

Departamento de Química Analítica

Universidad de Granada



TESIS DOCTORAL

LA ESPECTROFLUORIMETRIA DE CAMBIO IONICO
EN EL ANALISIS DE ALUMINIO Y BERILIO
CON MORINA EN AGUAS NATURALES

Eloisa Manzano Moreno

Granada, 1989

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN _____

Curso de 19 _____ a 19 _____

Folio _____

Número _____

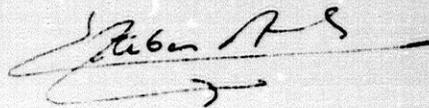
Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.^a Eloise Moreno Moreno, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: de Espectro fluorimétrico de compuestos iónicos en el análisis de Muminio (Berilio con Yodios e aguas naturales)

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, le calificó de Apto "Cum Laude" por unanimidad.

Granada 10 de Noviembre de 1988

EL PRESIDENTE,

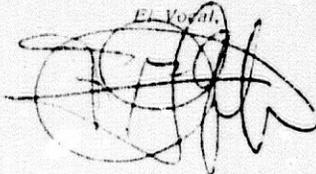
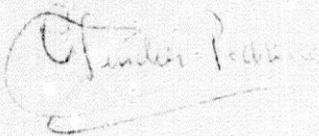
El Secretario del Tribunal,



El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,



Firma de Graduando,



INVESTIDURA

En el día de la fecha se ha conferido a D.^a Eloise Moreno Moreno el Grado de Doctor en la Facultad de Ciencias conforme a lo prevenido en las disposiciones vigentes.

Granada de _____ de 19 _____

EL DECANO,

CERTIFICO: Que el Acta que antecede en su contenido con la del expediente del interesado remitido a la Secretaría de la Universidad.

Granada de _____ de 19 _____

El Catedrático Secretario,

V.º B.º
EL DECANO

LA ESPECTROFLUORIMETRIA DE CAMBIO IONICO
EN EL ANALISIS DE ALUMINIO Y BERILIO
CON MORIN EN AGUAS NATURALES

por

ELOISA MANZANO MORENO

Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada

Visado en Granada, a 19 de
Septiembre de 1989.

Memoria presentada para aspirar
al grado de Doctor en Ciencias,
Sección de Químicas.

Granada, a 19 de Septiembre de 1989

Fdo.- Prof. Dr. D. Luis Fermín
Capitán Vallvey, Catedrático
del Dpto. de Química Analítica
de la Universidad de Granada y
Prof. Dr. D. Jose Luis Vilchez
Quero, Profesor Titular del
mismo Departamento.

Fdo.- Eloisa Manzano Moreno
Licenciada en Ciencias,
Sección de Químicas.

I N D I C E

4. INFLUENCIA DE VARIABLES	
4.1. ESTUDIO DEL pH	131
4.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	138
4.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE MORINA	146
4.4. ESTABILIDAD DE LA MORINA EN FASE RESINA	155

**CAPITULO IV: ESTUDIO DEL SISTEMA MORINA-
Be(II)-SEPHADEX QAE A-25 MEDIAN-
TE ESPECTROFLUORIMETRIA DE CAM-
BIO IONICO (F.C.I.)**

1. INTRODUCCION	161
2. EXPERIMENTAL	166
- Reactivos	166
3. GEOMETRIA DEL SISTEMA DE MEDIDA	168
3.1. Estudio del angulo de incidencia de la radiación	168
4. ESTUDIO DE LAS RENDIJAS DE EXCITACION Y EMISION	176
5. CARACTERISTICAS ESPECTRALES	179
5.1. Espectros de fluorescencia total del complejo Be(II)-morina en disolución y en fase resina Sephadex QAE A-25	179
5.2. Espectros diferencia	182
5.3. Curvas de nivel	185
5.4. Espectros bidimensionales en fase resina	186
5.5. Espectros bidimensionales en disolución	188
6. TIEMPO DE VIDA MEDIA DEL ESTADO EXCITADO	191
7. OPTIMIZACION DE VARIABLES	
7.1. INFLUENCIA DEL pH	203
7.1.1. Elección del tampón	203
7.1.2. Estudio del pH	204
7.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LA DISOLUCION REGULADORA	208
7.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE REACTIVO	212

	página
7.4. ESTABILIDAD DEL COMPLEJO EN FASE RESINA	217
7.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	220
7.5.1. Influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico	220
7.5.2. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia	224
7.6. CANTIDAD DE CAMBIADOR IONICO	228
7.7. TIEMPO DE AGITACION	231
7.8. ORDEN DE ADICION	236
7.9. RESUMEN LA DE OPTIMIZACION DE VARIABLES	238
8. CARACTERISTICAS ANALITICAS DEL SISTEMA	
8.1. INFLUENCIA DEL VOLUMEN SOBRE LA SENSIBILIDAD Y LIMITE DE DETECCION DEL METODO	243
8.2. RECTAS DE CALIBRADO	248
8.2.1. Recta de calibrado para un volumen final de 250 mL	248
8.2.2. Recta de calibrado para un volumen final de 500 mL	250
8.2.3. Recta de calibrado para un volumen final de 1000 mL	253
8.2.4. Comparación de la sensibilidad de los diferentes volúmenes	255
8.2.5. Comparación con el método en disolución que emplea morina	256
8.3. METODOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACION DE BERILIO	259
8.3.1. Método propuesto para un un volumen final de 250 mL	259
8.3.2. Método propuesto para un volumen final de 500 mL	260
8.3.3. Método propuesto para un volumen final de 1000 mL	262

	página
8.4. ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS METODOS PROPUESTOS	264
8.4.1. Reproducibilidad del empaquetamiento	265
8.4.2. Influencia de la centrifugación del sistema sobre la reproducibilidad del empaquetamiento	267
8.4.3. Reproducibilidad del empaquetamiento de las muestras centrifugadas	269
8.4.4. Reproducibilidad del método	270
8.5. LIMITES DE DETECCION Y DE DETERMINACION DE LOS METODOS PROPUESTOS	273
8.5.1. Comparación con otros métodos	277
8.6. SENSIBILIDAD DE LOS METODOS PROPUESTOS	279
8.7. RESUMEN DE LOS PARAMETROS ANALITICOS	281
9. INFLUENCIA DE IONES EXTRAÑOS. ELIMINACION DE INTERFERENCIAS	
9.1. INFLUENCIA DE IONES EXTRAÑOS	285
9.2. ELIMINACION DE INTERFERENCIAS	300
9.2.1. Eliminación de la interferencia debida a Al(III)	300
9.2.2. Eliminación de la interferencia debida a Fe(III)	304
9.2.3. Eliminación de la interferencia debida a Ca(II)	309
9.2.4. Eliminación de la interferencia debida a Mg(II)	313
9.2.5. Eliminación de la interferencia debida a cloro	315
10. APLICACIONES ANALITICAS	
10.1. APLICACIONES ANALITICAS	319

	página
10.1.1 Procedimiento propuesto para el análisis de aguas	319
10.1.2. Procedimientos empleados para la determinación de la composición de las aguas estudiadas	320
10.1.3 Determinación de Be(II) en aguas de manantial	321
10.1.3.1. Método analítico empleado y resultados (Ortigosa del Monte)	322
10.1.3.2. Método analítico empleado y resultados (Lanjarón)	326
10.1.4. Determinación de Be(II) en agua de pantano (Quentar)	329
10.1.4.1. Método analítico empleado y resultados	330
10.1.5. Determinación de Be(II) en agua urbana (Granada)	334
10.1.5.1. Método analítico empleado y resultados	335
10.1.6. ESTUDIO DE RECUPERACION	341
10.1.6.1. Agua mineral de Ortigosa del Monte	341
10.1.6.2. Agua mineral de Lanjarón	344
10.1.6.3. Agua del pantano de Quentar (Granada) ...	346
10.1.6.4. Agua urbana (Granada).....	349

**CAPITULO V: ESTUDIO DEL SISTEMA MORINA-
Al(III)-SEPHADEX SP C-25 MEDIAN-
TE ESPECTROFLUORIMETRIA DE CAM-
BIO IONICO (F.C.I.)**

1. INTRODUCCION	355
2. EXPERIMENTAL	360
- Reactivos	360

	página
3. GEOMETRIA DEL SISTEMA DE MEDIDA	362
3.1. Estudio del angulo de incidencia de la radiación	362
4. ESTUDIO DE LAS RENDIJAS DE EXCITACION Y EMISION	369
5. CARACTERISTICAS ESPECTRALES	372
5.1. Espectros de fluorescencia total del complejo Al(III)-morina en disolución y en fase resina Sephadex SP C-25	372
5.2. Espectros diferencia	375
5.3. Curvas de nivel	378
5.4. Espectros bidimensionales en fase resina	380
5.5. Espectros bidimensionales en disolución	381
6. DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DEL ESTADO EXCITADO	385
7. OPTIMIZACION DE VARIABLES	
7.1. INFLUENCIA DE LA ACIDEZ	391
7.1.1. Elección de la disolución reguladora	395
7.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LA DISOLUCION REGULADORA	400
7.3. INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA	403
7.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACION	406
7.5. ESTABILIDAD DEL COMPLEJO EN FASE RESINA	411
7.6. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE REACTIVO	418
7.7. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE CAMBIADOR IONICO	423
7.8. ORDEN DE ADICION	426
7.9. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	428
7.9.1. Influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico	428
7.9.2. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia	432
7.10. RESUMEN DE LA OPTIMIZACION DE VARIABLES	437

