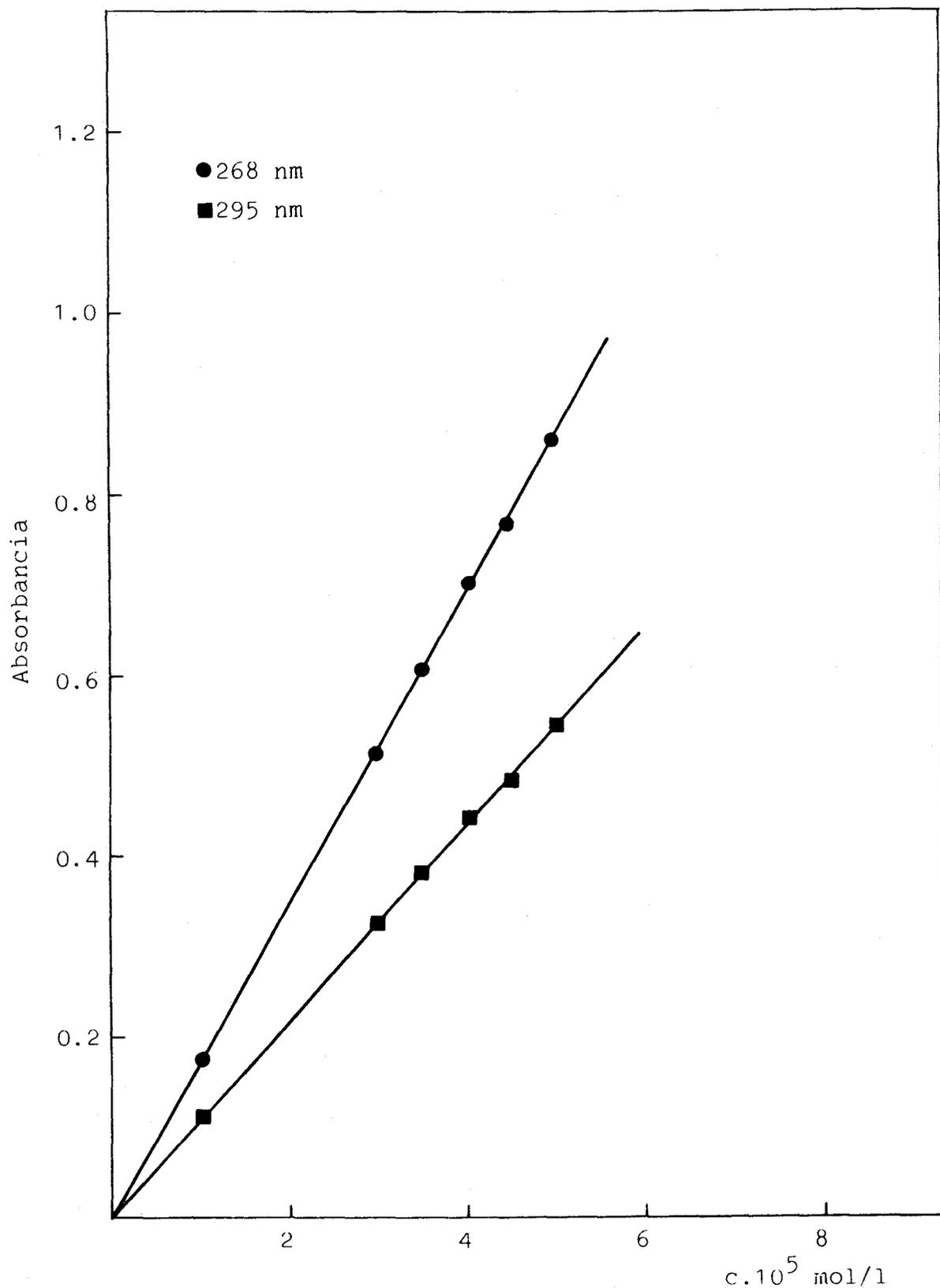
<u>Concentración (mol.l⁻¹)</u>	<u>Absorbancia (268nm)</u>	<u>Absorbancia (295nm)</u>
1,02.10 ⁻⁵	0,157	0,100
3,06.10 ⁻⁵	0,465	0,298
4,07.10 ⁻⁵	0,614	0,392
5,09.10 ⁻⁵	0,769	0,492
6,11.10 ⁻⁵	0,921	0,588
7,13.10 ⁻⁵	1,069	0,683

- Figura 5 -



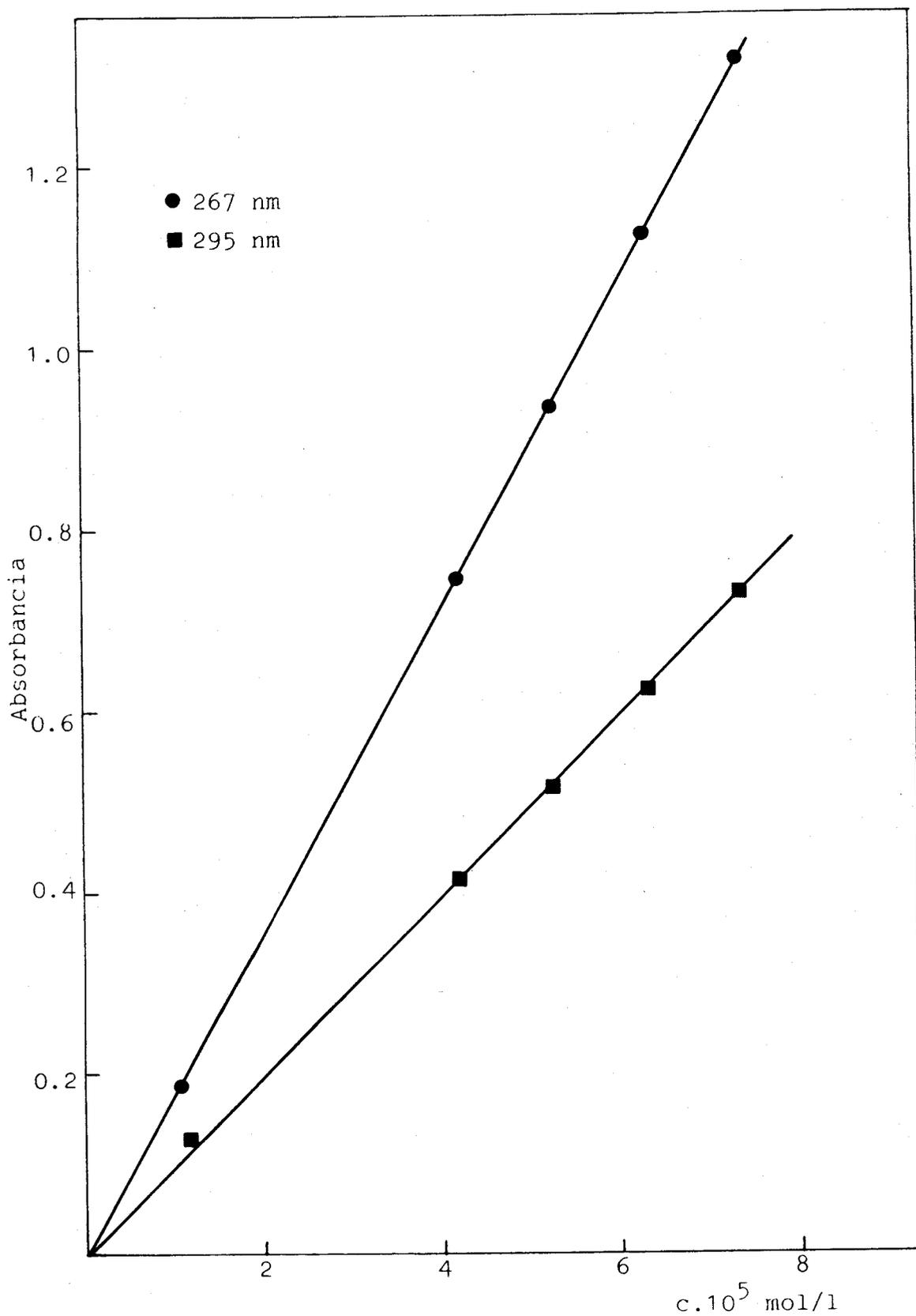
Variación de la absorbancia con la concentración de reserpina en Metanol

- Figura 6 -



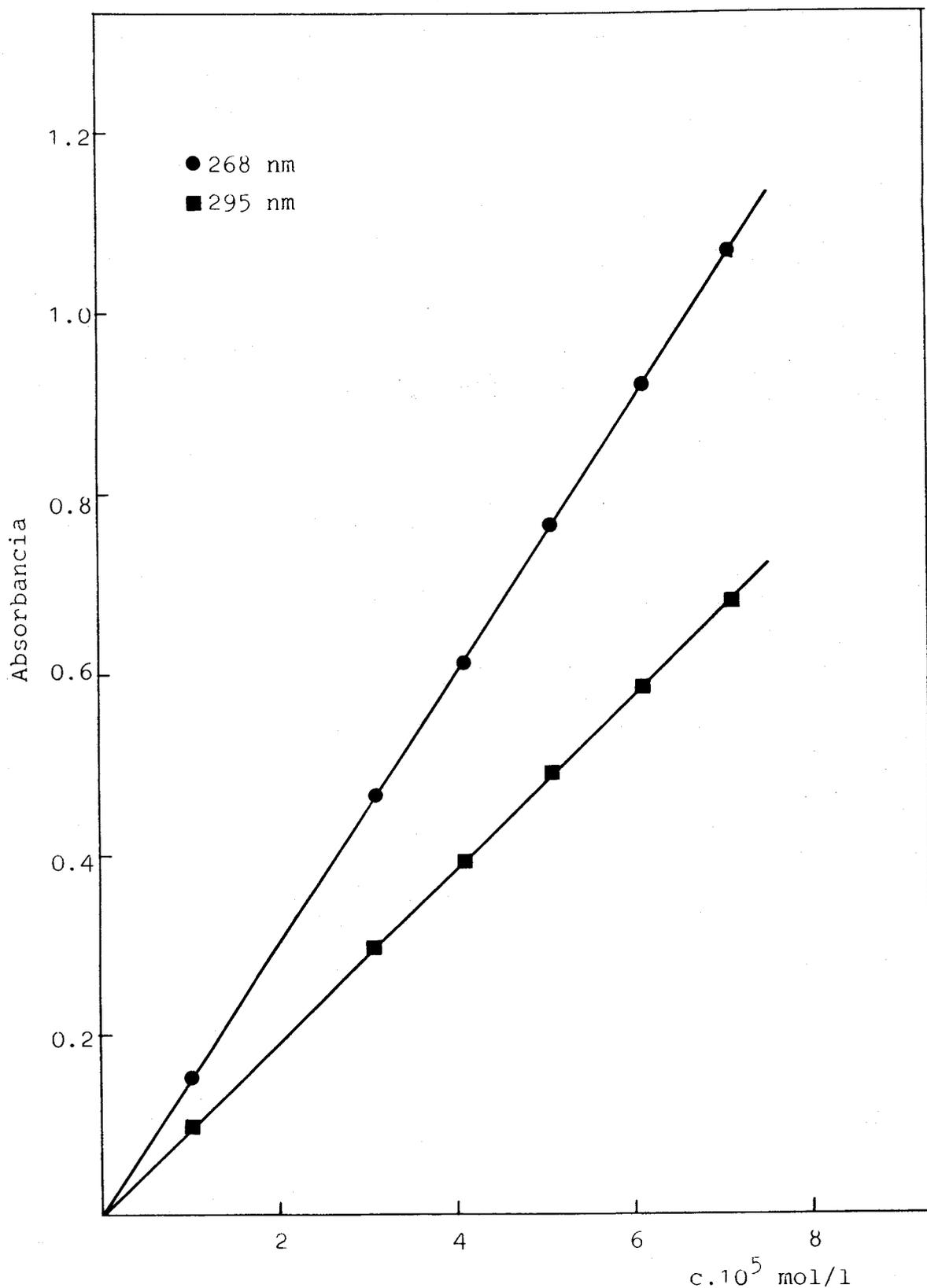
Variación de la absorbancia con la concentración de reserpina en Etanol

- Figura 7 -



Variación de la absorbancia con la concentración de reserpina en Acetonitrilo

- Figura 8 -



Variación de la absorbancia con la concentración de reserpina en Acido Acetico 5N

TABLA VI

Valores de absorptividad molar, ordenada en el origen y coeficiente de determinación de la reserpina en diferentes disolventes a las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción.

<u>Disolvente</u>	<u>λ (nm)</u>	<u>ϵ (l.mol⁻¹.cm⁻¹)</u>	<u>Ord. origen</u>	<u>r</u>
Metanol	268	16,7.10 ³	0,013	0,999
Metanol	295	10,5.10 ³	0,009	0,999
Etanol	268	17,0.10 ³	0,007	0,999
Etanol	295	10,8.10 ³	0,005	0,999
Acetonitrilo	267	17,9.10 ³	-0,004	0,999
Acetonitrilo	295	9,9.10 ³	-0,003	0,999
Ac. acético 5N	268	14,9.10 ³	0,006	0,999
Ac. acético 5N	295	9,5.10 ³	0,004	0,999

4.3.- FLUORESCENCIA

4.3.1.- Fluorescencia nativa o directa

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

Límite de detección.

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

4.3.1.- Fluorescencia nativa o directa

Se han estudiado las características espectrofluorimétricas de la reserpina en metanol, etanol, acetonitrilo y ácido acético 5N . Se hicieron pruebas de estabilidad de la reserpina 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 reserpina en los disolventes utilizados fué de $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. De-

bido a la pequeña solubilidad de la reserpina en los diferentes disolventes, las disoluciones se prepararon de la siguiente forma: se pesaron 0,0125 gramos de reserpina y para disolverlos se les añadió 1 ml de cloroformo, esto se llevó a 50 ml con el disolvente, se tomó 1 ml y se volvió a diluir hasta 25 ml, observándose en todas las diluciones que no aparecía precipitado . 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 .

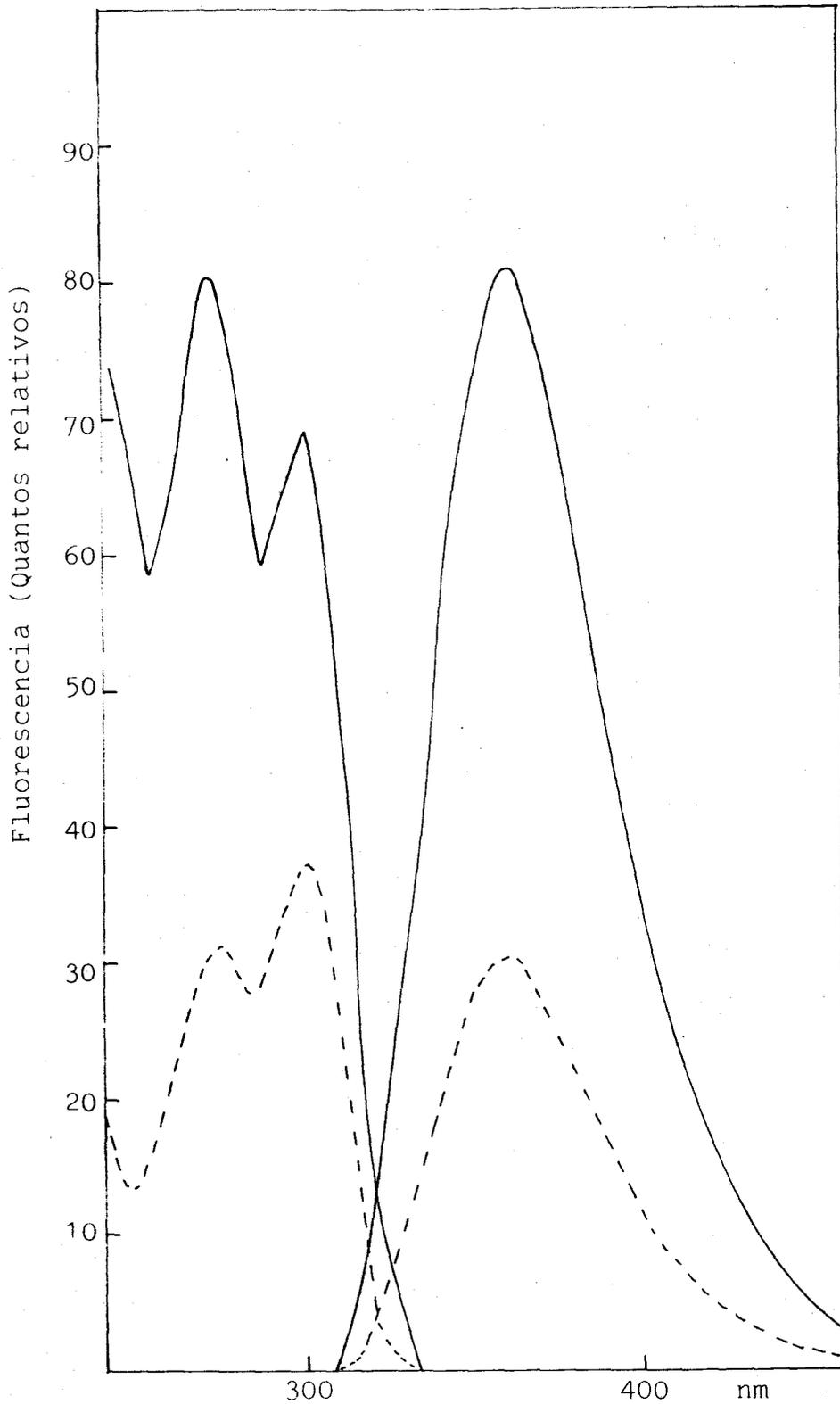
Las rendijas de excitación y de emisión usadas para la obtención de los espectros no corregidos fueron de 2 y 6 nm respectivamente .

