

ARS PHARMACEUTICA
REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tomo XXXI

— **Núms. 3 - 4** —

1990

Director:

Prof. Dr. D. Jesús Cabo Torres

Director Ejecutivo:

Prof. Dr. D. José Luis Valverde

Secretario General:

Prof. Dr. D. José Jiménez Martín

Consejo de Redacción:

D. Manuel Casares Porcel
D.^a M.^a Teresa Correa Sánchez
D.^a M.^a José Faus Dader
D. Jesús González López
D.^a M.^a del Mar Herrador del Pino
D. Eduardo Ortega Bernaldo de Quirós

Secretario de Redacción:

D. José Luis Campos Alvarez

Redacción y Administración:

Facultad de Farmacia
Granada - España

Dep. Legal: GR. núm. 17-1960
ISSN 004-2927

Imprime:

Servicio de Publicaciones
Colegio Máximo de Cartuja
Universidad de Granada

Sumario

PAG.

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

- Amortiguación de la fluorescencia del carbazol por alcaloides tropánicos (I), por Talavera, E. M.; Quintero, B.; Jiménez, M. y Alvarez, J. M. 143
- Amortiguación de la fluorescencia del carbazol por alcaloides tropánicos (II), por Talavera, E. M.; Quintero, B.; Jiménez, M. y Alvarez, J. M. 151
- Plantas utilizadas en medicina popular en la comarca de Baza, por Negrillo Galindo, A. M.; Aroza Montes, P. y Cobo Gómez, D. 157
- Una botica de Murcia del s. XVIII, por Arrebola Nacle, P. y López Andújar, G. 169
- Contaminación de aguas por pesticidas, por Jiménez, M.; Talavera, E. M.; Alvarez, J. M. y Quintero, B. 175
- Lactonas sesquiterpénicas en el género *Achillea*, por Fernández Barrero, A.; Alvarez-Manzaneda Roldán, E. J. y Alvarez-Manzaneda Roldán, R. 181
- Estudio oscilopolarográfico del ácido picrolónico, por Jara, V.; Crovetto, L.; González, R. M. y Martínez, I. 191

PAG.

● Determinación de los coeficientes de control de flujo en un tramo acotado de la ruta glucolítica, por Sola, M. M.; Oliver, J.; Salto, R.; Gutiérrez, M. y Vargas, A. M.	197
● Valoración espectrofotométrica de nitritos en agua, por Fernández, M. P.; Jiménez, M. y Quintero, B.	207
● Efecto de la refrigeración sobre la maduración del fruto del chirimoyo, por Lahoz, J.; Gutiérrez, M.; Martínez-Cayuela, M.; Pascual, L. y Vargas, A. M.	211
● Cinética de descomposición de penicilinas sintéticas, por Jiménez, M.; Escalera, B. y Sellés, E.	217
● Pervivencia de la zarzaparrilla en textos médico-farmacéuticos españoles, por FernándezNegri, M. A. y López Andújar, G.	223
● Cinética de descomposición de la cloxacilina sódica, aplicación de métodos estadísticos al tratamiento de datos cinéticos, por Jiménez, M.; Escalera, B. y Martín, J.	233
● Cumarinas en especies del género seseli (fam. umbelliferae), por Barrero, A. F.; Herrador, M. M. y Arteaga, P. .	241
● Estudio de N-carboximetil-L-fenilalanina y de su clorhidrato monohidrato por, Abarca García, M. E., González Pérez, J. M.; González García, S. y Nicolás Gutiérrez, J.	257

BIBLIOGRAFIA

● Crítica de libros	267
---------------------------	-----

DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

AMORTIGUACION DE LA FLUORESCENCIA DEL CARBAZOL
POR ALCALOIDES TROPANICOS (I)

Talavera E. M., Quintero B., Jiménez M., Alvarez J. M.

RESUMEN

La desactivación de la fluorescencia del carbazol por alcaloides tropanicos en ciclohexano ha sido estudiada en estado estacionario. Los resultados obtenidos indican la formación de un complejo por enlace de hidrógeno tanto en el estado fundamental como en el excitado. Los valores de las constantes de equilibrio son $K_g = 18.0 \text{ M}^{-1}$ y $158 < K_e < 430 \text{ M}^{-1}$ para el estado fundamental y el excitado respectivamente.

SUMMARY

The fluorescence quenching of carbazole by tropanic alkaloids in cyclohexane has been studied in the steady-state. The results obtained supports hydrogen-bond formation both in the ground and excited states. The values of the equilibrium constants are $K_g = 18.0 \text{ M}^{-1}$ and $158 < K_e < 430 \text{ M}^{-1}$ both for the ground and excited states respectively.