8. CARACTERISTICAS ANALITICAS DEL SISTEMA	
8.1. INFLUENCIA DEL VOLUMEN SOBRE LA SENSIBILIDAD Y LIMITE DE DETECCION DEL METODO	441
8.2. RECTAS DE CALIBRADO	445
8.2.1. Recta de calibrado para un volumen final de 250 mL	445
8.2.2. Recta de calibrado para un volumen final de 500 mL	447
8.2.3. Recta de calibrado para un volumen final de 1000 mL	450
8.2.4. Comparación de la sensibilidad de los diferentes volúmenes	452
8.2.5. Comparación con el método en disolución que emplea morina	453
9.1. METODOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACION DE ALUMINIO	456
9.1.1. Método propuesto para un volumen final de 250 mL	456
9.1.2. Método propuesto para un volumen final de 500 mL	457
9.1.3. Método propuesto para un volumen final de 1000 mL	459
9.2. ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD	461
9.2.1. Reproducibilidad del empaquetamiento	461
9.2.2. Influencia de la centrifugación del sistema sobre la reproducibilidad del empaquetamiento	465
9.2.3. Reproducibilidad del empaquetamiento de las muestras centrifugadas	467
9.2.4. Reproducibilidad del método	468
9.3. LIMITES DE DETECCION Y DETERMINACION DE LOS METODOS PROPUESTOS	471

	página
9.3.1. Comparación con otros métodos	473
9.4. SENSIBILIDAD DE LOS METODOS PROPUESTOS	476
9.5. RESUMEN DE LOS PARAMETROS ANALITICOS	477
10. INFLUENCIA DE IONES EXTRANOS	
10.1. INFLUENCIA DE IONES EXTRANOS	481
11. APLICACIONES ANALITICAS	
11.1. APLICACIONES ANALITICAS	497
11.1.1. Procedimiento propuesto para el análisis de aguas	497
11.1.2. Método de referencia	498
11.1.3. Determinación de Al(III) en aguas de manantial	498
11.1.3.1. Método analítico empleado y resultados (Bezoya)	499
11.1.3.2. Método analítico empleado y resultados (Lanjarón)	506
11.1.4. Determinación de Al(III) en agua de pantano (Quentar)	511
11.1.4.1. Método analítico empleado y resultados	512
11.1.5. Determinación de Al(III) en agua urbana (Granada)	515
11.1.5.1. Método analítico empleado y resultados	517
11.1.6. ESTUDIO DE RECUPERACION.....	525
11.1.6.1. Agua mineral (Bezoya)	525
11.1.6.2. Agua urbana (Granada)	528

CAPITULO VI: ESTUDIO DE LA FIJACION CONJUNTA DE LOS COMPLEJOS DE Al(III) Y Be(II) CON MORINA SOBRE SEPHADEX G-15 POR ESPECTROFLUORIMETRIA EN FASE SOLIDA Y ESPECTROFLUORIMETRIA SINCRONICA DERIVADA EN FASE SOLIDA

1. INTRODUCCION	535
2. EXPERIMENTAL	543
- Reactivos	543
3. CARACTERISTICAS ESPECTRALES.....	546
3.1. Espectros de fluorescencia total de los complejos Al(III)-morina y Be(II)-morina y la mezcla de ambos, en fase Sephadex G-15	546
3.2. Espectros diferencia	551
3.3. Curvas de nivel	557
3.4. Espectros bidimensionales en fase resina	561
4. ELECCION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE FORMACION DE LOS COMPLEJOS FIJADOS EN FASE RESINA	
4.1. INFLUENCIA DE LA ACIDEZ	567
4.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	571
4.3. ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS EN FASE SOLIDA	578
4.4. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE REACTIVO	582
4.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACION	587
4.6. RESUMEN DE LA DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LA FORMACION Y FIJACION DE LOS COMPLEJOS	590
5. SELECCION DE LAS CONDICIONES INSTRUMENTALES OPTIMAS	595
5.1. OPTIMIZACION DEL INCREMENTO DE LONGITUD DE ONDA	596

	página
5.2. ELECCION DEL FACTOR DE FILTRADO EN LA OBTENCION DE LOS ESPECTROS SINCRONICOS DERIVADOS	601
5.3. ELECCION DE LAS LONGITUDES DE ONDA ANALITICAS	606
6. CARACTERISTICAS ANALITICAS DEL SISTEMA	
6.1. RECTAS DE CALIBRADO	613
6.1.1. Rectas de calibrado de berilio	613
6.1.1.1. Recta de calibrado de berilio	613
6.1.1.2. Recta de calibrado de berilio en presencia de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III)	619
6.1.1.3. Recta de calibrado de berilio en presencia de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III)	624
6.1.2. Rectas de calibrado de aluminio	630
6.1.2.1. Recta de calibrado de aluminio	630
6.1.2.2. Recta de calibrado de aluminio en presencia de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II)	635
6.1.2.3. Recta de calibrado de aluminio en presencia de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II)	640
6.2. METODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACION CONJUNTA DE Be(II) y Al(III)	646
6.3. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO	649
6.4. LIMITE DE DETECCION Y DETERMINACION DEL METODO	651
6.5. SENSIBILIDAD DEL METODO PROPUESTO	654
6.6. RESUMEN DE LOS PARAMETROS ANALITICOS	655
7. INFLUENCIA DE IONES EXTRANOS	
7.1. INFLUENCIA DE IONES EXTRANOS	659
8. APLICACIONES ANALITICAS	
8.1. APLICACIONES ANALITICAS	675
8.1.1. RESOLUCION DE MEZCLAS EN MUESTRAS SINTETICAS	675
8.1.2. RESOLUCION DE MEZCLAS EN MUESTRAS REALES	682

	página
8.1.2.1. Procedimiento propuesto para el análisis de aguas	682
8.1.2.2. Método de referencia	683
8.1.2.3. Determinación conjunta de Be(II) y Al(III) en aguas de manantial	683
CONCLUSIONES	697
BIBLIOGRAFIA	707

OBJETO DE LA TESIS

OBJETO DE LA TESIS

Contribuir al desarrollo de la Espectrofluorimetría de Cambio Iónico, técnica iniciada por nuestro grupo de investigación de Espectrometría en Fase Sólida, en 1985.

Para ello se estudian dos sistemas ya conocidos en disolución: el complejo aluminio-morina y el berilio-morina, atendiendo a los aspectos formales de la medida como es la geometría del sistema de medida, las variables que influyen en la fijación de los quelatos, los parámetros analíticos que caracterizan el método propuesto y, por último, y con especial énfasis, la aplicación a muestras reales.

La resolución de mezclas de analitos fijada sobre un soporte sólido se aborda en ésta técnica en conexión con la espectrofluorimetría sincrónica y sincrónica derivada, tratando de poner a punto métodos para la resolución de mezclas a muy bajos niveles de concentración (sub $\mu\text{g.L}^{-1}$).

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

La Fluorimetría de Cambio Iónico es una técnica de análisis basada en la medida de la intensidad de fluorescencia de analitos fluorescentes, o que formen quelatos fluorescentes, fijados sobre un soporte sólido. El método operatorio básicamente consiste en añadir una cierta cantidad de resina de cambio iónico a un gran volumen de disolución que contiene el elemento traza a determinar en forma de complejo fluorescente. Mediante la agitación conveniente del sistema, el complejo fluorescente se incorpora al sustrato sólido aumentando la intensidad de fluorescencia emitida al haber experimentado un proceso de preconcentración.

Mediante la aplicación de ésta técnica se consigue rebajar el límite de detección, aumentar la sensibilidad y disminuir las interferencias de la espectrofluorimetría convencional en disolución.

1.- Antecedentes

Como antecedentes podemos citar la Espectrofotometría de Cambio Iónico por una parte, y la investigación desarrollada sobre la medida de fluorescencia en sólidos con una etapa de preconcentración por otra.

Vamos a revisar a continuación ambos aspectos para concluir la técnica objeto de ésta Memoria de Doctorado: la Espectrofluorimetría en Fase Sólida, comentando la problemática

surgida durante su puesta a punto así como los resultados obtenidos hasta la fecha.

1.1.-Espectrofotometría de Cambio Iónico

La preconcentración selectiva de analitos es, en la actualidad, una etapa común a múltiples técnicas para el análisis de trazas, con la que se consiguen dos objetivos fundamentales:

- Aumentar la sensibilidad de los métodos analíticos y disminuir límites de detección.
- Aumentar la selectividad de los mismos.

Entre las técnicas que pretenden alcanzar tales objetivos, destaca por la simplicidad de su procedimiento operatorio y la sencillez de la instrumentación requerida la Espectrofotometría de Cambio Iónico (E.C.I.) propuesta por *Yoshimura, Waki y Oshasi*; los cuales publicaron en 1976 y en la revista *Talanta* un artículo (1) en el que daban a conocer una nueva técnica analítica que permitía microdeterminaciones cuantitativas de diversos cationes en aguas naturales.

Esta nueva técnica operatoria, que fué denominada por sus autores "Ion Exchanger Colorimetry" es, en esencia, una aplicación al análisis cuantitativo del sistema operatorio cualitativo propuesto por *Fujimoto* en 1960 (2) con el nombre de "Resin Spot Test", metodología que permite la identificación de trazas de diversos iones por adición de unos granos de una resina de cambio iónico a la disolución que contiene la sustancia a investigar y el reactivo cromogénico apropiado. Con ello el producto coloreado de la reacción se fija en la resina aumentando como consecuencia su concentración y con ello la sensibilidad del ensayo, y permitiendo en ocasiones, el empleo de reacciones que en disolución no son utilizables.

Para su aplicación práctica, opera *Yoshimura* fijando en una resina de tipo adecuado el analito que previamente reacciona en disolución con una sustancia cromógena para conseguir de ésta forma un compuesto coloreado. Este proceso de fijación se consigue simplemente mediante la agitación de una pequeña cantidad de resina cambiadora (0.1 - 0.2 g) en el seno de la muestra problema, cuyo volumen solo vendrá limitado por los requerimientos de una razonablemente cómoda manipulación, habitualmente de 0.1 a varios litros.

La concentración del analito se determina midiendo la absorbancia del compuesto coloreado originado fijado en la resina.