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 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 9-12 se presentan los espectros no corregidos (...) y corregidos (—) de excitación y de fluorescencia de la reserpina en metanol, etanol, acetonitrilo, y ácido acético 5N .

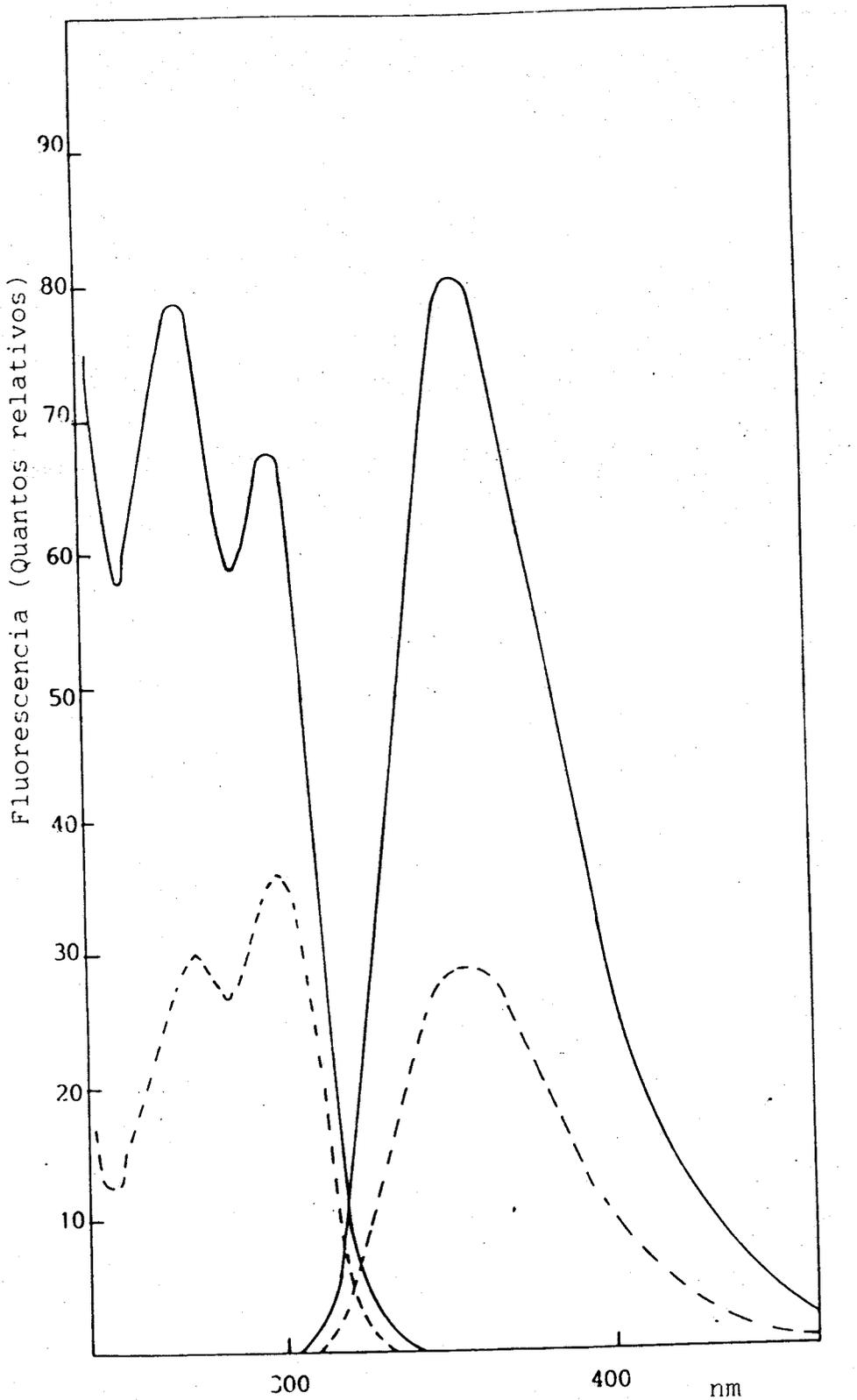
En la tabla (VII) se recogen las longitudes de onda de los máximos de excitación y de emisión de la reserpina en los antes mencionados disolventes .

- Figura 9 -



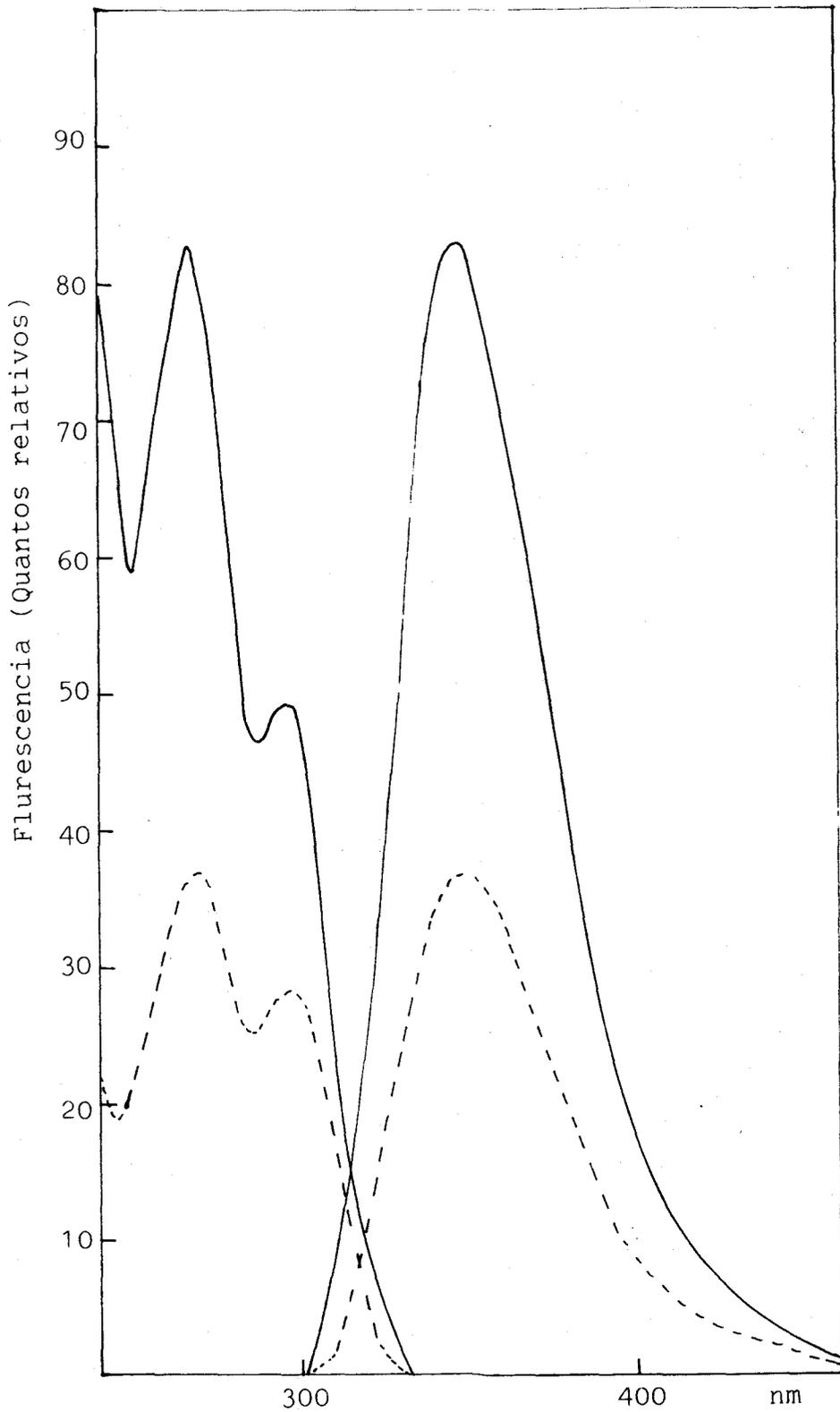
Espectros no corregidos (---) y corregidos (—) de excitación y emisión de la reserpina en Metanol

- Figura 10 -



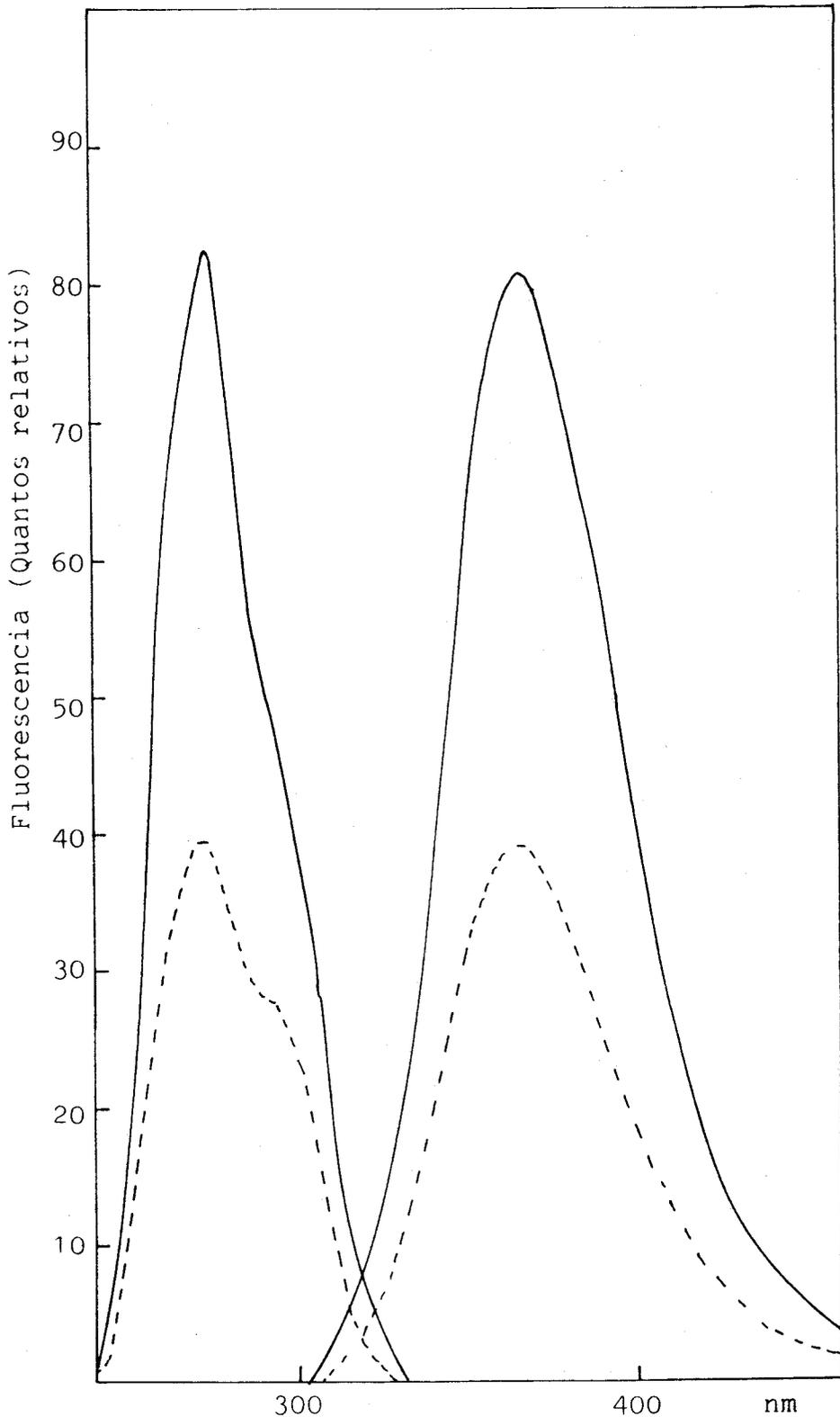
Espectros no corregidos (---) y corregidos (—) de excitación y emisión de la reserpina en Etanol

- Figura 11 -



Espectros no corregidos (---) y corregidos (—) de excitación y emisión de la reserpina en Acetonitrilo

- Figura 12 -



Espectros no corregidos (---) y corregidos (—) de excitación y emisión de la reserpina en Acido Acetico 5N

TABLA VII

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

<u>Disolvente</u>	<u>$\lambda_{exc.}$ (nm)</u>	<u>$\lambda_{em.}$ (nm)</u>
Metanol	271, 295	362
Etanol	271, 295	365
Acetonitrilo	270, 295	350
Ac. acético 5N	271, 295 (h)	366

4.3.2.- 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 reserpina en etanol ($\lambda_{exc.} = 295$ nm, $\lambda_{em.} = 365$ nm) .

La figura 13 indica una dependencia lineal hasta concentraciones de aproximadamente $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Se determinó el límite de detección en disoluciones de etanol . La tabla (VIII) indica los valores de emisión del blanco (etanol) a 365nm para una longitud de onda de excitación de 295nm . Se indica, asimismo, la media de estas medidas y la desviación standard . De la pendiente de la curva de calibración (figura 13) se obtiene como valor de la sensibilidad $12,8$ Intensidad relativa. $\mu\text{g}^{-1}.\text{ml}$. Para un nivel de confianza del 90% el límite de detección se calcula mediante la fórmula:

$$c_L = \frac{3 \overline{S}_{bl}}{\text{Sensibilidad}}$$

donde \overline{S}_{bl} es el valor standard de las medidas del blanco .

El valor encontrado es $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}.\text{ml}^{-1} = 3 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$

4.3.3.- Rendimientos cuánticos . Sensibilidad absoluta de fluorescencia .

Se han determinado los rendimientos cuánticos (Q) a 25°C de disoluciones de reserpina en etanol, y en ácido acético 5N . Para ello se han comparado los espectros corregidos de

emisión de las disoluciones de reserpina con el correspondiente al del bisulfato de quinina en ácido sulfúrico 1N, que se tomó como sustancia de referencia .

Las figuras 14-15 muestran los espectros corregidos de emisión de la reserpina en etanol y en ácido acético 5N respectivamente, y los correspondientes al bisulfato de quinina en ácido sulfúrico 1N .

Estos espectros se obtuvieron a partir de disoluciones diluidas recientemente preparadas a las que se les burbujeó nitrógeno, excitando a una longitud de onda de 300nm . Las rendijas de excitación y de emisión fueron de 5nm y 6nm respectivamente . Se midieron, asimismo, las absorbancias de las citadas disoluciones . Las áreas 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 (vease apéndice 1). Como rendimiento cuántico del bisulfato de quinina, sustancia de referencia, se tomó el valor de 0,546.

