

la plata

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

FOTOLUMINISCENCIA DEL INDOL Y DERIVADOS
POSIBILIDADES ANALITICAS

1981

Trabajo de Tesis presentado por
LILIANA BRUZZONE
Para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas
(Orientación Analítica)

el 20/08/81

50.987 1981

62

<p>Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Exactas Biblioteca 50 y 115 1º subnivel biblioteca@exactas.unlp.edu.ar Tel 0221 422-697779 int. 129</p>  <p>DEX-50389</p>

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**FOTOLUMINISCENCIA DEL INDOL Y DERIVADOS
POSIBILIDADES ANALITICAS**

**Trabajo de Tesis presentado por
LILIANA BRUZZONE
Para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas
(Orientación Analítica)**

1981

A mis padres

INDICE

INTRODUCCION.	1
PROPOSITO	4
1 PROCESOS FOTOFISICOS GENERALES. MECANISMOS	5
2 INSTRUMENTAL Y REACTIVOS	17
2.1 Absorción ultravioleta	17
2.2 Excitación y emisión.	17
2.3 Reactivos	19
2.4 Purificación de los reactivos	19
3 CORRECCION DE ESPECTROS	21
4 METODOS DE CALCULO.	24
4.1 Determinación de rendimientos de fluorescencia.	24
4.2 Determinación de rendimientos a baja temperatura.	25
4.3 Determinación del tiempo de decaimiento de fosforescencia.	26
4.4 Cálculo del tiempo de vida media natural y del tiempo de decaimiento de fluorescencia	26
5 PARTE EXPERIMENTAL.	31
5.1 Espectros de absorción.	31
5.1.1 Fuerza del oscilador por resolución gráfica de las bandas.	42
5.1.2 Análisis de los espectros	46
5.2 Espectros de fluorescencia a temperatura ambiente	53
5.2.1 Análisis de los espectros en ciclohexano.	59
5.2.2 Efecto de la temperatura.	62
5.2.3 Efecto de átomos pesados.	66
5.3 Espectros de luminiscencia a 77°K	69
5.3.1 Análisis de los espectros	74
5.3.2 Efecto de temperatura sobre la emisión de fosforescencia.	75
6 INTERPRETACION	76
CONCLUSIONES	84
APENDICE	89
BIBLIOGRAFIA	96

INTRODUCCION

El indol es una molécula de gran importancia analítica ya que es el grupo cromóforo del aminoácido triptofano. Estudiando sus propiedades espectroscópicas y las de sus derivados en medios de diferente polaridad se obtienen parámetros que pueden correlacionarse con las propiedades de las proteínas y a los cambios que éstas sufren asociadas con el medio que las rodea.

Existe gran número de trabajos dedicados al estudio de esta molécula y la variedad de teorías que explican sus distintas propiedades espectroscópicas indica la naturaleza compleja del problema.

La mayoría de los estudios realizados se basan en el comportamiento observado cuando esta molécula se disuelve en solventes de diferente polaridad.

Strickland, Horwitz y Billups (1) identificaron varias de las transiciones vibracionales del indol y del 3-metilindol provocando perturbación por acción de solventes en los espectros de absorción y ^{por} poder así diferenciar los corrimientos en las transiciones 1L_a y 1L_b , según la terminología de Platt (2).

Zimmermann y Joop (3) midieron los espectros de polarización de absorción y de fluorescencia. La transición 1L_b está polarizada en la dirección del eje molecular más largo y la 1L_a perpendicular a la 1L_b a lo largo del eje molecular corto. Los mismos autores dedujeron que la emisión de fluorescencia se originaba fundamentalmente desde el estado 1L_a pero que una fracción lo hacía también desde el 1L_b .

Song y Kurtin (4) efectuaron medidas de polarización de luminiscencia y cálculos de orbitales molecu-

lares llegando a la misma conclusión; o sea que la emisión era dual, proveniente de los estados $^1L_\alpha$ y 1L_b , tanto en solventes polares como en otros relativamente no polares.

Van Duuren ⁽⁵⁾ observó cambios pronunciados en los espectros de emisión de fluorescencia del indol y derivados con diferentes solventes, no así en los espectros de absorción o de excitación de fluorescencia. Este comportamiento se deberfa a la existencia de estados mesoméricos polares que generarían mayores contribuciones en la molécula activada que en el estado fundamental. Tales estados serían más sensibles a los cambios de las constantes dieléctricas de los solventes, produciendo el corrimiento en fluorescencia y no en absorción.

El corrimiento hacia mayores longitudes de onda de la banda de fluorescencia del indol cuando se examina en diferentes solventes, al pasar de no polares a los polares, ha sido atribuído a un incremento en el momento dipolar del estado excitado y a una mayor estabilización causada por interacciones soluto-solvente ⁽⁶⁻⁸⁾.

También ha sido explicado el corrimiento en los espectros de fluorescencia por la formación de uniones hidrógeno entre el indol y las moléculas del solvente ^(6,7,9).

Konev ⁽⁹⁾ determinó que la emisión de fluorescencia del indol involucraba dos transiciones electrónicas ya que al ir de un solvente no polar a uno polar, además del corrimiento, se producía la desaparición de la banda de fluorescencia de menor longitud de onda, 1L_b , y un corrimiento mayor y ensanchamiento en la banda de longitud de onda más larga, $^1L_\alpha$. Además postuló que existen procesos de relajación de solventes y como resultado de ello la banda a

mayor longitud de onda estaría formada por la luminiscencia de moléculas con tiempos de vida mayores.

Walker, Bednar, Lumry (10-12) y Humphries (13) sugieren la existencia de un complejo excitado soluto-solvente (exciplex) el cual sería el responsable del gran corrimiento y pérdida de estructura vibracional de los espectros de fluorescencia del indol y derivados en solventes polares. Este complejo sería del tipo de transferencia de carga, en el cual el indol excitado actuaría como dador y el solvente polar como aceptor.

Varios autores (12,13) postulan que el proceso de desactivación no radiativo del estado singlete excitado puede producirse por dos caminos: uno independiente de la temperatura y otro dependiente de la misma.

Freed y Salmre (14) obtuvieron espectros de emisión de fosforescencia del indol y derivados, los cuales tenían mayores diferencias entre sí que las halladas en los espectros de fluorescencia.

La escasa literatura existente referente a la fosforescencia (4,9) puntualiza que la misma se produciría desde el estado 3L_a .

Las teorías desarrolladas para la explicación del comportamiento espectroscópico del indol y derivados son varias. Los diferentes datos bibliográficos e interpretaciones demuestran que el comportamiento de estas moléculas en estado excitado es complejo.

PROPOSITO

El presente estudio está orientado a: verificar los diversos datos experimentales, no siempre concordantes, establecidos por diferentes autores relativos al proceso de absorción del indol (o indoles) en el ultravioleta, a hacer uso de valores que no son accesibles por experiencias en nuestro laboratorio -como los que surgen de procesos que ocurren en la escala de los nanosegundos-. y complementarlos con el estudio de fluorescencia y fosforescencia bajo efectos perturbadores: solventes, metilación, temperatura, átomos pesados.

Correlacionando los fenómenos de absorción y emisión será posible intentar interpretar, sobre la base de los valores encontrados, el proceso en sus aspectos energético y dinámico.

La interpretación, junto con los datos espectroscópicos, son específicamente importantes en relación con el comportamiento del triptofano en estado excitado y la fluorescencia de proteínas.

Además, desde el punto de vista analítico, se pueden adecuar las condiciones para mejorar la sensibilidad y selectividad de las determinaciones que involucren residuos de proteínas que contengan el grupo cromóforo indólico.

1 PROCESOS FOTOFISICOS GENERALES. MECANISMOS.

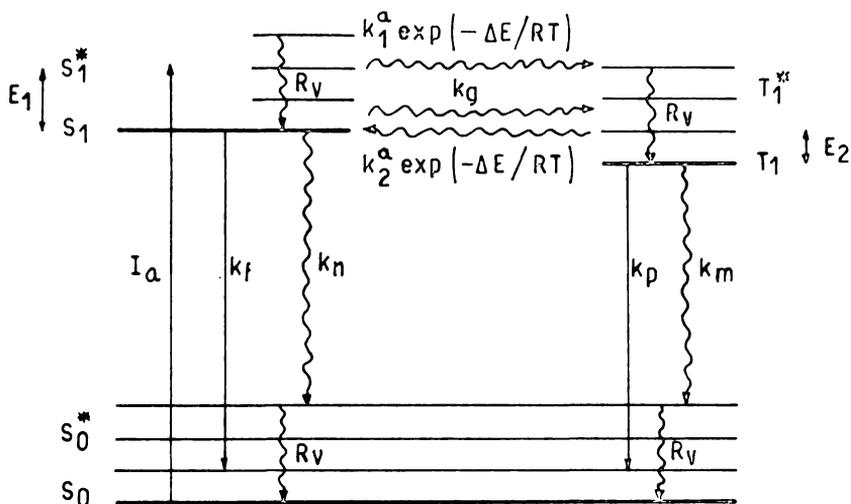
La absorción de luz por una molécula en fase condensada produce transiciones a estados excitados de diferentes configuraciones nucleares y electrónicas. Estos estados exhiben distinta reactividad química, ^{de los cuales se} ~~y representan~~ ^{finan} los caminos por los cuales la energía absorbida es disipada.

Esta serie de procesos tiene como consecuencia la emisión de la energía absorbida ^{sea} en forma parcial o total (rendimiento ϕ). La emisión parcial es debida a los procesos competitivos en el estado excitado, que dependen de los parámetros de estructura molecular, íntimamente asociados al medio que rodea a la molécula, el solvente, el cual afecta profundamente a los procesos actuando como perturbador, por lo que el sistema debe ser considerado como una entidad soluto-solvente.

Todos los ~~mecanismos de los~~ procesos de emisión o transferencia de energía pueden ocurrir entre niveles excitados de la misma o diferente multiplicidad. El fenómeno puede representarse por una serie de caminos que parten del proceso inicial de la absorción de radiación que lleva a la molécula (o sistema) a un estado cualquiera singlete excitado vibracionalmente (vibrónico) para luego ocurrir, como es el caso casi general, la degradación de la energía ~~del nivel~~ vibracional fundamental del primer estado singlete ~~excitado~~. ^{Luego del} ~~En este~~ proceso de degradación puede ocurrir la emisión de la radiación como fluorescencia o fosforescencia, según lo condiciona una serie de constantes de velocidad que regulan estos procesos fotofísicos, algunos dependientes y otros independientes de la temperatura.

En general, para una molécula en estado

electrónico y vibracional fundamental S_0 , los procesos pueden representarse según el diagrama de Jablonski:



Luego de alcanzar un estado estacionario, los procesos fotofísicos que pueden ocurrir se expresan mediante las ecuaciones cinéticas siguientes:

- | | | |
|------|--|--|
| I. | $S_0 + h\nu \rightarrow S_1^*$ | I_a , absorción a un estado electrónico singlete excitado. Estado vibrónico. |
| II. | $S_1^* \rightarrow S_1 + \text{calor}$ | Relajación vibracional. |
| III. | $S_1 \rightarrow S_0^* + h\nu_f$ | $k_f[S_1]$, fluorescencia. |
| IV. | $S_1 \rightarrow S_0$ | $k_n[S_1]$, conversión interna. |
| V. | $S_0^* \rightarrow S_0 + \text{calor}$ | Relajación vibracional. |
| VI. | $S_1 \rightarrow T_1^*$ | $k_g[S_1]$, cruce entre sistemas de diferente multiplicidad. |

VII.	$T_1^* \rightarrow T_1$	Relajación vibracional.
VIII.	$S_1 \rightarrow S_1^* \rightarrow T_1^*$	$k_1^a[S_1] \exp(-E/RT)$, activación térmica.
IX.	$T_1 \rightarrow S_0^* + h\nu_p$	$k_p[T_1]$, fosforescencia.
X.	$T_1 \rightarrow S_0^*$	$k_m[T_1]$, conversión interna.
XI.	$T_1 \rightarrow T_1^* \rightarrow S_1^*$	$k_2^a[T_1] \exp(-E/RT)$, activación térmica.

El proceso fotofísico I es la excitación electrónica de una molécula que involucra la transición de un electrón de un orbital molecular en el estado S_0 a un orbital de un estado electrónico superior excitado vibracionalmente S_1^* , ~~transición vibrónica~~. En el caso presente la energía de excitación proviene de radiación óptica, no ionizante, dando como resultado la absorción de fotones.

El proceso II corresponde a la disipación de la energía, generalmente por colisión con el medio, conduciendo a la molécula al estado vibracional fundamental del estado electrónico excitado S_1 , se denomina relajación vibracional (Rv). Se trata de una transición que involucra un ^{estado} ~~estado~~ electrónico. El proceso es del orden de 10^{-13} a 10^{-11} segundos.

El proceso III se denomina fluorescencia y es la desactivación con emisión de radiación desde el nivel vibracional fundamental del estado singlete excitado electrónicamente S_1 a cualquier nivel vibracional del estado fundamental S_0 . El proceso está determinado por una constante de velocidad k_f y es del orden de 10^{-9} a 10^{-8} segundos.

El proceso IV representa una relajación electrónica, transición isoenergética, en este caso entre el nivel vibracional fundamental del estado electrónico excitado

a cualquier nivel vibracional excitado del estado electrónico fundamental. Se denomina conversión interna (CI) y está determinado por una constante k_n .

El proceso V es relajación vibracional del estado fundamental.

El proceso VI, también es una relajación electrónica; es una conversión que está prohibida por spin desde el estado singlete al estado triplete cercano excitado vibracionalmente, transición isoenergética. Se produce por un proceso de acoplamiento vibracional, igual que en conversión interna y su constante de velocidad k_q es del orden de la de la fluorescencia. Se denomina cruce entre sistemas y puede o no ser activada por átomos pesados.

El proceso VII es relajación vibracional del estado triplete.

El proceso VIII corresponde a la activación térmica de niveles vibracionales del estado singlete excitado que aumenta la probabilidad de acoplamiento con niveles vibracionales de cualquier otro estado. k_7^a es el pre-exponencial para este proceso dependiente de la temperatura.

El proceso IX es la desactivación con radiación del nivel triplete fundamental a cualquier nivel vibracional excitado del estado singlete fundamental. El proceso se denomina fosforescencia, es regido por una constante k_p y es del orden de 10^{-4} a varios segundos.

El proceso X es de conversión interna regido por una constante de velocidad k_m y es seguido por el proceso V de relajación vibracional.

El proceso XI es de activación térmica de la molécula en el estado triplete más bajo, que puede, en

algunos casos, ser suficiente para poblar el nivel singlete excitado y producir emisión de radiación denominada fluorescencia retardada. k_2^a es el factor pre-exponencial.

La relación entre el número de fotones emitidos a fotones absorbidos define el rendimiento de la emisión ϕ , fluorescencia (ϕ_f) o fosforescencia (ϕ_p).

Si se quiere determinar la eficiencia de la emisión de fotones, se debe medir la pérdida de población del estado excitado en función del tiempo y la cantidad de fotones absorbidos por la sustancia irradiada. Esta última, llamada intensidad de la radiación absorbida, se expresa como el número de fotones absorbidos por segundo y está relacionada con la ley de Beer por intermedio de la intensidad de la luz incidente, I_0 , mediante la ecuación $I_a = I_0(1 - 10^{-\xi l c})$ donde ξ es la absorptividad molar de la sustancia, c la concentración molar y l la longitud del camino óptico.

En el caso menos general en que el fenómeno esté representado por los procesos I a III, toda la luz absorbida es emitida, o sea $\phi_f = 1$; se tiene entonces que:

$$\phi_f I_a = k_f [S_1] \quad (1)$$

$$-\frac{d[S_1]}{dt} = k_f [S_1] \quad (2)$$

De la ecuación (1) se define:

$$\phi_f = \frac{k_f [S_1]}{I_a} \quad (3)$$

y la integración de la ecuación (2):

$$[S_1] = [S_0] \exp(-k_f t) \quad (4)$$

define el tiempo de vida medio como el tiempo requerido para que $[S_1] = [S_0]/e$, de aquí que:

$$\tau^0 = \frac{1}{k_f} \quad (5)$$

En este caso particular, en que toda la energía absorbida es emitida, el tiempo de vida medio es el tiempo de vida medio natural o radiativo, τ^0 ; el proceso de emisión no está afectado por otros procesos competitivos, siendo la constante de velocidad la radiativa, k_f .

En realidad, ocurre en forma general que la energía es distribuida entre todos los procesos fotofísicos regulados por los siguientes parámetros de decaimiento desde S_1 :

$$k_f^e = k_f + k_n + k_g = \frac{1}{\tau_f} \quad (6)$$

donde e corresponde a datos experimentales.

La luz absorbida:

$$I_a = (k_f + k_n + k_g) [S_1]$$

Reemplazando en la ecuación (3):

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_n + k_g} \quad (7)$$

De las ecuaciones (5), (6) y (7) se tiene:

$$\tau_f = \phi_f \tau^0 \quad (8)$$

Es de interés, para la interpretación de los procesos y para distinguir la morfología molecular en el estado excitado respecto del fundamental, hacer una consideración según la forma en que se obtiene el valor del tiempo de vida natural. Cuando τ^0 se calcula mediante la medida experi-

mental de τ_f y del rendimiento cuántico Φ_f , se lo indica como τ_R^0 .

$$\tau_R^0 = \frac{\tau_f}{\Phi_f} \quad (9)$$

Otra manera de obtenerlo es mediante la integración del espectro de absorción (τ_a^0).

Los dos valores pueden diferir, porque τ_a^0 es obtenido de la fuerza de la absorción y está íntegramente asociado a la molécula en estado fundamental y τ_R^0 es calculado sobre la base de las propiedades de la molécula en estado excitado (ecuación 9). Cualquier diferencia en sus valores demostraría algún cambio de configuración en el estado excitado.

El proceso VI representa el fenómeno de transferencia de energía a un estado de diferente multiplicidad, regulado por una constante de velocidad k_g , mediante el cual se consigue poblar el estado triplete excitado cuando su valor compite con la constante de fluorescencia. Este estado excitado, de tiempo de vida largo y altamente reactivo, es de fundamental importancia en las reacciones fotoquímicas dentro de la química orgánica. Es desactivado en estado condensado, generalmente por colisión, llegando al estado fundamental por un proceso de conversión interna regido por una constante de velocidad k_m .

Se define la vida media radiativa de fluorescencia como:

$$\tau_p^0 = \frac{1}{k_p} \quad (10)$$

y teniendo en cuenta el proceso de desactivación, la constante del proceso total:

$$k_p^e = k_p + k_m \quad (11)$$

y el tiempo de decaimiento:

$$\tau_p = \frac{1}{k_p + k_m} \quad (12)$$

Como en el caso de fluorescencia, la ecuación del rendimiento queda expresada por:

$$\phi_p = \frac{k_p [T_1]}{I_a} \quad (13)$$

además de una ecuación que expresa el rendimiento en la población del estado triplete ϕ_t , que es directamente proporcional al producto del tiempo de decaimiento de fluorescencia τ_f , por la constante de velocidad del proceso de transferencia de energía entre ambos sistemas de diferente multiplicidad k_g :

$$\phi_t = \tau_f \cdot k_g = \frac{k_g}{k_f + k_g + k_n} \quad (14)$$

En un medio rígido (de un vidrio transparente), la constante k_n puede despreciarse:

$$\phi_t = \frac{k_g}{k_f + k_g} \quad (15)$$

$$I_a \cdot \phi_t = (k_p + k_m) [T_1] \quad (16)$$

Utilizando las ecuaciones (13), (10), (16) y (12) se obtienen:

$$\tau_p^o = \frac{\phi_t}{\phi_p} \cdot \tau_p \quad (17)$$

$$k_m = \frac{1}{\tau_p} - k_p \quad (18)$$

A bajas temperaturas la emisión de fluorescencia ocurre desde S_1 a niveles vibracionales del estado electrónico fundamental. El espectro de fluorescencia puede consistir en una serie de bandas cuyas diferencias en energía caracterizan los diferentes modos vibracionales de la molécula sin excitar, generalmente vibraciones C - C y C - H. Cuando se aumenta la temperatura se produce un ensanchamiento del espectro con pérdida de estructura. Este efecto produciría la población de niveles vibracionales excitados del nivel electrónico superior S_1^* con una energía E_1 en exceso respecto a la correspondiente al nivel vibracional fundamental del estado electrónico excitado S_1 .