Esta absorbancia se mide empaquetando la resina, previamente recogida mediante filtración, en una cubeta de vidrio óptico o cuarzo de 1 mm de paso de luz y realizando la medida a la longitud de onda del máximo de absorción de la sustancia coloreada.

La atenuación total de la capa de resina viene dada por:

$$A = A_{RC} + A_{SOL} + A_R + A_{RL}$$

donde: A_{RC} = Absorbancia neta de las especies complejas frecuentemente en fase sólida

A_{SOL} = Absorbancia de la solución intersticial entre los granos del sólido

A_R = Absorbancia de fondo debido a la absorción y difusión por parte de la matriz sólida

A_{RL} = Absorbancia del reactivo cromogénico fijado en fase sólida.

En la figura 1 se muestra un espectro típico de resina sola y en presencia de complejo en ella incorporado.

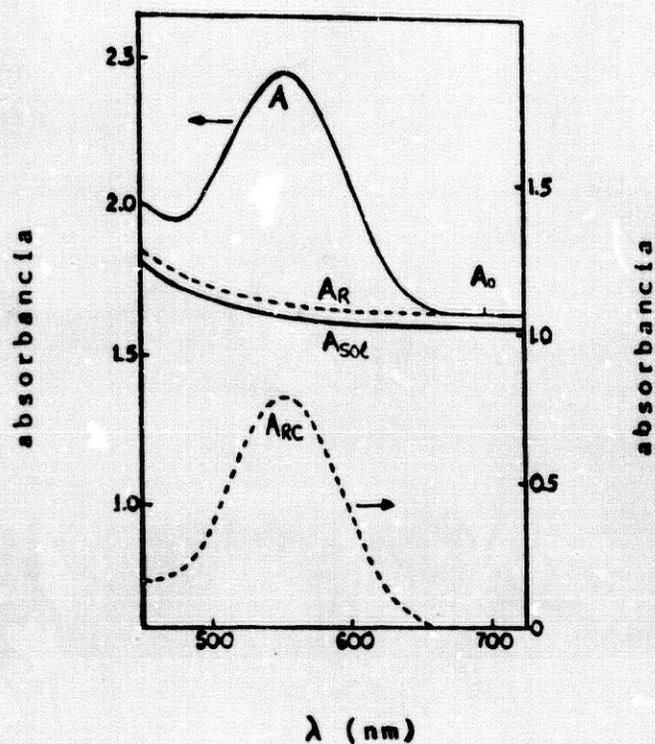


Figura 1. Espectro típico de resina sólo y en presencia de un complejo en ella incorporado.

Habitualmente A_{sol} es despreciable pues se emplean sistemas en que el coeficiente de distribución es grande.

El parámetro analítico, A_{RC} , se obtendría sin más que restar la absorbancia de la resina tratada en forma análoga con el reactivo/s y en ausencia de problema.

El asunto se complica debido a la variabilidad del empaquetamiento del sólido en la cubeta que hace que varíe el paso de luz y la difusión de la radiación en el sólido.

Se soluciona el problema midiendo a dos longitudes de onda: la del máximo del complejo o compuesto formado a partir del analito y otra donde sólo contribuya (por absorción o difusión) el sólido (generalmente en la zona 700-800 nm).

Las medidas se efectúan frente a sólido (resina) equilibrada con agua (o bien con reactivo si éste contribuyera A_{RL}) y empaquetada.

$$A_{RC} = A - A^*$$

donde: $A = A_{\lambda} - A_{800}$ para el problema.

De esta manera tengo una absorbancia diferencia que considera la variabilidad del empaquetamiento y que ha restado la absorbancia de la resina A_R y A_{RL} , en su caso, al medir frente a resina como referencia. A este valor habrá que restar la diferencia de la absorbancia de la resina sólo a la longitud de onda del problema y a 800 nm, debido a la forma del espectro, que absorbe más a menor longitud de onda. Por eso se resta A^* .

$$A^* = A_{\lambda}^* - A_{800}^*$$
 para el blanco de resina.

Que es un blanco preparado simultáneamente al problema y que se mide frente a la cubeta empaquetada con resina.

Si se conociera bien A^* no sería necesario medirlo cada vez sino que se podría restar como una constante y:

$$A_{RC} = A - cte$$

En una variante del procedimiento, *Yoshimura* incorpora previamente a la resina adecuada el reactivo a utilizar y añade la resina quelante así preparada a la de la disolución conteniendo el ión a identificar consiguiendo con ello, en no pocas ocasiones, aumentar la sensibilidad y selectividad de los ensayos así como la rapidez del análisis.

La nueva técnica fué y sigue siendo ampliamente utilizada. Como dato indicativo que a la misma se le concedió desde que fué propuesta, cabe citar el hecho de que el 5º Report sobre "Reactivos y Reacciones para el Análisis Cualitativo Inorgánico" publicado en 1964 por la I.U.P.A.C. (3) se hace mención expresa y elogiosa sólo de dos técnicas: la estufa anular de Weiss ("Ring Owen Technique") y el ensayo a la gota en resina ("Resin Spot Test") de *Fujimoto*, que sólo tienen como factor común su facilidad para concentrar a los productos de las reacciones y aumentar, por tanto, la sensibilidad de los ensayos a que se aplica.

En éste Departamento de Química Analítica se han utilizado, y dado origen a numerosas publicaciones, tanto la técnica cualitativa de *Fujimoto* como la cuantitativa de *Yoshimura*, en la siguiente tabla 1 se muestran las especies estudiadas y sus características más relevantes.

Tabla 1.

<i>Especie determinada</i>	<i>Límite Detección</i> <i>($\mu\text{g.L}^{-1}$)</i>	<i>(*)</i>	<i>Referencia</i>
Fe ³⁺	3	(1000 mL)	(2)
Fe ²⁺	1	(250 mL)	(4)
Cu ²⁺	0.44	(200 mL)	(5)
Co ²⁺	25	(80 mL)	(2)
Zn ²⁺	4.9	(1000 mL)	(6)
Bi ³⁺	1.3	(1000 mL)	(7)
Cd ²⁺	6	(200 mL)	(8)
Ni ²⁺	3	(200 mL)	(9)
Cr ₂ O ₄ ²⁻	0.11	(1000 mL)	(10)
UO ₂ ²⁺	0.5	(200 mL)	(10)
S ²⁻	0.03	(500 mL)	(11)
PO ₄ ³⁻	0.4	(500 mL)	(12)
NO ₂ ⁻	0.27	(1000 mL)	(13)
MoO ₄ ²⁻	6	(500 mL)	(14)
VO ₃ ⁻	0.56	(100 mL)	(15)
benzoato de metilo	12 mg.L ⁻¹	(500 mL)	(16)
acetoacetato	7.6	(500 mL)	(17)
F ⁻	1.1	(500 mL)	(18)
Ti(IV)	0.6	(500 mL)	(19)
Zr(IV)	8.0	(500 mL)	(20)

(*) mL de muestra empleada

1.2.-Antecedentes bibliográficos (medida de intensidad de luminiscencia en superficies sólidas)

La medida de luminiscencia en superficies sólidas es, por su sensibilidad y selectividad, una etapa de detección común a numerosas técnicas analíticas como la cromatografía en todas sus modalidades, electroforesis, análisis sobre superficies modificadas, etc... razón por la cual son numerosas las publicaciones que sobre el tema se encuentran en la bibliografía científica. En ella pueden encontrarse aplicaciones tanto cualitativas como cuantitativas de especies intrínsecamente fluorescentes, o bien que pueden llegar a serlo mediante una etapa de derivación adecuada. *Robert J. Hurtubise* (21) realiza un buen estudio sistemático de las mismas en su obra "Solid Surface Luminiscence Analysis", describiendo asimismo la instrumentación empleada, que es generalmente un espectrofotómetro o espectrofluorímetro convenientemente modificado.

Son muy escasos, sin embargo, los artículos encontrados en la bibliografía consultada, donde previamente a la etapa de medida existe una preconcentración. Así en 1972 *Heller* (22), propone un método para la determinación de 2,4,6 trinitrotolueno en agua de efluentes industriales por fluorescencia en resinas de cambio iónico. Para ello se emplea el dispositivo que se muestra en la figura 2.

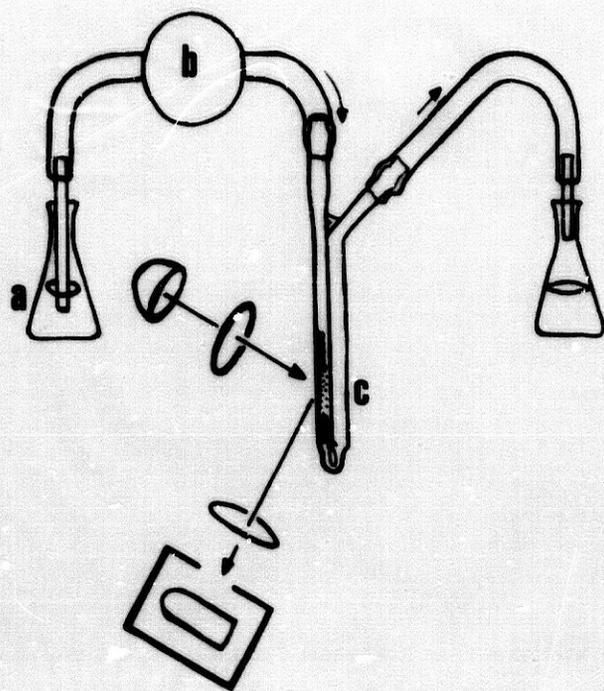
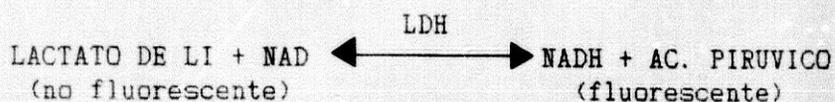
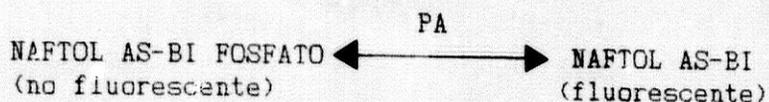


Figura 2.