Los rendimientos cuánticos se calcularon haciendo uso de la fórmula:

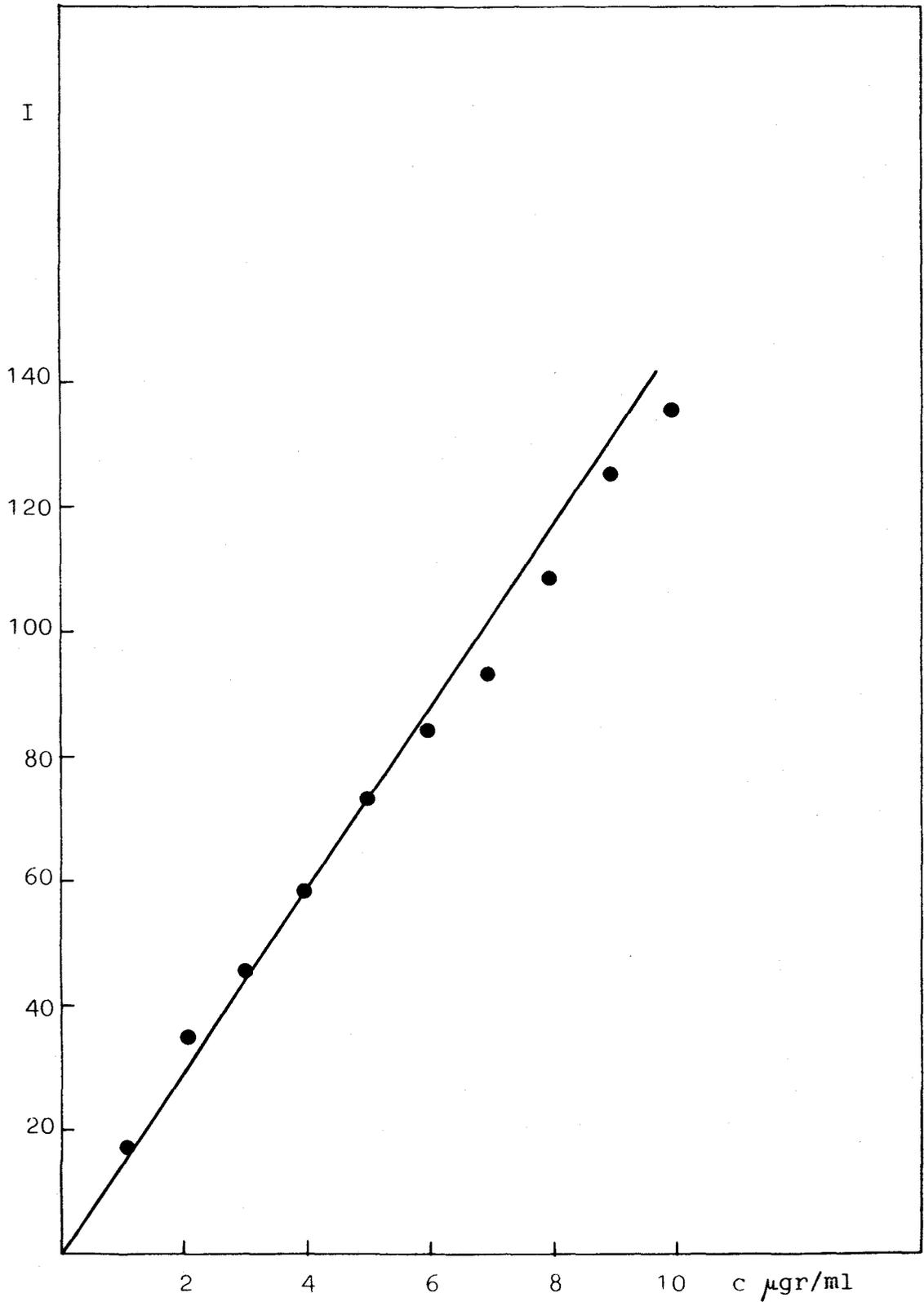
$$Q = 0,546 \frac{\text{Area bajo espectro reserpina}}{\text{Area bajo espectro bisulf. quinina}} \frac{\text{Ab. bisulf. quinina}}{\text{Ab. reserpina}}$$

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

Con el valor del rendimiento cuántico se puede obtener la sensibilidad de fluorescencia para la banda comple-

ta de emisión, determinando previamente la absorbancia por centímetro para una concentración de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ a una longitud de onda correspondiente al máximo de absorción (271nm) . Así mismo, conociendo la anchura espectral de banda del espectro de fluorescencia se obtiene la sensibilidad de fluorescencia para el pico de emisión . En la tabla (X) se indican los resultados .

- Figura 13 -



Variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de reserpina

TABLA VIII

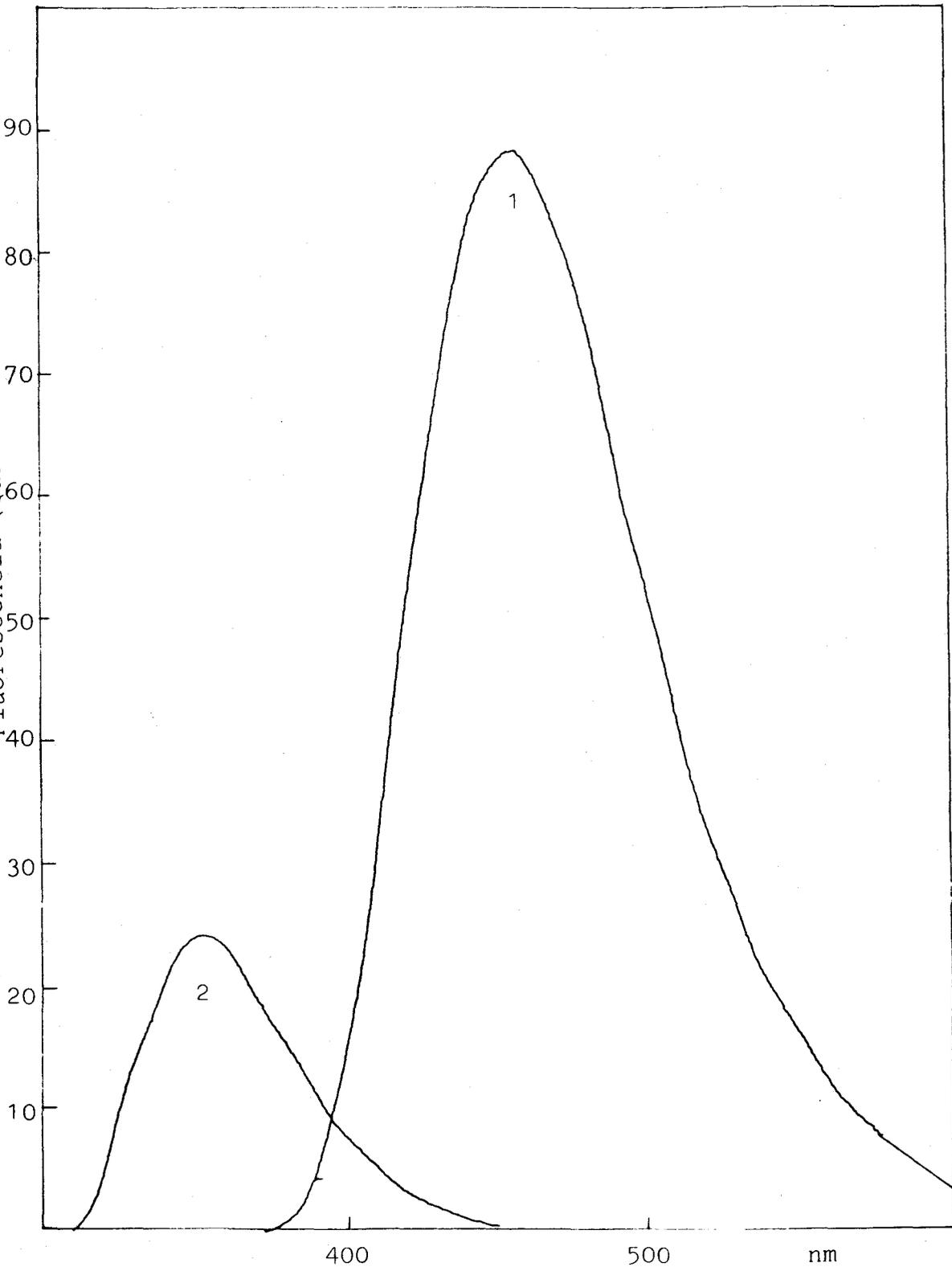
Valores de emisión de etanol a 365nm para $\lambda_{exc.} = 295nm$.

<u>I</u>	<u>I</u>	<u>I</u>
0,34	0,36	0,38
0,34	0,36	0,38
0,35	0,37	0,37
0,37	0,36	0,38
0,36	0,35	0,37
0,37	0,36	0,38
0,37	0,37	0,38
0,40	0,37	0,38
0,38	0,37	0,38
0,37	0,38	0,38

Media= $\overline{I_{bl}} = 0,37$

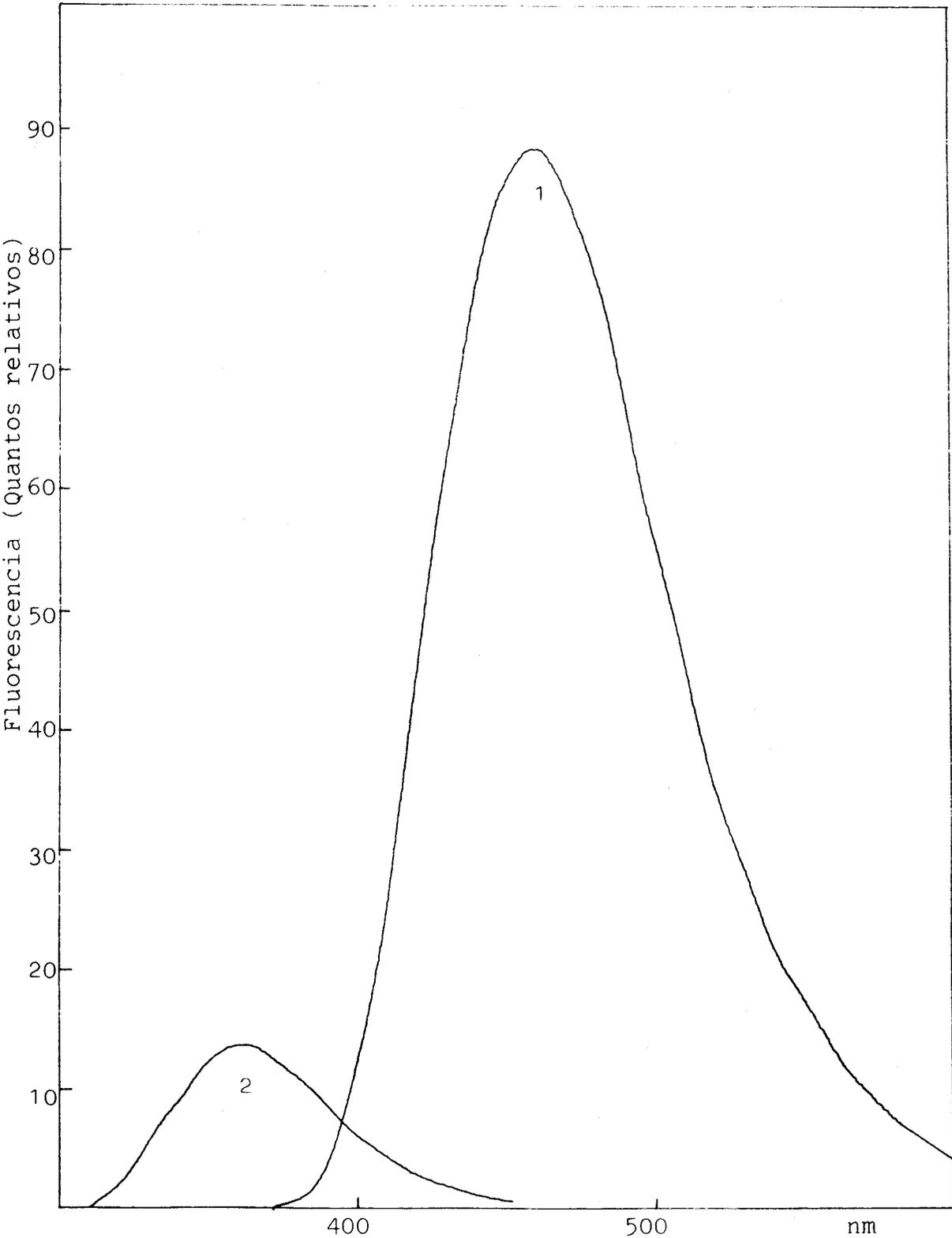
Desviación standard= $S_{bl} = 0,013$

- Figura 14 -



Espectros de fluorescencia corregidos de: 1 Bisulfato de Quinina en H_2SO_4 1N, 2 Reserpina en Etanol, a la longitud de onda de excitación de 300 nm y $25^\circ C$

- Figura 15 -



Espectros de fluorescencia corregidos de: 1 Bisulfato de Quinina en H_2SO_4 1N, 2 Reserpina en Acido Acético 5N, a la longitud de onda de excitación de 300 nm y $25^\circ C$

TABLA IX

Rendimiento cuántico de la reserpina en etanol y en ácido acético 5N.

<u>Compuesto</u>	<u>Disolvente</u>	<u>$\lambda_{exc.}$ (nm)</u>	<u>Ab.</u>	<u>Area (unidades relativas)</u>	<u>Q</u>
Reserpina	Etanol	300	0,016	7.332	0,050
Reserpina	Ac. acético 5N	300	0,016	6.378	0,044
Bisulfato de quinina	Ac. sulfúrico 1N	300	0,016	79.808	0,546

TABLA X

Sensibilidad absoluta de fluorescencia de la reserpina en etanol.

$D_{\text{máx.}}$ = absorbancia por cm para una concentración de $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$
al máximo de absorción, $271\text{nm} = 0,026$

$Q.D_{\text{máx.}}$ = sensibilidad de fluorescencia para la banda completa
de emisión = $0,0013$

H = anchura espectral de banda del espectro de fluorescencia (μ^{-1}) =
= $0,45$

$\frac{Q.D_{\text{máx.}}}{H}$ = sensibilidad de fluorescencia para el pico de emisión =
= $0,0029$

4.4.- CINETICA DE LA OXIDACION DE LA RESERPINA POR EL PEROXIDO

DE HIDROGENO

- 4.4.1.- Oxidantes ensayados .
- 4.4.2.- Amortiguación de la fluorescencia de la reserpina por el peróxido de hidrógeno .
- 4.4.3.- Cinética de la oxidación .
- 4.4.4.- Determinación de las constantes de velocidad .
- 4.4.5.- Influencia de la temperatura .
- 4.4.6.- Influencia de la concentración de reserpina .

4.4.1.- Oxidantes ensayados .

Antes de comenzar con el estudio cinético de la oxidación de la reserpina, se efectuaron pruebas cualitativas de esta reacción con diferentes oxidantes, identificándose por espectrofluorescencia los productos de oxidación . Los oxidantes ensayados fueron: peróxido de hidrógeno, perclorato potásico y ácido p-toluensulfónico . Se operó a temperatura de 80^o-90^oC y se mantuvo la reacción diferentes tiempos . Espectrofluorimétricamente se comprobó que se forma en primer lugar la 3,4-dehidro-

reserpina y posteriormente la reacción continúa, originándose la 3,4,5,6-tetrahidroreserpina . En este trabajo se eligió como oxidante el peróxido de hidrógeno .

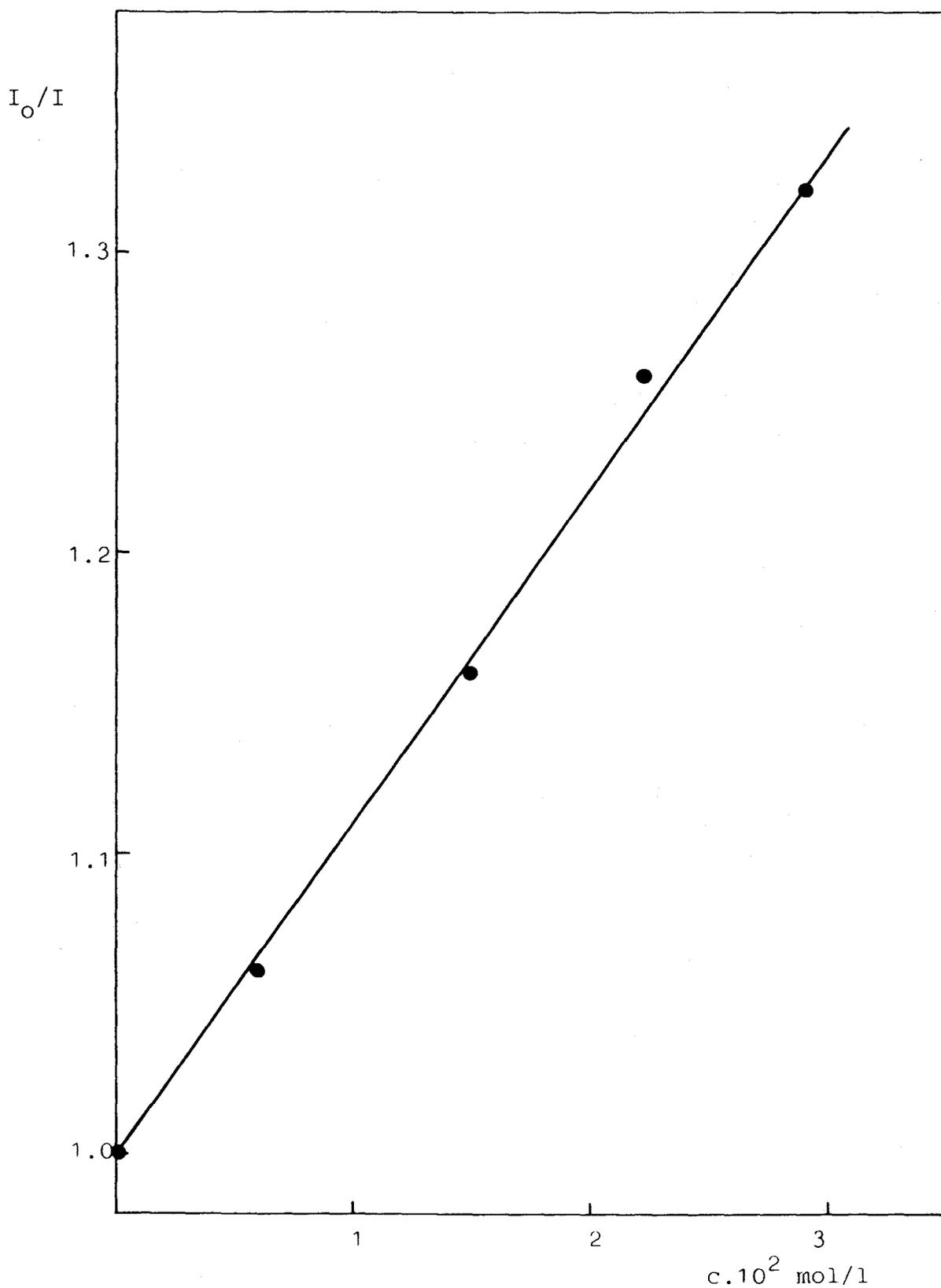
4.4.2.- Amortiguación de la fluorescencia de la reserpina por el peróxido de hidrógeno .