INTRODUCCION

La desactivación de la fluorescencia de sondas luminiscentes ha sido muy empleada en la investigación estructural y dinámica de membranas naturales y sintéticas (1-5). En base al interés que posee el conocimiento de la dinámica de un grupo de alcaloides tropanicos en su paso a través de membranas, hemos abordado el estudio de la amortiguación de fluorescencia de lumóforos por mencionados

alc

interacción idóneas para el posterior estudio en medios microheterogéneos.

Después de múltiples ensayos preliminares, hemos encontrado que el carbazol es uno de los fluoróforos más sensible a la amortiguación por tropánicos.

La fluorescencia del carbazol y sus derivados está recibiendo en la actualidad una gran atención, probablemente debido a su relación estructural con el triptófano. Según los últimos estudios realizados, la amortiguación de la fluorescencia del carbazol es debida principalmente a la formación de un complejo por enlace de hidrógeno (6-10) como resultado de la presencia de un átomo de nitrógeno con deficiencia electrónica (11); aunque se ha comprobado que también contribuye a la desactivación una interacción de transferencia de carga en el estado excitado (8) (10).

MATERIAL Y METODOS

Carbazol y N-etilcarbazol (99% Aldrich) fueron recristalizados dos veces en etanol absoluto, secados y sublimados antes de usarlos. Endo-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1] octan-3-ol (Tropanol) y α -(hidroximetil) ácido bencenoacético 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1.] oct-3-il ester (Atropina) grado analítico fueron donados por Boehringer Ingelheim, recristalizados dos veces en n-heptano, y almacenados en desecador. Ciclohexano (CH), metanol y etanol (para espectroscopía de fluorescencia, Merck) fueron utilizados como disolventes sin posterior purificación. La pureza para la espectroscopía de absorción y emisión fue comprobada en todos los disolventes.

Los espectros de absorción de las muestras fueron registrados en un Espectrofotómetro Lambda 5 de Perkin-Elmer. Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en un Espectrofluorímetro Shimadzu RF-5000 con un paso de banda de 15 Å y 30 Å para excitación y emisión respectivamente. La longitud de onda de excitación fue la de un punto isobéptico. Todos los espectros fueron corregidos para la respuesta del fotomultiplicador.

En todos los casos, las muestras fueron desoxigenadas en la cubeta de fluorescencia por paso de argón durante 4 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la fig. 1 se muestran los espectros de absorción del carbazol ($2.5 \times 10^{-5} M$) y del sistema carbazol $2.5 \times 10^{-5} M$ -tropanol (0.5×10^{-2} — $3.5 \times 10^{-2} M$) en ciclohexano. Como se puede observar aparecen varios puntos isobépticos, así como una banda nueva a 337 nm que no es debida ni al carbazol ni al tropanol cuando se encuentran solos en disolución. En la figura 1b se observa también que, en presencia de una concentra-

ción alta de tropanol, el espectro de absorción se ensancha y desplaza hacia el rojo. Todos estos hechos han sido reconocidos como indicativos de un enlace de hidrógeno en sistemas tales como carbazol-piridina y dibenzocarbazol-piridina (7-10).

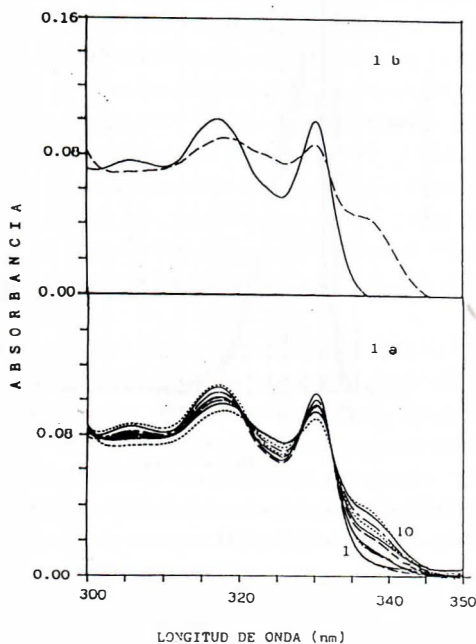


Fig. 1. a) Espectro de absorción de carbazol $2.5 \times 10^{-5} M$ y tropanol: (1) 0.0 ; (2) 0.2×10^{-2} ; (3) 0.4×10^{-2} ; (4) 0.8×10^{-2} ; (5) 1.0×10^{-2} ; (6) 1.5×10^{-2} ; (7) 2.0×10^{-2} ; (8) 2.5×10^{-2} ; (9) 3.0×10^{-2} ; (10) $3 \times 5 \times 10^{-2} M$.

b) Efecto del enlace de hidrógeno en el espectro de absorción de carbazol en disolución de ciclohexano: (—) carbazol $2.5 \times 10^{-5} M$; (- - -) carbazol $2.5 \times 10^{-5} M$ y tropanol $3.5 \times 10^{-2} M$.