En el compartimento (a) se sitúa la muestra problema que mediante una bomba peristáltica (b) se hace pasar a una velocidad de $10-50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por la resina Dowex 2-X10 situada en el tubo de cuarzo en forma de U (c) y en la que previamente se ha fijado una sustancia fluorescente que como la Rodamina B es capaz de reaccionar con el TNT originando un compuesto no fluorescente. La atenuación de fluorescencia es proporcional a la cantidad de TNT que se hace llegar a la resina, la cual a su vez depende de su concentración en agua y de la cantidad total de muestra que se hace pasar a través de la resina. Mediante éste método *Heller* determina niveles de TNT de 70 ppb. Los tiempos de reacción, comprendidos entre 3 y 24 horas, son excesivamente largos lo que resta operatividad a la técnica.

Gilbaut y Zimmerman (23,24) proponen métodos para la determinación de los enzimas fosfatasa alcalina (PA) y láctico deshidrogenasa (LDH) en suero humano, para ello se basan en que estos enzimas catalizan respectivamente las reacciones:



En ambos casos inmoviliza sobre unos discos de silicona las sustancias reaccionantes en concentraciones relativamente elevadas. Si sobre su superficie se deposita una gota de suero con el tampón adecuado es evidente que las concentraciones de los respectivos productos de reacción (ambos fluorescentes) serán proporcionales a la concentración de enzima presente, dentro de unos determinados límites, pudiendo ser determinada por medida de la intensidad de fluorescencia, en las condiciones operatorias adecuadas y previa obtención de las correspondientes curvas de calibrado. La incertidumbre de ambos métodos vienen determinadas por la uniformidad en el tamaño de la gotas.

Ditzler y col. (25) publican en 1982 un artículo en el que estudian por diversas técnicas, entre ellas la espectrofluorimetría, el complejo 2,2',4-trihidroxiazobenceno-Al(III) inmovilizado sobre gel de sílice. Para ello obtienen en primer lugar el ligando inmovilizado mediante reacción sucesiva de la gel de sílice con n-propilamina, 2,4,6-triclorotriazina y 2,2',4-trihidroxiazobenceno.

El complejo inmovilizado lo obtienen mediante equilibración durante dos horas de 0.25 g de gel de sílice con el reactivo en un litro de disolución conteniendo Al(III) a pH 4.5. Una vez transcurrido el tiempo de equilibración, se filtra y se seca el sistema, obteniéndose a continuación una pastilla que se sitúa mediante el accesorio adecuado, en el espectrofluorímetro y se mide su intensidad de fluorescencia frontal, la cual resulta ser proporcional a la concentración de Al(III) en el intervalo comprendido entre 0.1 y 1.5 mg.L⁻¹. Los autores, si bien no aportan más detalles acerca del método, afirman que el número de interferencias disminuye respecto del mismo método en disolución.

2.- Extrapolación de la Espectrofotometría de Cambio Iónico a la Espectrofluorimetría. El problema de la medida.

Los buenos resultados alcanzados en Espectrofotometría de Cambio Iónico unido a las superiores características que en cuanto a sensibilidad y selectividad posee la Espectrofluorimetría respecto a la Espectrofotometría, nos hicieron pensar en la posibilidad de sustituir ésta por la Espectrofluorimetría en la etapa de detección de la E.C.I., esta posibilidad podría ser aplicable siempre que el analito fuese fluorescente o susceptible de originar un compuesto fluorescente mediante la adición de un fluorógeno adecuado.

El primer problema a resolver fué el del diseño de la geometría del sistema de medida de la intensidad de fluorescencia del sistema fluorescente fijado sobre la resina.

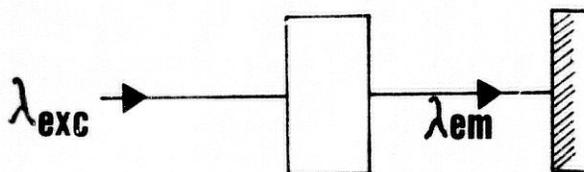
En la medida de la intensidad de luminiscencia, la colocación de la muestra respecto al haz de excitación y al monocromador de emisión puede realizarse experimentalmente de diversas formas pudiendo ser clasificadas todas ellas en dos grupos diferentes (21,26-28):

1.- Métodos de reflexión. En él se incluyen a los métodos experimentales en los que la fuente luminosa y el detector se encuentran en el mismo semiplano, respecto a los dos que define la cara iluminada de la muestra.

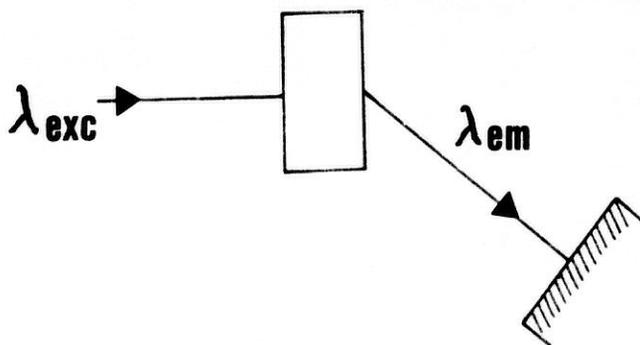
En ellos se mide la luminiscencia reflejada o especular y es empleada preferentemente en muestras sólidas, disoluciones de materiales de origen biológico y dispersiones coloidales.

2.- Métodos de refracción. En éste grupo incluimos a los dispositivos instrumentales en los que el detector mide la luminiscencia procedente de cualquier semiplano distinto al de la cara iluminada. A este tipo de luminiscencia se le denomina difusa o dispersa y en su medida los instrumentos pueden adoptar diversas geometrías, dependiendo de las características de la muestra o del instrumento, así se pueden distinguir tres principales:

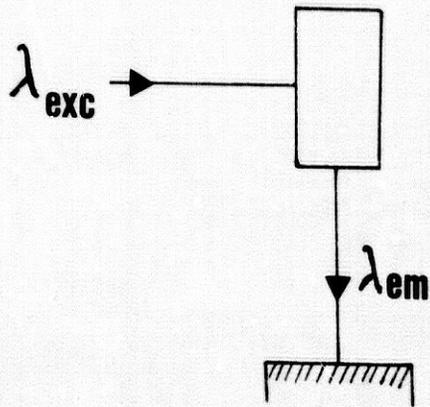
Disposición rectilínea.



Disposición oblicua.



Disposición en ángulo recto.



Tras diversas pruebas orientativas se empleó como instrumento de medida un espectrofluorímetro comercial, que adopta la disposición en ángulo recto. El problema de la ubicación adecuada de la cubeta de medida fué resuelto construyendo el dispositivo que se muestra en las figuras 3 y 4, situando su centro en la intersección del haz de excitación con la recta imaginaria que formando un ángulo de 90° con ésta se dirige al centro del sistema detector.

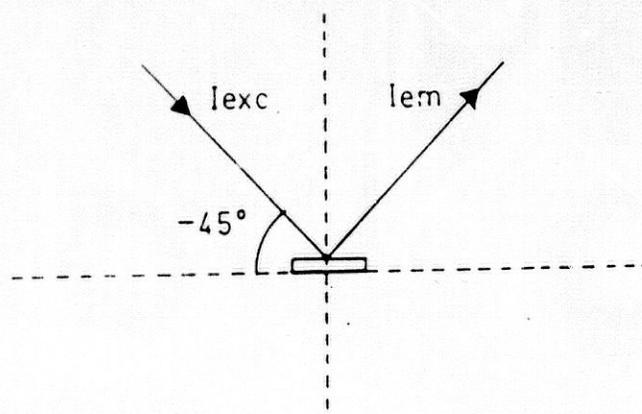
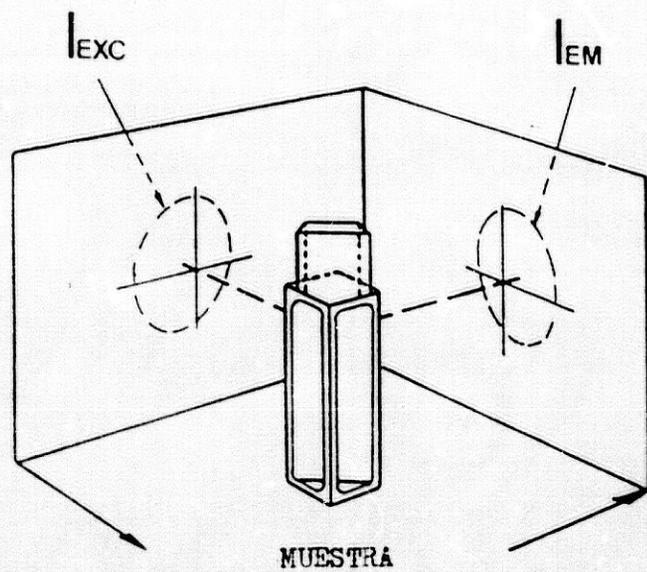