En los ensayos previos, citados anteriormente, de la oxidación de la reserpina con el peróxido de hidrógeno, se observó que además de la citada oxidación, el peróxido de hidrógeno ocasiona una amortiguación ("Quenching") en la fluorescencia de este alcaloide, por lo que se procedió en primer lugar al estudio de este fenómeno . Se operó a 25°C y se registró la intensidad de fluorescencia de disoluciones de reserpina ($2,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) en ácido acético 5N para diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno . La longitud de onda de excitación fué de 271nm y la de emisión de 365nm . Las rendijas de excitación y de emisión fueron respectivamente de 4 y 6 nm .

En la tabla (XI), se recogen los resultados obtenidos, donde I_0 es la intensidad relativa de fluorescencia en ausencia de peróxido de hidrógeno e I la correspondiente intensidad relativa a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno .

En la figura 16, se representa I_0/I frente a la concentración molar de peróxido de hidrógeno . La pendiente de la recta, constante de Stern-Volmer, tiene el valor de $1,05 \text{ l}.\text{mol}^{-1}$.

- Figura 16 -



Variación de I_0/I con la concentración de peróxido de hidrógeno

TABLA XI

Valores experimentales de I_0/I frente a la concentración molar de peróxido de hidrógeno.

I_0/I	$[H_2O_2]$ (mol.l ⁻¹)
1,00	0,000
1,04	0,018
1,06	0,059
1,16	0,150
1,26	0,220
1,31	0,290

4.4.3.- Cinética de la oxidación .

La reacción de oxidación de la reserpina por el peróxido de hidrógeno se siguió espectrofluorimétricamente . En primer lugar se observó la disminución de la intensidad de fluorescencia de la reserpina con el tiempo ($\lambda_{exc.} = 271$ nm, $\lambda_{em.} = 365$ nm), y simultáneamente se midió la variación de la intensidad de fluorescencia de la 3,4-dehidroreserpina ($\lambda_{exc.} = 400$ nm, $\lambda_{em.} = 500$ nm) y de la 3,4,5,6-tetradehidroreserpina ($\lambda_{exc.} = 330$ nm, $\lambda_{em.} = 420$ nm) . En todos los casos se mantuvieron constantes la apertura de las rendijas de excitación y de emisión a 4 y 6 nm respectivamente .

El portacubetas del espectrofluorímetro se acopló a un termostato, permitiendo mantener las temperaturas con

una precisión de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Antes de la adición del peróxido de hidrógeno, se burbujeó nitrógeno a las disoluciones del alcaloide . Como disolvente se utilizó ácido acético 5N .

Se ha estudiado la influencia de la temperatura y de la concentración del alcaloide, utilizando siempre exceso de oxidante . Además se han hecho algunos ensayos sobre la influencia de la concentración del peróxido de hidrógeno y de la acidez del medio .

4.4.4.- Determinación de las constantes de velocidad .

Se preparan disoluciones de reserpina en ácido acético, a las que se les burbujea nitrógeno . Se introducen en el termostato hasta que alcanzan la temperatura de trabajo, posteriormente se les añade el peróxido de hidrógeno; momento en el que comienza la reacción . Se toman rápidamente dos partes alícuotas de la disolución y se colocan en sendas cubetas del espectrofluorímetro . La concentración del alcaloide es de $4 \cdot 10^{-7}$ M ($0,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), la del peróxido de hidrógeno $0,088$ M ($0,3\%$), y el disolvente ácido acético 5N . A continuación, y a diferentes intervalos de tiempo, se va midiendo la intensidad relativa de fluorescencia de la reserpina (cuya concentración va disminuyendo), de la 3,4-dehidroreserpina (la concentración comienza aumentando, llega a un máximo, para posteriormente disminuir) y de la 3,4,5,6-tetradehidroreserpina (su concentración aumenta) .

Estas medidas se hicieron a las siguientes temperaturas: 52° , 60° , 65° , 70° , 75° y 83°C . En las tablas (XII, XIII, XIV, XV, XVI y XVII) se recogen los resultados experimentales . Cada medida que aparece en las tablas es el valor medio ob-

tenido con cada una de las muestras colocadas en las cubetas . En las citadas tablas aparece también el valor del blanco obtenido en las mismas condiciones experimentales, pero sin alcaloide .

En la figura 17, se representan, como ejemplo, las intensidades relativas de fluorescencia, a las que se les ha restado el valor del blanco, frente al tiempo en minutos para el caso de 65°C (obsérvese que los valores de las intensidades que figuran en ordenadas son, para cada caso, proporcionales a los experimentales) .

La forma de las curvas de esta figura, indican que se puede considerar el proceso, en las condiciones a las que se ha operado, como una reacción consecutiva (como se verá en la discusión) .

Los valores de las intensidades relativas de fluorescencia de la reserpina se ajustan a una cinética de primer orden con respecto al alcaloide . A título de ejemplo, en la figura 18 se representa, para 65°C , el logaritmo neperiano de las intensidades relativas de fluorescencia, excluido el valor del blanco, frente al tiempo, observándose una dependencia lineal . Procediendo de la misma manera para las diferentes temperaturas experimentales, se han obtenido las correspondientes pendientes, de las cuales se obtuvieron las constantes cinéticas k_1 , correspondientes a la transformación de la reserpina en 3,4-dehidroreserpina . En la tabla (XVIII), se recogen los valores de dichas constantes de velocidades, indicándose, además el máximo error estimado para dichas constantes .

En la figura 19, se representan los valores

de las intensidades relativas de fluorescencia (excluido el valor del blanco), para la 3,4-dehidroreserpina, para el caso de 65°C . Operando de forma similar para el resto de las temperaturas, se determinó el tiempo para el cuál la intensidad de fluorescencia tiene un valor máximo, mediante un programa de ajuste polinomial basado en el método de los mínimos cuadrados (vease apéndice 2). Los valores de estos tiempos, $t_{\text{máx.}}$, así como las correspondientes intensidades $I_{\text{máx.}}$, se recopilan en la tabla (XIX) . A partir de los valores de estos $t_{\text{máx.}}$, se evalúa la constante de velocidad, k_2 , correspondiente a la transformación de la 3,4-dehidroreserpina en 3,4,5,6-tetradehidroreserpina . Los valores obtenidos para las diferentes temperaturas se indican en la tabla (XVIII) . Asimismo, en dicha tabla figura el error máximo estimado para k_2 .

4.4.5.- Influencia de la temperatura .

En las figuras 20 y 21 se representan los logaritmos neperianos de las constantes k_1 y k_2 , respectivamente, frente a la inversa de la temperatura absoluta . A partir de las pendientes de las rectas se obtienen los valores de las energías de activación:

$$E_1 = 15,9 \text{ Kcal.mol}^{-1} = 66,5 \text{ KJ.mol}^{-1}$$

$$E_2 = 11 \text{ Kcal.mol}^{-1} = 46 \text{ KJ.mol}^{-1}$$

4.4.6.- Influencia de la concentración de reserpina .

Manteniendo la temperatura a 65°C y con la misma concentración de peróxido de hidrógeno, $0,088\text{ M}$, se ha estudiado la influencia de la concentración de la reserpina . Las disoluciones estudiadas fueron de las siguientes concentraciones en alcaloide: $1,03 \cdot 10^{-7}$, $2,05 \cdot 10^{-7}$, $4,10 \cdot 10^{-7}$, y $8,21 \cdot 10^{-7}\text{ M}$.

En las tablas (XX, XXI, XIV, y XXII) se indican los resultados experimentales .

Procediendo de forma análoga a la indicada en el apartado anterior, se evalúan los valores de las constantes k_1 y k_2 que se presentan en la tabla (XXIII) .

TABLA XII

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), y 3,4-dehidroreserpina(DR), en ácido acético 5N a 52°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$|Reserpina| = 4,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t(min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>
5	4,60	4,20
10	4,40	4,99
20	5,30	11,70
30	4,86	17,30
40	4,50	23,90
50	4,15	30,60
60	3,90	37,70
70	3,50	44,30
80	3,18	51,00
90	2,92	56,40
100	2,66	61,70
110	2,45	65,60
120	2,26	69,60
130	2,15	72,40
140	2,05	74,50
150	1,96	76,50
170	1,88	78,00
195	1,82	79,50
210	1,80	79,50
230	1,82	78,90
250	1,83	78,80
I _{blanco}	0,11	0,80

TABLA XIII

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina (R), y 3,4-dehidroreserpina (DR), en ácido acético 5N a 60°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$|Reserpina| = 4,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t (min.)</u>	<u>I_R (exc.271nm) em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em.500nm)</u>
5	5,05	8,06
10	4,86	11,80
15	4,65	16,00
20	4,33	20,80
25	4,05	26,20
30	3,70	31,20
35	3,53	36,30
40	3,21	40,90
45	3,04	45,40
50	2,82	49,40
55	2,63	53,20
60	2,42	56,10
65	2,30	59,30
70	2,22	61,50
80	2,05	64,80
90	1,95	66,60
100	1,85	67,70
110	1,77	67,40
120	1,71	66,70
130	1,65	66,70
I _{blanco}	0,63	0,50

TABLA XIV

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 65°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$|Reserpina| = 4,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t (min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
6	3,90	5,30	0,60
9	3,80	7,40	0,64
12	3,60	10,00	0,67
15	3,50	13,20	0,74
18	3,30	16,30	0,76
21	3,10	19,90	0,79
24	2,90	23,40	0,85
27	2,70	27,00	0,90
30	2,55	30,60	0,98
33	2,40	34,10	1,05
39	2,00	40,00	1,20
42	1,95	43,00	1,33
45	1,80	45,00	1,40
48	1,70	46,80	1,53
51	1,60	48,90	1,60
54	1,50	50,00	1,70
57	1,50	51,60	1,80
60	1,36	52,50	1,95
63	1,30	53,10	2,05
69	1,25	54,30	2,30
72	1,22	54,50	2,40
74	1,20	54,50	2,50
76	1,23	54,60	2,60

TABLA XIV (CONTINUACION)

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina (R), 3,4-dehidroreserpina (DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina (TR), en ácido acético 5N. a 65 °C.

<u>t (min.)</u>	<u>I_R (exc. 271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc. 400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc. 330nm em. 420nm)</u>
78	1,20	54,60	2,65
80	1,18	54,30	2,75
83	1,15	54,20	2,90
86	1,14	54,00	3,00
89	1,13	53,50	3,10
92	1,08	53,50	3,36
95	1,13	53,30	3,36
99		52,90	3,55
102		52,70	3,70
105		52,20	3,80
108	1,15	51,70	4,00
111		51,60	4,06
114		51,30	4,20
116		50,90	4,30
118		50,40	4,40
120		49,90	4,50
124	1,17	49,50	4,78
127		49,20	4,85
130		48,80	5,01
133		48,40	5,10
136		47,90	5,20
139		47,20	5,30
142	1,15	47,10	5,45
145		46,70	5,60
148		46,10	5,70
152		45,60	5,80
155		45,10	6,00
159		44,90	6,10

TABLA XIV (CONTINUACION)

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 65 °C.

<u>t(min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
162	1,16	44,20	6,30
168		43,20	6,50
175		42,50	6,91
180		41,70	7,10
190	1,22	40,20	7,50
200		39,00	7,90
220		36,10	11,20
240	1,36	33,50	10,24
260		30,90	10,00
280		27,90	10,40
300		25,30	11,00
320		22,80	11,50
340		20,80	11,50
360	1,50	18,90	12,40
380		17,10	12,60
400		15,20	12,80
420		13,70	13,00
430	1,60	13,00	12,50
435		12,60	12,50
I _{blanco}	0,30	1,64	0,40

TABLA XV

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), y 3,4-dehidroreserpina(DR), en ácido acético 5N a 70°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$|Reserpina| = 4,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t(min.)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>
3	4,35	6,94
6	3,71	11,80
9	3,60	16,20
12	3,30	20,70
15	2,95	25,20
18	2,72	30,40
21	2,55	34,80
24	2,30	39,40
27	2,12	43,40
30	1,95	47,20
33	1,88	49,80
36	1,71	52,40
39	1,60	54,40
42	1,47	55,70
45	1,39	56,80
48	1,35	57,70
51	1,30	58,10
56	1,22	57,70
61	1,21	57,60
66	1,25	57,20
71	1,22	56,60
76	1,19	55,50
81	1,19	54,70
90		53,30
100		51,50

TABLA XV (CONTINUACION)

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), y 3,4-dehidroreserpina(DR), en ácido acético 5N a 70°C.

<u>t (min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>
110		50,00
120		48,20
130		45,80
140		44,20
150		42,00
205	1,40	32,40
215		30,50
230		27,50
245	1,60	25,20
260		22,80
275		20,40
290	1,50	18,40
305		16,80
320		15,00
335	1,74	13,50
340		13,50
355		11,20
370	1,64	9,71
385		8,78
400		7,80
415	1,55	7,06
I _{blanco}	0,40	1,40

TABLA XVI

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 75°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$|Reserpina| = 4,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t (min.)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
3	4,70	6,20	0,85
6	4,00	9,59	0,87
9	3,40	15,40	
12	3,16	20,70	
15	2,75	27,30	
18	2,40	32,90	1,35
21	2,10	38,10	
24	1,90	42,50	
27	1,70	45,80	
30	1,52	48,70	2,30
33	1,40	50,50	
36	1,35	51,60	
39	1,30	52,20	
42	1,20	52,20	3,42
44	1,16	52,20	3,60
46	1,15	52,00	3,80
48	1,15	51,90	4,02
50	1,16	51,50	4,20
52	1,13	51,10	4,40
54	1,13	50,90	4,60
56	1,10	50,50	4,79
58	1,15	49,90	5,02
60	1,12	49,60	5,15
65		48,30	5,54

TABLA XVI (CONTINUACION)

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 75°C.

<u>t(min.)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
70		46,60	6,07
75	1,15	45,00	6,52
80		43,50	7,00
85		42,40	7,51
90	1,20	41,00	7,96
95		39,70	8,40
100		38,30	8,83
105	1,25	37,00	9,28
110		35,80	9,71
115		34,50	10,10
120	1,28	33,20	10,40
125		31,90	10,80
130		30,60	11,20
135	1,30	29,50	11,60
145		26,80	12,10
150		25,90	12,30
155	1,40	24,70	12,50
160	1,44	23,60	12,70
I _{blanco}	0,30	1,56	0,65

TABLA XVII

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 83°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