De otra parte, se obtiene una desactivación apreciable de la fluorescencia del carbazol cuando se aumenta la concentración de tropanol hasta $2.5 \times 10^{-2} M$, como se aprecia en la figura 2, en la que además se puede observar la presencia de un punto isoemisivo, lo que es indicativo de que hay dos especies involucradas en la emisión fluorescente.

Estos resultados junto a la ausencia de modificaciones en los espectros de absorción y emisión del carbazol inducidos por tropanol o atropina en disolventes hidroxilados, así como la ineficacia de los alcaloides mencionados para amortiguar la fluorescencia del N-etilcarbazol en ciclohexano, indican con claridad la formación de un complejo por enlace de hidrógeno tanto en el estado fundamental como en el excitado (7)(12)(13).

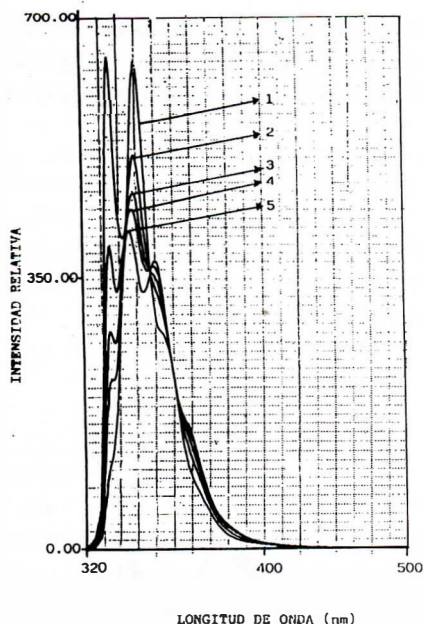


Fig. 2. Cambio en la fluorescencia del carbazol en ciclohexano, con la adición de tropanol. Las concentraciones son: carbazol $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$; tropanol: (1) 0.0; (2) 0.5×10^{-2} ; (3) 1.0×10^{-2} , (4) 1.5×10^{-2} ; (5) $2.5 \times 10^{-2} \text{M}$.

De los cambios espectrales observados cuando se aumenta la concentración de tropanol, hemos determinado la constante K_g del equilibrio en el estado fundamental (ver esquema I), usando la ecuación 1 aplicada a la banda de absorción de 337 nm. El resultado obtenido, $K_g = 18.0 \text{M}^{-1}$, es del mismo orden de magnitud que los aportados para otros enlaces de hidrógeno (7).

$$\frac{1-d_0/d}{[Q]} = -K_g + \frac{\epsilon_{\text{CH...Q}}(\lambda_{\text{ex}})}{\epsilon_{\text{CH}}(\lambda_{\text{ex}})} K_g \left(\frac{d_0}{d} \right) \quad [1]$$

En donde d_0 y d son las absorciones a 337 nm de la disolución de carbazol y las de carbazol-tropanol, respectivamente, ϵ_{CH} y $\epsilon_{\text{CH...Q}}$ son los coeficientes de extinción molar del carbazol y del complejo y $[Q]$ es la concentración de tropanol en la disolución.

Se puede calcular el valor de la constante K_e del equilibrio en el estado excitado (ver esquema I), a partir del obtenido para K_g , y usando la ecuación 2:

$$\log K_e = \log K_g + \frac{0,625}{T} \delta\nu$$

[2]

donde T es la temperatura en la escala Kelvin y $\delta\nu$ representa el desplazamiento espectral, que ha sido determinado por la diferencia entre la posición del máximo de absorción expresado en número de onda (cm^{-1}), o como la semisuma de las frecuencias de los picos de absorción y fluorescencia (también en cm^{-1}). Los resultados encontrados por ambos métodos han sido de 158 M^{-1} y 430 M^{-1} respectivamente. Aunque hay una cierta discrepancia entre los dos valores dependiendo del procedimiento usado en el cálculo de $\delta\nu$, se puede aceptar en todos los casos que $K_e \gg K_g$, circunstancia que ha sido observada en otros sistemas relativamente similares (7) y que es de importancia en la explicación de la desactivación de fluorescencia por enlace de hidrógeno.

El aumento de la concentración de tropanol hasta $4.5 \times 10^{-2} \text{ M}$, hace desaparecer el punto isoemisivo en los espectros de fluorescencia, como se indica en la figura 3. Tal hecho se puede interpretar como resultado de la aparición de una tercera especie (emisiva o no) en equilibrio con las dos anteriores; aunque también podría ser el resultado de la alteración de la polaridad del medio con el aumento de la concentración de tropanol.