Figura 3. Fluorescencia difusa reflejada

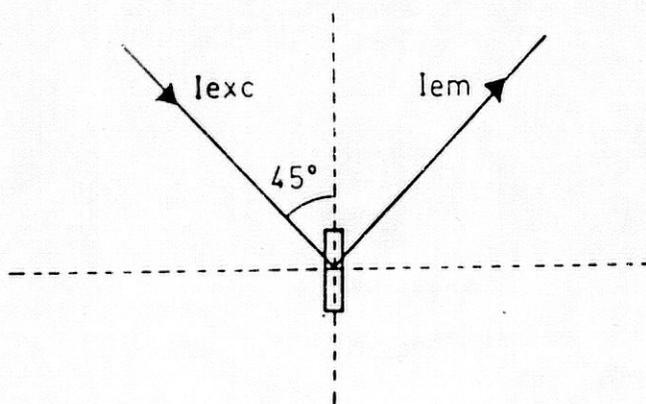
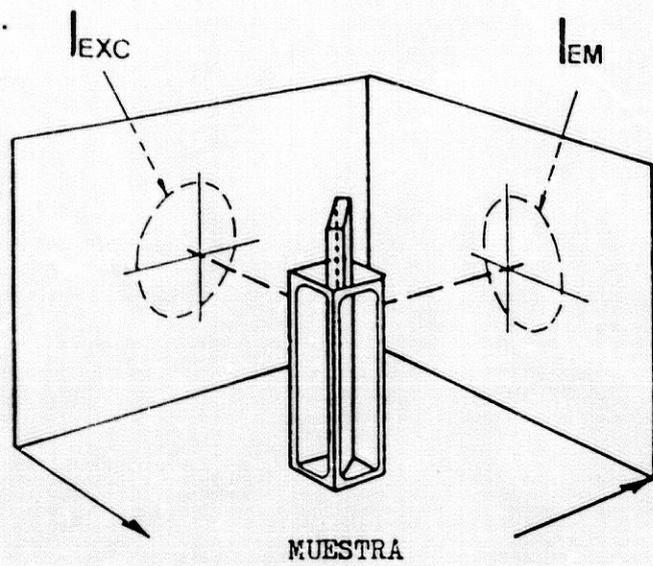


Figura 4. Fluorescencia difusa transmitida

Como puede deducirse, son dos las posiciones que puede adoptar la cubeta y que se muestran en las figuras 3 y 4. En la primera de ellas la luminiscencia de la muestra se mide por la misma cara en que recibe el haz de excitación, es lo que según la clasificación anterior denominamos FLUORESCENCIA REFLEJADA. En la segunda posición la cubeta recibe el haz de excitación por una cara y la medida se realiza por la otra, denominándose FLUORESCENCIA DIFUSA TRANSMITIDA. Los valores relativos de una y otra dependen de los soportes empleados. En la práctica totalidad de los sistemas estudiados por nosotros la intensidad de fluorescencia transmitida es superior a la reflejada, por lo que la posición b de la cubeta se muestra generalmente adecuada.

3.- Resultados obtenidos en Espectrofluorimetría de Cambio Iónico

La Espectrofluorimetría de Cambio Iónico fué iniciada en 1985 (29) por nuestro Grupo de Investigación. Las experiencias preliminares consistieron, una vez resuelto el problema de la medida, en estudiar el efecto que experimentan los espectros de excitación y emisión de un sistema por el hecho de pasar de disolución a fase sólida. Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron diversos tipos de soportes y dos clases de sistemas:

- Moléculas orgánicas fluorescentes: Fluoresceína, Eosina, Rodamina B y Sulfato de Quinina.
- Complejos fluorescentes: 2-Quinizarinsulfonato sódico-Be(II), 2-Quinizarinsulfonato sódico-Al(III), Acido Carmínico-W(VI), 1,3-Dihidroxi-antraquinona-Mg(II), Saliciliden-o-aminofenol-Al(III), Morina-Al(III) y Morina-Be(II).

El método operatorio fué siempre el mismo: Se prepararon series de disoluciones de 500 mL de la especie fluorescente a estudiar a distintos valores de pH, se transfirieron a los correspondientes frascos de polietileno de 1 Litro, se añadió 100 mg de soporte y se sometieron a una agitación de 10 minutos, transcurridos los cuales, se filtró la disolución y con la ayuda de un capilar se transfirió dicho soporte a una cubeta de cuarzo de 1 mm de espesor. A continuación se registraron los espectros de excitación y emisión del sistema.

La observación de los espectros de excitación de los anteriores sistemas puso de manifiesto tres tipos de comportamiento:

1.- Desplazamiento de los máximos de excitación en fase resina respecto a los espectros en disolución hacia longitudes de onda superiores: Rodamina B, Fluoresceína-QAE-A.25, Eosina, Morina-Be(II) y SOAF-Al(III).

2.- Desplazamiento de los máximos de excitación en fase resina respecto a los espectros en disolución hacia longitudes de onda inferiores: 2-Quinizarinsulfonato sódico-Al(III), 2-Quinizarinsulfonato sódico-Be(II), 1,5-Dihidroxiantraquinona-Mg(II) y Morina-Al(III).

3.- No se modifican los máximos de excitación de los sistemas: Sulfato de Quinina, Fluoresceína-DEAE-A.25 y Acido Carmínico-W(VI)

4.- Las longitudes de onda de los máximos de emisión de todos los sistemas en fase sólida sufren un desplazamiento hacia valores superiores respecto a los que presentan en disolución, excepto el sistema Morina-Al(III) que lo hace hacia valores inferiores y Morina-Be(II) que no se modifica.

El estudio realizado nos permitió por otra parte poner la técnica a punto y conocer su potencialidad analítica, pues en todos los casos se puso de manifiesto el gran incremento que experimentaba la intensidad de luminiscencia en fase sólida respecto a disolución.

Posteriormente se han estudiado cuantitativamente alguno de esos sistemas. En la tabla 2 se resumen algunas de sus condiciones operatorias. Así puede observarse que además de las longitudes de onda de excitación y emisión puede cambiar el pH óptimo al pasar de disolución a fase resina, y por tanto la disolución reguladora adecuada para su formación y fijación.

Tabla 2

<i>Sistema</i>	<i>Fase</i>	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	<i>Disolución Reguladora</i>	<i>pH</i>	<i>Referencia</i>
Fluoresceína	Disol.	475	510	----	>9	(29)
"	Resina	475	520	Tris/ClH	5,2-9	(29)
SOAF-Al	Disol.	396	506	AcH/Ac ⁻	4,8	(29)
"	Resina	400	508	AcH/Ac ⁻	5,8	(29)
Ac, Carminico-W	Disol.	515	580	AcH/Ac ⁻	4,6	(30)
"	Resina	490	580	HClAc/ClAc ⁻	3-3,3	(31)
Ac, Carminico-Mo	Disol.	560	590	AcH/Ac ⁻	5,2	(30)
"	Resina	490	582	ClAcH/ClAc ⁻	4,6	(32)
Ac, 2-hidroxi-3-naftoico-Be(II)	Disol.	380	450	----	9-10	(33)
	Resina	380	450	----	9-10	(33)
Morina-Al	Disol.	440	525	AcH	3,0±0,3	(34)
"	Resina	426	496	AcH/Ac ⁻	5,3	ésta Memoria
Morina-Be	Disol.	443	525	AEDT-piperidina	11,50	(35)
"	Resina	457	525	HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻	11,50	ésta Memoria

En la siguiente tabla 3 se muestran algunas características analíticas de los métodos propuestos en fase resina para volúmenes de muestra problema de 500 mL. Su observación permite apreciar que la Fluorimetría de Cambio Iónico disminuye el límite de detección y la sensibilidad analítica un orden de magnitud respecto del mismo método en disolución.

Tabla 3

<i>Sistema</i>	<i>Fase</i>	<i>L, D, ($\mu\text{g}, \text{L}^{-1}$)</i>	<i>s</i>	<i>DSR (%) empaquet.</i>	<i>DSR (%) método</i>
Fluoresceína	Disol.	0,283	----	----	----
"	Resina	0,021	0,017	1,4	0,8
SOAF-Al	Disol.	0,300	----	----	----
"	Resina	0,020	0,079	1,1	0,7
SOAF-Ga	Disol.	6,000	----	----	----
	Resina	0,300	0,186	1,5	1,3
Ac. Carmínico-Mo	Disol.	0,100	----	----	----
"	Resina	0,500	0,264	1,3	1,9
Ac. Carmínico-W	Disol.	36,000	13,0	----	----
"	Resina	0,300	0,3	1,4	1,5
Morina-Be	Disol.	0,150	----	----	0,4
"	Resina	0,020	0,005	1,8	1,4
Morina-Al	Disol.	0,250	----	----	----
"	Resina	0,040	0,012	1,6	2,0

<i>Sistema</i>	<i>Fase</i>	<i>L. D.</i> <i>($\mu\text{g. L}^{-1}$)</i>	<i>s</i>	<i>DSR (%)</i> <i>empaquet.</i>	<i>DSR (%)</i> <i>método</i>
Ac. 2-hidroxi-3-naftoico-Be(II)	Disol.	----	----	----	----
	Resina	0,060	----	----	5,0

L.D.; Límite de Detección

s; Sensibilidad Analítica

DSR (empaquet.); Desviación estandar relativa de la etapa de empaquetamiento

DSR (método); Desviación estandar relativa del método

Por otra parte, el protocolo de la aplicación de la FCI lo podemos esquematzar en las cinco etapas siguientes:

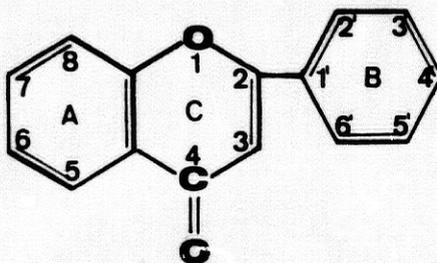
- 1.- Preparación de la disolución
- 2.- Agitación
- 3.- Filtración
- 4.- Empaquetamiento de la resina
- 5.- Medida de la intensidad de fluorescencia

A las etapas de la espectrofluorimetría convencional la FCI le añade las etapas de agitación, filtración y empaquetamiento de la resina, razón por la cual podría pensarse en la posibilidad de una mayor incertidumbre de la técnica. Sin embargo, el empleo de resinas que posean buenas cualidades para su empaquetamiento (ser homogéneas en tamaño y no atacables por los reactivos empleados), origina que las desviaciones estandar relativas de la FCI sean del mismo orden que las de los métodos convencionales en disolución.

Finalmente, en cuanto a la interferencia causada por la presencia de iones extraños al medio, merece destacar el hecho de que se observa, en general, una mayor tolerancia en la F.C.I. respecto a los mismos métodos en disolución. Este aumento de la tolerancia se ha puesto de manifiesto particularmente con algunos iones paramagnéticos como el Cu(II).