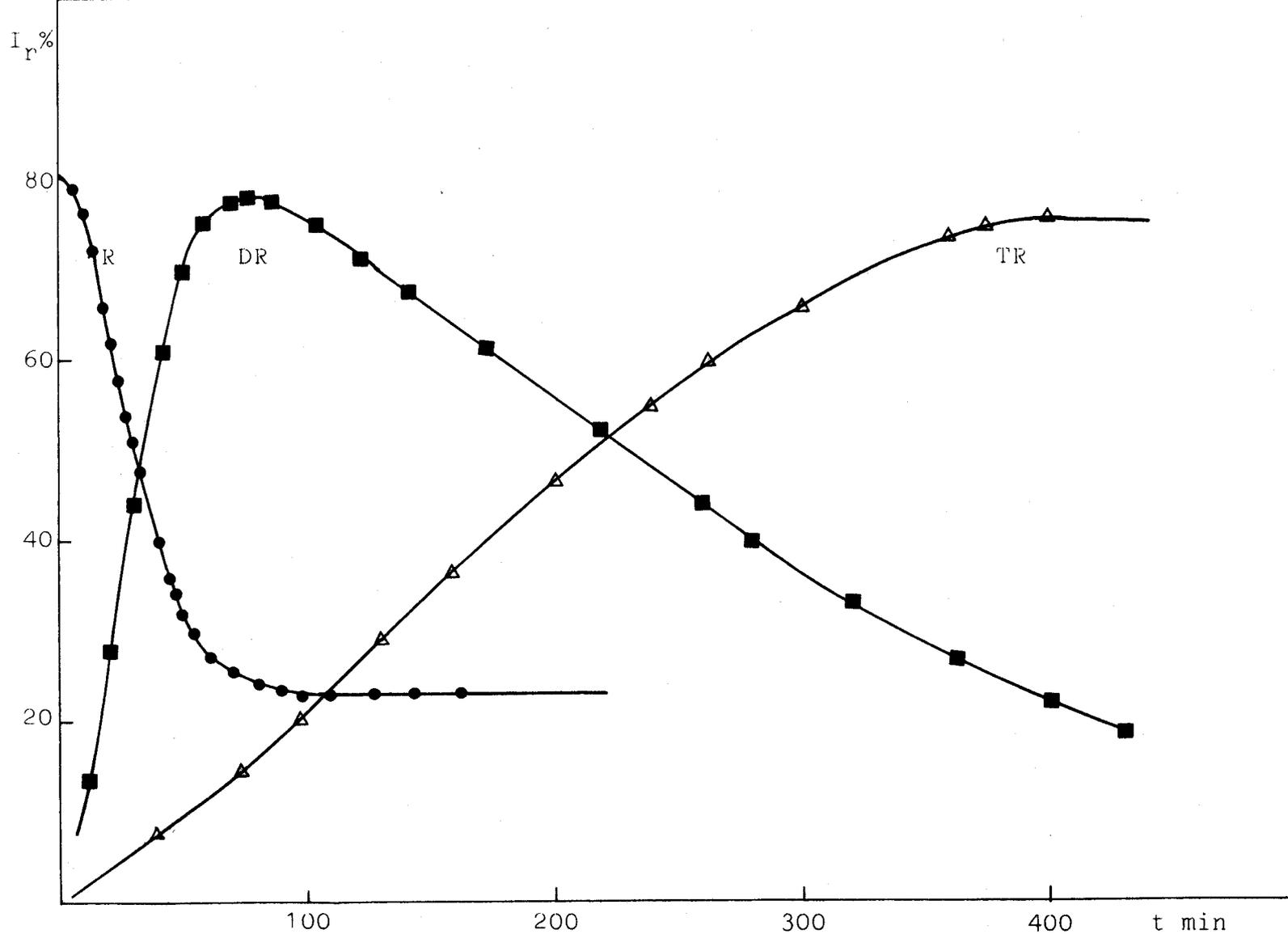
$$|Reserpina| = 4,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t(min.)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
3	3,82	11,30	1,17
6	2,98	16,40	1,17
9	2,48	24,60	
12	2,07	32,70	
15	1,69	39,00	
18	1,44	44,40	2,32
21	1,19	47,90	
24	1,07	49,80	
27	1,00	50,70	
29	0,95	50,90	3,92
31	0,94	50,60	4,20
33	0,92	50,30	4,51
35	0,90	49,70	4,88
37	0,91	49,30	5,25
40	0,93	48,20	5,69
45		45,90	6,35
50		43,90	7,11
55		42,40	7,85
60	0,96	40,30	8,49
65		38,30	9,18
70		35,70	9,68
75		33,60	10,40
80	1,10	31,70	11,00

TABLA XVII (CONTINUACION)

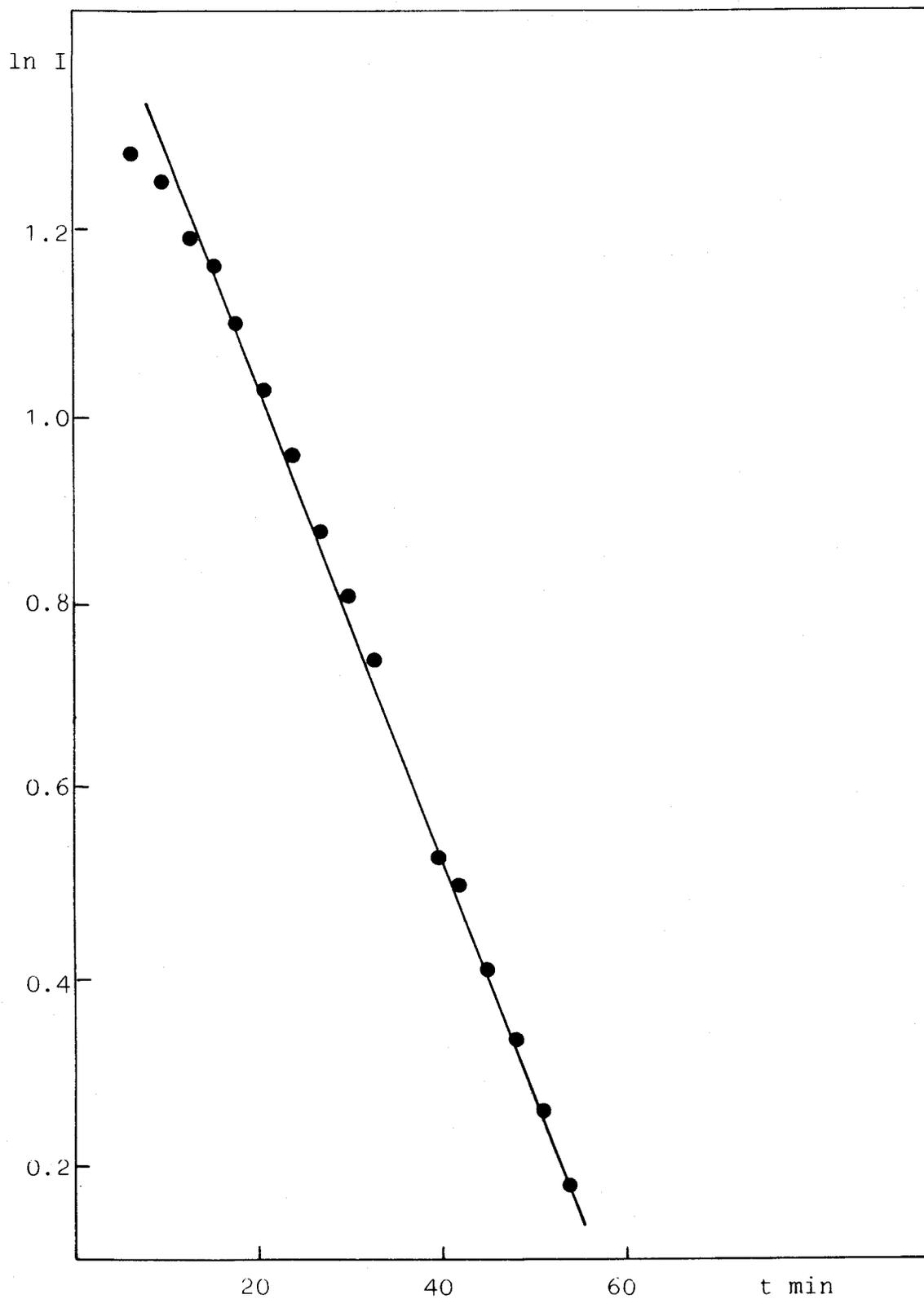
Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 83°C.

<u>t (min.)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
90		28,30	12,00
100		24,20	12,80
110		21,00	13,90
120	1,30	17,80	14,20
130		15,30	14,80
140		13,30	15,30
150		11,10	15,30
160	1,34	9,40	15,70
170		7,90	15,90
180		6,40	15,70
190		5,42	15,90
200	1,43	4,50	15,60
210		3,64	15,30
220		3,02	15,00
230		2,43	14,80
I _{blanco}	0,30	1,56	0,65



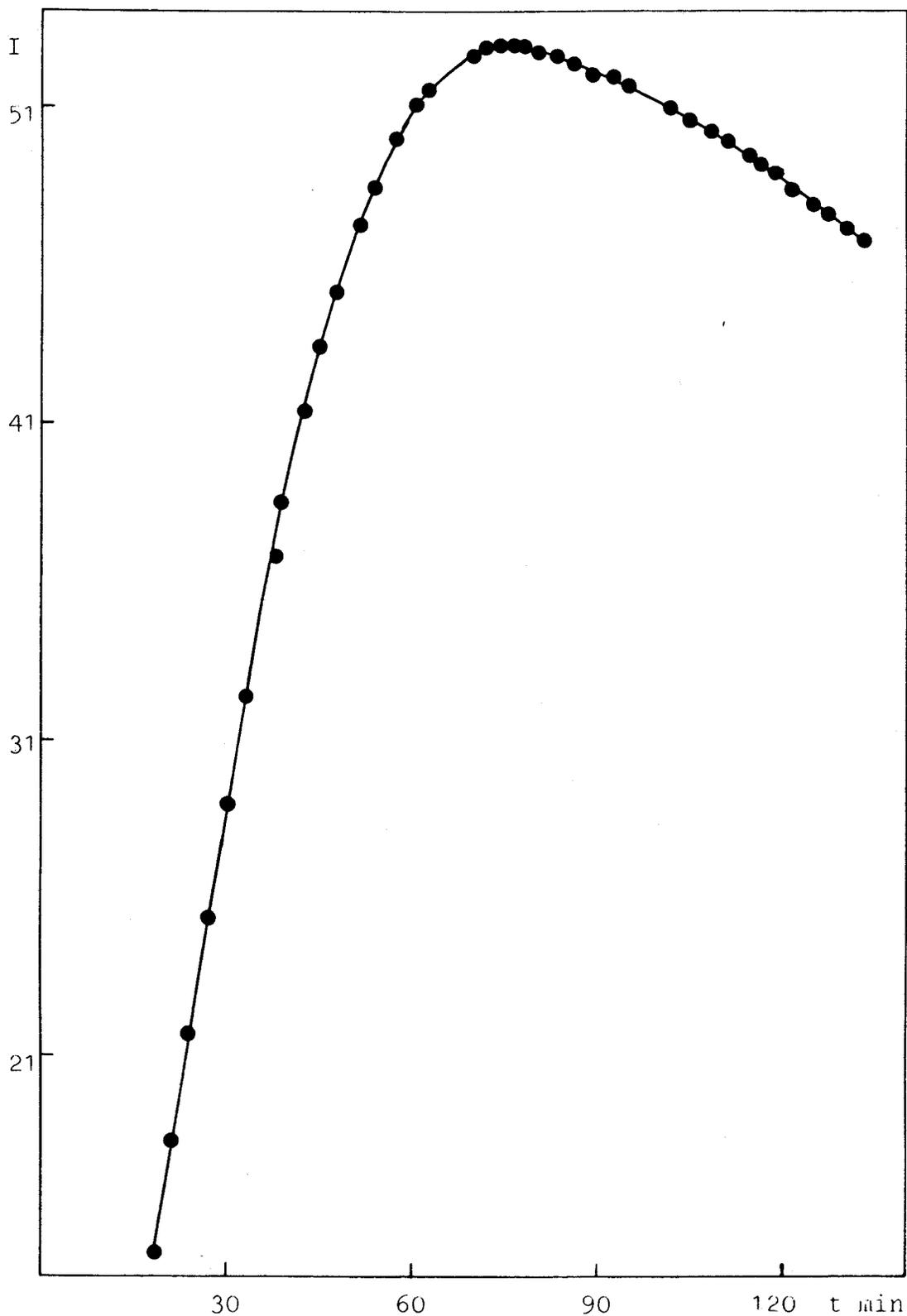
Variación de la intensidad relativa de fluorescencia de la Reserpina (R), 3,4- Dehidroreserpina (DR) y 3,4,5,6- Tetrahidroreserpina en la oxidación con peróxido de hidrógeno, a 65°C

- Figura 18 -



Variación de $\ln I$ frente al tiempo para la reserpina (R), a 65°C

- Figura 19 -



Variación de la intensidad de fluorescencia de la 3,4-Dehidroreserpina frente al tiempo, a 65°C

TABLA XVIII

Valores de las constantes de velocidad observadas de la oxidación de la reserpina, en disolución 5N de ácido acético, por el peróxido de hidrógeno a diferentes temperaturas.

$$|\text{H}_2\text{O}_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$|\text{Reserpina}| = 4,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

T (°C)	$k_1 \cdot 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$k_2 \cdot 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$
52°	0,88	0,25
60°	1,7	0,50
65°	2,4	0,65
70°	3,2	0,90
75°	4,7	1,0
83°	7,5	1,2

Error máximo estimado = $\pm 0,003$

TABLA XIX

Valores de $t_{\text{máx.}}$ y las correspondientes $I_{\text{máx.}}$ para las diferentes temperaturas.

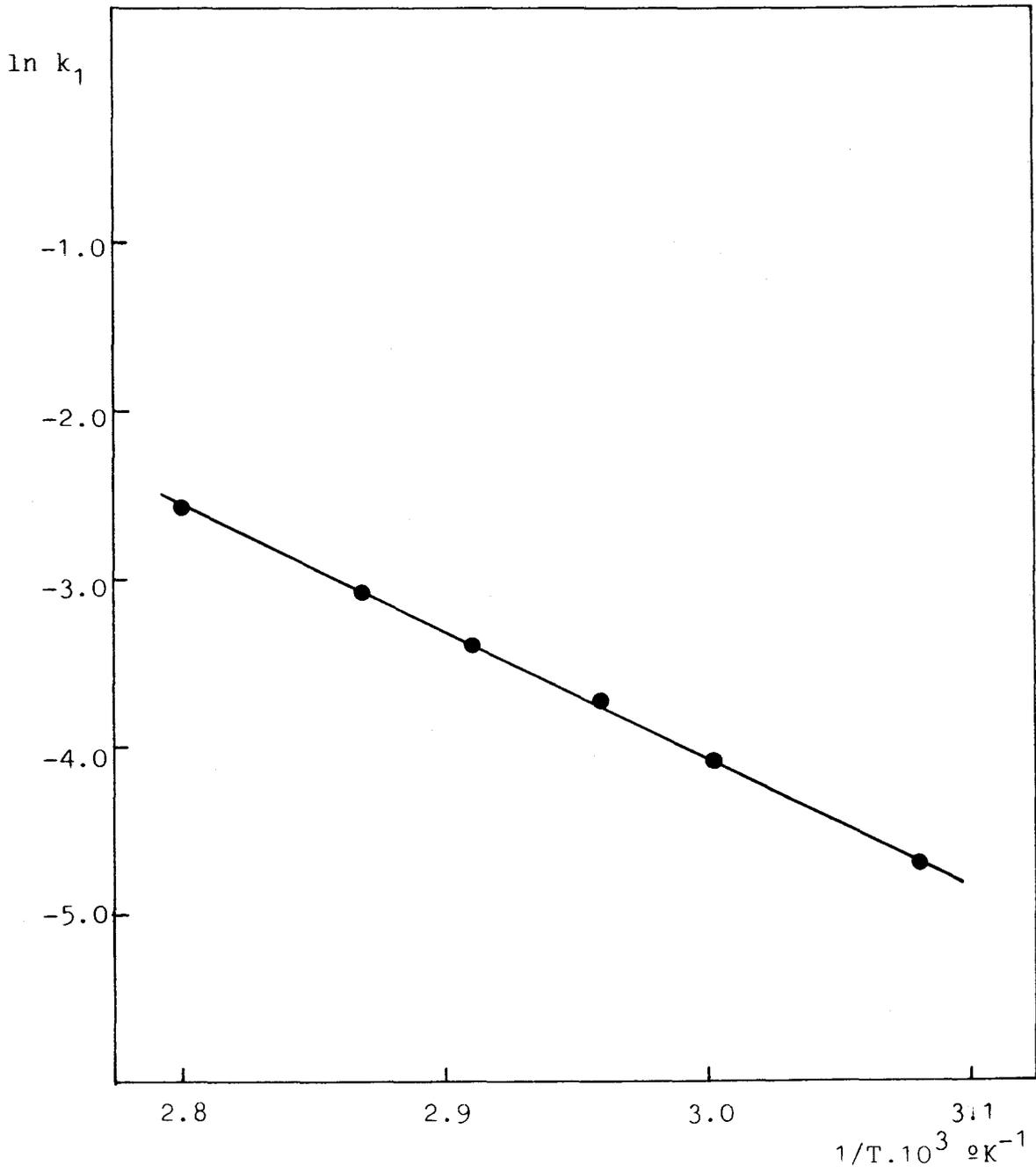
<u>T °C</u>	<u>t_{máx.} (min)</u>	<u>I_{máx.}</u>
52°	202	78,6
60°	102	67,1
65°	138	54,9
70°	55	56,7
75°	42	50,8
83°	29	49,3

TABLA XIX

Valores de $t_{\text{máx.}}$ y las correspondientes $I_{\text{máx.}}$ para las diferentes temperaturas.