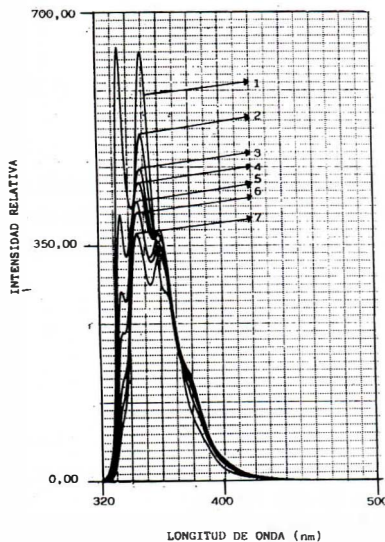
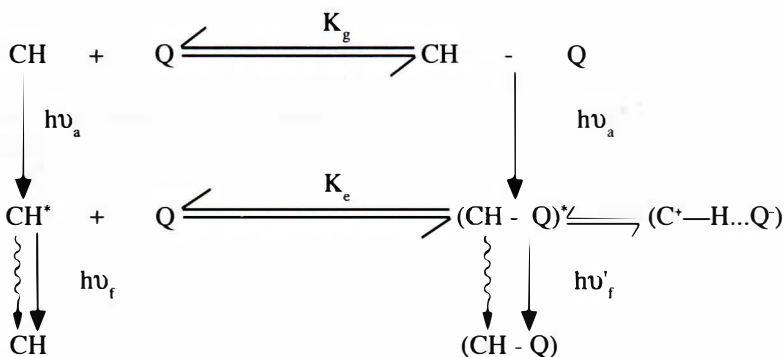


Fig. 3. Desaparición del punto isoemisivo en los espectros de fluorescencia del sistema carbazol-tropanol. Las concentraciones son: carbazol $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$; tropanol: (1) 0.0; (2) 0.5×10^{-2} ; (3) 1.0×10^{-2} ; (4) 1.5×10^{-2} ; (5) 2.5×10^{-2} ; (6) 3.5×10^{-2} ; (7) $4.5 \times 10^{-2} \text{ M}$.

A la luz de los estudios de fotólisis con técnicas laser de picosegundos, efectuados por Mataga y Martín en sistemas dibenzocarbazol-piridina (8-10) se ha podido postular la existencia de un complejo de transferencia de carga no radiativo, en equilibrio con el complejo por enlace de hidrógeno en el estado excitado. Dada la similitud de tales sistemas con los que nosotros hemos investigado, así como el pequeño orden de magnitud del cambio en la polaridad del medio, cuando la concentración de alcaloide solo alcanza hasta $4.5 \times 10^{-2} M$ (máxima solubilidad a $20^\circ C$), se puede postular el siguiente esquema del mecanismo de los procesos de excitación y desactivación del sistema carbazol-alcaloide tropánico en disolución de ciclohexano:

Esquema I



Una vez justificado el anterior mecanismo, se puede concluir que el carbazol es un lumóforo útil para el estudio de la amortiguación de su fluorescencia inducida por alcaloides tropánicos en medios apolares similares a los del interior de la bicapa lipídica de vesículas y membranas naturales.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BADLEY, R.A. In *Modern fluorescence spectroscopy*; WEHRY, E.L., Ed.; Plenum Press: New York,; pp. 91-168, (1976).
- (2) BLATT, E. y SAWYER, W.H. *Biochim-Biophys. Acta*, 822, 43-62, (1985).
- (3) FENDLER, J.H. In *Ann. Rev. Phys. Chem.* RABINOVITCH, B.S., SCHURR, J.M., STRAUSS, H.L. (eds), 35, pp. 137-157, (1984).
- (4) LAKOWICZ, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*; Plenum Press: New York, pp. 257-301, (1983).

- (5) TURRO, M.J.; GRÄTZEL, M. y BRAUN, A.M. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 19, 675-696, (1980).
- (6) ROY, R. y MUKHERJEE, S., *Chem. Phys. Lett.*, 140 (2); 210-214, (1987).
- (7) MARTÍN, N.M y WARE, W.R., *J. Phys. Chem.*, 82, 2770-2776, (1978).
- (8) MARTIN, N.M., IKEDA, N., OKADA, T. y MATAGA, N., *J. Phys. Chem.*, 86, 4148-4156, (1982).
- (9) MARTIN, N.M., GRAND, D., IKEDA, N., OKADA, T. y MATAGA, N., *J. Phys. Chem.*, 88, 167-170, (1984).
- (10) MARTIN, N.M., MIYASAKA, H., KAREN, A. y MATAGA, N., *J. Phys. Chem.*, 89 (1), 182-185, (1985).
- (11) KRISHNAMURTHY, M. y DOGRA, S.K., *Spectrochim. Acta*, 42A, 793-798, (1986).
- (12) SPENCER, T.S. y O'DONNELL, C.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 12, 4846-4849, (1972).
- (13) MATAGA, N. y KUBOTA, T. In *Molecular interactions and electronic spectra*. Marcel Dekker: New York, pp. 346-351, (1970).