Si E_1 es la energía de activación del estado singlete excitado, la nueva ecuación que define al estado estacionario es:

$$\frac{d[S_1]}{dt} = I_a - [S_1][k_f + k_n + k_g + k_1^a \exp(-E_1/RT)] = 0 \quad (19)$$

La constante de velocidad del decaimiento de la fluorescencia es:

$$k_f^a = k_f + k_n + k_g + k_1^a \exp(-E_1/RT) \quad (20)$$

Empleando como parámetro de medida el rendimiento, se puede obtener la energía de activación efectuando ciertas simplificaciones:

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_n + k_g + k_1^a \exp(-E_1/RT)} \quad (21)$$

Operando matemáticamente se obtiene:

$$\frac{1}{\phi_f} - 1 - K_1 = K_2 \exp(-E_1/RT) \quad (22)$$

donde:

$$K_1 = \frac{k_n + k_g}{k_f} \quad K_2 = \frac{k_f^a}{k_f}$$

K_1 es una constante que representa a los procesos independientes de la temperatura en el intervalo estudiado.

A temperaturas del nitrógeno líquido (77°K) se eliminan ciertos caminos no radiativos y la emisión desde el nivel singlete aumenta en intensidad al mismo tiempo que ocurre la emisión desde el nivel triplete fundamental T_1 , dando lugar al fenómeno de fosforescencia.

Un efecto de elevación de temperatura a partir de estas condiciones produce la población de niveles vibracionales del estado triplete. Estos niveles pueden contribuir a la emisión fosforescente o puede ocurrir que la energía de activación E_2 sea suficiente para alcanzar a poblar el estado singlete, dando como resultado una emisión de la misma energía que la de fluorescencia con un valor del parámetro de decaimiento del orden del de fosforescencia, denominada fluorescencia retardada (15).

La constante de velocidad del decaimiento de la fosforescencia está representada por:

$$k_p^a = k_p + k_m + k_2^a \exp(- E_2 / RT) \quad (23)$$

Reemplazando la ecuación (11) en la (23) y tomando la inversa:

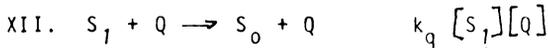
$$\tau_p^a = \frac{1}{k_p^a} = \frac{1}{k_p^e + k_2^a \exp(- E_2/RT)} \quad (24)$$

Operando se obtiene, por ecuación (12):

$$\frac{1}{\tau_p^a} - \frac{1}{\tau_p} = k_2^a \exp(-E_2 / RT) \quad (25)$$

La medida de la eficiencia de fluorescencia y tiempos de decaimiento de la fosforescencia en función de la temperatura permitiría obtener valores de constantes de velocidades y energías de activación de los procesos no radiativos.

Cuando en el sistema existe una molécula extraña, el proceso que puede ocurrir se representa mediante:



Este proceso está regulado por la constante k_q que puede ser calculada mediante la ley de Stern - Volmer (16).

La intensidad de la luz absorbida cuando existe una molécula extraña:

$$I_a = (k_f + k_n + k_g + k_q [Q]) [S_1]$$

la que combinada con la ecuación (3) resulta:

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_n + k_g + k_q [Q]} \quad (26)$$

Si se considera ϕ_f^0 la eficiencia de fluorescencia en ausencia de la sustancia extraña, de las ecuaciones (7) y (26) se obtiene:

$$\frac{\phi_f^0}{\phi_f} = 1 + \frac{k_q [Q]}{k_f + k_n + k_g} = 1 + K_{sv} [Q] \quad (27)$$

siendo K_{sv} la constante de Stern - Volmer, la cual, cuando se

conoce el tiempo de decaimiento de la fluorescencia, permite calcular el valor de la constante k_q :

$$K_{sv} = k_q \cdot \tau_f \quad (28)$$

2 INSTRUMENTAL Y REACTIVOS

2.1 Absorción ultravioleta

Los espectros de absorción de las moléculas estudiadas fueron registrados en un espectrofotómetro Bausch & Lomb 600 E y las longitudes de onda medidas con una aproximación de 1 nm. Ancho de banda: 0,5 nm.

2.2 Excitación y emisión

Los espectros de excitación y emisión fueron estudiados con un espectrofotofluorómetro Aminco Bowman SPF convencional ⁽¹⁷⁾ equipado con fuente de xenón de 150 vatios, espejo condensador elipsoidal y fotómetro proporcional con fototubo multiplicador RCA 4837.

El sistema condensador elipsoidal aumenta la sensibilidad del equipo convencional y la resolución de los espectros de excitación y emisión.

El sistema consiste en una fuente de xenón y dos espejos: uno es el condensador elipsoidal y el otro es uno plano que dirige la radiación condensada hacia el equipo a través de una ranura variable. Por medio de este sistema se disminuyen las fluctuaciones debidas a la oscilación del arco de la lámpara de xenón ya que los dos espejos rotan la imagen del arco 90° con respecto a su eje original. La oscilación del arco se mueve así a lo largo de la ranura en lugar de hacerlo a lo ancho de la misma manteniendo aproximadamente constante las condiciones de la excitación.

El fotómetro proporcional varía la sensibilidad del fototubo multiplicador en forma inversa a las variaciones en la intensidad de la radiación de excitación debi

das a las fluctuaciones del arco de la lámpara.

La radiación de excitación pasa a través de un divisor de haces: parte penetra al compartimiento de la muestra y la otra porción es desviada, sin atravesar la celda, alternándose ambos haces mecánicamente en su incidencia sobre el fototubo multiplicador.

Durante la fase I la radiación de fluorescencia de la muestra pasa por el monocromador de emisión y el fototubo produce una señal. Al continuar girando el alternador, la radiación de fluorescencia se bloquea y la porción de radiación de excitación que había sido desviada llega al fototubo (fase II). La señal resultante es retenida momentáneamente y llevada a un amplificador diferencial de referencia donde se compara con un potencial fijo. Si las dos señales son iguales, no hay variación en la salida del amplificador diferencial y no es necesaria ninguna corrección en el potencial del fototubo. Si la intensidad de la lámpara de xenón varía, se producirá una variación en la señal de salida del amplificador diferencial de referencia. Esta señal modificará el potencial del fototubo, o sea la sensibilidad del mismo, hasta que la señal en el amplificador diferencial sea igual a la de referencia fija, manteniéndose sin cambio la salida del amplificador diferencial.

Esta corrección requiere aproximadamente 150 milisegundos, lo que es considerablemente mucho menor que la constante de tiempo del registrador X-Y, por lo que no se observan cambios.

La escala de longitudes de onda del monocromador de emisión se calibra con una lámpara de mercurio de baja presión tipo lapicera. La calibración de la escala de

longitudes de onda del monocromador de excitación se realiza después de calibrado el de emisión, colocando en la celda una suspensión de sulfato de bario en agua y encontrando el máximo de dispersión para distintas posiciones del monocromador de emisión.

2.3 Reactivos

La pureza de las especies usadas para la investigación de su luminiscencia debe ser muy alta ya que cualquier sustancia extraña podría atenuarla.

Los solventes empleados también deben ser muy puros. En las medidas absorciométricas un criterio de pureza suficiente es que no absorba en la región espectral de estudio.

En las medidas fosforimétricas, además de las condiciones anteriores, el solvente debe formar vidrios transparentes a la temperatura del nitrógeno líquido y poseer la capacidad de disolver los compuestos de interés.

Los solventes empleados en el presente estudio fueron de diferente polaridad y constante dieléctrica, ciclohexano ($\mu = 0$, $\epsilon = 2,0$) y alcohol etílico ($\mu = 1,66$, $\epsilon = 24,5$). Para efectuar la calibración del equipo Aminco Bowman SPF se empleó etilenglicol como disolvente de la rodamina 8.

2.4 Purificación de los reactivos

Alcohol etílico (18)

El alcohol de 95% se mantuvo a reflujo durante varias horas con 25 ml/l de H_2SO_4 12N y luego se destiló. El destilado se trató con 20 g de KOH y 10 g de Ag_2O_3 por litro y fue destilado nuevamente. Este destilado se man-

tuvo durante una semana sobre amalgama de aluminio activada, se filtró y destiló.

Ciclohexano

Reactivo Matheson, Coleman & Bell calidad espectroscópica; se utilizó sin tratamiento adicional de purificación.

Etilenglicol

Reactivo Merck, se utilizó sin tratamiento de purificación.

Sulfato de quinina

Reactivo Merck, se recrystalizó como dihidrato en H_2SO_4 0,05 M seguido por dos recrystalizaciones en agua. Se secó a 100°C.

Rodamina B

Reactivo BDH, se recrystalizó en una solución de éter-benceno (1+1).

Indol (Fluka) (p.f. 52,0°C-52,4°C) y 2-metilindol (Aldrich) (p.f. 58,0°C-58,2°C) fueron recrystalizados en éter de petróleo y luego sublimados al vacío.

3-metilindol

Reactivo Fluka, fue recrystalizado en heptano y luego sublimado al vacío (p.f. 95,0°C-95,3°C).

L(-) triptofano

Reactivo Carlo Erba, fue recrystalizado en una solución de etanol-agua (1+1) (p.f. 292,5°C d.)

Yoduro de sodio

Reactivo Carlo Erba, fue utilizado sin purificación adicional.

3 CORRECCION DE ESPECTROS

Los espectros de excitación y emisión registrados por la mayoría de los espectrofotofluorómetros son aparentes.

A fin de obtener el espectro verdadero de un compuesto es necesario calibrar el equipo, ya que el espectro obtenido es una resultante de la geometría óptica, de la intensidad de la fuente de excitación en función de la longitud de onda y de la sensibilidad del fotodetector.

El método utilizado para la corrección de ambos espectros fue el desarrollado por Meluish (19).

Se utiliza una solución concentrada de rodamina B (3 g/l en etilenglicol) como pantalla fluorescente empleando el accesorio frontal de fluorescencia.

Se registra el espectro de excitación de fluorescencia con el monocromador de emisión colocado a 640 nm. Este espectro es la respuesta combinada de la lámpara y del monocromador: $Q(\lambda)$.

Para calibrar el sistema de detección se reemplaza el contador cuántico por un espejo recientemente aluminizado y se mide la energía reflejada: $R(\lambda)$.

El factor de calibración para obtener los espectros de emisión verdaderos es:

$$S(\lambda) = \frac{Q(\lambda) \cdot M(\lambda)}{R(\lambda) \cdot B(\lambda) \cdot W(\lambda)}$$

donde:

$S(\lambda)$: factor por el cual deben ser multiplicadas las lecturas del fototubo para obtener una medida relativa en cuantos/s.nm.

$Q(\lambda)$: respuesta a la energía del contador cuántico.

$M(\lambda)$: transmisión de la ventana de la celda en que se mide la respuesta del contador.

$R(\lambda)$: respuesta del monocromador-fototubo a la energía reflejada.

$B(\lambda)$: ancho de banda del monocromador de emisión.

$W(\lambda)$: reflectancia del espejo aluminizado.

Para longitudes de onda mayores de 400 nm, se interpone una placa de vidrio a la salida del monocromador de excitación para absorber el segundo orden de radiación.

Cuando se determina $R(\lambda)$ se debe fijar exactamente el espejo aluminizado; cualquier movimiento introducirá error en $R(\lambda)$. Se registra la emisión para cada valor de longitud de onda de excitación, prácticamente cada 10 nm, obteniéndose una distribución en forma de pico agudo. La altura del pico es el valor de $R(\lambda)$ y el ancho medio el de $B(\lambda)$. Dado que se trabaja con red de difracción, $B(\lambda)$ es constante.

Los espectros de excitación se corrigieron multiplicando cada valor de intensidad registrada a una determinada longitud de onda por el factor correspondiente en la curva de $Q(\lambda)$.

Las curvas de $S(\lambda)$ y $Q(\lambda)$ se muestran en la figura 1.

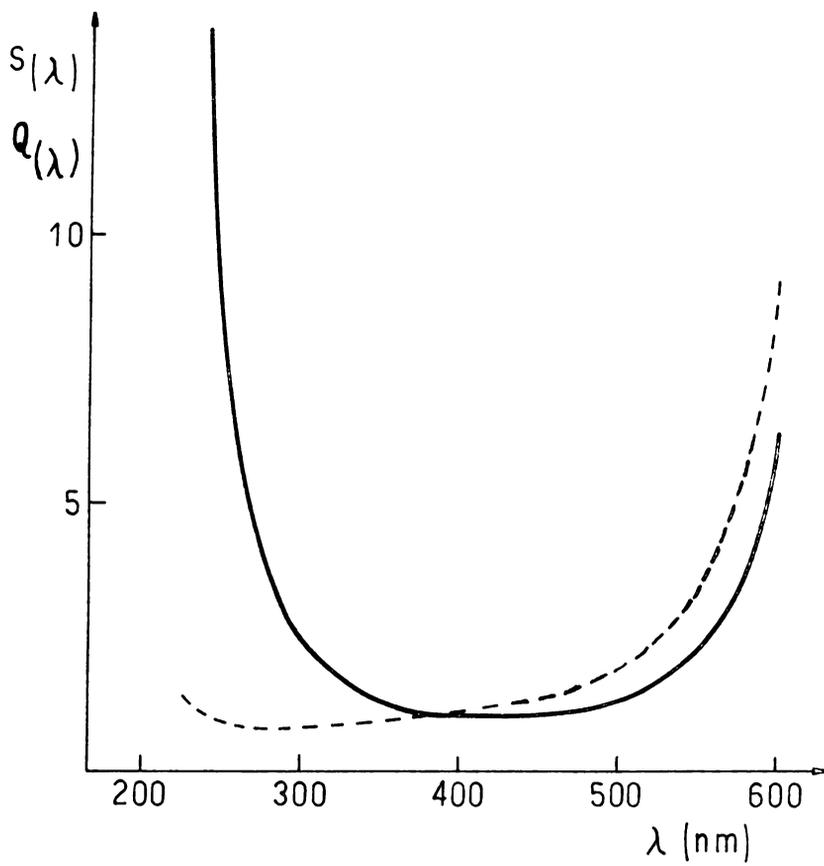


Figura 1. Curvas de calibración

----- $Q(\lambda)$

————— $S(\lambda)$

4 METODOS DE CALCULO

4.1 Determinación de rendimientos de fluorescencia

Se utilizó el método propuesto por Parker y Rees (20). Para ello se determinan los espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de la sustancia en estudio y de una sustancia de rendimiento cuántico conocido, bajo las mismas condiciones instrumentales.

Como la emisión de fluorescencia es proporcional a $I_0 c l \Phi_f$ y, por consiguiente, al área integrada del espectro de fluorescencia corregido, se cumple:

$$\frac{\text{area}_2}{\text{area}_1} = \frac{I_0 \epsilon_2 c_2 l \Phi_2}{I_0 \epsilon_1 c_1 l \Phi_1} \quad (29)$$

donde:

2 y 1 identifican muestra y referencia respectivamente.

ϵ : absorptividad molar a la longitud de onda de excitación.

Φ : rendimiento de fluorescencia.

c: concentración.

l: camino óptico.

Como sustancia de referencia se utilizó sulfato de quinina disuelto en H_2SO_4 0,1 N. Se tomó como valor del rendimiento, para una longitud de onda de excitación de 366 nm, el dado por Meluish (21) de 0,55.

Cuando se utilizan solventes distintos al agua se debe corregir por la diferencia en los índices de refracción. El valor del rendimiento debe ser multiplicado por $n^2(\text{solvente}) / n^2(\text{agua})$ (22).

Precauciones

En el método seguido se debe tener cuida-

do de no cometer errores debidos a: efecto de filtro interno, uso de luz de excitación no monocromática, apagado por oxígeno. La ecuación mencionada sólo es aplicable en condiciones de absorción muy pequeña de luz. Se utilizaron soluciones muy diluídas, con absorbancias menores de 0,05. Para evitar errores en la medida de la absorbancia se usaron celdas de 100 mm de camino óptico. Antes de cada ensayo se eliminó el oxígeno disuelto mediante el burbujeo con nitrógeno (99,998%).

4.2 Determinación de rendimientos a baja temperatura

Los espectros de emisión a baja temperatura y las curvas de decaimiento de fosforescencia se obtuvieron haciendo uso del accesorio de fosforescencia (17). El fundamento del método empleado para la determinación es el mismo que el descrito en la sección anterior operando a la temperatura del nitrógeno líquido (77°K) y midiendo primero a esa temperatura y después a temperatura ambiente. El valor de absorbancia empleado posteriormente en el cálculo es el medido a temperatura ambiente.

En el caso especial de los indoles los espectros de fluorescencia y fosforescencia no se solapan y por consiguiente es posible calcular las áreas correspondientes a cada proceso en forma individual.

Precauciones

Además de las requeridas para el caso de la fluorescencia se debe tener cuidado de evitar la formación de burbujas en el nitrógeno líquido, por cuanto podrían provocar la difusión de la radiación de excitación.

Una vez registrado el espectro de emisión a baja temperatura, se deja equilibrar el sistema a la tempe-

ratura ambiente, y sin mover la celda, a fin de mantener inalterada su posición, se mide nuevamente el espectro de emisión.

4.3 Determinación del tiempo de decaimiento de fosforescencia

Se establecieron las curvas de decaimiento de fosforescencia intercalando en el camino óptico de la radiación de excitación un interruptor mecánico.

No es necesario usar el cilindro rotatorio ya que los tiempos de decaimiento son largos y los espectros de fluorescencia y fosforescencia están separados entre ellos.

Temperaturas comprendidas entre 77°K y la ambiente fueron alcanzadas permitiendo que la temperatura de la muestra se elevase lentamente por evaporación del nitrógeno líquido. Las temperaturas fueron medidas insertando una termocupla en la celda.

La intensidad de la emisión de fosforescencia se graficó versus tiempo en un registrador con base de tiempo (velocidad: 0,2 pulg/s).

4.4 Cálculo del tiempo de vida media natural y del tiempo de decaimiento de fluorescencia

Se utilizó el método propuesto por Strickler y Berg ⁽²³⁾ empleando la fórmula:

$$\frac{1}{\tau_a^0} = 2,880 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \bar{\nu}_f^{-3} \rangle_{\text{prom}}^{-1} \frac{g_l}{g_u} \int \epsilon d \ln \bar{\nu} \quad (30)$$

donde:

τ_a^0 : tiempo de vida media natural.

g_l : estado degenerado inferior.

g_u : estado degenerado superior.

$\frac{g_1}{g_u} = 1$ en transiciones singlete-singlete.

n : índice de refracción a la longitud de onda media de la banda de fluorescencia.

$\int \epsilon d \ln \bar{\nu}$: integral bajo la banda de absorción electrónica.

$$\langle \bar{\nu}_f^{-3} \rangle_{\text{prom}}^{-1} = \frac{\int I(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int \bar{\nu}^{-3} I(\bar{\nu}) d\bar{\nu}} : \text{valor recíproco del término medio } \bar{\nu}_f^{-3} \text{ en el espectro de fluorescencia.}$$

Los espectros de absorción se integraron en forma gráfica por el método de Simpson utilizando una computadora Monroe 1656.

Para facilitar los cálculos en las medidas de rendimientos y tiempos de decaimiento se utilizó un programa por computación. El programa, denominado CINEF (24), fue escrito en lenguaje FORTRAN IV para una computadora IBM 360.

En la figura 2 se representa el diagrama de flujo con la siguiente secuencia: hasta el punto (1) son leídos y controlados todos los datos referentes a la curva de calibración. Estos son introducidos según un orden determinado y cualquier alteración será detectada e indicada, luego de lo cual el procesamiento se detendrá. Los pasos siguientes hasta el punto (2) son semejantes a la secuencia anterior pero referidos al espectro que se desea corregir.

Si hasta aquí no ha habido inconvenientes, los datos introducidos son listados y comienza la ejecución de la corrección propiamente dicha.

La subrutina INTERP es una interpolación parabólica progresiva que puede alcanzar hasta el grado cuatro; en ella se fija el error deseado y durante el procesa-

miento éste progresará hasta el grado necesario (siempre que no sea mayor que cuatro) para que el valor obtenido tenga un error menor al indicado. En esta parte, dicha subrutina inter pola el valor del factor de corrección para cada longitud de onda introducido como dato en el espectro problema.

A continuación se lleva a cabo la corrección de la intensidad de la emisión para cada punto y se trabaja en número de onda, nm^{-1} , en lugar de longitud de onda.

Con el fin de precisar el trazado del espectro se vuelve a llamar a la subrutina INTERP para obtener valores cada $0,01 \text{ nm}^{-1}$.

El espectro así obtenido se regulariza por cuadrados mínimos según el concepto aplicado por Golay⁽²⁵⁾.

En las secuencias siguientes se llevan a cabo dos integraciones gráficas por el método de Simpson usando la subrutina que ya posee la biblioteca de programas de la máquina.

La primera integración es $\int I(\bar{\nu}) d\bar{\nu}$ donde I es la intensidad de la fluorescencia corregida; la segunda es $\int I(\bar{\nu})/\bar{\nu}^{+3} \cdot d\bar{\nu}$. El cociente de ambas da el valor de $\langle \bar{\nu}^{-3} \rangle^{-1}$ que interviene en la fórmula de Strickler y Berg para la obtención del tiempo de vida natural de un estado excitado electrónicamente por integración del espectro de absorción.