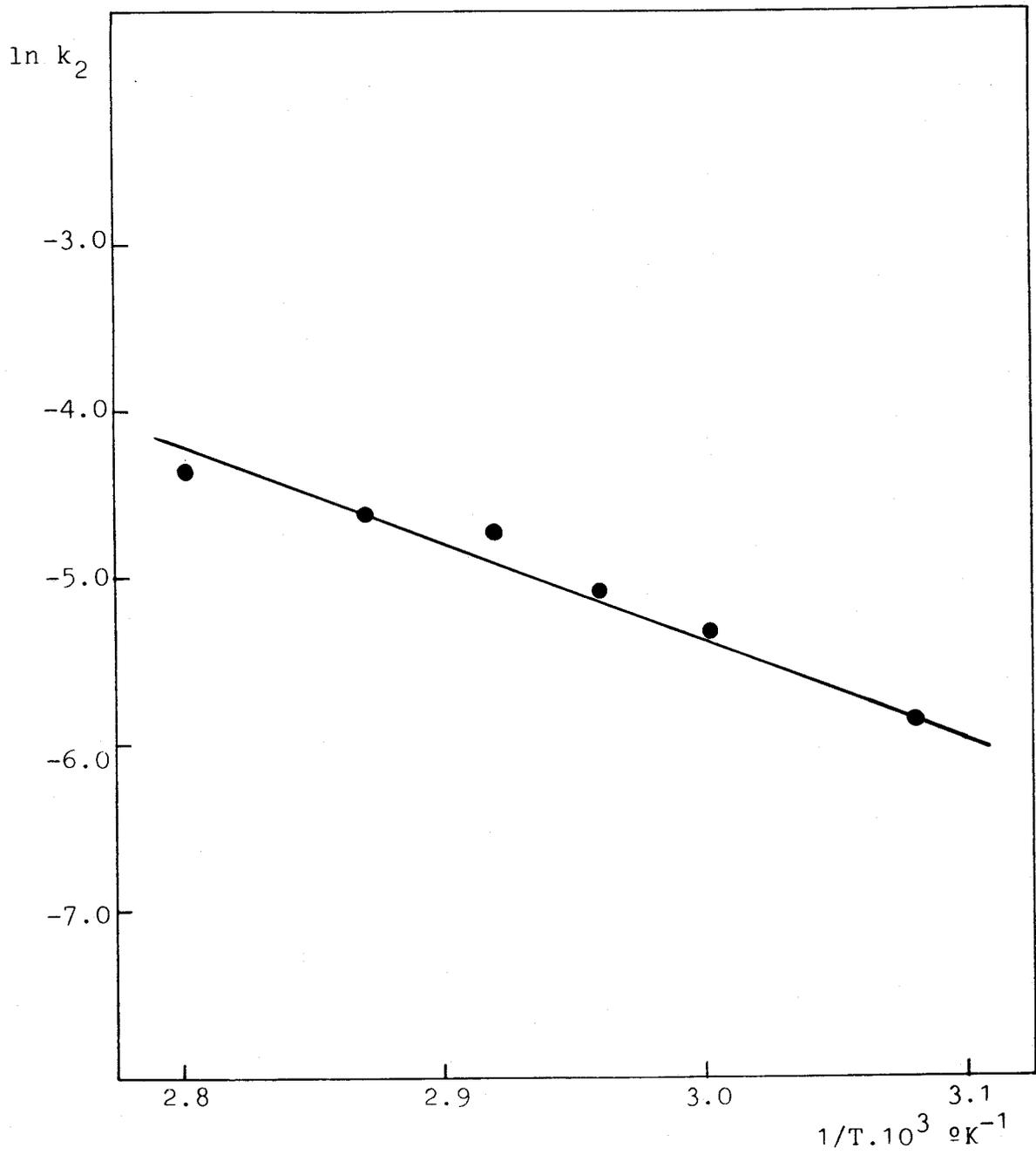
<u>T °C</u>	<u>t_{máx.} (min)</u>	<u>I_{máx.}</u>
52°	202	78,6
60°	102	67,1
65°	138	54,9
70°	55	56,7
75°	42	50,8
83°	29	49,3

- Figura 20 -



Variación de $\ln k_1$ frente a $1/T$

- Figura 21 -



Variación de $\ln k_2$ frente a $1/T$

TABLA XX

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 65°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$|\text{Reserpina}| = 1,03 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t(min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
7	3,50	1,40	0,96
10	3,43	2,00	0,95
13	3,40	2,78	0,97
16	3,37	3,57	0,96
19	3,35	4,50	0,98
22	3,25	5,40	1,00
28	3,10	6,94	1,02
31	3,06	7,69	1,02
34	3,01	8,45	1,03
37	2,95	9,08	1,07
40	2,91	9,66	1,08
43	2,83	10,30	1,10
46	2,81	10,60	1,12
49	2,74	11,00	1,13
52	2,71	11,40	1,15
55	2,67	11,60	1,20
58	2,61	11,90	1,22
61	2,59	12,00	1,24
64	2,57	12,10	1,25
67	2,52	12,20	1,29
70	2,49	12,30	1,32
73	2,38	12,30	1,31
76	2,40	12,30	1,34
79	2,40	12,30	1,38

TABLA XX (CONTINUACION)

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 65^oC.

<u>t (min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
82	2,36	12,30	1,40
85	2,36	12,20	1,42
88	2,31	12,10	1,44
91	2,33	12,10	1,48
94	2,27	12,00	1,50
97	2,24	11,90	1,53
100	2,23	11,90	1,55
103	2,21	11,80	1,63
106	2,15	11,70	1,63
109	2,13	11,70	1,63
112	2,10	11,60	1,68
115	2,05	11,50	1,70
118	2,06	11,40	1,69
136	1,97	10,90	1,90
142	1,98	10,60	1,93
148	1,93	10,40	1,99
154	1,86	10,30	2,04
160	1,88	10,10	2,08
166	1,80	10,00	2,18
172	1,80	9,82	2,20
178	1,79	9,65	2,23
184	1,76	9,42	2,32
190	1,73	9,21	2,34
196	1,71	9,02	2,40
202	1,69	8,80	2,47
208	1,66	8,69	2,51
I _{blanco}	2,30	0,66	0,50

TABLA XXI

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 65°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol. l}^{-1}$$

$$|Reserpina| = 2,05 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t (min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
6	4,95	2,82	1,00
9	4,71	4,05	1,03
12	4,59	5,48	1,05
15	4,53	7,08	1,07
18	4,39	8,71	1,08
21	4,28	10,60	1,10
27	4,15	13,70	1,15
30	3,93	15,10	1,17
33	3,89	16,60	1,20
36	3,72	17,90	1,22
39	3,65	19,10	1,26
42	3,52	20,40	1,32
45	3,48	21,30	1,34
48	3,40	22,00	1,36
51	3,31	22,90	1,41
54	3,25	23,50	1,46
57	3,19	23,70	1,52
60	3,14	23,90	1,62
63	3,10	24,20	1,63
66	3,10	24,50	1,70
69	3,07	24,60	1,75
72	3,01	24,60	1,78

TABLA XXI (CONTINUACION)

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina (R), 3,4-dehidroreserpina (DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina (TR), en ácido acético 5N a 65°C.

$$I_{\text{blanco}} = \begin{matrix} \text{(exc. 271nm} & \text{(exc. 400nm} \\ \text{2,30 em. 365nm)} & \text{0,66 em. 500nm)} \end{matrix}$$

<u>t (min)</u>	<u>I_R (exc. 271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc. 400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc. 330nm em. 420nm)</u>
75	2,98	24,60	1,78
78	2,95	24,60	1,89
81	2,94	24,60	1,94
87	2,78	24,40	2,02
90	2,82	24,20	2,09
93	2,71	24,10	2,14
96	2,75	23,90	2,16
99	2,71	23,80	2,25
102	2,69	23,60	2,31
105	2,68	23,50	2,35
108	2,64	23,30	2,42
111	2,66	23,20	2,50
114	2,62	23,00	2,52
117	2,59	22,70	2,59
135	2,50	21,20	2,90
141	2,36	20,80	2,96
147	2,31	20,50	3,08
153	2,35	20,20	3,20
159	2,28	19,80	3,25
165	2,29	19,40	3,42
171	2,22	19,00	3,50
177	2,23	18,70	3,65
183	2,20	18,30	3,77
189	2,10	17,80	3,82
195	2,30	17,60	3,96
201	2,10	16,90	3,97
207	2,11	16,60	4,05

TABLA XXII

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina (R), 3,4-dehidroreserpina (DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina (TR), en ácido acético 5N a 65°C.

$$|H_2O_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$|Reserpina| = 8,21 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

<u>t (min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
7	10,20	8,00	1,77
10	9,30	11,30	1,76
13	8,96	15,80	1,80
25	7,70	39,80	2,03
28	7,20	45,80	2,06
31	6,90	52,10	2,17
34	6,48	58,70	2,27
37	6,12	64,30	2,37
40	5,78	69,40	2,43
46	5,25	78,60	2,73
49	5,05	82,50	2,86
52	5,03	85,40	2,97
55	5,00	88,30	3,14
61	4,51	91,50	3,43
64	4,37	92,50	3,57
67	4,29	93,90	3,70
70	4,25	94,60	3,84
73	4,31	94,80	4,01
76	4,14	95,00	4,15
79	4,09	94,80	4,30
82	4,00	94,70	4,51
88	4,16	95,00	4,80
91	3,91	94,00	4,94
94	3,90	93,60	5,09

TABLA XXII (CONTINUACION)

Valores experimentales de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, para la reserpina(R), 3,4-dehidroreserpina(DR), y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina(TR), en ácido acético 5N a 65^oC.

<u>t(min)</u>	<u>I_R (exc.271nm em. 365nm)</u>	<u>I_{DR} (exc.400nm em. 500nm)</u>	<u>I_{TR} (exc.330nm em. 420nm)</u>
97	3,87	93,30	5,30
100	3,86	92,60	5,40
103	3,86	92,00	5,54
106	3,82	91,60	5,70
109	3,79	90,90	5,82
112	3,82	90,10	6,00
115	3,80	89,50	6,19
118	3,77	88,60	6,36
121	3,74	87,70	6,48
127	3,71	86,50	6,79
133	3,67	85,60	7,14
139	3,65	84,50	7,40
145	3,63	83,10	8,10
151	3,65	81,80	7,75
157	3,72	80,70	8,35
I _{blanco}	2,21	1,20	1,10

TABLA XXIII

Valores de las constantes de velocidad observadas de la oxidación de la reserpina, en disolución 5N de ácido acético, por el peróxido de hidrógeno a 65°C para diferentes concentraciones de reserpina.

$$|\text{H}_2\text{O}_2| = 0,088 \text{ mol.l}^{-1}$$

<u> Reserpina (mol.l⁻¹)</u>	<u>k₁ · 10² (min⁻¹)</u>	<u>k₂ · 10² (min⁻¹)</u>
1,03 · 10 ⁻⁷	2,3	0,70
2,05 · 10 ⁻⁷	2,1	0,75
4,10 · 10 ⁻⁷	2,4	0,65
8,21 · 10 ⁻⁷	2,3	0,60

Error máximo estimado = ± 0,003

5.- DISCUSION

- 5.1.- Espectros U.V. y de fluorescencia .
- 5.2.- Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia .
- 5.3.- Rendimientos cuánticos . Sensibilidad absoluta de fluorescencia .
- 5.4.- Amortiguación de la fluorescencia por el peróxido de hidrógeno .
- 5.5.- Cinética de la oxidación de la reserpina por el peróxido de hidrógeno .
- 5.6.- Influencia de la temperatura .
- 5.7.- Influencia de la concentración de reserpina .
- 5.8.- Indicación adicional .

5.1.- Espectros U.V. y de fluorescencia .

Los espectros U.V. de la reserpina en algunos disolventes han sido ya descritos en la bibliografía, (3) (4) (5) (6) .

Los valores encontrados por nosotros para los máximos de absorción coinciden perfectamente con los ya reseñados; lo mismo ocurre con los coeficientes de extinción molar (tablas I y VI) .

Como ya se ha indicado en el apartado 4.3.1

la fluorescencia nativa o directa de la reserpina ha sido estudiada por algunos autores en metanol y en ácido acético (10) (11) (12) (13) (14), pero todos ellos se limitan a dar los espectros no corregidos tanto de excitación como de emisión, o a señalar simplemente los máximos de excitación y de emisión. 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 las longitudes de onda, versiones fuertemente distorsionadas de los verdaderos espectros y pueden diferir considerablemente con los obtenidos en otros laboratorios con un instrumento diferente.

En las figuras 9-12 se indican los espectros no corregidos y corregidos de excitación y de fluorescencia de la reserpina en los disolventes utilizados. Como se puede observar las intensidades aumentan considerablemente en los espectros corregidos. Los de excitación no corregidos en metanol y etanol presentan el máximo de menor longitud de onda a menor intensidad que el máximo a mayor longitud de onda y precisamente ocurre lo contrario en los espectros corregidos. En todos los casos, los espectros corregidos de excitación coinciden bien con los espectros de absorción (figuras 1,2,3,4), tanto en la intensidad como en la longitud de onda de los máximos. En disolución 5N de ácido acético, se observa tanto en el espectro de absorción (figura 4) como en el espectro corregido de excitación (figura 12), que el máximo a la longitud de onda superior aparece en forma de hombro por estar solapado por la banda de menor longitud de onda, posiblemente debido a una mayor interacción entre las moléculas del disolvente y el heteroátomo (de hecho este disolvente presen

ta una constante dieléctrica superior a los demás) .

En lo que respecta al espectro de fluorescencia, es destacable en todos los casos un desplazamiento apreciable de Stokes y una pérdida en la estructura de la banda; esto se debe a que todos los disolventes empleados son muy polares . Debido a la insolubilidad de la reserpina en disolventes no polares, como por ejemplo en ciclohexano, no se pudo hacer el espectro en estos disolventes para una comparación . Este efecto se puede explicar (40) (41) debido a interacciones de la molécula excitada con las moléculas del disolvente . Es asimismo destacable que la reserpina emite a una longitud de onda notablemente superior al indol (40), presentando en cambio la absorción a longitudes de onda parecidas .

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

En la parte experimental se ha visto que para concentraciones bajas de alcaloide (hasta unos $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ aproximadamente) existe una proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración . Esto se puede explicar fácilmente . En efecto, según la ley de Lambert-Beer se tiene que, para radiaciones monocromáticas, se cumple:

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

donde I_0 es la intensidad incidente, I_t es la intensidad transmitida, ϵ es la absortividad molar, b el espesor en centímetros de la célula y c 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:

$$Q = \frac{I}{I_a}$$

donde I es la intensidad de fluorescencia. Por lo que:

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

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:

$$I = 2,3 \cdot Q \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot b \cdot c = \text{cte} \cdot c \quad -1-$$

que nos dice que para concentraciones bajas la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración. La figura 13 confirma esta proporcionalidad. El valor de ϵ para disoluciones de etanol a una longitud de onda de 295nm, vale (tabla VI) $10,8 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Por lo que para concentraciones de $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} = 8,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, el valor de ϵbc es igual a 0,08, que es del orden indicado anteriormente. En cambio, para concentraciones superiores, ya no existe tal proporcionalidad y los valores reales quedan por debajo de las teóricas (figura 13).

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 razona-

ble . El valor de I_1 es (42)

$$I_1 = \overline{I_{bl}} + k \cdot s_{bl}$$

donde $\overline{I_{bl}}$ es la media de las medidas del blanco, s_{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 (42):

$$c_1 = \frac{I_1 - \overline{I_{bl}}}{S} \quad -2-$$

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

$$S = \frac{dI}{dc}$$

y para concentraciones pequeñas (figura 13) 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% (42); 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% (42).

El valor obtenido para el límite de detección, 3 ng.ml^{-1} , es notablemente pequeño e indica 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 mínimo de fotones emitidos y el de absorbidos, 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 radiactivos en moléculas, para la correlación entre los tiempos de vida media observados y teóricos, para la evaluación de la pureza de sustancias, 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 Demas y Crosby (43) . Uno de los métodos más empleados (43) (44) (45), 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 (43) (44) siguiente:

$$Q_x = Q_r \cdot \frac{A_r(\lambda_r)}{A_x(\lambda_x)} \cdot \frac{I(\lambda_r)}{I(\lambda_x)} \cdot \frac{D_x}{D_r} \cdot \frac{n_x^2}{n_r^2} \quad -3-$$

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(λ) es la absorbancia por centímetro de la disolución a la longitud de onda de excitación . I(λ) es la in

tensidad de la radiación de excitación a la longitud de onda .
 D es el área bajo el espectro corregido de emisión y n es el va--
 lor medio del índice de refracción de la disolución en la emisión.

Los espectros de fluorescencia corregidos pa--
 ra la sustancia de referencia y para la reserpina se midieron con
 las mismas anchuras de rendijas y a la misma longitud de onda (vea
 se parte experimental, apartado 4.3.3), 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 (43) (vease
 parte experimental, tabla IX, donde se observa que las absorban--
 cias son del orden indicado y además iguales para la misma longi--
 tud de onda de 300nm) . Las áreas, D , bajo los espectros se calcu
 laron de la forma indicada en la parte experimental . No se hizo
 ninguna corrección para los índices de refracción . Se estimó (46)
 que los índices de refracción de los disolventes de referencia y
 problema no diferían apreciablemente .

El sulfato o el bisulfato de quinina en ácido
 sulfúrico 0,1N o 1,0N se ha descrito como un standard muy adecuado
 (43) y su rendimiento cuántico es prácticamente constante en la re
 gión de 200 a 400 nm (43) (47) . Se tomó el valor propuesto por Mel
 huish (48) .

Para evitar la amortiguación ("Quenching") de--
 bida al oxígeno disuelto y una posible oxidación inducible fotoquí
 micamente, se burbujeó nitrógeno a los disolventes .

Para comprobar este método de cálculo del ren--
 dimiento 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 (44) .

Los rendimientos cuánticos fueron determinados en etanol, por ser un disolvente conveniente para determinaciones analíticas, y en ácido acético 5N, porque en este disolvente se estudia posteriormente la oxidación de la reserpina .