4.- La morina como reactivo analítico

Las flavonas, también llamadas antoxantinas, son pigmentos amarillos que existen en la naturaleza bien en estado libre o como glucósidos o asociados con tanina. Las flavonas son derivados de la flavona, que es la 2-fenil-4-cromona.



Los anillos A y B de la flavona se comportan, más o menos, como los de cualquier compuesto aromático, mientras que el anillo C (pirona) muestra reacciones típicas de las flavonas. Así el grupo carbonilo que contiene este anillo C, no reacciona con reactivos habituales tales como hidroxilamina, semicarbazida o fenilhidracina. El tratamiento con bases abre el anillo de pirona originando 1,3-dicetonas que pueden degradarse posteriormente.

Los flavonoides tienen un sistema aromático altamente conjugado y consecuentemente muestran una absorción de radiación intensa y característica, localizada habitualmente en dos zonas:

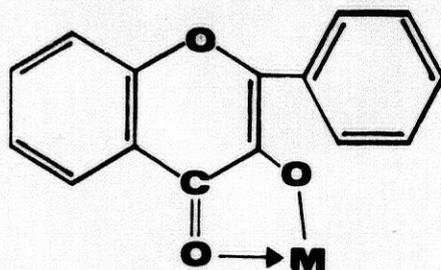
la banda I que aparece entre 320 y 380 nm y la banda II entre 240 y 270 nm.

Este núcleo puede estar parcialmente alcoholado. En la mayoría de los casos, las posiciones 5 y 7 están hidroxiladas y, con frecuencia, también lo están una o más de las 3', 4' y 5'.

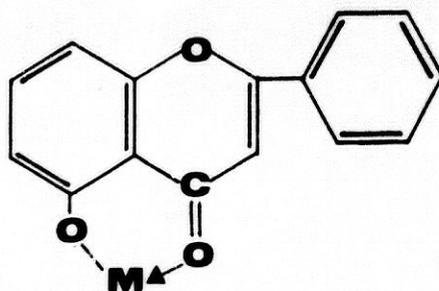
Las hidroxiflavonas pueden formar complejos quelatos con gran número de iones metálicos. Complejos que manifiestan características analíticas muy interesantes siendo por ello reactivos muy usados en análisis químico

La molécula de flavona puede formar quelatos a través de:

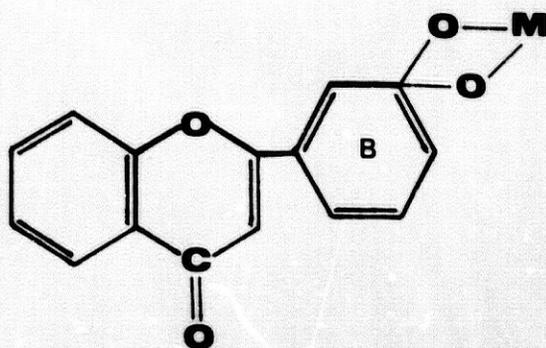
- 1.- El grupo hidroxilo en posición 3 y el carbonilo.



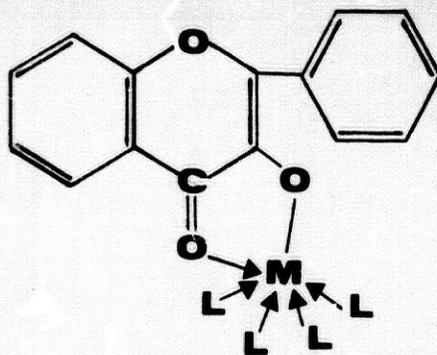
- 2.- El grupo hidroxilo en posición 5 y el grupo carbonilo.



3.- Dos grupos hidroxilos contiguos y situados en el grupo B.

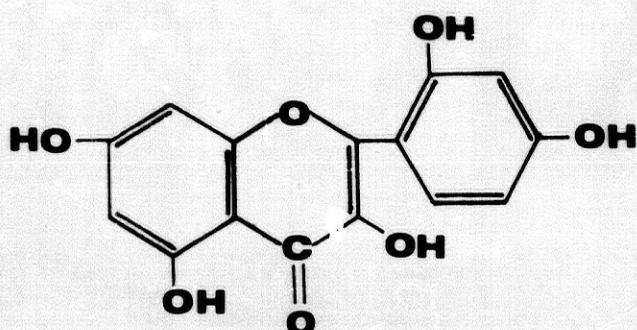


4.- Alguno de los anteriores ligandos diversos tales como antipirina, perclorato, sulfato, etc., que determina la formación de complejos de ligando mixto.



Los flavonoides que más se han utilizado en Química Analítica han sido los flavonoles. Destacan entre ellos la morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona), la quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), la galangina (3,5,7-trihidroxiflavona), la robinetina (3,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona), la miricetina (3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona), la quercetagetina (3,5,6,7,3',4'-hexahidroxiflavona), datiscetina (3,5,7,2'-tetrahidroxiflavona), quercemeritrina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona-7-D-glucopirano-xido), kaempferol, rutina, herperitina, hesperidina, etc.

La flavona más utilizada en Química Analítica es sin duda la morina, cuyo nombre sistemático es 3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona. Se encuentra en la naturaleza en la madera del árbol *Artocarpus Integrifolia* y *Toxylon Pomiferum*, de donde se puede extraer y purificar por precipitación de su sal de plomo, de la que se libera por acción del H₂S y cristaliza en ácido acético.



La morina es un reactivo muy utilizado en Química Analítica e introducido desde hace muchos años. En la figura 5 se muestra la distribución temporal de los trabajos publicados sobre esta flavona en el presente siglo y relacionados con análisis. Destaca el que desde la década de los años 40 el interés por su uso no ha decaído, aunque sí ha variado el campo de su aplicación como posteriormente comentaremos.

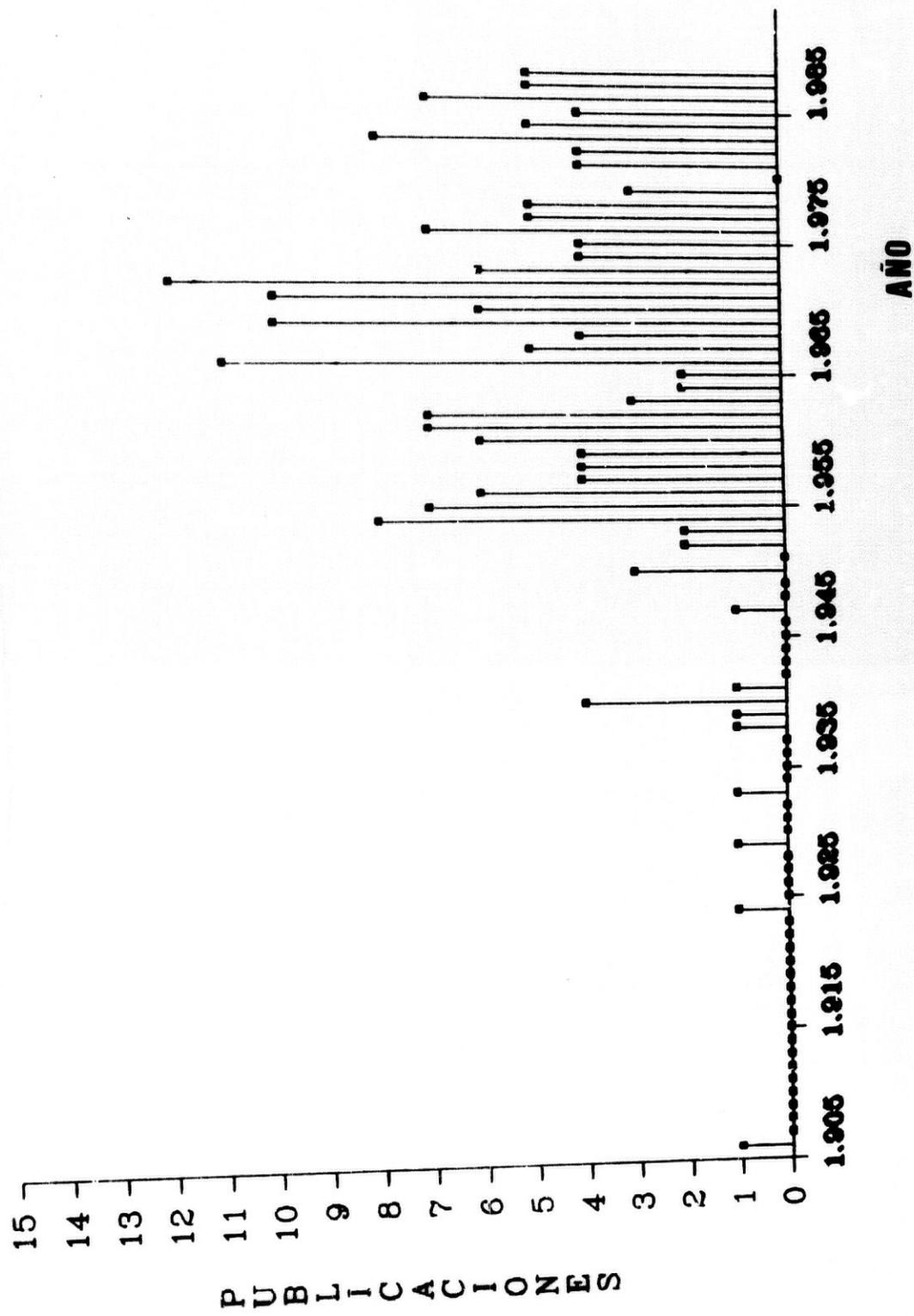


Figura 5. Distribución temporal de los trabajos publicados sobre morina y relacionados con análisis

Los artículos publicados sobre la utilización en Química Analítica de la morina se pueden clasificar en doce grupos: análisis cualitativo, uso de la estufa anular, volumetrías, gravimetrías, determinaciones espectrofluorimétricas, determinaciones por atenuación de fluorescencia, quimiluminiscencia, determinaciones espectrofotométricas, determinaciones basadas en el uso de surfactantes, determinaciones catalíticas, uso de cromatografía líquida y revisoras. En la siguiente figura 6 se muestra la distribución de la bibliografía relacionada con la morina en los anteriores grupos.