El espectro corregido es impreso gráficamente luego de normalizado, lo que permite obtener como resultado el factor de normalización y el área del espectro.

Conjuntamente con el espectro se imprime un listado de los valores interpolados y los grados utilizados; esto hace posible un examen rápido de la efectividad del proceso y del espaciamiento entre puntos. Si el grado es cero

significa que la longitud de onda de la curva de calibración y del espectro coinciden y no se lleva a cabo la interpolación; si el grado es cuatro, los puntos a tomar deben estar más próximos. Esta subrutina permite elegir los puntos tomados como datos en el espectro con entera libertad, sin que sea necesario mantener un $\Delta\lambda$ constante, ni que haya coincidencia con la longitud de onda de calibración.

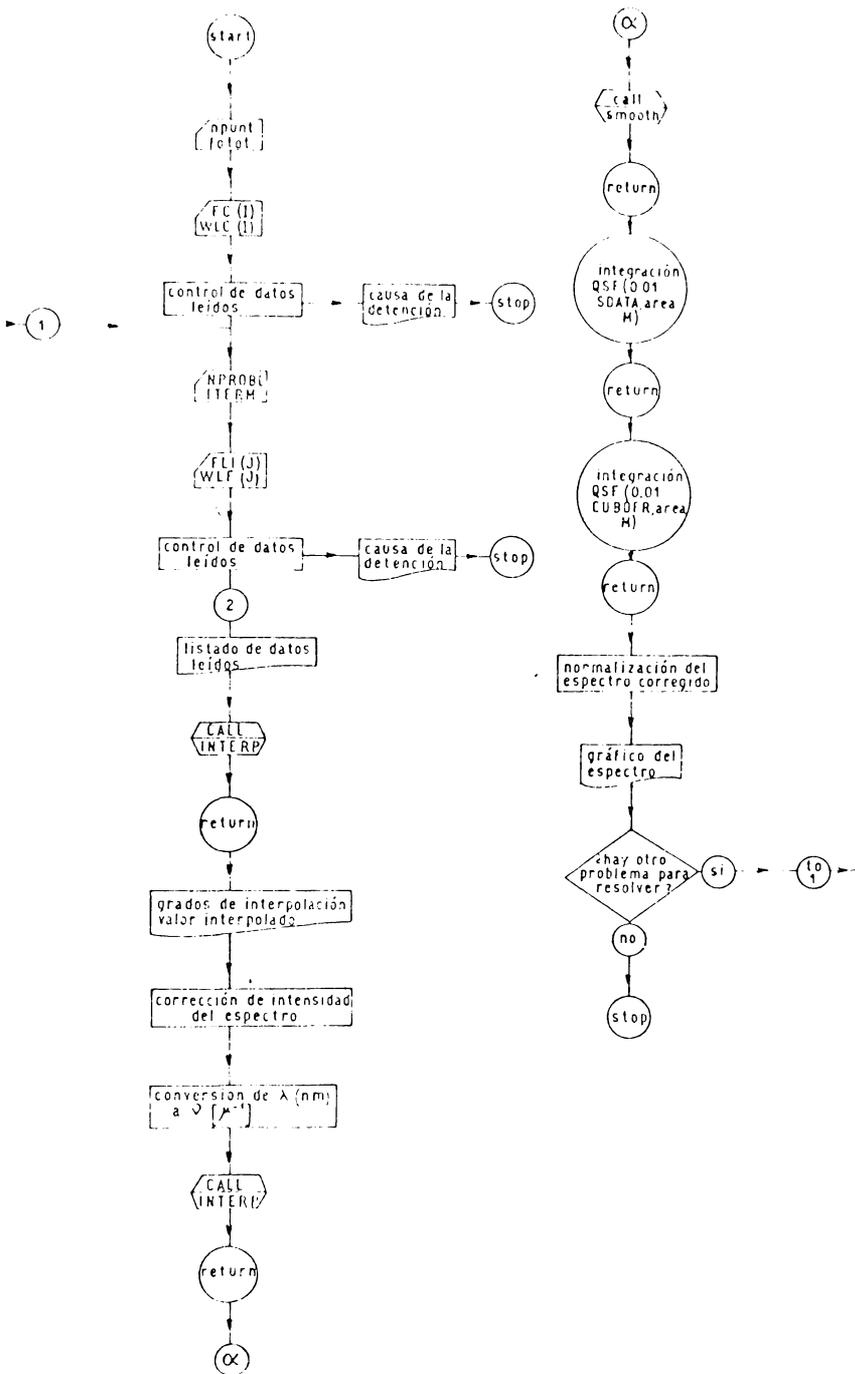


Figura 2. Diagrama de flujo correspondiente al programa CINEF.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Espectros de absorción

Se registraron los espectros de absorción en ciclohexano y etanol en el intervalo comprendido entre 33000 y 40000 cm^{-1} .

En las figuras 3, 4 y 5 se muestran los espectros en ambos solventes del indol, 3-metilindol y 2-metilindol normalizados en los respectivos máximos de absorción.

En las figuras 7 y 8 se observan los espectros de los tres indoles estudiados en ciclohexano y etanol respectivamente. En la figura 8 se incluye el espectro del L(-)triptofano. Se han desplazado los valores absolutos de ordenadas para apreciar las frecuencias de las distintas bandas.

Todos los espectros se barrieron con soluciones aproximadamente $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ en celdas de 100 mm de camino.

El indol en fase vapor muestra un espectro con estructura fina lo cual ha permitido a Strickland y colaboradores ⁽¹⁾ determinar la secuencia vibrónica de las bandas.

Comparando las posiciones de las bandas de los compuestos disueltos en ciclohexano con las obtenidas en fase vapor se trató de identificar las transiciones a las cuales corresponden.

Todos los espectros demuestran alguna analogía en lo que respecta a la energía de las transiciones, pero se observan ensanchamientos de las bandas y variaciones en los contornos por efecto del solvente.

Las transiciones correspondientes al indol se dan en la tabla 1.

Luego de identificadas las bandas en ciclohexano es posible compararlas con las obtenidas en etanol (tabla 2).

Tabla 1. Comparación de las posiciones de las bandas del indol disuelto en ciclohexano con las correspondientes en fase vapor.

Ciclohexano		Vapor (Strickland)	
Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
0-0 ¹ L _b	34750	0-0 ¹ L _b	35248
0 + 950 ¹ L _b	35700	$\left\{ \begin{array}{l} 0 + 937 \text{ } ^1L_b \\ 0 + 968 \text{ } ^1L_b \\ 0 + 989 \text{ } ^1L_b \end{array} \right.$	36155
			36216
			36237
0 + 1100 ¹ L _b ?	35850	0 + 1120 ¹ L _b ?	36368
0 + 1300 ¹ L _b	36050	0 + 1313 ¹ L _b	36561
0-0 ¹ L _a	36050	0-0 ¹ L _a	36561
0 + 700 ¹ L _a	36750 NR	0 + 750 ¹ L _a	37311 NR
0 + 1000 ¹ L _a	37050 NR	0 + 1000 ¹ L _a	37561 NP
0 + 1250 ¹ L _a	37300 NP	0 + 1700 ¹ L _a	38261 NP
0 + 2100 ¹ L _a	38250 NP	0 + 2450 ¹ L _a	39011 NP

NR: no resueltas, NP: no puras

Tabla 2. Comparación de las posiciones de las bandas del indol disuelto en etanol con las correspondientes en ciclohexano.

Etanol		Ciclohexano		$\Delta\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	
0-0 ¹ L _b	34650	0-0 ¹ L _b	34750	100
0 + 930 ¹ L _b	35600	0 + 950 ¹ L _b	35700	100
0-0 ¹ L _a	35900	0-0 ¹ L _a	36050	150
0 + 700 ¹ L _a	36600	0 + 700 ¹ L _a	36750	150

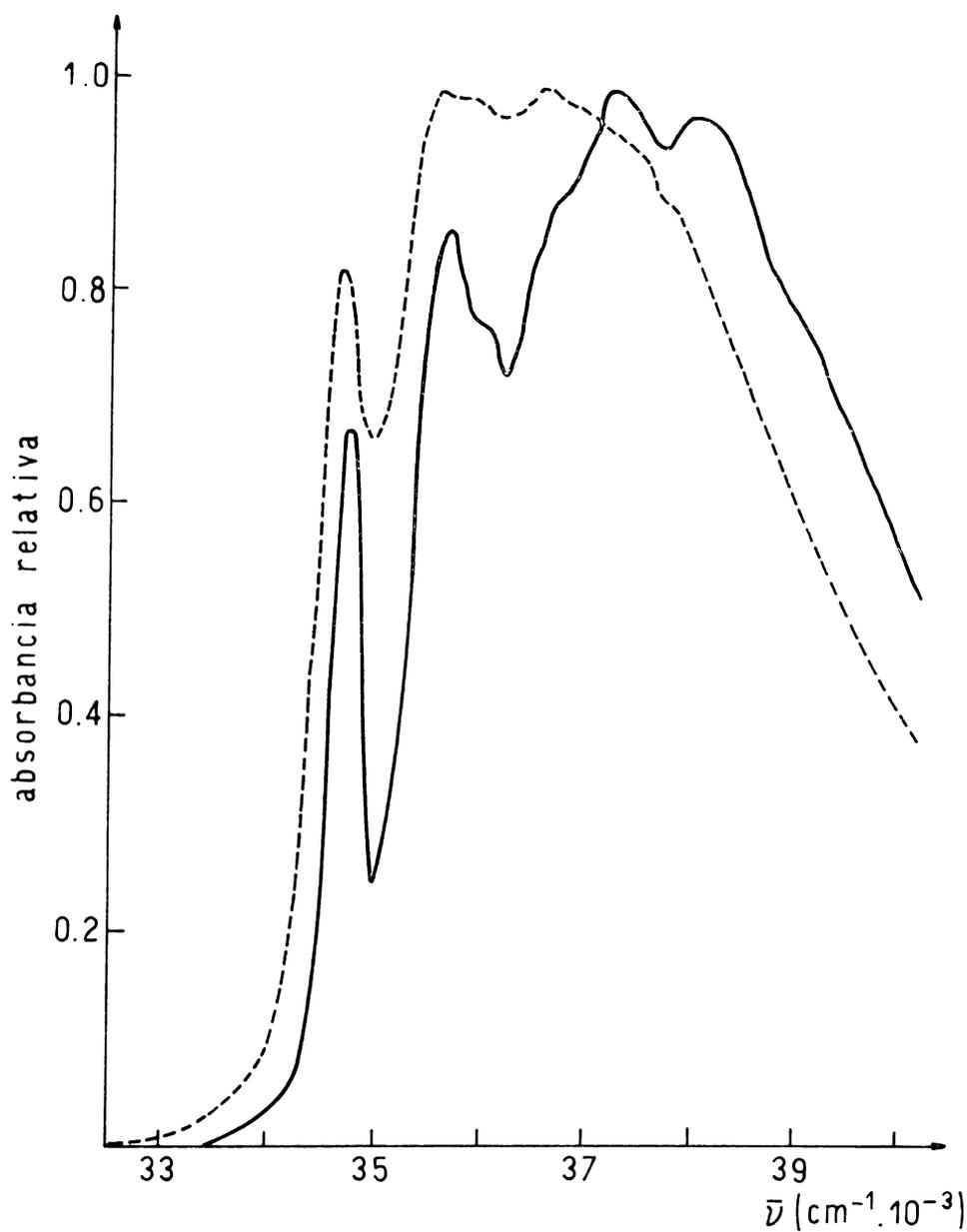


Figura 3. Espectros de absorción del indol en:

— ciclohexano
- - - etanol

El espectro del 3-metilindol es más difícil de interpretar que el del indol debido a que las bandas a mayores longitudes de onda son el resultado de un solapamiento de las dos transiciones. No obstante, efectuando el mismo tipo de análisis que el practicado para el caso del indol, se determinaron las transiciones correspondientes a las bandas más características (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las posiciones de las bandas del 3-metilindol disuelto en ciclohexano con las correspondientes en fase vapor.

Ciclohexano		Vapor (Strickland)	
Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
0-0 ¹ L _b	34500	0-0 ¹ L _b	34831
0-0 ¹ L _a	34500	0-0 ¹ L _a	35510
0 + 950 ¹ L _b	35450	0 + 980 ¹ L _b	35811
0 + 1400 ¹ L _b	35900	0 + 1340 ¹ L _b	36171
0 + 2100 ¹ L _b	36600	0 + 2100 ¹ L _b	36931
0 + 2750 ¹ L _b	37250	0 + 2800 ¹ L _b	37631

Las tres últimas bandas pueden ser solapamientos de ¹L_a y ¹L_b

La única banda posible de identificar en etanol es la de 34450 cm⁻¹ que correspondería a la de 34500 cm⁻¹ en ciclohexano.

El 2-metilindol no fue estudiado por Strickland. En la tabla 4 se dan las transiciones correspondientes a las distintas bandas observadas considerando los modelos del indol y del 3-metilindol.

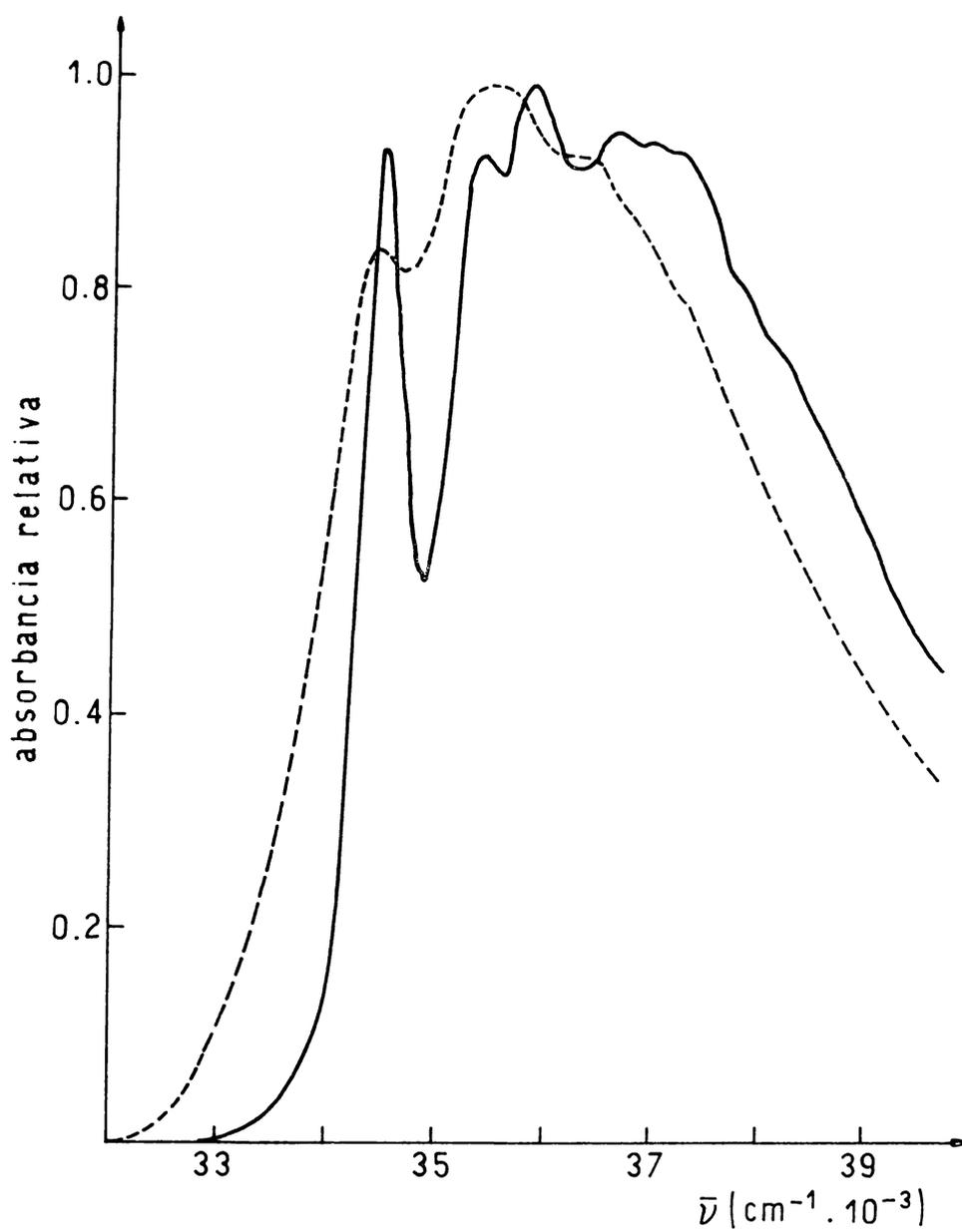


Figura 4. Espectros de absorción del 3-metilindol
en:
———— ciclohexano
----- etanol

El espectro del 2-metilindol (figura 5) sufre variaciones similares a las producidas en el indol cuando se cambia de solvente. La banda 0-0 1L_a se puede determinar considerando el aumento de su intensidad relativa en etanol respecto a ciclohexano, por analogía con lo ocurrido en el caso del indol (tabla 5).

Tabla 4. Posiciones de las bandas del 2-metilindol disuelto en ciclohexano.

Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
0-0 1L_b	34800
0 + 900 1L_b	35700
0 + 1050 1L_b	35850
0 + 1400 1L_b	36200
0-0 1L_a	36200
0 + 800 1L_a	37000
0 + 2200 1L_b	37000
0 + 2800 1L_b	37600
0 + 3150 1L_b	37950

Las dos últimas bandas pueden ser solapamientos de 1L_a y 1L_b .

Tabla 5. Comparación de las posiciones de las bandas del 2-metilindol disuelto en etanol con las correspondientes en ciclohexano.

Etanol		Ciclohexano		$\Delta\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Designación	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	
0-0 1L_b	34700	0-0 1L_b	34800	100
0-0 1L_a	36100	0-0 1L_a	36200	100

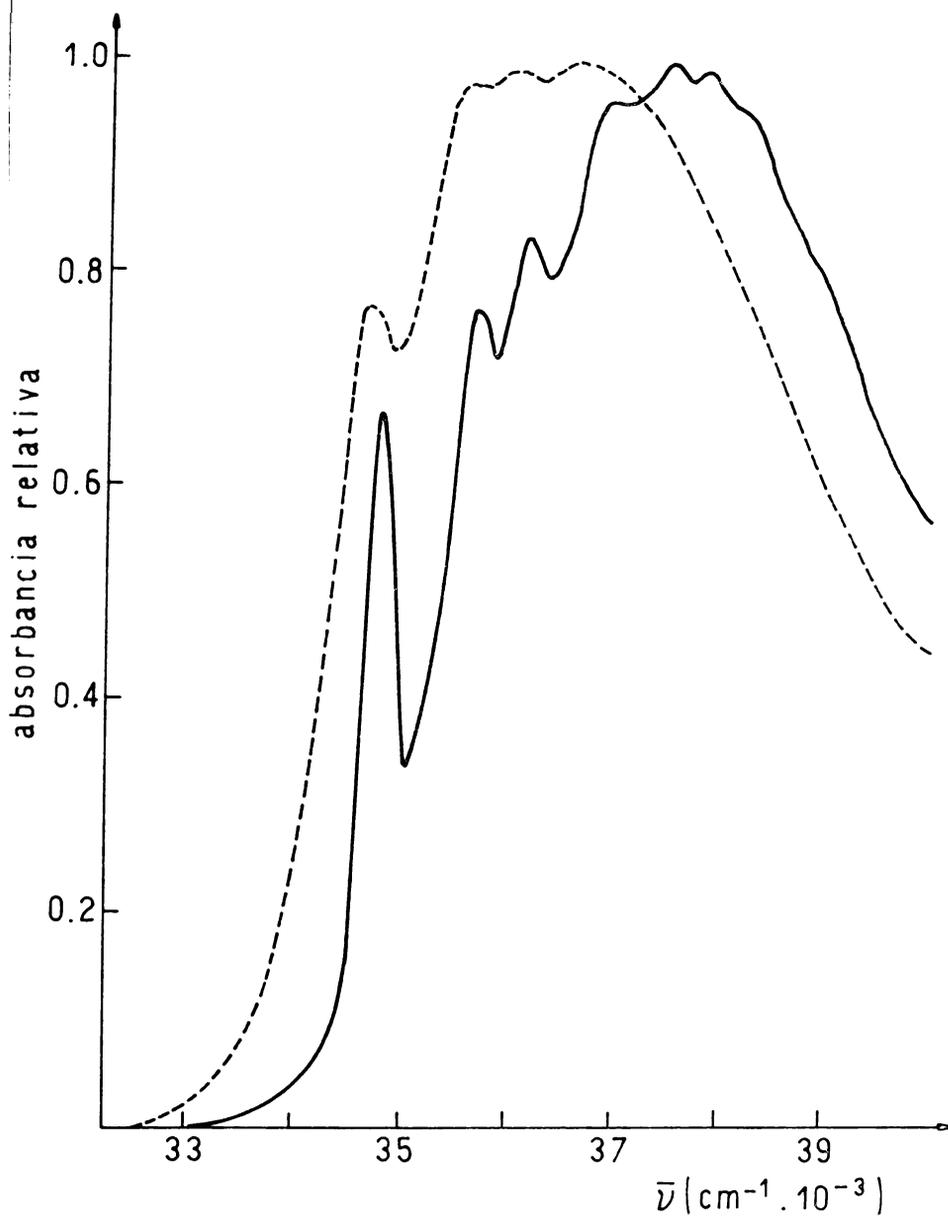


Figura 5. Espectros de absorción del 2-metilindol en:

— ciclohexano

- - - etanol

Se registró el espectro de absorción del L₍₋₎triptofano sólo en etanol (figura 6) debido a su insolubilidad en ciclohexano. Se observó que dicho espectro coincide aproximadamente con el del 3-metilindol, lo que permite suponer que las transiciones son las mismas para las dos sustancias.