La sensibilidad absoluta de fluorescencia indicada en la tabla X se calculó de acuerdo a cómo fué definida por Parker y Rees (44) . El producto $Q \cdot \epsilon$, donde Q es el rendimiento cuántico y ϵ 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 (44), una unidad práctica para ϵ es la absorbancia por centímetro para una concentración de $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. 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 X), son naturalmente menores que los correspondientes a sustancias muy fluorescentes como sulfato de quinina, rodamina B, fluoresceína, antraceno, etc. (44), pero son superiores a algunos otros alcaloides de la Rauwolfia tales como rescinamina, ajmalicina, reserpilina, etc. (49) .

5.4.- Amortiguación de la fluorescencia por el peróxido de hidrógeno .

La figura 16 indica una dependencia lineal entre I_0/I y la concentración de peróxido de hidrógeno . Esto indica que se cumple la conocida ecuación de Stern-Volmer, aplicable

para la cinética de amortiguación de la fluorescencia en solución, y que es:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} |q| \quad -4-$$

donde I_0 es la intensidad de fluorescencia en ausencia de amortiguador, I es la intensidad de fluorescencia en presencia de amortiguador, $|q|$ es la concentración de amortiguador, K_{SV} es la constante de Stern- Volmer .

Por otra parte, la constante de Stern-Volmer vale:

$$K_{SV} = k_q \cdot \tau \quad -5-$$

donde k_q es la constante de velocidad para la desactivación de la reserpina excitada, y τ el tiempo de vida media del estado excitado .

Al no disponer del valor de τ para la reserpina (su determinación experimental exige una sofisticada instrumentación de la que carecemos), no es posible evaluar el valor de la constante cinética que indicaría el tipo de proceso de desactivación .

5.5.- Cinética de la oxidación de la reserpina por el peróxido de hidrógeno .

En los ensayos previos de la oxidación de la reserpina por el peróxido de hidrógeno, se observó que aparecía un producto fluorescente con un máximo de excitación a 388nm y un máximo de emisión a 495nm, que corresponde a la 3,4-dehidroreser-

pina (12) . Una oxidación más prolongada origina un nuevo producto cuyas características fluorimétricas son $\lambda_{exc.} = 330\text{nm}$, $\lambda_{em.} = 435\text{nm}$ que corresponden a la 3,4,5,6-tetradehidroreserpina (12) . En dichos ensayos previos se observó así mismo que esta reacción era muy lenta a la temperatura ambiente, por ello se efectuó un estudio cinético a temperaturas más elevadas .

La formación, mediante esta oxidación, de los dos compuestos citados indica que se trata de una reacción compleja . Sin embargo, la espectrofluorimetría nos brinda la oportunidad de seguir el curso de la citada reacción de una manera especialmente interesante porque se puede medir, en función del tiempo, la variación de la concentración de la reserpina, 3,4-dehidroreserpina y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina; ya que las longitudes de onda de excitación y de emisión están suficientemente separadas y la técnica espectrofluorimétrica es muy sensible, aún operando con concentraciones muy bajas necesarias para que exista proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración (vease ecuación -1-) . Las concentraciones iniciales de reserpina empleadas oscilan entre $1 \cdot 10^{-7}$ a $8 \cdot 10^{-7}$ M aproximadamente, que están muy por debajo de la concentración máxima ($8 \cdot 10^{-6}$ M) para la cual la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración (vease apartado 4.3.2) . Es evidente, que las concentraciones de la 3,4-dehidroreserpina y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina que se van originando, son aún mucho más pequeñas . Esta misma reacción es imposible de seguir espectrofotométricamente, aún operando con concentraciones notablemente superiores . La técnica espectrofotométrica permite medir la disminución de la reserpina, pero no la aparición de los productos de oxidación .

Con objeto de evitar en lo posible el solapamiento de la fluorescencia de las tres sustancias implicadas en la reacción, las longitudes de onda tanto de excitación como de emisión elegidas fueron:

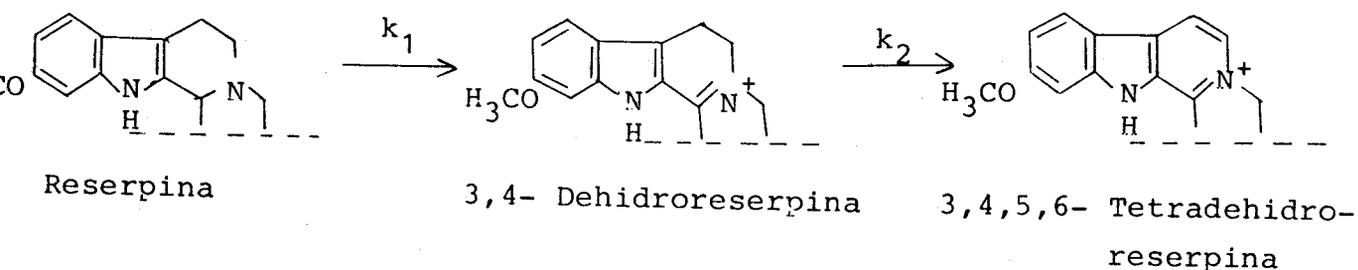
para la reserpina $\lambda_{exc.} = 271\text{nm}$, $\lambda_{em.} = 365\text{nm}$

para la 3,4-dehidroreserpina $\lambda_{exc.} = 400\text{nm}$, $\lambda_{em.} = 500\text{nm}$

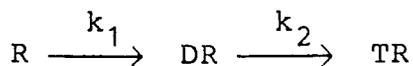
para la 3,4,5,6-tetradehidroreserpina $\lambda_{exc.} = 330\text{nm}$, $\lambda_{em.} = 420\text{nm}$

que como se observa están muy próximos a los máximos correspondientes .

La disminución de la intensidad de fluorescencia de la reserpina en función del tiempo (curva R, figura 17), así como la variación del logaritmo de dicha intensidad también en función del tiempo (figura 18), indican que en las condiciones en que se realiza la oxidación, la reacción es de primer orden con respecto a la reserpina . Por otra parte, la intensidad de fluorescencia de la 3,4-dehidroreserpina aumenta con el tiempo, para alcanzar un valor máximo, y disminuye posteriormente (figura 17, curva DR) . Finalmente, la curva de la 3,4,5,6-tetradehidroreserpina (figura 17, curva TR), empieza aumentando lentamente tendiendo a un valor máximo . Todo ésto, sugiere que el esquema general de este proceso puede ajustarse al de reacciones consecutivas:



O de forma simplificada:



donde las constantes k_1 y k_2 son, con rigor, constantes globales observadas de pseudoprimer orden, puesto que se opera con un gran exceso de peróxido de hidrógeno .

Las ecuaciones cinéticas correspondientes a la reacción consecutiva son las siguientes:

$$|R| = |R|_0 \cdot e^{-k_1 \cdot t} \quad -6-$$

$$|DR| = |R|_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot (e^{-k_1 \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t}) \quad -7-$$

$$|TR| = |R|_0 \cdot \left(1 - \frac{k_2}{k_2 - k_1} \cdot e^{-k_1 \cdot t} + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot e^{-k_2 \cdot t} \right) \quad -8-$$

donde $|R|$, $|DR|$ y $|TR|$ son las concentraciones de reserpina, 3,4-dehidroreserpina y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina en el tiempo t , $|R|_0$ es la concentración inicial de la reserpina; e es la base de los logaritmos neperianos y k_1 y k_2 son las constantes cinéticas indicadas en el esquema anterior .

La ecuación -6-, se puede poner de la forma:

$$\ln \frac{|R|}{|R|_0} = -k_1 \cdot t \quad -9-$$

Como se ha indicado ya, en las condiciones de operación, a bajas concentraciones de reserpina, existe proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración (ecuación -1-), por lo que se tendría:

$$I_{OR} = \text{cte. } |R|_0$$

-10-

$$I_R = \text{cte. } |R|$$

donde I_{OR} e I_R representan las intensidades relativas de fluorescencia iniciales (tiempo 0) y en el tiempo t respectivamente, a las que se ha restado el valor de las intensidades del blanco .

Sustituyendo las ecuaciones -10- en la ecuación -9-, se obtiene finalmente:

$$\ln I_R = \ln I_{OR} - k_1 \cdot t \quad -11-$$

que indica que la representación gráfica de $\ln I_R$ frente al tiempo es una recta de pendiente $-k_1$. La figura 18 confirma esta linealidad a 65°C y de la pendiente de la misma se obtiene el valor de k_1 a esa temperatura . Procediendo de la misma manera se obtienen los valores de la constante cinética para el resto de las temperaturas (tabla XVIII) .

El cálculo de k_2 se puede efectuar fácilmente, derivando la ecuación -7- e igualando a cero para obtener las condiciones del máximo; el resultado es:

$$t_{\text{máx.}} = \frac{\ln \frac{k_1}{k_2}}{k_1 - k_2} \quad -12-$$

donde $t_{\text{máx.}}$ es el tiempo que transcurre hasta que la concentración de la 3,4-dehidroreserpina alcanza el valor máximo; o bien el tiempo en el que la intensidad relativa de fluorescencia de la 3,4-dehidroreserpina alcanza el citado valor máximo, puesto que

para esta sustancia también existirá naturalmente proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración . Obsérvese que la concentración máxima de 3,4-dehidroreserpina que se alcanza será menor que la inicial de reserpina . Este valor máximo se obtiene finalmente llevando la ecuación -12- a la -7-, el resultado es:

$$|DR|_{\text{máx.}} = |R|_0 \cdot \left(\frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}} \quad -13-$$

Conocido el valor de k_1 y de $t_{\text{máx.}}$ la, ecuación -12- permite obtener el valor de k_2 (tabla XVIII) .

Se observa en la citada tabla (XVIII), que para todas las temperaturas el valor de k_1 es notablemente superior al de k_2 .

5.6.- Influencia de la temperatura .

La ecuación de Arrhenius que relaciona la constante de velocidad con la temperatura es:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}} \quad -14-$$

donde k es la constante de velocidad, A es el factor de frecuencia, E la energía de activación, T la temperatura en $^{\circ}\text{K}$, y R la constante de los gases . Esta ecuación se puede poner de la forma siguiente:

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{RT} \quad -15-$$

La representación gráfica de $\ln k$ frente a $1/T$ da una línea recta de cuya pendiente se evalúa la energía de activación .

La figura 20 indica que para la constante k_1 se cumple muy bien la ecuación de Arrhenius . La figura 21, indica que para la constante k_2 se cumple razonablemente bien esta ecuación . Se observa que la energía de activación es notablemente superior para la transformación de la reserpina en 3,4-dehidroreserpina, que para la formación de la 3,4,5,6-tetradehidroreserpina a partir de 3,4-dehidroreserpina .

5.7.- Influencia de la concentración de reserpina .

Para comprobar que la reacción es de pseudo-primer orden con respecto a la reserpina, se ha estudiado a una temperatura, 65°C , y manteniendo constante y en exceso la concentración de peróxido de hidrógeno, la posible influencia de la concentración del alcaloide . Los valores encontrados para las constantes k_1 y k_2 , recopilados en la tabla (XXIII), obtenidos para las distintas concentraciones de reserpina ensayadas, indican que tanto k_1 y k_2 permanecen prácticamente constantes, lo cual demuestra que la reacción es, efectivamente, de primer orden .

5.8.- Indicaciones adicionales .

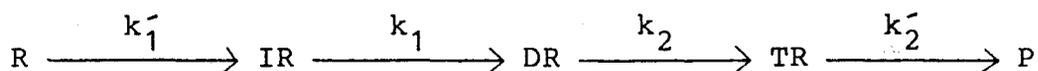
En la figura 17, así como la tabla (XIV) que contiene los datos experimentales correspondientes a la temperatu

ra de 65^oC, se observa que la intensidad relativa de fluorescencia para la 3,4,5,6-tetradehidroreserpina aumenta lentamente, llega a un valor máximo, en el que permanece largo tiempo, y posteriormente tiende a disminuir muy lentamente. Lo mismo se puede observar en las tablas (XVI-XVII) que contienen los datos para 75^o y 83^oC (para el resto de las temperaturas no se tomaron datos para la 3,4,5,6-tetradehidroreserpina). Esto sugiere que la reacción continúa, pero de forma muy lenta para formar un ulterior producto que probablemente implica una profunda destrucción de la molécula. En todo caso, por las razones aludidas, la correspondiente constante cinética de este último paso sería muchísimo más pequeña que k_2 , por lo que prácticamente no influiría en los valores encontrados para k_1 y k_2 .

En la figura 17 se observa para la curva correspondiente a la reserpina R, que para tiempos pequeños, correspondientes al comienzo de la reacción los valores de la intensidad de fluorescencia disminuyen más lentamente a como lo hacen posteriormente. Así mismo, la curva correspondiente a la formación de la 3,4-dehidroreserpina, DR, presenta para el citado comienzo de la reacción un cambio en la curvatura. Esto sugiere que existe un pequeño periodo de inducción que probablemente supone la formación de un intermediato del oxidante con la reserpina con propiedades fluorescentes prácticamente idénticas a las de la propia reserpina, pero que se forma muy rápidamente. Actualmente se está estudiando la influencia de la concentración del peróxido de hidrógeno y de la concentración protónica en la reacción de oxidación con objeto de obtener más información sobre es-

te aspecto y sobre el mecanismo de la oxidación .

A título provisional se puede postular un esquema más completo al discutido, tal como:



donde R, DR y TR son, como anteriormente se ha indicado, reserpina, 3,4-dehidroreserpina y 3,4,5,6-tetradehidroreserpina , IR sería el intermediato y P el producto o productos finales de la oxidación . En todo caso, con los datos que poseemos es evidente que $k_1' \gg k_1$ y $k_2' \ll k_2$, por lo que no influyen apreciablemente en los valores obtenidos por nosotros para k_1 y k_2 .

6.- CONCLUSIONES

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

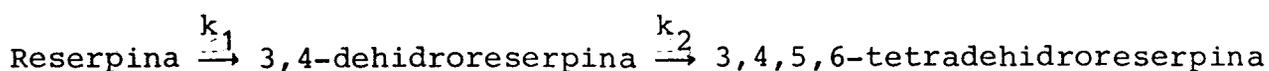
2.- Se ha encontrado una dependencia lineal entre la intensidad de fluorescencia de la reserpina en etanol y la concentración hasta concentraciones de $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ($8,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol}.\text{l}^{-1}$).

A partir de esta curva de calibración, se determinó el límite de detección, encontrándose un valor de 3 ng.ml^{-1} .

3.- Se han calculado los rendimientos cuánticos de fluorescencia de la reserpina en etanol y en ácido acético 5N. Los valores encontrados son 0,050 y 0,044 respectivamente. Así mismo, se ha evaluado la sensibilidad absoluta de fluorescencia de la reserpina en etanol. Los valores encontrados son 0,0013 para la sensibilidad de fluorescencia de la banda completa y 0,0029 para la sensibilidad de fluorescencia del pico de emisión.

4.- Se ha constatado que el peróxido de hidrógeno amortigua la fluorescencia de la reserpina en disolución de ácido acético, determinándose la constante de Stern-Volmer, y el valor encontrado es $1,05 \text{ l.mol}^{-1}$.

5.- La oxidación de la reserpina en disolución de ácido acético 5N por el peróxido de hidrógeno, se ajusta a una cinética de reacciones consecutivas, de acuerdo con el siguiente esquema:



Determinándose los valores de las constantes k_1 y k_2 , operando con exceso de oxidante, a las temperaturas de 52° , 60° , 65° , 70° , 75° y 83°C .

6.- A partir de la dependencia de las constantes k_1 y k_2 con la temperatura se han evaluado las correspondientes energías de activación. Los resultados son:

66,5 KJ.mol⁻¹ para la transformación de la reserpina a 3,4-dehidroreserpina .

46 KJ.mol⁻¹ para la transformación de la 3,4-dehidroreserpina a 3,4,5,6-tetradehidroreserpina .

7.- BIBLIOGRAFIA

- (1) Woodson, R.E., Younken, H.W., Schlitter, E. y Schneider, J.A., Little, Brown, Boston (1957).
Ref.: Takern Higuchi y Einar Brochmann-Hansten (Ed.), Interscience, Nueva York (1961).
- (2) Clarke, E.G.C., vol. 1, Pharmaceutical Press, London (1969).
- (3) Mueller, J.M., Schlitter, E. y Bein, H.J., *Experientia*, 8, 338, (1952).
- (4) Dorfman, L., Furlenmeier, A., Huebner, C.F., Lucas, R., Mac Phillamy, H.B., Mueller, J.M., Schlittler, E., Schwyzer, R., y St. André, A.F., *Helv.Chim.Acta*, 37, 59, (1954).