La aplicación cualitativa (identificaciones en tubo o papel más el uso en la estufa anular) supone un 10.5 %, mientras que su empleo en análisis clásico como reactivo precipitante o indicador, es de un 7.3 %. El número de artículos dedicados a la propuesta de métodos espectrofluorimétricos aporta el mayor porcentaje, un 40.4 %; siguiéndole el de métodos espectrofotométricos con un 25.7 %. El resto de los grupos presentan contribuciones próximas, como máximo, al 5 %, aunque entre ellas se encuentran las aplicaciones más recientes de la morina.

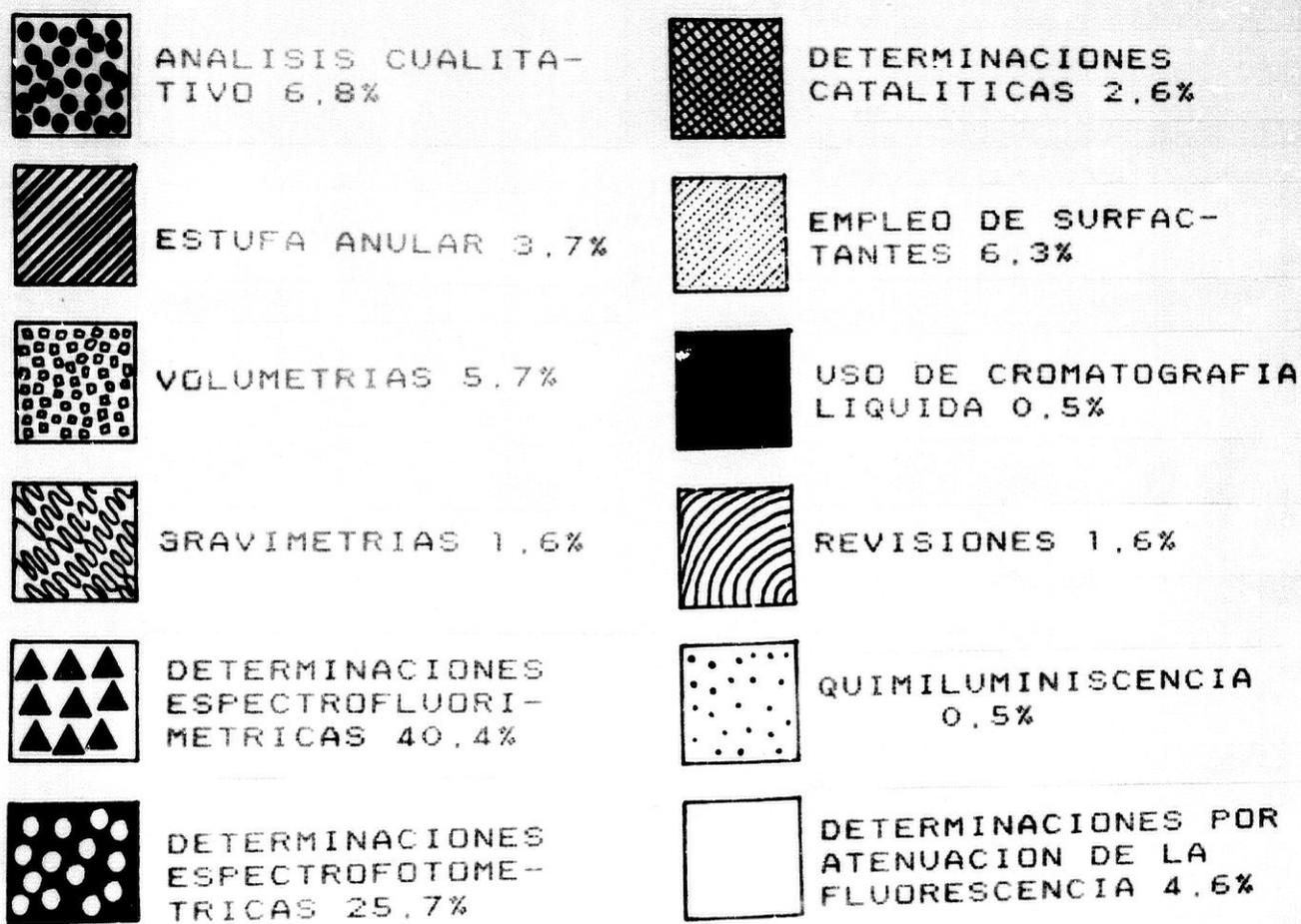
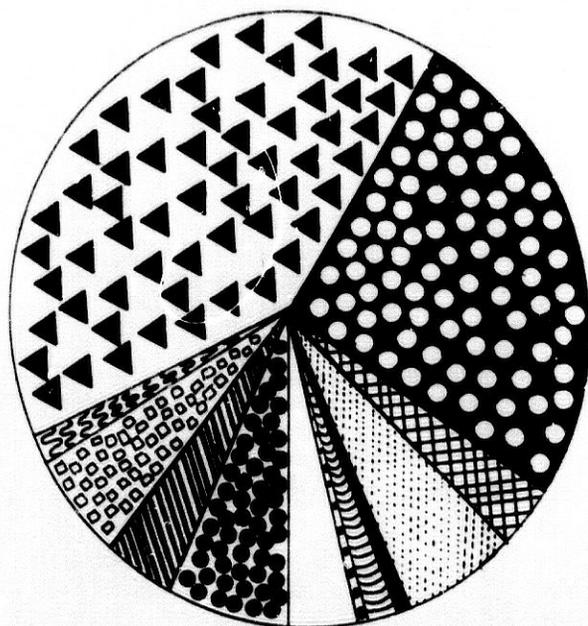


Figura 6. Distribución de artículos publicados sobre el empleo de morina en Química Analítica

La aplicación analítica de las hidroxiflavonas, y de la morina por tanto, se fundamenta en su capacidad para formar quelatos metálicos.

Estos quelatos metálicos son, generalmente, coloreados y, por tanto, adecuados para la determinación espectrofotométrica de metales. Por otra parte, muchos de estos complejos muestran emisión fluorescente por lo que se pueden emplear para la determinación fluorimétrica de aquellos iones que la originan. Al objeto de aumentar la selectividad y sensibilidad de estos métodos espectrofotométricos y espectrofluorimétricos se han usado diversas técnicas de separación como son: cromatografía, extracción con disolventes, estufa anular, etc.

El color o la emisión fluorescente de los complejos que originan puede ser disminuida por la presencia de diversos aniones, lo cual es la base para la determinación indirecta de éstos.

También se han utilizado estos reactivos para la determinación gravimétrica de metales debido a la insolubilidad de algunos complejos.

Vamos a ceñirnos a continuación al uso de la morina en Química Analítica, pues éste será el reactivo empleado en la presente Memoria de Doctorado.

5.- Análisis Cualitativo.

En la tabla periódica de la figura 7 se muestran los elementos que se pueden identificar mediante el uso de la morina.

APLICACIONES CUALITATIVAS

GRUPO	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8	8	8	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	0
PERIODO 1°	H																H	He
2°	Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
3°	Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	A
4°	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
5°	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
6°	Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
7°	Fr	Ra	Ac															

Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lw



Tubo



Estufa Anular

Figura 7. Elementos que se pueden identificar con el uso de la morina

La primera aplicación analítica de la fluorescencia viene precisamente de la mano de la morina. *Goppelsröder* observa en 1867 que la morina contenida en "fustic" origina una intensa fluorescencia verde en presencia de aluminio y que puede servir como ensayo para la detección de pequeñas cantidades de aluminio (36). Esta reacción ha sido estudiada por muchos investigadores, siendo clásico el método de identificación propuesto por *Feigl* (37).

El ión berilio reacciona con morina dando lugar a fluorescencia amarillo verdosa aunque en vez de en medio acético como el aluminio en medio básico fuerte (38). El método propuesto por *Sandell* presenta una sensibilidad de 0.01 mg.L^{-1} (39).

Al igual que el aluminio, el galio origina fluorescencia verdosa en medio neutro o ligeramente acético; la reacción con aluminio puede ser enmascarada con fluoruro, lo cual proporciona una vía para la diferenciación de ambos. Según *Beck* la reacción es más sensible que para aluminio (40).

La reacción con escandio muestra fluorescencia verde y sirve para identificar hasta $0.03 \mu\text{g}$ de éste (41). El indio también reacciona con nuestro reactivo, aunque, al igual que el escandio es parcialmente enmascarada con fluoruros (40). Se pueden detectar la presencia de aluminio, escandio, galio e indio en una mezcla utilizando enmascarantes y variaciones de pH (40).

De las tierras raras, lantano y lutecio reaccionan con morina originando complejos de intensa fluorescencia verde. Gadolinio también reacciona aunque su fluorescencia verde es débil. Se ha usado para la detección de Lu y Gd en cromatografía de papel (42).

Litio y cesio originan fluorescencia característica y se ha propuesto su identificación mediante la técnica de la estufa anular (43).

Muchos hidróxidos metálicos insolubles en agua originan una intensa fluorescencia verde cuando se ponen en contacto con disolución etanólica o acetónica de morina. Tal es el caso del estaño, tanto en estado de oxidación 2 como 4. Así se ha propuesto para la detección de estaño en minerales o en aleaciones que lo contengan. Se han utilizado varios métodos para conseguir la eliminación de interferencias. Uno de ellos consiste en la disolución del mineral o aleación en H_2SO_4 y extracción del estaño en benceno como SnI_4 . Sobre papel se identifica con morina. Otra forma propuesta de eliminar interferencias es añadir sulfuro alcalino que originara sulfuros o tiocomplejos con los posibles interferentes y desenmascarar selectivamente al estaño que está como SnS_3^{2-} con H_2O_2 , con lo cual precipita como $Sn(OH)_4$, forma en la cual reacciona con morina (44).