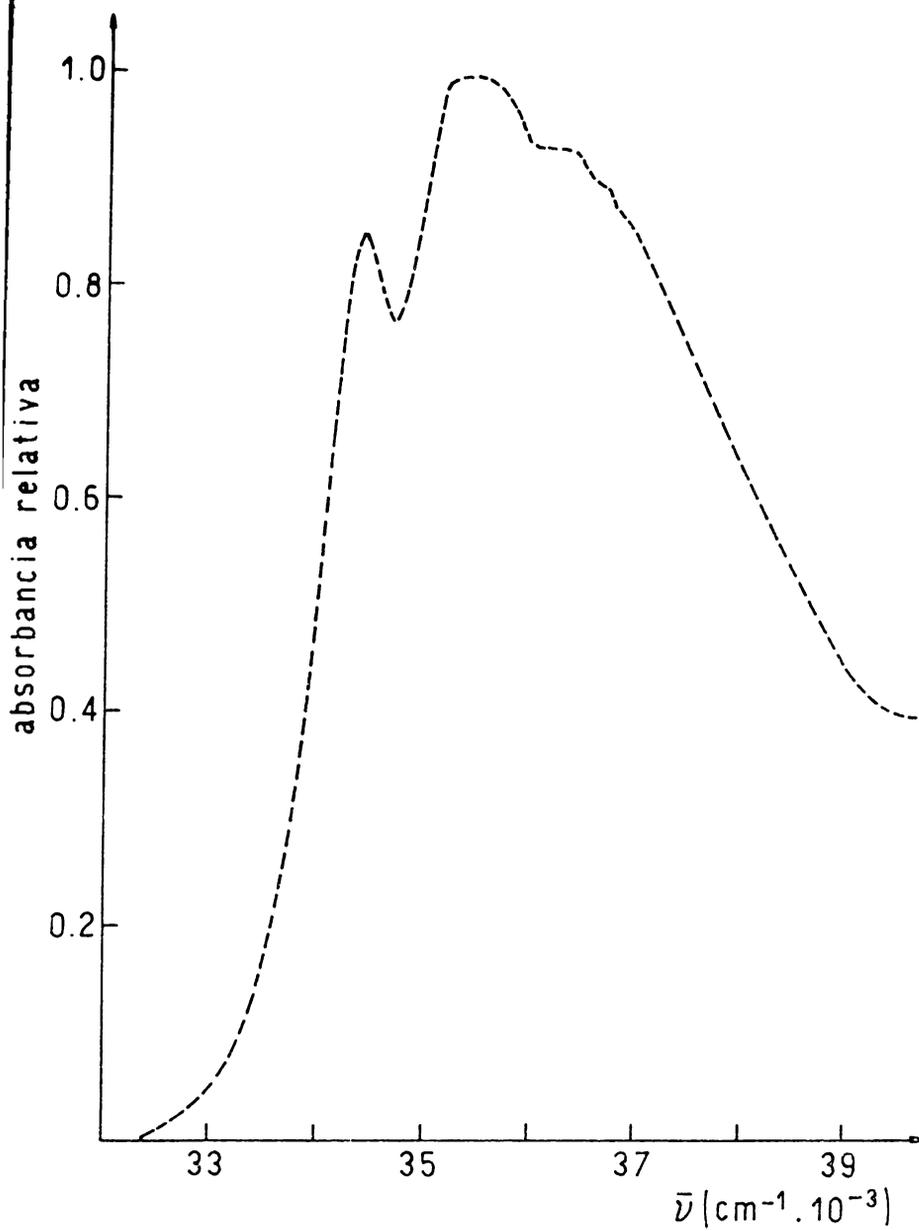


Figura 6. Espectro de absorción del L(-) triptofano en etanol.

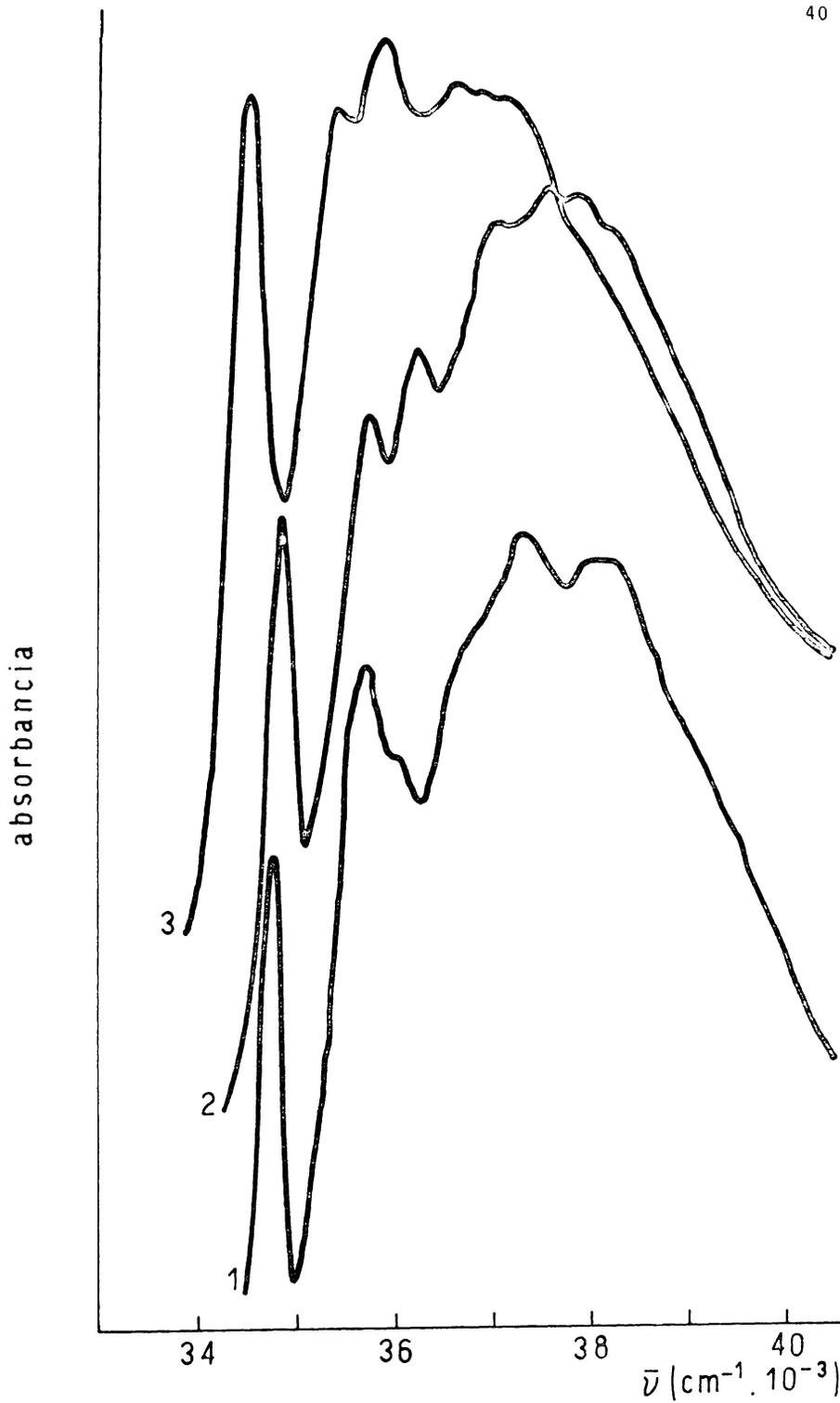


Figura 7. Espectros de absorción del (1) indol, (2) 2-metilindol y (3) 3-metilindol en ciclohexano.

5.1.1 Fuerza del oscilador por resolución gráfica de las bandas.

Es posible determinar la intensidad de una transición sobre la base de la fuerza del oscilador, f (26), el cual puede alcanzar el valor unitario para la máxima probabilidad de la transición.

La fuerza del oscilador se calcula mediante la expresión conocida:

$$f = 4,319 \cdot 10^{-9} \int \epsilon d\bar{\nu}$$

en que $\int \epsilon d\bar{\nu}$ es la intensidad integrada de la banda correspondiente del espectro de absorción y $\bar{\nu}$ es la frecuencia (cm^{-1}).

El cálculo de las fuerzas de los osciladores de las bandas 1L_a y 1L_b para el indol y sus derivados, a causa de su solapamiento, requieren ser resueltas descontando sobre el espectro, la absorción correspondiente a cada una de ellas.

Como ejemplo del procedimiento se dan en la figura 9 las bandas 1L_a y 1L_b halladas para el indol disuelto en ciclohexano.

En las tablas 6 y 7 figuran los valores obtenidos en ambos solventes para las fuerzas de los osciladores y los momentos de transición de las bandas 1L_a y 1L_b de las sustancias en estudio suponiendo el mismo tipo de solapamiento.

En la tabla 8 se indican las relaciones de las fuerzas de los osciladores de las bandas 1L_a y 1L_b en los mismos solventes.

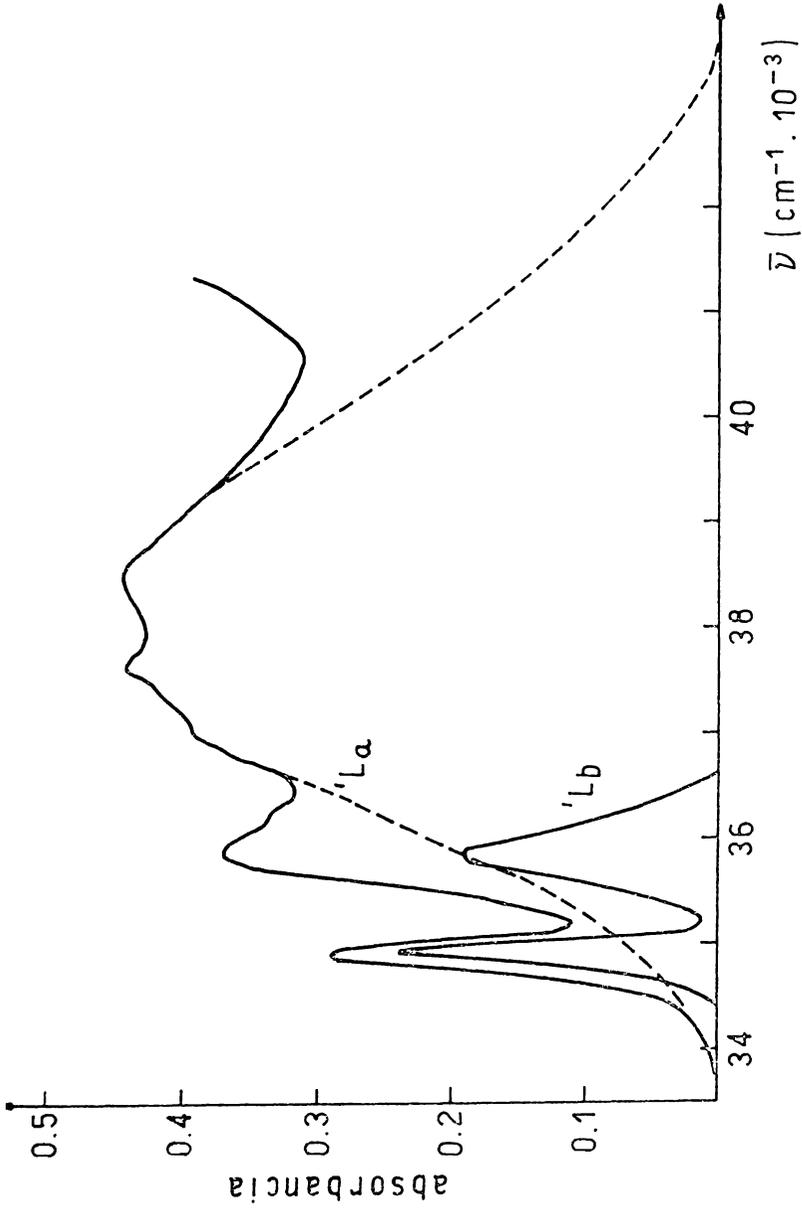


Figura 9. Resolución gráfica de las bandas $1L_{\alpha}$ y $1L_{\beta}$ del indol en ciclohexano.

Tabla 6. Fuerzas del oscilador para la banda 1L_a del indol y sus derivados.

Solvente Compuesto	Ciclohexano		Etanol	
	$\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	f (Debyes)	$\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	f (Debyes)
Indol	37300	0,189	36600	0,096
2-metilindol	37600	0,151	36750	0,149
3-metilindol	36600	0,092	36300	0,159
L(-) triptofano			36100	0,074

Tabla 7. Fuerzas del oscilador para la banda 1L_b del indol y sus derivados y sus correspondientes anchos medios de banda.

Solvente Compuesto	Ciclohexano		Etanol	
	$\bar{\nu}_{0-0}$ (cm^{-1})	f (Debyes)	$\bar{\nu}_{0-0}$ (cm^{-1})	f (Debyes)
Indol	34750	0,017	34400	0,008
2-metilindol	34800	0,013	34600	0,009
3-metilindol	34500	0,021	34350	0,012
L(-) triptofano			34250	0,012

Tabla 8. Relación entre las fuerzas del oscilador de las bandas 1L_a y 1L_b del indol y sus derivados en función del solvente.

Compuesto \ Solvente	Ciclohexano	Etanol
	$f {}^1L_a / f {}^1L_b$	$f {}^1L_a / f {}^1L_b$
Indol	11,1	12,0
2-metilindol	11,6	16,6
3-metilindol	4,4	13,2
L(-) triptofano		6,2

5.1.2 Análisis de los espectros

En general se observa que las transiciones 1L_a son más sensibles a las perturbaciones por efecto del solvente que las 1L_b .

Los espectros ultravioleta de las sustancias estudiadas en un determinado solvente y de cada uno de los compuestos en los dos solventes usados, exhiben una característica fundamental, la banda de mayor longitud de onda sufre muy pequeños cambios respecto a la energía e intensidad y las mayores variaciones aparecen a partir de los 36000 cm^{-1} en el sentido de las frecuencias decrecientes.

De los solventes estudiados el ciclohexano es el que produce menos alteraciones en los espectros de absorción lo que cabe atribuir a su no polaridad.

Según Konev ⁽⁹⁾ cuando se pasa de soluciones en hidrocarburos a solventes más polares el máximo correspondiente a bajas longitudes de onda sufre un gran corrimiento (700 cm^{-1}) hacia el rojo; en cambio, el máximo a longitudes de onda mayores se corre muy poco (150 cm^{-1}). La interpretación de Konev es que se producen uniones hidrógeno entre las moléculas del indol y las del solvente.

Observando la tabla 2 se advierte que en los sistemas estudiados no se produce el gran corrimiento postulado por Konev; el corrimiento se encuentra dentro de los 150 cm^{-1} . La discrepancia surge del hecho de que en el cálculo de los valores encontrados, dicho autor solo computó los máximos de absorción sin tener en cuenta el estado vibracional al cual pertenecían.

Si se consideran los máximos para el indol disuelto en ciclohexano (37300 cm^{-1}) y en etanol

(36600 cm^{-1}) el corrimiento da el mismo valor que encontró K_onev (700 cm^{-1}).

El corrimiento de los máximos (únicos valores susceptibles de ser comparados) del 3-metilindol en ciclohexano (35900 cm^{-1}) y en etanol (35500 cm^{-1}) es de 400 cm^{-1} , menor que en el caso indol, lo que estaría indicando que se produce un gran solapamiento de las bandas 1L_a y 1L_b .

En cambio, para el 2-metilindol, el corrimiento de los máximos en ciclohexano (37600 cm^{-1}) y en etanol (36750 cm^{-1}) es de 850 cm^{-1} , comparable al del indol.

Los estudios sobre polarización de los espectros de absorción (3, 4, 9) han permitido llegar a establecer que la banda a mayor longitud de onda del indol en ciclohexano es una transición ${}^1L_b \leftarrow {}^1A$ con una leve superposición de la banda 1L_a en la zona de mayor longitud de onda.

Si suponemos que los dos primeros máximos corresponden a la misma banda, 1L_b , se determina por resolución gráfica la frecuencia vibracional, la que da un valor de aproximadamente 900 cm^{-1} para las sustancias disueltas en ciclohexano y muy próximo a este valor para las disueltas en etanol (tabla 9).

Los espectros fueron medidos con una resolución de 0,5 nm que corresponde a $\pm 50 \text{ cm}^{-1}$ en la región barrida.

Tabla 9. Frecuencias vibracionales de la banda 1L_b .

Solvente Compuesto	Ciclohexano $\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Etanol $\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
Indol	0 + 940	0 + 975
2-metilindol	0 + 820	0 + 900
3-metilindol	0 + 830	0 + 890
L(-) triptofano		0 + 760

Esta vibración de intensidad fuerte correspondería a la de 980 cm⁻¹ dada por Strickland en metilciclohexano y a la que Hollas (27) caracterizó a 907 cm⁻¹ en fase vapor.

Yamamoto y Tanaka (28) en sus estudios encuentran que el cristal de indol exhibe prácticamente el mismo espectro que el del compuesto en solución y una frecuencia vibracional de 850 cm⁻¹ para la banda 1L_b . Esto está de acuerdo con lo anterior y si se tiene en cuenta que Kaneda y Tanaka (29) han establecido que la molécula de indol es muy plana, se puede concluir que la conformación del estado fundamental en solución es la misma que la del cristal, lo que además estaría de acuerdo con el hecho probado y conocido de que cuanto más plano es el estado fundamental más estructurado resulta el espectro de absorción.

Se observa también que las dos frecuencias vibracionales de menor energía de cada sustancia en los dos solventes ensayados, permanecen aproximadamente constantes (tabla 9).

Analizando las relaciones de las fuerzas de los osciladores (tabla 8) en ciclohexano se observa que

los valores son parecidos para el indol y el 2-metilindol y mucho menor para el 3-metilindol, lo cual corroborarfa que en este solvente la banda a 34500 cm^{-1} es un solapamiento muy grande de 1L_a y 1L_b , en concordancia, por lo demás, con lo observado anteriormente.

La relación de las fuerzas de los osciladores de las dos bandas en el $L(-)$ triptofano es mucho menor que los valores alcanzados en los otros derivados; cabe atribuir este efecto al aumento de la fuerza del oscilador de 1L_b .

El solapamiento también determina un aumento en el ancho medio de la banda, en el caso del espectro del indol cuando se pasa de ciclohexano a etanol como solvente, y en el del 3-metilindol respecto al del indol ambos en ciclohexano.

Valeur y Weber ⁽³⁰⁾, en un trabajo reciente, midieron los espectros de excitación polarizados, seleccionando, por medio de filtros, el nivel desde el cual se origina la transición. Consiguen de esta manera resolver el espectro en las dos bandas 1L_a y 1L_b de las moléculas de triptofano y de indol disueltos en propilenglicol. La figura 10 representa en forma comparativa la resolución del espectro estudiado por el método simple usado en nuestro laboratorio y el que usaron los autores.

Ambos espectros están en plena correspondencia y dan una frecuencia vibracional de $0 + 760\text{ cm}^{-1}$. Lo mismo sucede en el caso del indol en ciclohexano; para éste la frecuencia vibracional hallada en nuestro estudio es de $0 + 940\text{ cm}^{-1}$. Los valores siempre resultan muy próximos a las dos frecuencias dadas por Strickland ⁽¹⁾ que son de $0 + 730\text{ cm}^{-1}$ y $0 + 980\text{ cm}^{-1}$.