- (5) Furlenmeier, A., Lucas, R., Mac Phillamy, H.B., Mueller, J.M., y Schlittler, E., *Experientia*, 9, 331, (1953).
- (6) Neuss, N., Boaz, H.E., y Forbes, J.W., *J.Am.Chem.Soc.*, 76, 2463, (1954).
- (7) Mc. Mullen et al., *J.Am.Pharm.Assoc.Sci.Ed.*, 44, 446, (1954).
- (8) Szalkowski, C.R., y Mader, W.J., *J.Am.Pharm.Assoc.Sci.Ed.*, 45, 613, (1956).
- (9) Banes, D., *J.Am.Pharm.Assoc.Sci.Ed.*, 46, 601, (1957).
- (10) Udenfriend, S., Duggan, D.E., Vasta, B.M., y Brodie, B.B., *J.Pharmacol.Exptl.Therap.*, 120, 26, (1958).
- (11) Udenfriend, S., vol. 1, Academy Press, New York, (1962).
- (12) Haycock, Sheth y Mader, *J.Am.Pharm.Assoc.Sci.Ed.*, 48, 479, (1959).
- (13) Jung, Z., y Jungová, M., *Cesk.Farm.*, 22, 195, (1973).
- (14) Radejová, E., Parrák, V. y Ciranová, O., *Farm.Obz.*, 46, 369, (1977).
- (15) Haycock, R.P. y Mader, W.J., *J.Am.Pharm.Assoc.Sci.Ed.*, 46, 744, (1957).
- (16) "United States Pharmacopeia", 17th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1965).
- (17) Mader, W.J., Haycock, R.P., Sheth, P.B. y Conolly, R.J., *J.Assoc.Offic.Agr.Chemists*, 43, 291, (1960).
- (18) Mader, W.J., Haycock, R.P., Sheth, P.B., Conolly, R.J. y Shapoe, P.M., *J.Pharm.Sci.*, 44, 13, (1961).
- (19) Mader, W.J., Papariello, G.J. y Sheth, P.B., *J.Pharm.Sci.*, 45, 589, (1962).
- (20) Haycock, R.P., Sheth, P.B., Higuchi, T., Mader, W.J. y Papariello, G.J., *J.Pharm.Sci.*, 55, 826, (1966).

- (21) Kabadi, B.N., Warren, A.T. y Newman, C.H., *J.Pharm.Sci.*, 58, 1127, (1969).
- (22) Smith, W.M. y Clark, C.C., *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, 59(4), 811, (1976).
- (23) Kabadi, B.N., *J.Pharm.Sci.*, 60, 1862, (1971).
- (24) Galiana, A., Quintero, B. y Sánchez, M., *Pharmacia Mediterránea*, XIII, 745, (1980).
- (25) Martinez, M.I., Quintero, B., Sánchez, M. y Thomas, J., *An.Real Acad.Farm.*, 46, 167, (1980).
- (26) Stainier, R., *Il Farmaco Ed.Pr.*, 3(24), 167, (1969).
- (27) Stainier, R., *Il Farmaco Ed.Pr.*, 12(26), 753, (1971).
- (28) Urbányi, T. y Stober, H., *J.Pharm.Sci.*, 59, 1824(1970).
- (29) Barkan, S., *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, 55, 149, (1972).
- (30) Urbányi, T. y Stober, H., *J.Assoc. Off.Anal.Chem.*, 55, 180, (1972).
- (31) Stainier, R., *J.Pharm.Belg.*, 28, 115, (1973).
- (32) Stainier, R., Husson, H.P. y Lapière, C.L., *J.Pharm.Belg.*, 28, 307, (1973).
- (33) Kreienbaum, M.A., *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, 59(2), 289, (1976).
- (34) Smith, W.M., *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, 60(5), 1018, (1977).
- (35) Wright, G.E. y Tang, T.Y., *J.Pharm.Sci.*, 61, 299, (1972).
- (36) Jakovljevic, I.M., Fose, J.M. y Kuzel, N.R., *Anal.Chem.*, 34, 410, (1962).
- (37) Dechene, E.B., *J.Am.Pharm.Assoc.Sci.Ed.*, 44, 6571, (1955).
- (38) Chiang, H.C. y Chen, W.F., *J.Pharm.Sci.*, 52, 808, (1963).
- (39) Sprince, H. y Rowly, G.R., *Science*, 125, 25, (1957).
- (40) Berlman, I.B., Academic Press, New York, (1971).
- (41) Eisinger, J. y Navon, G., *J.Chem.Phys.*, 50, 2069, (1969).

- (42) "International Union of Pure and Applied Chemistry", Anal. Chem., 48, 2294, (1976).
- (43) Demas, J.N. y Crosby, G.A., J.Phys.Chem., 75, 99, (1971).
- (44) Parker, C.A. y Ress, W.T., Analyst, 85, 587, (1960).
- (45) Torra Vinyals, C., Afinidad, XXX, 613, (1973).
- (46) Weast, R.C., Astle, M.J.(eds.), "CRC Handbook of Chemistry and Physics" 63rd edition. CRC Press, Inc.
- (47) Gill, J.E., Photochem.Photobiol., 9, 313, (1969).
- (48) Melhuish, W.H., J.Phys.Chem., 65, 229, (1961).
- (49) Hidalgo, J., Tejeda, P.P., Muñoz, M.A., Maestre, A., Balon, M. y Sánchez, M., Pharm. Acta Helv., en prensa.

8.- APENDICES

8.1.- Apéndice 1 .

8.2.- Apéndice 2 .

8.1.- Apéndice 1

Programa para el cálculo de las áreas realizado por los Drs. D. Emilio Roldán González y D. Domingo González Arjona .

FLUORINT

```

L.
2REM REGISTRO DE ESPECTROS DE FLUORESCENCIA E INTEGRACION
3P. $12;B=#B800;T#B800=#50;H=#B809;D=#B800
5IN."INICIO DE BARRIDO (NM) "L.P."
6IN."AMPL. BARRIDO (NM) "N;DIM MMCH);K01 (FDIMMMCH)
77#80=H
10DIMVV9;P.$21
15F.I=@T01;P=#2800
20C
21LDY00
22:VV0 LDY00
23:VV1 LDA@#03;STA#
24CPX00;BEQVV4
25:VV2 LDA@#20
26:VV3 BITD;BEQ VV3
27INX;CPX@20;BNEVV1
28INY;CPY#20;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;J
61N.
70P.$6
75LINK#2800
80P.$7
90F.I=@TON;MMCI)=I*#3900#100+I*#3B00#10+I*#3A00
95%MMCI)=MMCI)/6;N.
98CLEAR4;F.I=1TON
100PLOT13,I,%MMCI);N.
105F.I=@TON 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+(MMCI)+MMCI+1)/2;N.;P.$12
140P."";P."AREA = "S
150LINK#FFE3
160P.$12
170FOR I=C TO D;J=I+L.P.J;MMCI);LINK#FFE3;N. LINK#FFE3
180P.$12;P."DESEA VOLVER A INTEGRAR(S/N) "
185IN.$K;IFI=0=CH"3";G.38
190END

```

8.2.- Apéndice 2 .

Programa de ajuste polinomial para el cálculo de la intensidad relativa de fluorescencia máxima y del tiempo máximo, realizado por los Drs. D. Emilio Roldán González y D. Domingo González Arjona .

```

10 HOME : PRINT TAB( 9)" *****"
20 PRINT TAB( 9)" *REGRESION POLINOMIAL*"
30 PRINT TAB( 9)" *****"
35 GOTO 1000
40 PRINT : HOME
50 PRINT "GRADO DEL POLINOMIO ";
60 INPUT D
70 PRINT : PRINT
80 PRINT "NUMERO DE PUNTOS ";
90 INPUT N: PRINT
100 DIM X(2 * N),Y(2 * N),W(2 * N),Z(2 * N)
105 DIM A(2 * N),T(2 * N),R(2 * N,2 * N)
110 IF N - D < 2 THEN 80
120 A(1) = N
130 PRINT : PRINT : PRINT
132 INPUT "VARIABLE X= ";X$: PRINT : INPUT "VARIABLE Y= ";Y$: PRINT
140 FOR I = 1 TO N
150 PRINT "X(*;I;")= ";
160 INPUT X:X(1) = X
170 PRINT "Y(*;I;")= ";
180 INPUT Y:Y(1) = Y
190 NEXT I
195 HOME : GOTO 1000
200 FOR J = 2 TO 2 * D + 1:A(J) = 0: NEXT J: FOR K = 1 TO D + 2:T(K) = 0: NEXT K: FOR I = 1 TO N
210 FOR K = 1 TO D + 1: FOR J = 1 TO D + 2:R(K,J) = 0: NEXT J: NEXT K
220 FOR J = 2 TO 2 * D + 1
230 A(J) = A(J) + X(1) ^ (J - 1): NEXT J
240 FOR K = 1 TO D + 1
250 R(K,D + 2) = T(K) + Y(1) * X(1) ^ (K - 1)
260 T(K) = T(K) + Y(1) * X(1) ^ (K - 1): NEXT K
270 T(D + 2) = T(D + 2) + Y(1) ^ 2: NEXT I
280 FOR J = 1 TO D + 1: FOR K = 1 TO D + 1
290 R(J,K) = A(J + K - 1): NEXT K: NEXT J
300 FOR J = 1 TO D + 1: FOR K = J TO D + 1
310 IF R(K,J) < > 0 THEN 350
320 NEXT K

```

```

330 PRINT " NO SOLUCION UNICA "
340 END
350 FOR I = 1 TO D + 2: S = R(J,I): R(J,I) = R(K,I): R(K,I) = S: NEXT I
360 Z = 1 / R(J,J): FOR I = 1 TO D + 2: R(J,I) = R(J,I) * Z: NEXT
370 FOR K = 1 TO D + 1: IF K = J THEN 390
380 Z = - R(K,J): FOR I = 1 TO D + 2: R(K,I) = R(K,I) + Z * R(J,I): NEXT I
390 NEXT K: NEXT J
395 HOME
400 PRINT : PRINT : PRINT "          CONSTANTE = ";
410 PRINT R(1,D + 2)
420 FOR J = 1 TO D
430 PRINT : PRINT "COEFICIENTE DE GRADO "; J; " = ";
440 PRINT R(J + 1,D + 2): NEXT : PRINT
450 P = 0: FOR J = 2 TO D + 1: P = P + R(J,D + 2) * (T(J) - A(J) * T(1) / N): NEXT J
460 Q = T(D + 2) - T(1) * 2 / N: Z = Q - P: I = N - D - 1: H = P / Q: PRINT
470 PRINT : PRINT "COEF. DE CORRELACION = "; SQR ( ABS ( H )): PRINT
480 PRINT "DESVIACION STANDARD = "; SQR ( Z / I ): PRINT : PRINT
481 IF F = 1 GOTO 728
482 GET A$: HOME : GOTO 1000
487 HOME : PRINT
490 INPUT "INTERPOLACION (S/N)"; U$
500 IF U$ = "N" THEN HOME : GOTO 1000
505 HOME
510 PRINT : P = R(1,D + 2): PRINT "X = ";
520 INPUT X: FOR J = 1 TO D: P = P + R(J + 1,D + 2) * X * J: NEXT J: PRINT : PRINT : PRINT "Y = "; P
530 PRINT : PRINT : PRINT : GOTO 490
540 HOME : PRINT : INPUT "ABSCISA MINIMA = "; XN: PRINT : INPUT "ORDENADA MINIMA = "; YN: PRINT : INPUT "ORDENADA MAXIMA = "; YX
550 HOME : HGR2 : FOR I = 1 TO N: W(I) = 2 + 275 * (X(I) - XN) / (XX - XN): Z(I) = 185 * (Y(I) - YN) / (YX - YN): GOSUB 770: NEXT I
560 HPLLOT 0,0 TO 278,0 TO 278,190 TO 0,190 TO 0,0
570 FOR I = XN TO XX STEP (XX - XN) / 275: P = R(1,D + 2): FOR J = 1 TO D: P = P + R(J + 1,D + 2) * I * J: NEXT J
580 IF P < YN THEN P = YN
590 T = 275 * (I - XN) / (XX - XN): U = 185 * (P - YN) / (YX - YN)
610 IF U > 189 THEN U = 190
620 HPLLOT 2 + T,190 - U: NEXT
622 PRINT CHR$ (7): PRINT CHR$ (7)
625 GET T$: TEXT : HOME : GOTO 1000
690 PRINT : INPUT "IMPRESION ? (S/N) "; X$: IF X$ = "N" THEN 740
700 D$ = CHR$ (13) + CHR$ (4) + "BLOAD": P$ = CHR$ (13) + CHR$ (4) + "BRUN"

```

```

710 POKE 49237,0: POKE 49234,0: POKE 49239,0: POKE 49232,0: PRINT : PRINT : PRINT : GET T$: TEXT
715 HOME
720 PRINT : PRINT : INVERSE : PRINT "CONECTE IMPRESORA": NORMAL : PRINT : PRINT
722 INPUT "FORMATO ? ";PP$:RT = 60: IF PP$ = "FG" THEN RT = 80
724 PRINT CHR$(4);"PR#1": PRINT P$:PP$: PRINT CHR$(27);"B"
725 PRINT : PRINT : PRINT TAB(5)"REPRESENTACION DE "Y$" FRENTE A "X$": PRINT : PRINT
726 PRINT TAB(5)"-EJE DE ABCISAS ": PRINT : PRINT TAB(10)XN" SITUADA EN EL ORIGEN.": PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
727 PRINT TAB(5)"-EJE DE ORDENADAS ": PRINT : PRINT TAB(10)YN" SITUADA EN EL ORIGEN. ": PRINT : PRINT : PRINT : PRINT :F = 1: GOTO 400
728 PRINT CHR$(27);"L000": PRINT CHR$(27); CHR$(242): FOR A = 1 TO RT: PRINT CHR$(10);: NEXT
729 PRINT CHR$(27); CHR$(230): PRINT CHR$(27);"A": GOSUB 1200: PRINT CHR$(4): PRINT CHR$(27);"B"
730 PRINT CHR$(4);"PR#0"
735 HOME : GOTO 1000
740 HOME
750 PRINT : INPUT "GRADO DEL POLINOMIO ? ";D
755 HOME : GOTO 1000
770 HPLOT W(I) - 1,189 - Z(I) TO W(I) + 1,189 - Z(I) TO W(I) + 1,191 - Z(I) TO W(I) - 1,191 - Z(I) TO W(I) - 1,189 - Z(I): RETURN
780 GOSUB 800: HOME : GOTO 1000
800 HOME : PRINT : PRINT TAB(3)"N"; TAB(15)X$; TAB(25)Y$
810 PRINT : HTAB 1: PRINT "-----"
820 FOR T = 1 TO N: PRINT TAB(3)T; TAB(15)X(T); TAB(25)Y(T): NEXT
830 GET TT$: RETURN
900 END
1000 PRINT : PRINT "1-INTRODUCCION DE DATOS"
1010 PRINT : PRINT "2-MODIFICACION DE DATOS"
1020 PRINT : PRINT "3-PARAMETROS DE REGRESION"
1030 PRINT : PRINT "4-VISUALIZACION DE DATOS"
1040 PRINT : PRINT "5-REPRESENTACION GRAFICA"
1050 PRINT : PRINT "6-INTERPOLACION"
1060 PRINT : PRINT "7-IMPRESION"
1070 PRINT : PRINT "8-CAMBIO DE GRADO"
1080 PRINT : PRINT "9-FIN DE PROGRAMA"
1085 PRINT
1090 INPUT OP: ON OP GOTO 40,2000,200,780,540,505,700,740,900
1200 PRINT : PRINT "N",X$,Y$: PRINT : PRINT "-----"
1210 PRINT : FOR T = 1 TO N: PRINT T,X(T),Y(T): NEXT : RETURN
2000 HOME : PRINT : PRINT : PRINT "MODIFICACION: ": PRINT : PRINT
2010 PRINT TAB(5)"1-ELIMINACION": PRINT
2020 PRINT TAB(5)"2-INTRODUCCION": PRINT

```

```
2030 PRINT TAB( 5)*3-RECTIFICACION": PRINT
2040 PRINT TAB( 5)*4-FIN DE MODIFICACION": PRINT
2050 INPUT M: ON M GOTO 2100,2200,2150,735
2100 HOME : IF N > 3 GOTO 2120
2110 PRINT : PRINT "NO ES POSIBLE ELIMINAR MAS PUNTOS": GET A$: GOTO 2000
2120 PRINT : PRINT : INPUT "NUMERO DEL PUNTO A ELIMINAR? ";I
2130 FOR G = I TO N - 1:X(G) = X(G + 1):Y(G) = Y(G + 1): NEXT :N = N - 1
2140 GOSUB 800: GOTO 2000
2150 HOME : PRINT : PRINT : INPUT "NUMERO DEL PUNTO? ";0
2160 PRINT
2170 PRINT "X(";0;")= ";: INPUT X(0)
2180 PRINT "Y(";0;")= ";: INPUT Y(0)
2190 GOSUB 800: GOTO 2000
2200 HOME : PRINT : PRINT : INPUT "NUMERO DE PUNTOS A INTRODUCIR? ";I:N = N + I: PRINT : PRINT
2210 FOR T = (N - I + 1) TO N: PRINT "X(";T;")= ";: INPUT X(T): PRINT "Y(";T;")= ";: INPUT Y(T): PRINT : NEXT T
2220 GOSUB 800: GOTO 2000
```