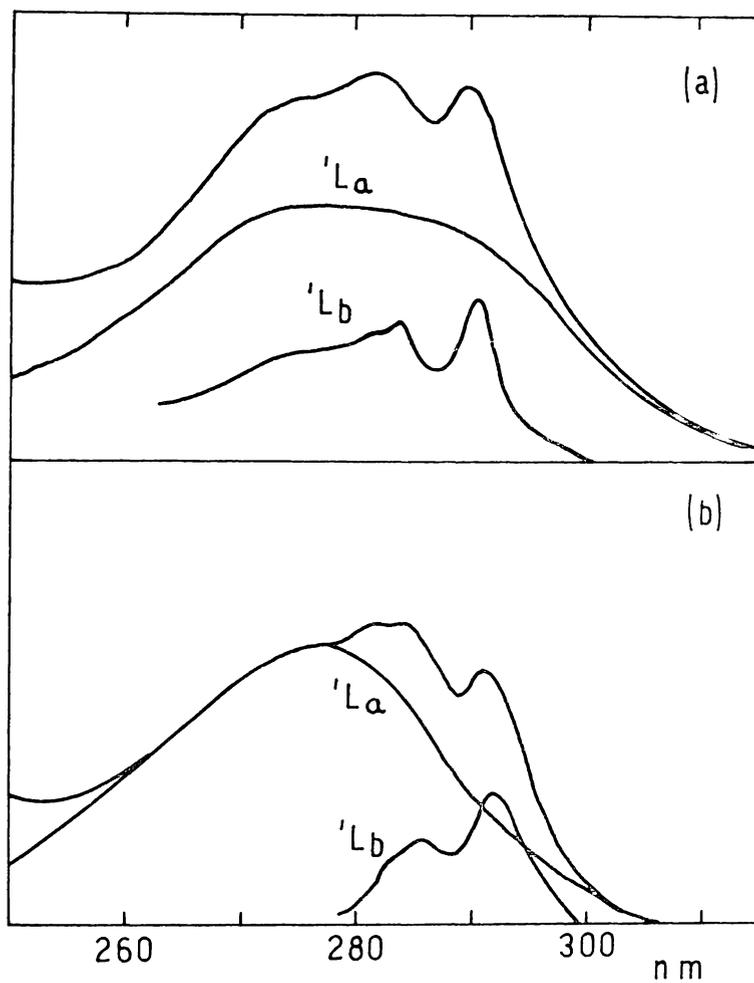


Figura 10. Resolución gráfica de las bandas 1L_a y 1L_b para el $L(-)$ triptofano.
a) Método de Valeur y Weber.
b) Método usado en el laboratorio.

En general se puede decir que los espectros de absorción del L(-) triptofano y del indol en solución están constituidos por dos transiciones bien características en la zona estudiada; una banda 1L_b a mayor longitud de onda, con cierto solapamiento de 1L_a , que es posible resolver gráficamente con cierta seguridad y una transición 1L_a para la cual es muy aventurado establecer una analogía con la fase vapor.

En solventes diferentes, la banda 1L_a solapa con la 1L_b en un grado que depende de la polaridad de aquellos.

Puede observarse que los dos estados cumplen, aún en solución, lo que está demostrado para los espectros respectivos en fase gaseosa, a saber: que el primer estado da una banda aguda y que el segundo es mucho más ancho, con el agregado de que en este caso, el ensanchamiento vibrónico no alcanza a anular la estructura vibracional.

La conservación, en lo sustancial, de la forma y contorno de las bandas demuestra que la sustitución afecta poco la geometría molecular y no hay prácticamente efecto inductivo del grupo metilo sobre la frecuencia vibracional de la banda 1L_b y solamente con alcance limitado sobre las de la banda 1L_a .

Se puede decir también que en el indol y derivados estudiados la interacción se produce entre dos estados del mismo tipo orbital, es decir, los dos electrones del heteroátomo contribuyen a la estructura electrónica π , la transición es $\pi - \pi^*$ como en el pirrol, dando como resultado que se conserve el modelo vibrónico del estado excitado.

En los espectros del L(-) triptofano y del

3-metilindol en etanol se observa que las bandas a mayor longitud de onda sufren un corrimiento hacia el rojo con respecto al indol o al 2-metilindol conservando básicamente su contorno.

Esta estabilización del estado excitado no puede ser atribuída a una transferencia de carga con el grupo ácido aceptor del triptofano ya que el 3-metilindol exhibe un espectro análogo sin tal posibilidad; en todo caso esto demuestra la relevancia de la posición 3 a la estabilización cuando el H es sustituido ⁽³¹⁾.

Esta propiedad y la planaridad del grupo cromóforo quedan demostradas en el estudio de Rivero y colaboradores ⁽³²⁾ sobre la estructura cristalina del complejo de transferencia de carga entre escatol y tetracianoetileno.

5.2 Espectros de fluorescencia a temperatura ambiente.

Los espectros de emisión de fluorescencia a temperatura ambiente se registraron termostaticando a 25°C el compartimiento donde se aloja la celda.

Las soluciones empleadas para correr los espectros de fluorescencia fueron las mismas usadas para los espectros de absorción.

Todos los espectros de fluorescencia corregidos se han representado, en forma normalizada, conjuntamente con los espectros de absorción. Es importante destacar que el espectro de excitación corregido se extiende entre los límites correspondientes al de absorción y coincide en su aspecto vibracional con éste.

En ciclohexano se observa una cierta estructura en el contorno de la banda de fluorescencia además de tener una imagen especular parcial respecto al de absorción; por lo tanto se ha tratado de establecer la concordancia entre las frecuencias vibracionales de ambos espectros.

En las figuras 11, 12 y 13 se representan los espectros del indol, 3-metilindol y 2-metilindol disueltos en ciclohexano. Las flechas indican las frecuencias vibracionales de la banda de menor energía asignada a la transición ${}^1L_b \leftarrow {}^1A$ del cristal de indol.

En la tabla 10 figuran los valores de los parámetros de fluorescencia de los compuestos citados disueltos en ciclohexano.

Cuando se utiliza etanol como solvente se observa que los espectros de emisión de fluorescencia carecen completamente de estructura y sus máximos se desplazan hacia frecuencias menores.

En la tabla 11 figuran los valores de los parámetros de fluorescencia de los compuestos estudiados disueltos en etanol, cuyos espectros se dan, conjuntamente con los de baja temperatura, en las figuras 18, 19, 20 y 21.

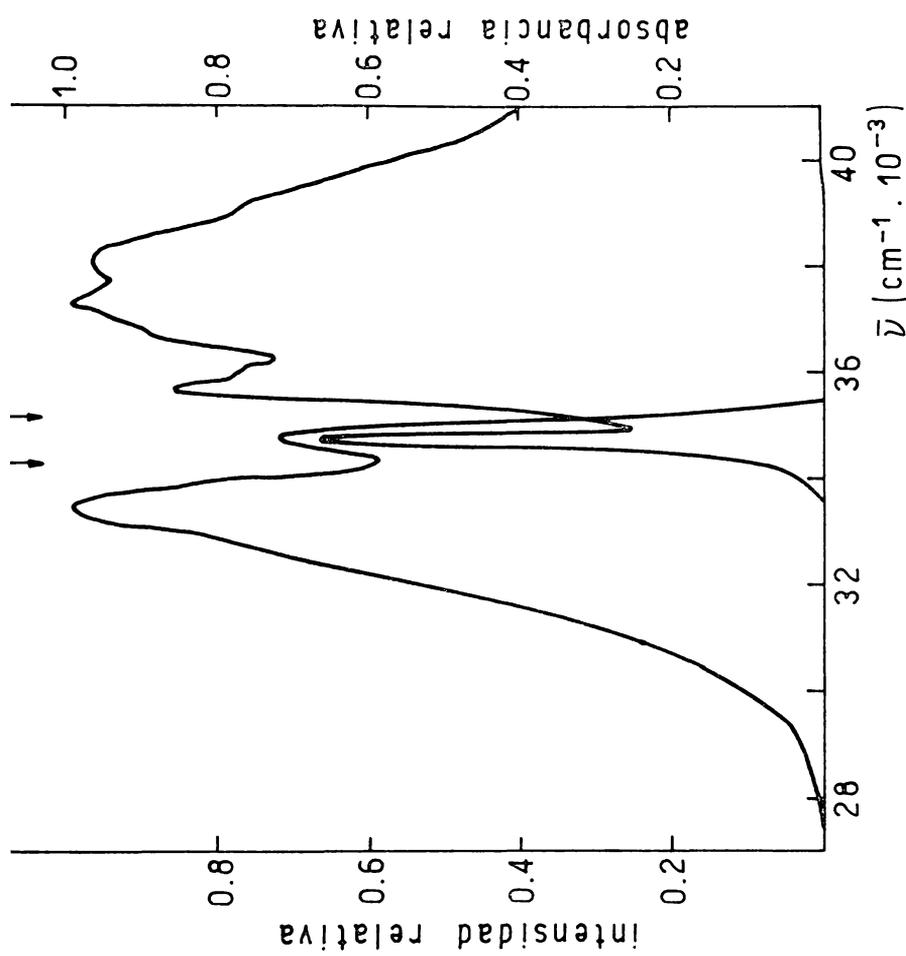


Figura 11. Espectros de absorción y de emisión a 25°C del indol en ciclohexano.

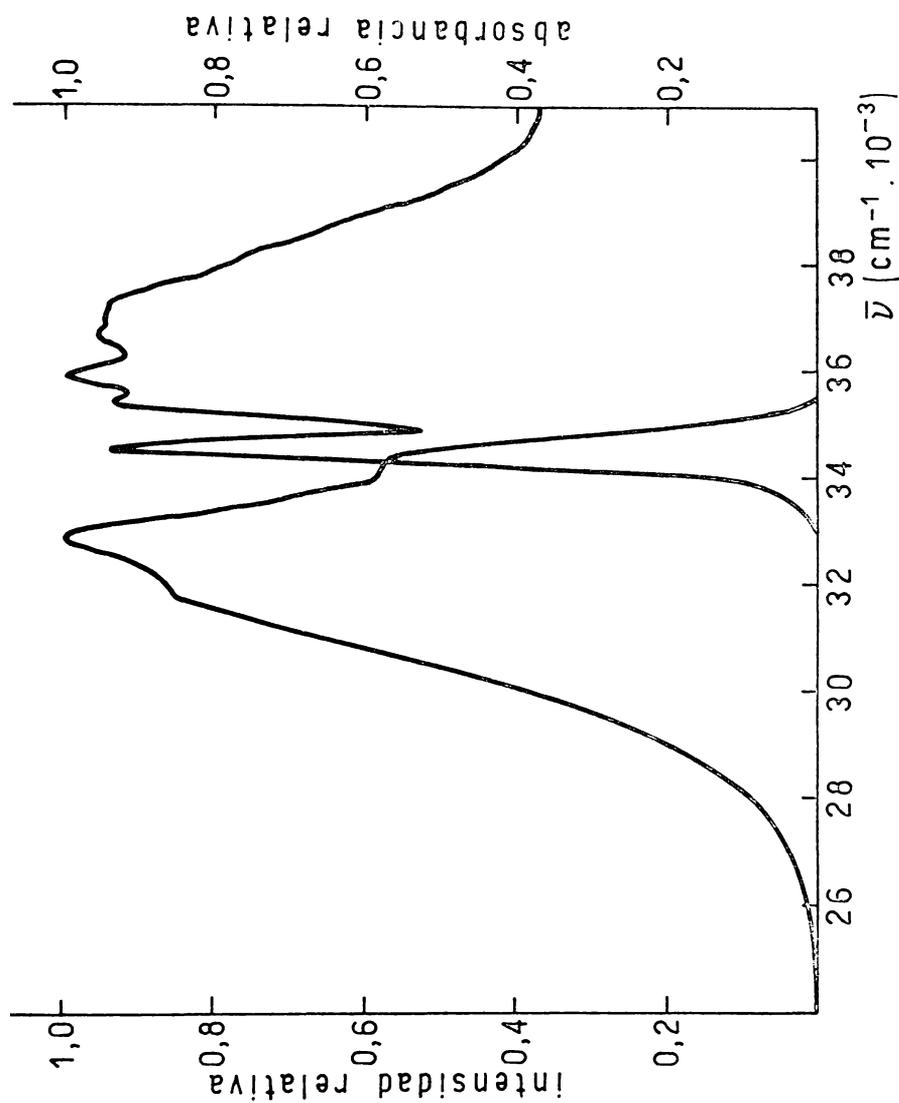


Figura 12. Espectros de absorción y de emisión a 25°C del 3-metilindol en ciclohexano.

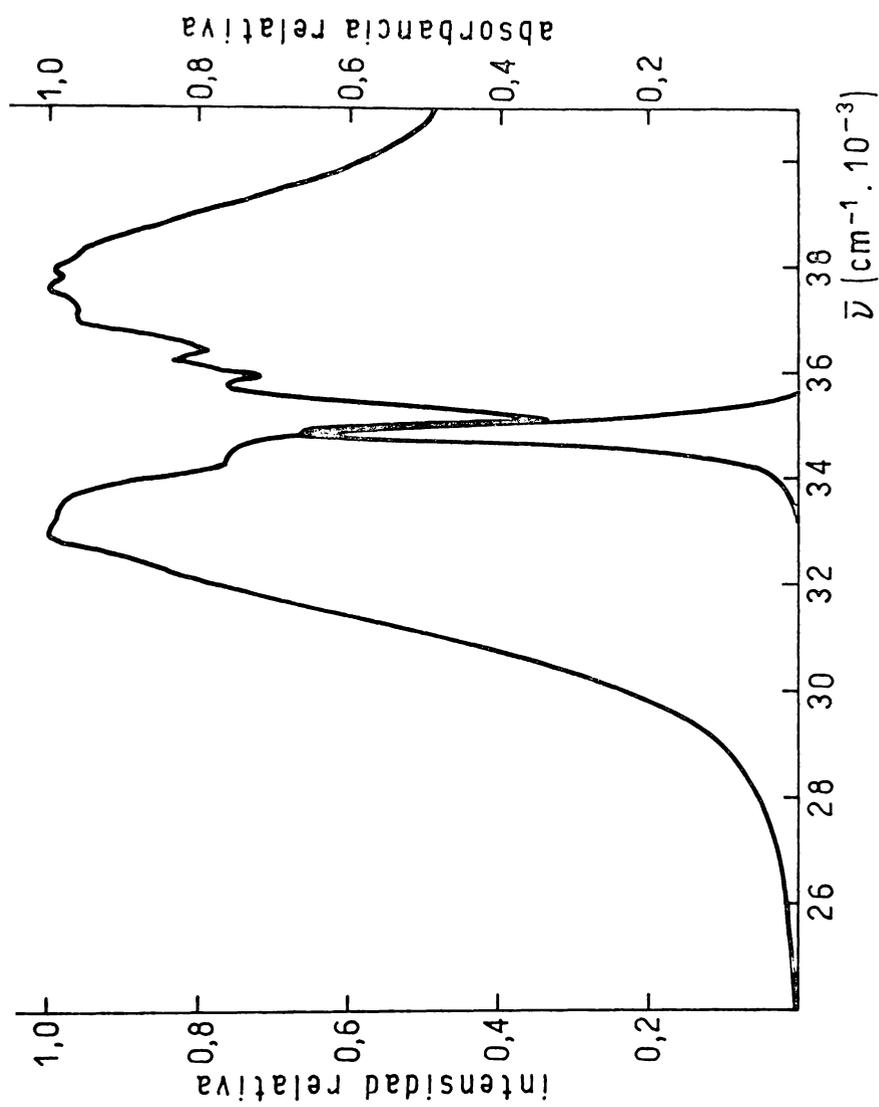


Figura 13. Espectros de absorción y de emisión del 2-metilindol en ciclohexano. a 25°C.

Tabla 10. Parámetros de fluorescencia del indol y derivados en ciclohexano a 25°C.

Compuesto	$\bar{\nu}_{exc}(cm^{-1})$	$\bar{\nu}_{em}(cm^{-1})$	ϕ_f	$\tau_a^0 \cdot 10^9(s)$	$\tau_R^0 \cdot 10^9(s)$	$\tau_f \cdot 10^9(s)$	$0-0 \bar{\nu}_b(cm^{-1})$	$0-0 \bar{\nu}_a(cm^{-1})$
Indol	37300	33500	0,37	3,5	21,1	7,8(1)	34750	34775
2-metilindol	37600	33000	0,39	4,6	9,5	3,7(2)	34575	34600
3-metilindol	35900	32800	0,35	5,8	9,1	3,2(2)	34300	33650

Tabla 11. Parámetros de fluorescencia del indol y derivados en etanol a 25°C.

Compuesto	$\bar{\nu}_{exc}(cm^{-1})$	$\bar{\nu}_{em}(cm^{-1})$	ϕ_f	$\tau_a^0 \cdot 10^9(s)$	$\tau_R^0 \cdot 10^9(s)$	$\tau_f \cdot 10^9(s)$	$(\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f)/2 (cm^{-1})$	$(\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f)(cm^{-1})$
Indol	36500	30500	0,36	10,8	12,8	4,6(1)	33550	6100
2-metilindol	36200	29750	0,41	7,8	---	3,2(3)	33225	7050
3-metilindol	35700	28650	0,41	7,9	---	3,3(3)	32100	6900
L(-)triptofano	35500	29700	0,16	13,9	---	2,2(3)	32600	5800

(1) W.B. de Lauder y Ph. Wahl, Biochim. Biophys. Acta, 243, 153 (1971)

(2) M.S. Walker, T.W. Bednar, R.Lumry y F. Humphries, Photochem. Photobiol., 14, 147 (1971)

(3) En la bibliografía no se han encontrado valores para los tiempos de decaimiento de los derivados, por lo tanto, los valores que figuran en la tabla son valores calculados y por consiguiente no aplicables

5.2.1 Análisis de los espectros en ciclohexano.

La imagen especular parcial de la figura 11 se observa en la figura 14, donde se hacen coincidir las alturas de las bandas 0-0 de absorción y de fluorescencia, proyectando luego el espectro sobre la línea de simetría.

Los picos a 34750 cm^{-1} correspondientes a la transición 0-0 1L_b en absorción y en fluorescencia son coincidentes y el pico a 35700 cm^{-1} en absorción corresponde a la inflexión observada a 33750 cm^{-1} en fluorescencia. La frecuencia vibracional de esta banda arroja un valor de 1000 cm^{-1} para el estado fundamental, en correspondencia con la frecuencia vibracional en absorción, que daba un valor de 940 cm^{-1} por resolución del espectro (Tabla 9).

Las frecuencias del máximo de fluorescencia a 33500 cm^{-1} y la inflexión a 32500 cm^{-1} pueden ser comparadas con las de absorción a 36050 cm^{-1} y 37050 cm^{-1} respectivamente correspondientes a la transición 1L_a . Estas energías difieren en los espectros de emisión y absorción en el mismo intervalo: $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$.

La transición correspondiente a 36750 cm^{-1} en absorción no se observa en el espectro de fluorescencia, supuesto que deba existir a 32800 cm^{-1} .

Considerando la simetría parcial de los espectros, el origen de la transición 1L_a se encontraría a 34775 cm^{-1} , muy cercana a la transición 0-0 1L_b (34750 cm^{-1}).

El corrimiento de Stokes para la banda 0-0 1L_a es de 2550 cm^{-1} .

Se estudiaron los otros compuestos efectuando el mismo tipo de consideraciones.

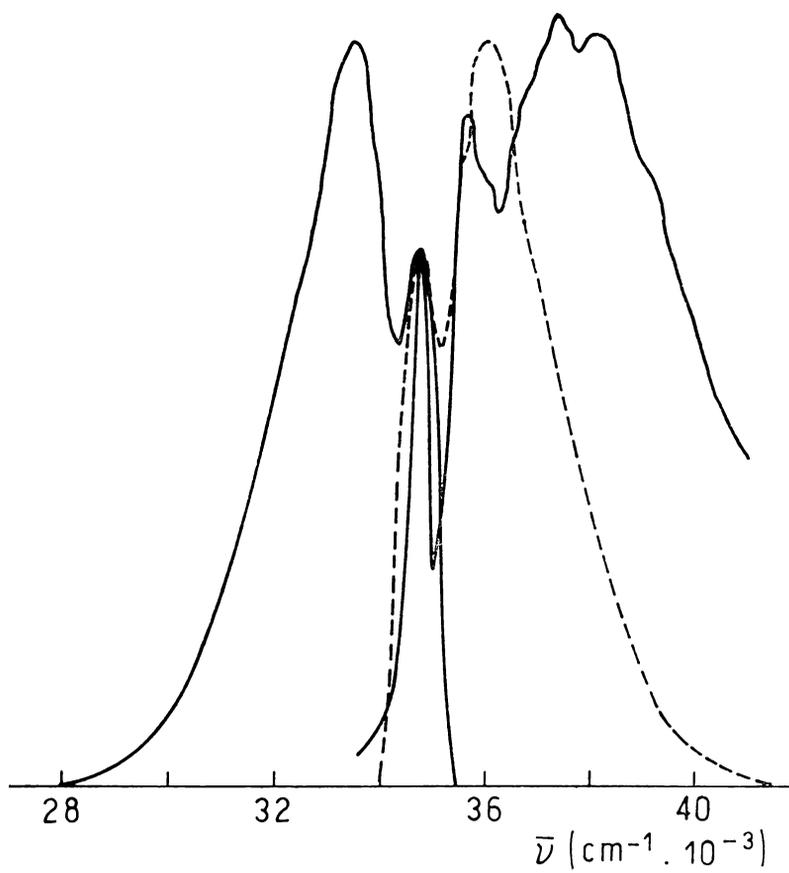


Figura 14. Proyección del espectro de absorción sobre el de fluorescencia del indol en ciclohexano.

Para el 3-metilindol la energía a 34100 cm^{-1} en el espectro de fluorescencia correspondería a la de 34500 cm^{-1} en absorción (el origen de la transición 1L_b estaría en 34300 cm^{-1}).

Si el máximo de la emisión de fluorescencia corresponde a la transición 1L_a (32800 cm^{-1}) y de la absorción a 34500 cm^{-1} a la misma transición, el origen de la banda 1L_a estaría en 33650 cm^{-1} o sea a mayor longitud de onda que la $0-0 \text{ } {}^1L_b$.

El corrimiento de Stokes para la banda $0-0 \text{ } {}^1L_b$ es de 400 cm^{-1} y para la banda $0-0 \text{ } {}^1L_a$ es de 1700 cm^{-1} .

Para el 2-metilindol, el pico a 34300 cm^{-1} en absorción se corresponde con el hombro a 34350 cm^{-1} en fluorescencia, por lo cual el origen de la transición 1L_b estaría en 34575 cm^{-1} .

El hombro a 33400 cm^{-1} en fluorescencia se halla a 950 cm^{-1} del de 34350 cm^{-1} y se corresponde con el pico a 35700 cm^{-1} en absorción, que se halla a 900 cm^{-1} del de 34300 cm^{-1} , lo cual significa que corresponden a la misma transición 1L_b .

El máximo a 33000 cm^{-1} en fluorescencia correspondería al pico a 36200 cm^{-1} en absorción y la inflexión a 32200 cm^{-1} en fluorescencia con la de 37000 cm^{-1} en absorción, serían transiciones 1L_a .

El origen de la banda 1L_a estaría en 34600 cm^{-1} , con lo cual el origen de esta transición sería el mismo que el de la 1L_b .

El corrimiento de Stokes para la banda $0-0 \text{ } {}^1L_b$ es de 450 cm^{-1} y para la banda $0-0 \text{ } {}^1L_a$ es de 3200 cm^{-1} .

5.2.2 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la emisión de fluorescencia fue estudiado en el intervalo de 20°C a 60°C. Con la medida experimental del rendimiento de fluorescencia se determinó la energía de activación.

En la figura 15 se muestra la variación del rendimiento de fluorescencia con la temperatura para el indol y el L(-) triptofano disueltos en etanol. El aumento de la temperatura afecta las velocidades de los procesos de desactivación en solventes polares. En ciclohexano no se ha encontrado variación con la temperatura en el rendimiento de fluorescencia.

Con la hipótesis de la existencia de dos caminos de desactivación del estado excitado es posible calcular la energía de activación para el proceso dependiente de la temperatura, mediante la ecuación (22) que expresada en forma logarítmica resulta:

$$\ln\left(\frac{1}{\Phi_f} - 1 - K_1\right) = \ln K_2 - \frac{E_1}{RT} \quad (31)$$

La constante K_1 se obtiene introduciendo valores en la ecuación hasta conseguir la mejor recta (33,34) al representar $\ln\left(\frac{1}{\Phi_f} - 1 - K_1\right)$ vs. T^{-1} . El valor de K_1 debe ser considerado como aproximado ya que existe la posibilidad de incurrir en errores sistemáticos en su evaluación.

En la figura 16 se muestran las rectas obtenidas para el indol y el L(-) triptofano disueltos en etanol.

El trazado de la recta obliga a desprestigiar el valor de K_1 , lo que indica que el proceso de desactivación es únicamente dependiente de la temperatura.

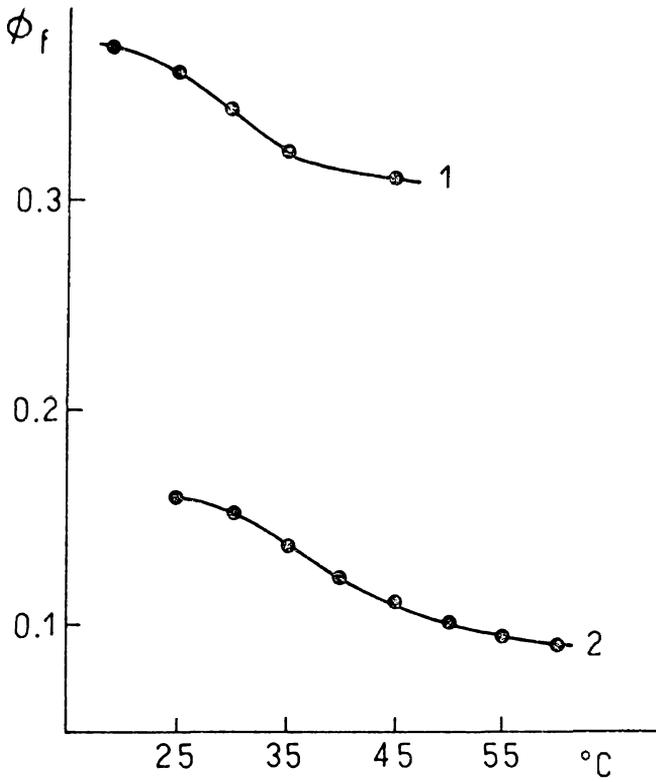


Figura 15. Variación del rendimiento de fluorescencia con la temperatura del (1) indol y (2) L(-) triptofano en etanol.

En la tabla 12 se muestran los valores hallados para la energía de activación y las constantes correspondientes.

En el caso del ciclohexano (solvente no polar), al ser el proceso de desactivación independiente de la temperatura, la ecuación (22) se simplifica ya que $\phi_f^{-1} - 1 = K_1$, lo que conduce a valores de $K_1 > 1$ para los compuestos estudiados, lo que significa que $k_f < k_n + k_g$.

Tabla 12. Resultados experimentales correspondientes a la ecuación (22) para el apagado de la fluorescencia en etanol por efecto de la temperatura, $K_1 = 0$.

Compuesto	K_2	E_1 (cm^{-1})	$k_1^a \cdot 10^{-9}$ (s^{-1})(1)	$k_1^a \cdot \exp(-E_1/RT)$ (s^{-1})(25°C)
Indol	52,4	700	4,1	$1,4 \cdot 10^8$
2-metilindol	25,0	600	3,2	$1,8 \cdot 10^8$
3-metilindol	22,9	600	2,9	$1,9 \cdot 10^8$
L(-) triptofano	3568,8	1400	256,9	$3,5 \cdot 10^8$

(1) Valores calculados con τ_f de tabla 11

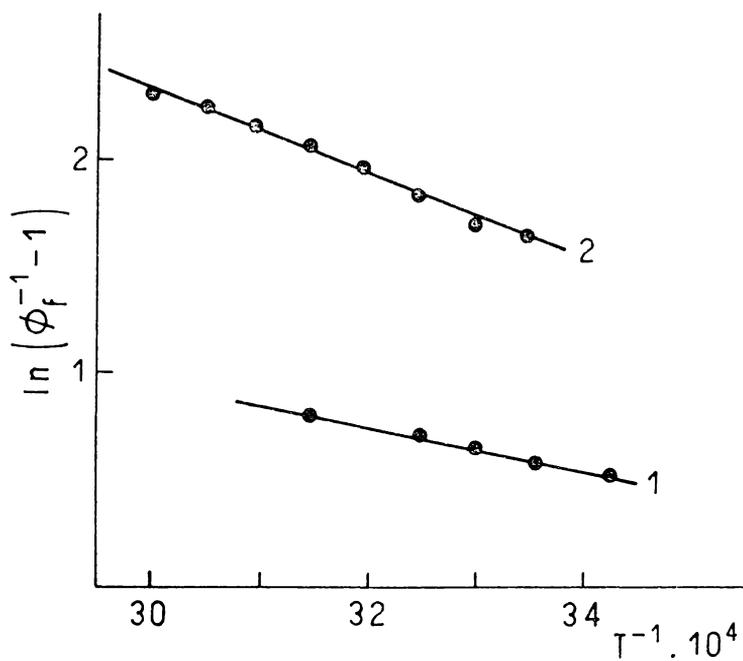


Figura 16. Representación gráfica de la aplicación de la ecuación (31) para el
(1) indol y
(2) $L(-)$ triptofano en etanol, $K_1 = 0$

5.2.3 Efecto de átomos pesados

La eficiencia de fluorescencia en un sistema puede disminuir debido a la presencia de ciertas sustancias que producen apagado.

La cinética del apagado en soluciones se describe mediante la ley de Stern-Volmer (ecuación 27). Graficando la relación de eficiencias de fluorescencia en función de la concentración de átomo pesado que produce el apagado, se obtiene una recta cuya pendiente es la constante de Stern-Volmer, K_{SV} , con la cual se calcula la constante de apagado, k_q , (ecuación 28). El valor de esta constante determina si el proceso está controlado difusionalmente, para lo cual es necesario que el tiempo de vida del estado excitado sea mayor de 10^{-9} segundos. En este caso, las constantes de apagado dependen de la viscosidad del solvente y de la temperatura.

La constante de velocidad de un proceso controlado difusionalmente es (35):

$$k_c(\text{litro mol}^{-1}\text{s}^{-1}) = 8RT/3000 \eta \quad (32)$$

η : viscosidad del solvente en poises.

Básicamente pueden existir dos mecanismos mediante los cuales se pierde la energía en forma colisional: aumento del cruce entre sistemas o transferencia electrónica.

En el presente trabajo se estudió el efecto producido por el agregado de yoduro de sodio a soluciones de un indol en etanol. Se observó que la forma del espectro de emisión de fluorescencia no variaba, pero sí disminuía su intensidad. La disminución de la fluorescencia es debida al I^- que actúa como átomo pesado; el Na^+ no produce apagado.

Las concentraciones de yoduro de sodio se

mantuvieron lo suficientemente bajas como para que no existiera absorción de la luz de excitación.

En la figura 17 se adopta el indol para ejemplificar la representación gráfica de la ley de Stern-Volmer.

En la tabla 13 se dan los valores hallados para las constantes de apagado del indol y derivados disueltos en etanol a 25°C. El apagado del L(-)triptofano por I⁻ en etanol es despreciable.

Se puede observar que los valores encontrados son comparables con el de la constante de control difusional calculada mediante la ecuación (32):

$$k_c(\text{etanol}) = 5,4 \cdot 10^9 \text{ litros mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Tabla 13. Resultados experimentales del apagado de la fluorescencia por efecto del NaI en etanol a 25°C.

Compuesto	$K_{SV}(\text{M}^{-1})$	$k_q \cdot 10^{-9}(\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	(1)
Indol	19,1	4,1	
2-metilindol	11,2	3,5	
3-metilindol	6,1	1,9	

(1) Valores calculados con τ_f de tabla 11.

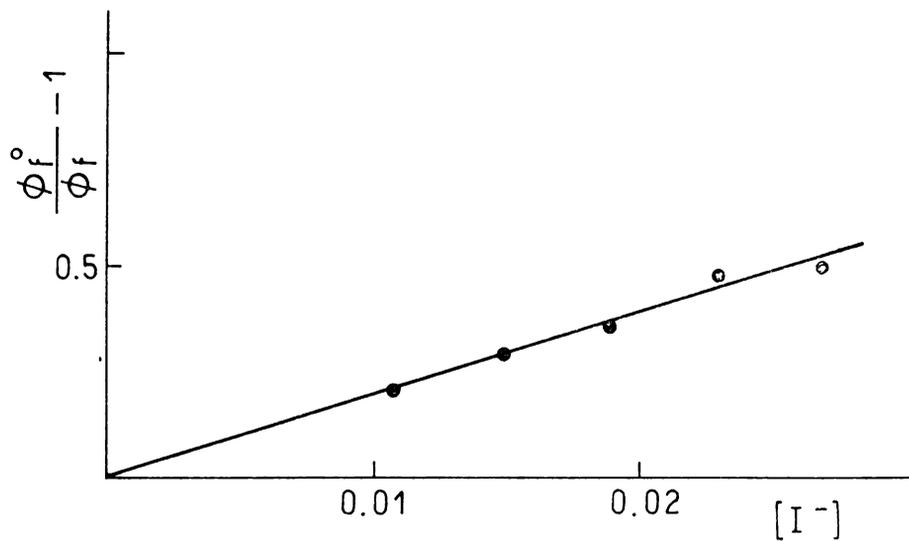


Figura 17. Representación gráfica del efecto del I^- sobre el indol en etanol.

5.3 Espectros de luminiscencia a 77°K.

Los espectros de emisión y las curvas de decaimiento se barrieron usando el accesorio de fosforescencia y enfriando con nitrógeno líquido.

Las curvas de decaimiento de la fosforescencia se obtuvieron interrumpiendo la radiación de excitación (280 nm) y graficando la intensidad versus tiempo para la longitud de onda de emisión correspondiente a la banda 0-0 en el espectro de fosforescencia.

En las figuras 18, 19, 20 y 21 se representan los espectros de absorción y emisión a temperatura ambiente y el espectro de emisión total en etanol a 77°K de los compuestos estudiados.

Los parámetros de emisión a 77°K se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Parámetros de la luminiscencia del indol y derivados a 77°K en etanol (excitación: 280 nm).

Fluorescencia								
Compuesto	$\bar{\nu}_{em} (cm^{-1})$			ϕ_f	$\Delta\bar{\nu}_{max} (cm^{-1})$ $(\bar{\nu}_{77^{\circ}K} - \bar{\nu}_{298^{\circ}K})$			
	Indol	31100	32600		33850	0,79	2100	
2-metilindol	30800	31650	32800	0,68	1900			
3-metilindol	30500	31550	33300	0,69	2900			
L(-)triptofano	30700	31750		0,60	2050			

Fosforescencia								
Compuesto	$\bar{\nu}_{em} (cm^{-1})$						ϕ_p	$\tau_p(s)$
	Indol	24700	23900	23100	22200	21800		
2-metilindol	25050	24250	23450	22600	22050	20550	0,17	6,2
3-metilindol	24000		22700		21400	20100	0,13	5,1
L(-)triptofano	24600	23900	23200	22200	21800	20600	0,15	6,6

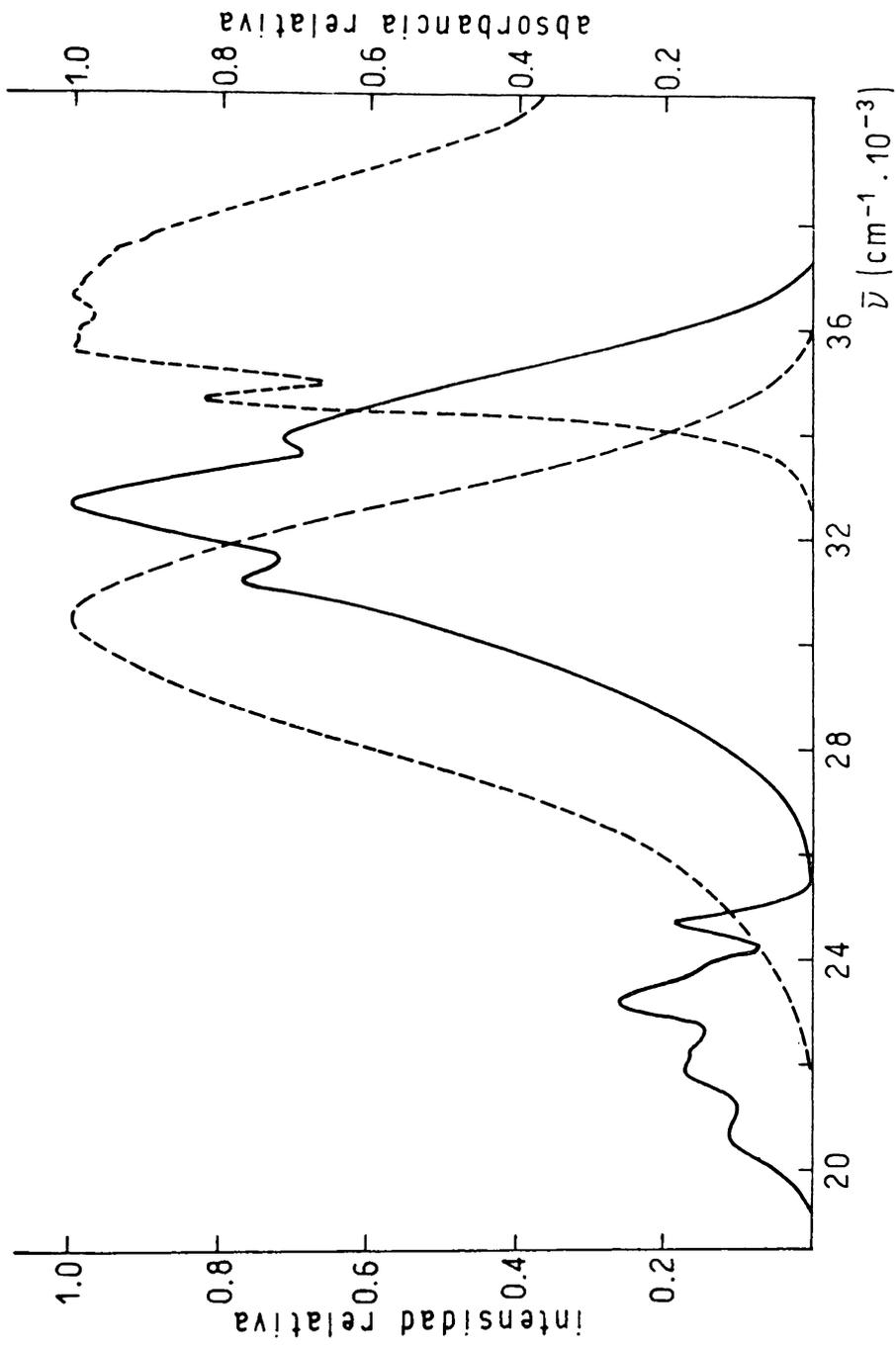


Figura 18. Espectros de absorción y emisión a 25°C ---- y de emisión a 77°K ----- del indol en etanol.

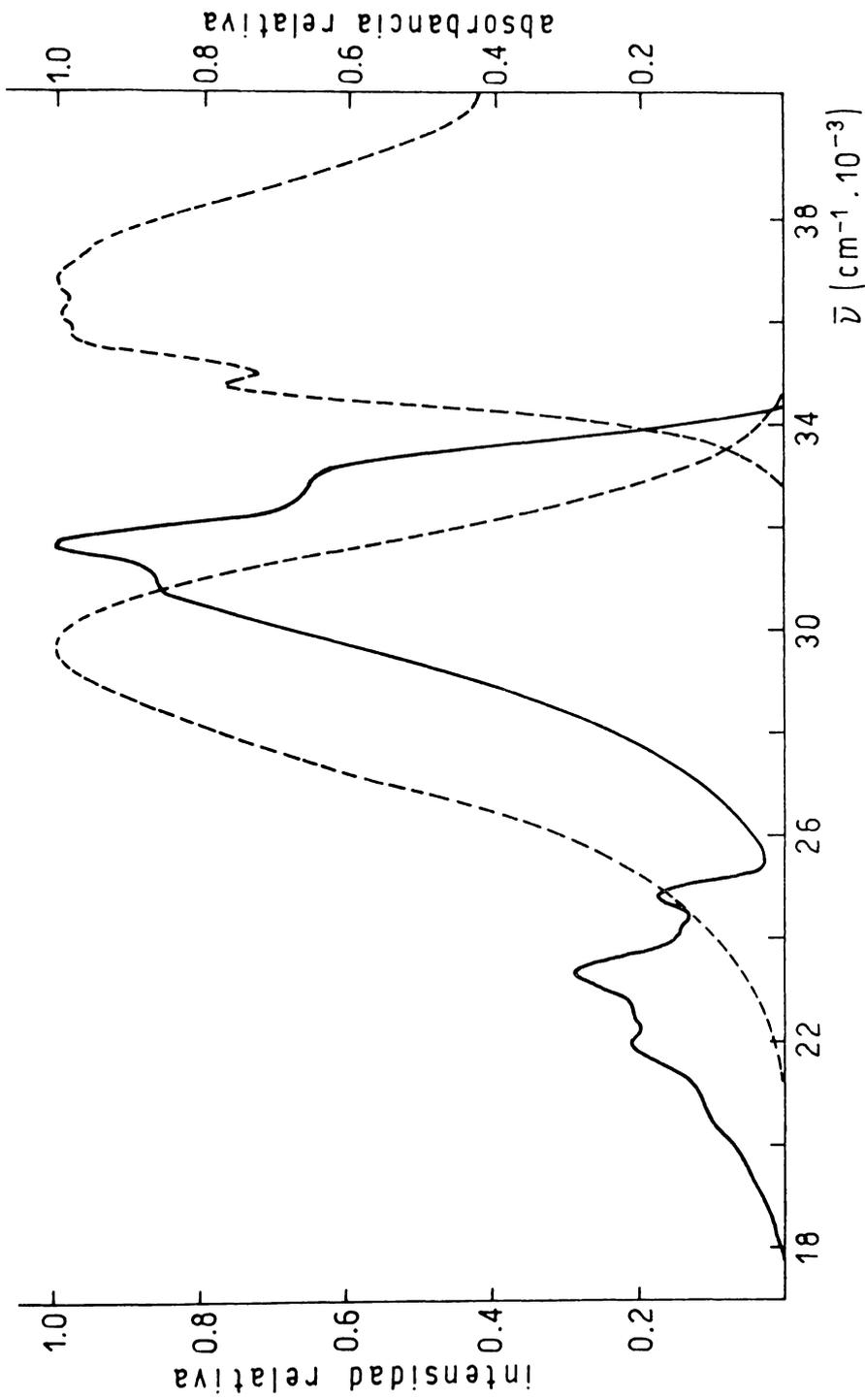


Figura 19. Espectros de absorción y emisión a 25°C ----- y de emisión a 77°K — del 2-metilindol en etanol.

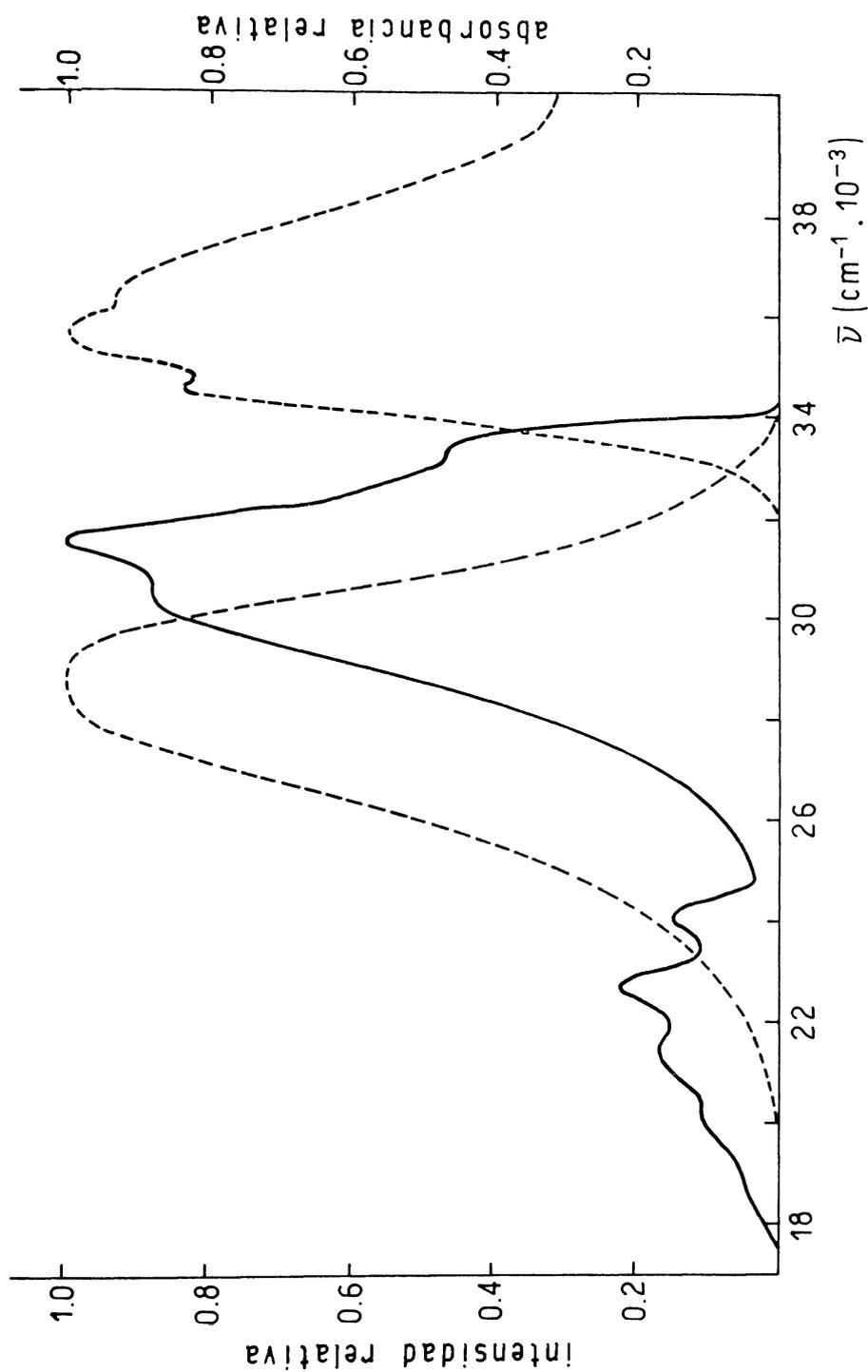


Figura 20. Espectros de absorción y emisión a 25°C ---- y de emisión a 77°K — del 3-metilindol en

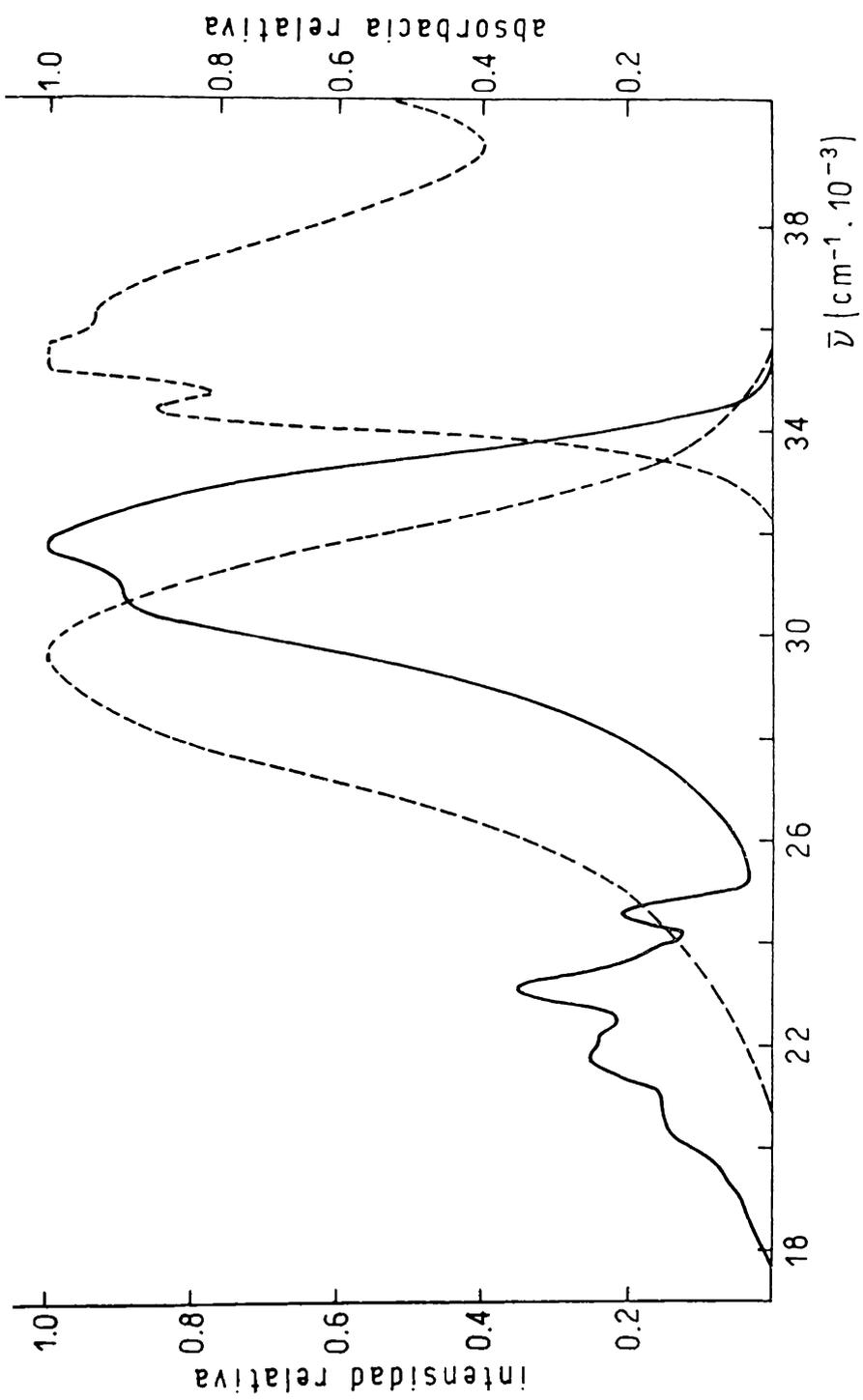


Figura 21. Espectros de absorción y emisión a 25°C ---- y de emisión a 77°K - - - - del L(-) triptofano en etanol.

5.3.1 Análisis de los espectros

Enfriando a 77°K, los máximos de emisión de fluorescencia de todos los compuestos experimentan un efecto batocrómico muy grande.

Analizando el espectro del indol, aparece un máximo a 32600 cm^{-1} con un corrimiento de 2100 cm^{-1} respecto al de 25°C. A su vez, aparecen dos vibraciones bastante bien resueltas a ambos lados del mismo: una a 33850 cm^{-1} y otra a 31100 cm^{-1} .

Para los derivados, los espectros de fluorescencia a 77°K también demuestran estructuras parecidas a la del indol, sufriendo corrimientos de 2000 cm^{-1} respecto a los de 25°C, excepto en el caso del 3-metilindol cuyo máximo se desplaza unos 3000 cm^{-1} (tabla 14).

Los espectros de fosforescencia muestran varios picos bien definidos (tabla 14) con energías e intensidades del mismo orden. Lo mismo ocurre con respecto a la distribución vibracional si se excita a otra longitud de onda.

La primer vibración corresponde a la transición 0-0 3L_a .

Cuando se agregó yoduro de sodio, los espectros mantuvieron sus aspectos vibracionales y no hubo variación en las intensidades.

Los espectros corregidos de excitación a 77°K presentan energías iguales que las de los mismos a 25°C, lo que indica que el efecto de temperatura sobre el espectro de absorción es prácticamente nulo.

5.3.2 Efecto de temperatura sobre la emisión de fosforescencia.

En la figura 22 se muestra la recta obtenida para el indol disuelto en etanol cuando se representa la ecuación (25) en forma logarítmica en función de la inversa de la temperatura.

El valor de la energía de activación encontrado fue de 0,29 kcal/mol y el del preexponencial (k_2^0) de 70 s^{-1} .

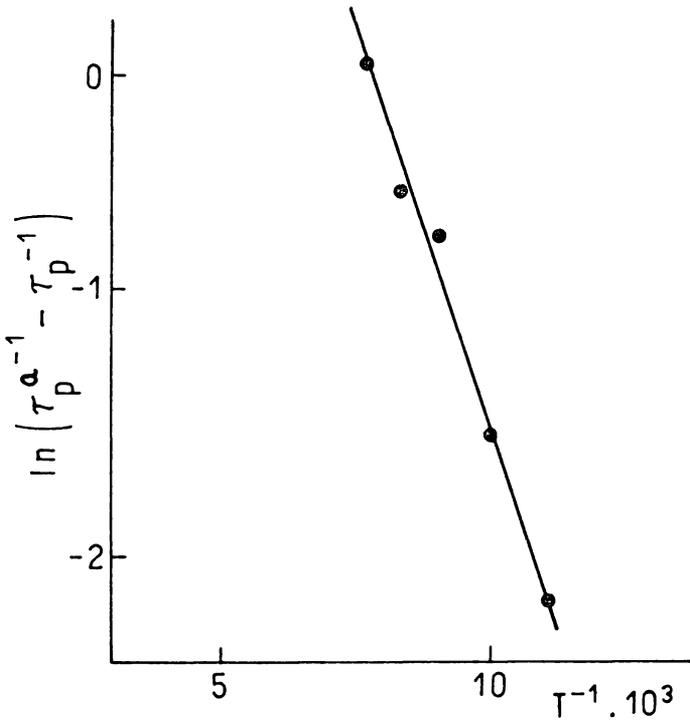


Figura 22. Representación gráfica de la aplicación de la ecuación (25) para el indol en etanol.

6 INTERPRETACION

Por el análisis efectuado del espectro de emisión del indol en ciclohexano, se asigna la transición 0-0 a la banda de mayor energía por coincidir con la banda 0-0 en absorción; este solapamiento es una confirmación de que los estado de equilibrio fundamental y excitado tienen la misma conformación.

Si consideramos la transición 0-0 de absorción en el cristal a 34250 cm^{-1} , se observa que está desplazada 500 cm^{-1} hacia el rojo respecto a la absorción correspondiente en solución.

Está bien establecido por estudios de solvación, que las transiciones en solventes no polares están corridas hacia mayores frecuencias respecto a transiciones en el cristal cuando las moléculas de soluto tienen la misma conformación de equilibrio que el estado cristalino.

El efecto de solvente no polar es prácticamente nulo y el nivel de emisión puede considerarse como un nivel Franck-Condon, indicando también que el momento dipolar de la transición ${}^1L_0 \leftarrow {}^4A_g$ es el mismo.

Además, el espectro de excitación corregido coincide en sus rasgos característicos con las dos transiciones ${}^1L_a \leftarrow {}^4A_g$ y ${}^1L_0 \leftarrow {}^4A_g$ y existe una relación especular parcial con el espectro de emisión, el cual no cambia en su contorno con la longitud de onda de la excitación, lo que indica la población de los dos niveles 1L_a y 1L_0 .

El desplazamiento de la banda 1L_a muestra un corrimiento de 2500 cm^{-1} , lo que está de acuerdo con lo establecido por varios autores (36,37) respecto a que el momen-

to dipolar de la transición 1L_a es mayor que el de la 1L_b .

De lo expuesto, se puede tomar como origen de la banda 1L_b a 34750 cm^{-1} y de la banda 1L_a a 34775 cm^{-1} .

El origen de la banda 1L_b es un valor razonable comparado con el dado por Mani y Lombardi (38) de 35232 cm^{-1} en su estudio del espectro electrónico del indol en fase gaseosa, por lo que el solvente tendría el efecto de correr la banda en aproximadamente 500 cm^{-1} .

La banda 1L_a de 36050 cm^{-1} en absorción está en franca coincidencia con la banda 1L_a dada por Kadiri, Martinaud y Cazeau-Dubroca (39) los cuales recientemente hicieron un estudio de las bandas del indol a distintas temperaturas.

El cromóforo metilado en posición 2 ó 3 demuestra pérdida de estructura en los espectros de emisión en ciclohexano.

La banda 0-0 en indol se transforma en un hombro con frecuencia muy cercana a la transición 0-0 en absorción, siempre corrida unos cientos de cm^{-1} hacia el azul con respecto al cristal del indol; esto hace suponer que no hay diferencias entre la conformación de equilibrio en el estado cristalino del indol y estos derivados.

Las frecuencias vibracionales corresponden aproximadamente a las del indol, el rendimiento de fluorescencia es prácticamente el mismo y sólo se nota un ensanchamiento de la banda de emisión dando una indicación del solapamiento de niveles superiores y de que existe un cambio en la relación de los niveles que emiten.

El 2-metilindol presenta un corrimiento de Stokes mayor que el 3-metilindol, lo que puede atribuirse,

además del efecto inductivo, a la posible interacción del grupo metilo con los hidrógenos en posición 1 y 3, lo que daría un balance de repulsión estérica y estabilización por resonancia.

Para el 3-metilindol, el origen de la banda 1L_b estaría en 34300 cm^{-1} y el de la 1L_a en 33650 cm^{-1} .

Para el 2-metilindol, el origen de la banda 1L_b estaría en 34575 cm^{-1} y el de la 1L_a en 34600 cm^{-1} .

Los espectros de emisión en etanol a temperatura ambiente no poseen estructura; por lo tanto es difícil extraer conclusiones de ellos.

Los rendimientos de fluorescencia a 77°K se acercan a un valor parecido para todos ellos, lo que indica la eliminación del mismo tipo de proceso no radiativo.

El corrimiento hacia el azul puede deberse a que la matriz de vidrio bloquea parcialmente la rotación del estado excitado y la emisión puede considerarse desde el estado Franck-Condon.

La diferencia de 1250 cm^{-1} para el indol, es una vibración del estado fundamental. La banda de mayor energía a 33850 cm^{-1} está separada 800 cm^{-1} de la banda a 34650 cm^{-1} del espectro de absorción en solución. El promedio da un valor de 34250 cm^{-1} , en coincidencia con la transición 0-0 del cristal, lo que indicaría una pérdida de la energía por desactivación vibracional representada por 400 cm^{-1} .

El gran corrimiento de los máximos a las dos temperaturas extremas estudiadas indica que la reorientación del solvente a baja temperatura es parcialmente impedida.

Si se toma el origen de las bandas como el promedio de los máximos de absorción y emisión da un valor

para el indol a 25°C de 33550 cm^{-1} , muy próximo a la vibración de mayor energía del espectro de emisión a 77°K; para el 2-metilindol, 3-metilindol y el L(-)triptofano el origen correspondiente a 33225, 33050 y 32600 cm^{-1} , respectivamente.

En general, los espectros a baja temperatura tienen una imagen especular con el espectro de absorción.

El espectro de emisión del triptofano a 77°K tiene una característica: pierde la estructura en la zona de mayor energía de la banda, la frecuencia vibracional que existe en los otros compuestos desaparece y el efecto de temperatura es mucho mayor. Esto se manifiesta sobreponiendo los espectros de emisión a las dos temperaturas, pudiendo así observarse que a 77°K hay una contracción de la banda, lo que no ocurre en los demás compuestos. Además, el espectro es la réplica especular de la región identificada como 1L_a en el espectro de absorción, indicando que este estado es el mayor emisor.

Salvo esta característica del triptofano, los demás compuestos tienen espectros de emisión muy semejantes en solventes no polares a 25°C y polares a 77°K.

Comparando los tiempos de vida radiativa y los obtenidos por absorción (tabla 10 y 11) se observa que sólo τ_a^0 guarda relación con la polaridad del solvente: aumenta en etanol y es del mismo orden para los diferentes compuestos en cada solvente; mientras que τ_R^0 , por el contrario, muestra una disminución cuando se pasa de ciclohexano a etanol.

En ciclohexano se observa que τ_R^0 es mayor que τ_a^0 : unas seis veces en indol y aproximadamente el doble en los otros derivados.

En cambio, en etanol τ_a^0 y τ_R^0 son apro-

ximadamente del mismo orden para el indol suponiéndose que lo mismo ha de suceder para los otros derivados.

La diferencia encontrada para el indol en ciclohexano puede interpretarse que las transiciones que involucra la fluorescencia emiten en una relación distinta a la que corresponde a las fuerzas de los osciladores en absorción.

Además, esto está de acuerdo con la imagen especular parcial que se ha encontrado entre los dos espectros a que se ha hecho referencia en la sección 5.2.

En solvente polar como etanol, el desplazamiento masivo de la banda 1L_a hacia mayor longitud de onda colocaría a esta banda a menor energía que la 1L_b , de ahí que la emisión podría considerarse proveniente principalmente de esta transición.

La energía de activación del triptofano en alcohol respecto del proceso de apagado de la emisión, en el orden de temperatura estudiado, indica una constante de velocidad (tabla 12) mayor que la de los otros compuestos, pero dentro del orden de la constante de velocidad de la fluorescencia.

El valor del factor de frecuencia es de 10^{11} para el triptofano y 10^9 para los otros compuestos. El valor de 10^{11} se aproxima más a los procesos permitidos que a los prohibidos; por lo tanto, esta energía de activación correspondería a la desactivación por conversión interna (k_n) involucrando algún modo vibracional del estado excitado, camino que lleva a una disminución del rendimiento de fluorescencia.

El triptofano presenta el menor valor de τ_f en un medio como etanol y conjuntamente el menor valor de

ϕ_f (tabla 11).

Teniendo en cuenta que el rendimiento y decaimiento de la fosforescencia de los compuestos son prácticamente iguales, los dos caminos posibles de desactivación se rían k_g y k_n ; si se aplica la fórmula

$$\frac{1}{\tau_f} - \frac{1}{\tau_R^0} = k_n + k_g \quad \text{ello indicaría un incremento}$$

de ϕ_t .

La diferencia de energía entre el primer estado singlete excitado y el primer estado triplete da un valor de aproximadamente 8000 cm^{-1} para todos los compuestos.

La energía de activación calculada dió 100 cm^{-1} ($0,29 \text{ kcal/mol}$) con un factor de frecuencia muy pequeño. La separación entre los niveles singlete (S_1) y triplete (T_1) es un valor grande para que el proceso de transferencia de energía sea directo al nivel T_1 ; por lo tanto debe existir un nivel superior T_2 con modos vibracionales solapados con los de 1L_a o 1L_b , lo cual facilita este tipo de transferencia, explicándose así que el rendimiento de fosforescencia sea igual en todos los compuestos. Asimismo, el bajo valor de la energía de activación indica una desactivación independiente de la temperatura $T_1 \rightarrow S_0$.

Los valores obtenidos de los picos e inflexiones en los espectros de estos compuestos se han comparado con el espectro Raman del indol dado por Heckman (40) y con el espectro del cristal dado por Zuclich (41) (tabla 15). Las frecuencias vibracionales que corresponderían al estado fundamental son las mismas, lo que indicaría que el efecto de la sustitución no afecta la conformación de este estado. La

frecuencia más fuerte, de 1600 cm^{-1} , para indol corresponder a la vibración $\text{C}=\text{C}$ del ciclo bencénico dado por Bellamy (42) aunque la vibración de deformación del grupo $>\text{NH}$ tiene la misma energía.

Tabla 15. Comparación de las frecuencias vibracionales obtenidas para el indol y derivados con las del cristal de indol (41) y del espectro Raman (40).

INDOL		2-METILINDOL		3-METILINDOL		L ₍₋₎ TRIPTOFANO				
$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Int. $\Delta\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Int. $\Delta\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Int. $\Delta\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Int. $\Delta\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)			
		Cristal	Raman							
24700	mf	0	24740	0-0	0	24000	mf	24600	mf	0
23900	h	800	23923	759	800			23900	h	700
23100	mf	1600	23170	1507,1576	1600	22700	mf	23200	mf	1400
22200	h	2500	22129	1576+759	22600	h	2450	22200	h	2400
21800	f	2900		2 x 1507	22050	f	3000	21400	f	2800
20600	f	4100		3 x 1507	20550	h	4500	20100	f	3900

Int. = intensidad; mf, muy fuerte; f, fuerte; h, hombro.

CONCLUSIONES

La investigación sobre la polarización de la absorción y la emisión del indol, realizada por varios autores (3, 4, 9), y el estudio efectuado por nosotros sobre los espectros de excitación corregidos (absorción) que dan una imagen especular respecto al de emisión, es un argumento más que confirma que los dos niveles están emitiendo simultáneamente.

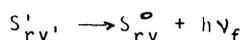
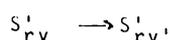
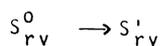
El cambio de la frecuencia de excitación no altera la distribución de intensidades de los espectros y además las medidas experimentales realizadas por varios autores que han encontrado una curva exponencial de decaimiento de la fluorescencia, todo lo cual concurre a concluir que existe un estado de equilibrio térmico entre los niveles 1L_a y 1L_b en todos los compuestos estudiados.

La absorción de luz en estos derivados conduce a la población de dos estados muy cercanos energéticamente de una dada multiplicidad por lo que presentan propiedades luminiscentes que no son comunes a todas las moléculas.

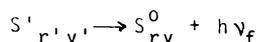
Los fenómenos de emisión pueden ser representados por medio de dos procesos: uno desde un estado Franck-Condon, que se produciría en solventes no polares o polares estado vítreo, y otro que se produciría en solvente polar a temperatura ambiente, donde hay una fuerte reorientación del mismo con el estado 1L_a .

Si se supone que se alcanza el equilibrio a través de una coordenada de relajación vibracional y una ordenada función de la reorientación del solvente, los procesos se pueden representar, sin hacer distinción entre los es

tados, de la siguiente manera:



en ciclohexano o en solventes polares en estado vítreo y



en solventes polares a temperatura ambiente.

r representa la coordenada de reorientación por el solvente y v la de relajación vibracional.

En solventes no polares, la banda de absorción a mayor energía está compuesta por dos frecuencias vibratoriales bien definidas y separadas por 850 cm^{-1} . Esta banda asignada a la transición ${}^1L_b \leftarrow {}^1A$ es bien específica del grupo cromóforo y resiste cualquier perturbación por efecto del solvente o temperatura (según se lo ha comprobado por medio del espectro de excitación). La modificación de esta banda en el solvente polar es debida al corrimiento que sufre la transición ${}^1L_a \leftarrow {}^1A$ al ser perturbada por solvente o sustitución, lo que la hace solapar en mayor o menor medida hasta un punto tal que esta transición puede llegar a ser la de menor energía.

Las características de los espectros y los parámetros derivados de la fluorescencia son propiedades útiles para controlar los cambios que ocurren en el medio que rodea a las proteínas, principio de aplicación en el campo biológico, ya que ellas presentan las propiedades luminiscentes del aminoácido del cual derivan.

De los resultados obtenidos se puede infe-

rir que el mejor solvente de los dos usados para el estudio de estos derivados es el etanol cuando se trabaja a 77°K. A esta temperatura la sensibilidad de la emisión es diez veces superior a la de la temperatura ambiente y cien veces respecto a la que se alcanza en absorción.

Los espectros de fluorescencia a 77°K son característicos de cada derivado, con máximos de emisión diferentes para cada uno de ellos y son análogos a los que se obtienen en solventes no polares a temperatura ambiente.

Los máximos de emisión en etanol a temperatura ambiente son también característicos de cada derivado.

El efecto de apagado por I⁻ sobre el rendimiento de la fluorescencia a temperatura ambiente, con una constante de Stern-Volmer determinada, es un elemento más de juicio para la identificación de los compuestos.

La característica que manifiesta el L(-) triptofano de mantener constante el valor del rendimiento de fluorescencia en presencia de yoduro, a diferencia de los otros derivados considerados, permitiría desarrollar un método analítico de determinación de aquél en presencia de alguno de los otros.

Los espectros luminiscentes han permitido obtener una serie de parámetros asociados con el estado excitado de los compuestos estudiados (tabla 16). Sobre la base de ellos, se representan en la figura siguiente los valores obtenidos para la molécula del L(-) triptofano en etanol.

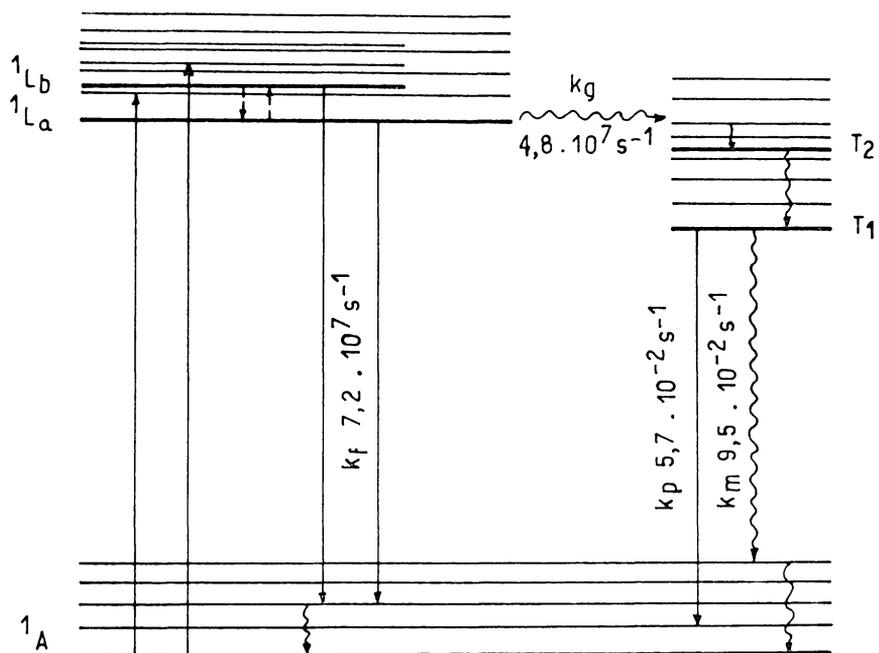


Tabla 16. Parámetros asociados con los estados excitados del indol y derivados en etanol a 77°K.

Compuesto	$k_f \cdot 10^{-7} (s^{-1})$	Φ_t	$k_g \cdot 10^{-7} (s^{-1})$	$k_m \cdot 10^2 (s^{-1})$	$k_p \cdot 10^2 (s^{-1})$	$\tau_p^0 (s)$
Indol	9,3	0,21	2,5	6,5	8,7	11,5
2-metilindol	12,8	0,32	6,0	7,6	8,6	11,6
3-metilindol	12,6	0,31	5,6	11,4	8,2	12,2
L(-) triptofano	7,2	0,40	4,8	9,5	5,7	17,6



APENDICE

Programa CINEF

CINEF
DEFINICION DE VARIABLES

NPUNT : NUMERO DE PUNTOS DE LA CURVA DE CALIBRACION
FOTCT : TIPO DE FOTOTUBO
FC : FACTORES DE CORRECCION
WLC : LONG. DE ONDA DE LOS FACT. DE CORRECCION
NPROBL : NUMERO DE PROBLEMA (IDENTIFICATIVO)
ITEFM : NUMERO DE PUNTOS DEL ESPECTRO PROBLEMA
FLI : INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA
WLF : LONG. DE ONDA DE FLUORESCENCIA
NOTA : LOS VALORES DE LAS VARIABLES DEBEN SER INTRODUCIDOS EN
ORDEN DECRECIENTE DE LONGITUDES DE ONDA


```

JJ34      13 WRITE (6,18)
JJ35      18 FORMAT (1H ,10S VALORES DE LCNG. DE CNDA DEL PROBLEMA NO ESTAN EN
JJ36      19 WRITE (6,19)
JJ37      1999 FORMAT (F12.2,18)
JJ38      STOP
JJ39      14 J=J+1
JJ40      GO TO 7

CCCCC
          COMIENZA LA INTERPOLACION
JJ41      2) IF (N4SC.NE.0) GO TO 16
JJ42      WRITE (6,15)
JJ43      16 FORMAT (160) , 'DATOS' // 157, 'FACT. CERR.' , 5X, 'LCNG. (CNDA)'
JJ44      19 WRITE (6,26) (I,FC(I),MLC(I),I=1,NPLNT)
JJ45      26 FORMAT (142,15,10X,F8.3,8X,F7.0)
JJ46      16 WRITE (6,27)
JJ47      27 FORMAT (7,7) 157, 'INT. FLUJO.' , 5X, 'LCNG. (CNDA)'
JJ48      27 WRITE (6,28) (J,FLI(J),J=1,ITERM)
JJ49      28 FORMAT (142,15,10X,F8.1,8X,F7.0)
JJ50      LE=2
JJ51      WRITE (6,132)
JJ52      132 FORMAT (1H) , 5X, 'GRAFICOS DE INTERPOLACION' // T5,1, 'LCNG. (CNDA)' , 5X, 'GR
JJ53      130) , 2X, 'VAL. INTERP.'
JJ54      19) 6X, 'ITERM'
JJ55      24) LE (MLF(K), MLC(L)) 21,22,23
JJ56      GO TO 24
JJ57      22) INTERP.
JJ58      WRITE (6,29) K,MLF(K),INTG,FC(L)
JJ59      GO TO 22
JJ60      23) INT=L-2
JJ61      GO TO 5) I=1,5
JJ62      1) (INT+5,GT,NPUNT) GO TO 30
JJ63      1) FC(I)=FC(INT+1)
JJ64      4) FC(I)=MLC(INT+1)
JJ65      GO TO 25)
JJ66      3) 0) FC(I)=FC(L-I+1)
JJ67      4) FC(I)=MLC(L-I+1)
JJ68      25) APPROXIMACION(2)/2)
JJ69      CALL INTERP(MLF(K),APROX)
JJ70      WRITE (6,25) K,MLF(K),INTG,FC(L)
JJ71      29) FORMAT (143,14,F11.1,11,F12.3)
JJ72

```

C

```

117+
1175
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000

```

CALCULO DE LA COFFECCION

INTERPOLACION DE PUNTOS CCFECCIDCS

REGULARIZACION

```

1112          CALL OSF(C,I),SDATA,AFEA,M)
1113          AFEA1=AFEA(M)
1114          CALL OSF(C,O1,CURCOFF,AFEA,M)
1115          AFEA2=AFEA(M)
1116          NORMALIZACION
1117          OFDMAX=C*
1118          DO I=1,N K=1,M
1119          IF(SCATA(K).GT.OFDMAX)OFDMAX=SDATA(K)
1120          FACNCK=1./OFDMAX
1121          DO I=1,N
1122          J=I+M
1123          POLI=SDATA(J)
1124          NPASS=1
1125          IND=POLI*100+I*5
1126          IF(IND.LI.1)IND=1
1127          IF(IND.GT.101)IND=101
1128          IF(LINE.EQ.3)GO TO 1112
1129          LINE=LINE+1
1130          LG=ENL(IND)
1131          FENI(IND)=IA*STEP
1132          FENI(6,IND)=POLI,FENI,FAVE(J)
1133          FENI(8,IND)=F6.4,2X,ICIA1,F7.1)
1134          FENI(IND)=IG
1135          GJ=IC.140
1136          IG=FEN?(IND)
1137          LINE=9
1138          FEN2(IND)=IA*STEP
1139          FENI(6,IND)=FFECU(J),POLI,FEN2,FAVE(J)
1140          FENI(8,IND)=F4.2,F9.4,2X,ICIA1,F7.1)
1141          FEN2(IND)=IG
1142          CONTINUE
1143          WRITE(6,1114)FEN2
1144          FENI(6,IND)=A*ENL(IND)
1145          FENI(8,IND)=A*ENL(IND)
1146          WRITE(6,1115)A*ENL(IND),FACNCK
1147          FENI(1,IND)=5,A*ENL(IND),FACNCK
1148          I=1,E12.5/I5,FACTOR DE NORM.=,E12.5)
1149          GO TO 6
1150          STOP
1151          END
1152          INVERSA DE <FFEC** 3>

```



```

JJJ1
JJJ2
JJJ3
JJJ4
JJJ5
JJJ6
JJJ7
JJJ8
JJJ9
JJJ10
JJJ11
JJJ12
JJJ13
JJJ14
JJJ15
JJJ16
JJJ17
JJJ18
JJJ19
JJJ20
JJJ21
JJJ22
JJJ23
JJJ24
JJJ25
JJJ26
JJJ27
JJJ28
JJJ29
JJJ30
JJJ31
JJJ32
JJJ33
JJJ34
JJJ35
JJJ36
JJJ37
JJJ38
JJJ39
JJJ40
JJJ41
JJJ42
JJJ43
JJJ44
JJJ45
JJJ46
JJJ47
JJJ48
JJJ49
JJJ50
JJJ51

SUBROUTINE INTEFP(VAF,EFFCF)
COMMON Y(5),X(5),POLI,INTG
MM=1
MMM=1
XX=X(3)
DELPI=X(2) X(1)
DELVI=XX-X(1)
POLI=Y(1)+(Y(2)-Y(1))/DELPI*DELVI
GO TO (50,51,52),M
4) A2=Y(3) POLI
5) IF(ABS(A2).LT.EPFR) GO TO 501
XX=X(4)
M=3
GO TO 400
501 XX=VAF
M=2
INTG=1
GO TO 400
520 DELP2=X(3) X(1) *(X(3) X(2))
DELV2=DELVI*(XX-X(2))
POLI=POLI+A2*DELP2*DELV2
GO TO (53,54),MM
53) A3=Y(4) POLI
54) IF(ABS(A3).LT.EPFR) GO TO 531
MM=3
XX=X(5)
GO TO 400
531 XX=VAF
M=2
INTG=2
GO TO 400
540 DELP3=X(4) X(1) *(X(4) X(2)) *(X(4) X(3))
DELV2=DELV2*(XX-X(3))
POLI=POLI+A3*DELP3*DELV3
GO TO (55,56),MMM
55) A4=Y(5) POLI
56) IF(ABS(A4).LT.EPFR) GO TO 551
MM=3
XX=VAF
M=2
INTG=3
GO TO 400
551 XX=VAF
MMM=2
INTG=3
GO TO 400
56) DELP4=X(5) X(1) *(X(5) X(2)) *(X(5) X(3)) *(X(5) X(4))
POLI=POLI+A4*DELP4*DELV4
51) RETURN
END

```

BIBLIOGRAFIA

- 1- E.H. Strickland, J. Horwitz y C. Billups, *Biochemistry*,
9, 4914 (1970).
- 2- J.R. Platt, *J. Chem. Phys.*, 19, 101 (1951).
- 3- H. Zimmermann y N. Joop, *J. Elektrochem.*, 65, 61 (1961).
- 4- P.S. Song y W.E. Kurtin, *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 4892 (1969).
- 5- B.L. Van Duuren, *J. Org. Chem.*, 26, 2354 (1961).
- 6- N. Mataga, Y. Torihashi y K. Ezumi, *Theoret. Chim. Acta*,
2, 153 (1964).
- 7- E. Vander Donckt, *Bull. Soc. Chim. Belges*, 78, 69 (1963).
- 8- A. Kowski y J. Czajko, *Z. Naturforsch.*, 29a, 84 (1974).
- 9- S.V. Konev, *Fluorescence and Phosphorescence of Proteins
and Nucleic Acids*, S. Udenfriend, Tr., Plenum
Press, N.Y., (1967).
- 10- M.S. Walker, T.W. Bednar y R. Lumry, *J. Chem. Phys.*,
45, 3455 (1966)
- 11- M.S. Walker, T.W. Bednar y R. Lumry, *J. Chem. Phys.*,
47, 1020 (1967).
- 12- M.S. Walker, T.W. Bednar y R. Lumry, *Mol. Lumin., Int. Conf.*,
Ed., Benjamin, N.Y.,
135 (1963).
- 13- M.S. Walker, T.W. Bednar, R. Lumry y F. Humphries, *Photo-
chem. Photobiol.*, 14, 147 (1971).
- 14- S. Freed y W. Salmer, *Science*, 128, 1341 (1958).
- 15- C.A. Parker y C.G. Hatchard, *Trans. Faraday Soc.*,
59, 284 (1963).
- 16- Q. Stern y M. Volmer, *Phys. Z.*, 20, 183 (1919).
- 17- American Instrument Co., Inc. (J.S.A.), *Manual de instruc-
ción 768 G, 959-A1 y 904-A.*

- 18- P.A. Leighton, R.W. Crary y L.T. Schipp, J. Am. Chem. Soc.,
53, 3017 (1931).
- 19- W.H. Meluish, J. Opt. Soc. Am., 52, 1256 (1962).
- 20- C.A. Parker y W.T. Rees, The Analyst, 85, 587 (1960).
- 21- W.H. Meluish, New Zealand J. Sci. Technol., 37, 142 (1955).
- 22- J.J. Hermans y S. Levinson, J. Opt. Soc. Am., 41, 460 (1951).
- 23- S.J. Strickler y R.A. Berg, J. Chem. Phys., 37, 814 (1962).
- 24- J.F. Magallanes, L. Bruzzone y M.E. Roselli, Anales Asoc. Quím
Argentina, 65, 23
(1977).
- 25- A. Savitzky y M. Golay, Anal. Chem., 36, 1627 (1964).
- 26- H. Suzuki, Electronic Absorption Spectra and Geometry of
Organic Molecules, Academic Press, N.Y., (1967).
- 27- J.M. Hollas, Spectrochim. Acta, 19, 753 (1963).
- 28- Y. Yamamoto y J. Tanaka, Bull. Chem. Soc. of Japan,
45, 1362 (1972).
- 29- T. Kaneda y J. Tanaka, Bull. Chem. Soc. of Japan,
49, 1799 (1976).
- 30- B. Valeur y G. Weber, Photochem. Photobiol., 25, 441 (1977).
- 31- L. Bruzzone y M.E. Roselli, Anales Asoc. Quím. Argentina,
65, 107 (1977).
- 32- B.E. Rivero, A.D. Podjarny, E.E. Castellano y M.E. Roselli,
Acta Cryst., B36, 1726 (1980).
- 33- K.K. Turoverov, Opt. Spectrosc., 26, 310 (1969).
- 34- E.P. Kirby y R.F. Steiner, J. Phys. Chem., 74, 4480 (1970).
- 35- C.A. Parker, Photoluminescence of Solutions, Elsevier, (1968).
- 36- G. Jacyno y A. Kowski, Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci.,
Math. Astr. e Phys., 21, 289 (1973).
- 37- M. Sung y P.S. Song, Photochem. Photobiol., 25, 3 (1977).
- 38- A. Mani y J.R. Lombardi, J. Mol. Spect., 31, 308 (1969).

- 39- A. Kadiri, M. Martinaud y C. Cazeau-Dubroca, Chem. Phys. Letters, 65, 484 (1979).
- 40- R.C. Heckman, J. Mol. Spect., 2, 27 (1958).
- 41- J. Zuclich, J.V. von Schutz y A.H. Maki, J. Am. Chem. Soc., 96, 710 (1974).
- 42- L.J. Bellamy, The Infrared Spectra of Complex Molecules, J. Wiley & Sons, Inc., N.Y., (1956).