También se ha propuesto para la identificación de otros elementos aunque con menor selectividad. Así torio (45), antimonio (límite de identificación: $0.05 \mu g$) (46), plomo ($0.25 \mu g$), cadmio ($0.1 \mu g$), cinc ($0.05 \mu g$), circonio: fluorescencia amarilla verdosa, estable en medio HCl fuerte ($0.1 \mu g$) (47), volframio ($0.25 \mu g$), molibdeno: complejo de color marrón, soluble en n-butanol ($0.05 \mu g$) (46), titanio: complejo de color marrón ($0.01 \mu g$) (48).

6.- Análisis Cuantitativo.

El uso de la morina, y en general de las flavonas como reactivo analítico se ha revisado en varias ocasiones. En 1968 por *Katyal* (49), en 1977 por *Katyal y Prakash* (50) y en 1986 por *Hernández y Medina Escriche* (51).

A continuación, vamos a reseñar de forma sucinta las diversas aplicaciones al análisis cuantitativo del reactivo objeto de estudio.

Se ha usado la morina en ANALISIS GRAVIMETRICO, como agente para la precipitación cuantitativa de metales de elevado estado de excitación con los que origina compuestos insolubles. Así se ha propuesto utilizar el complejo naranja de Ti(IV), el amarillo de Zr(IV), el rojo de Nb(V) y el naranja de Ta(V) para la precipitación de estos metales, aunque en todos los casos es necesario calcinar los complejos para su pesada como TiO_2 (52), ZrO_2 (53), Nb_2O_5 (54) y Ta_2O_5 (54).

Mayor es su empleo en ANALISIS VOLUMETRICO donde se ha usado la morina como indicador metalocrómico fluorescente en volumetrias de formación de complejos, especialmente complexométricas. En la siguiente tabla 4 se señalan algunos de los métodos propuestos y sus aplicaciones.

Tabla 4

<i>Analito</i>	<i>Agente valorante</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Referencias</i>
Al	Oxalato	Minerales	(55)
In	EDTA	-----	(56)
In	TETHA	-----	(56)
Ga	EDTA	Semiconductores	(57)
Sc	EDTA	-----	(58)
Th	EDTA	Hilo volframio	(59)
Th	Oxalato	-----	(60)
Zr	EDTA	-----	(61)
Zr	Fluoruros	-----	(61)
F ⁻	Al	-----	(62)
F ⁻	Zr	-----	(63)

TETHA: Acido trietilentetraaminhexacético

7.- Métodos Espectrofluorimétricos y Espectrofotométricos.

Mucha mayor importancia tienen los métodos de análisis cuantitativo que se basan en la medida de la fluorescencia que originan muchos complejos. En la siguiente tabla periódica (figura 8) se muestran aquellos elementos que se pueden determinar fluorimetricamente con morina. Por otra parte algunos datos característicos de estos métodos, seleccionados de entre los más representativos, y sus aplicaciones se muestran en la tabla 5.

DETERMINACIONES ESPECTROFLUORIMÉTRICAS

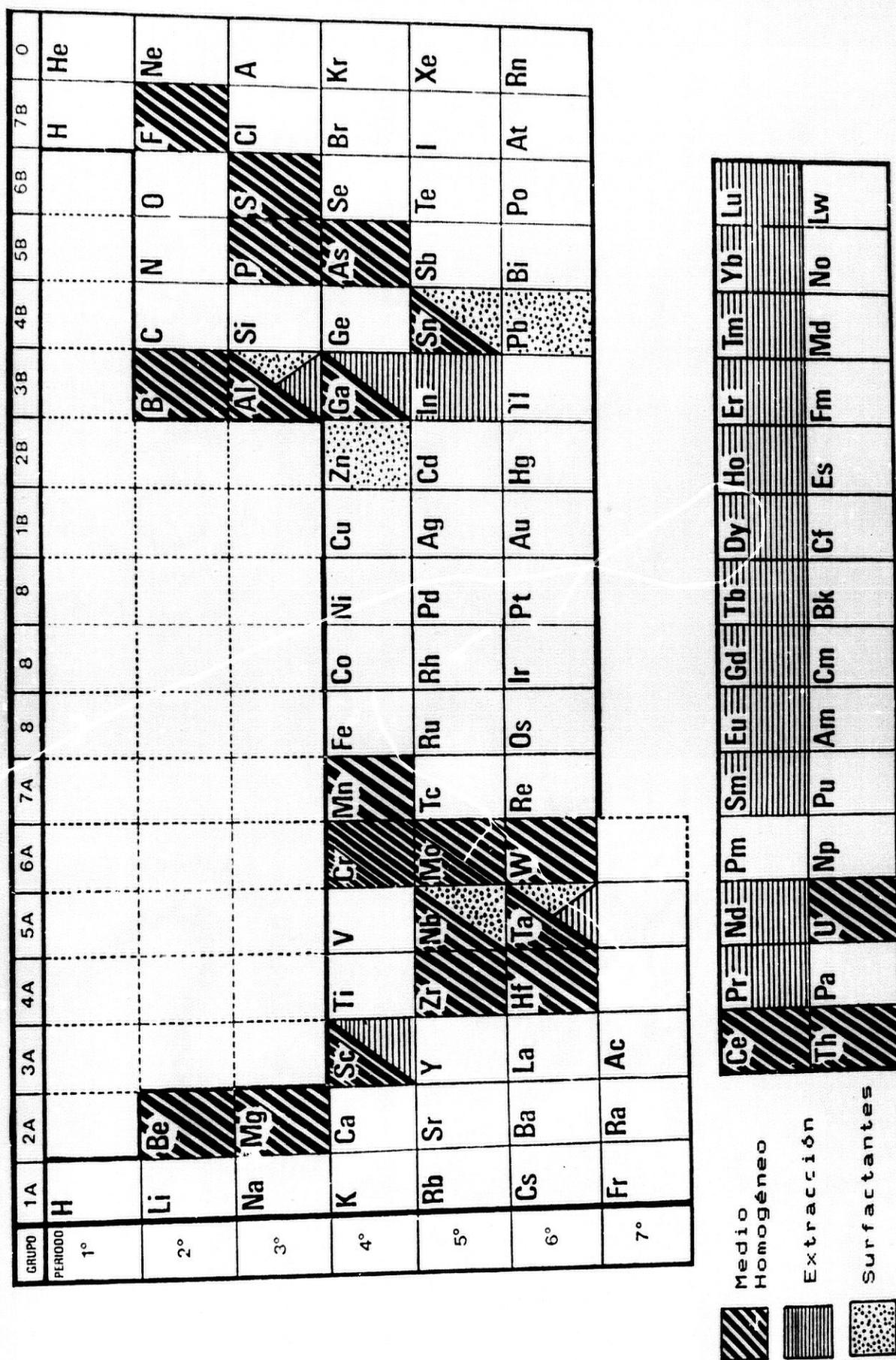


Figura 8. Determinaciones espectrofluorimétricas

Tabla 5

Elemento	pH	Medio	Rango Lim, Detec,	Aplicaciones	Referencia
Be	11,5	Homog.	0,36 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Tierra, Acero Aire, orina	35
Be	13	Homog.	0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Minerales	64,65
Be	11,5	Homog.	0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Aire	66
Mg	9,85	Homog.	0,1-0,9 mg.L^{-1}		67
B		Homog.	0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$		68,69 70,71
Al		C1CH3	$<2 \times 10^{-5}$ M		72
Al	5-7	MIBC	$<20 \mu\text{g.L}^{-1}$	Agua	73,74
Al	3,3	Homog.	0,1-1,2 mg.L^{-1}		75
Ga	2,5	Homog.	5-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Semiconductores	76,77
Ga		C13CH	1-6 μg		78
In	3,6	Homog.			76
In		C13CH	20-250 $\mu\text{g.L}^{-1}$		79
Sn	0,04N HCl	Homog.	0,2-0,8 mg.L^{-1}	Minerales	80,81
Sb		Homog.	0,5-20 μg	Minerales	82
Sc	1,2-4	C13CH	0,1 mg.L^{-1}		83
TR	2,5	Homog.	40 $\mu\text{g.L}^{-1}$		84
TR	4,5	AIA	$2,5 \times 10^{-7}$ - $2,5 \times 10^{-5}$ M		85
Lu	5,5-7	AIP	1,5-10 μg		86
Ce ³⁺	2,5	Homog.	100 $\mu\text{g.L}^{-1}$		87
Th	2,0	Homog.	3,5 mg.L^{-1}	Orina	88,89
U	4-7	Homog.	0,4-4 mg.L^{-1}		90
Zr	4N HCl	Homog.	1 mg.L^{-1}	Triclorosilano, Silicatos, HF,U Aleaciones	91,92 93,94 95,96,97
Hf	7N HCl	Homog.	4-24 $\mu\text{g.L}^{-1}$		98,99

Elemento	pH	Medio	Rango Lim, Detec.	Aplicaciones	Referencia
Nb	3	Homog.			100,101
Ta	3	Homog.			102
Mo	5	Homog.	0,1-1,6 mg.L ⁻¹		103
W	5,1	Homog.	3-48 µg.L ⁻¹		104

AIP; Acetato de isopentilo

AIA; Alcohol isoamílico

La morina, por otra parte, origina complejos coloreados, generalmente amarillos, anaranjados o rojos, que exhiben o no fluorescencia y, susceptibles de ser usados para determinaciones espectrofotométricas. En la tabla periódica de la figura 9 se muestran aquellos elementos susceptibles de análisis espectrofotométrico. Algunas características de métodos seleccionados, tanto extractivos como en medio homogéneo, para el análisis de estos iones metálicos se recogen en la tabla 6.

DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS

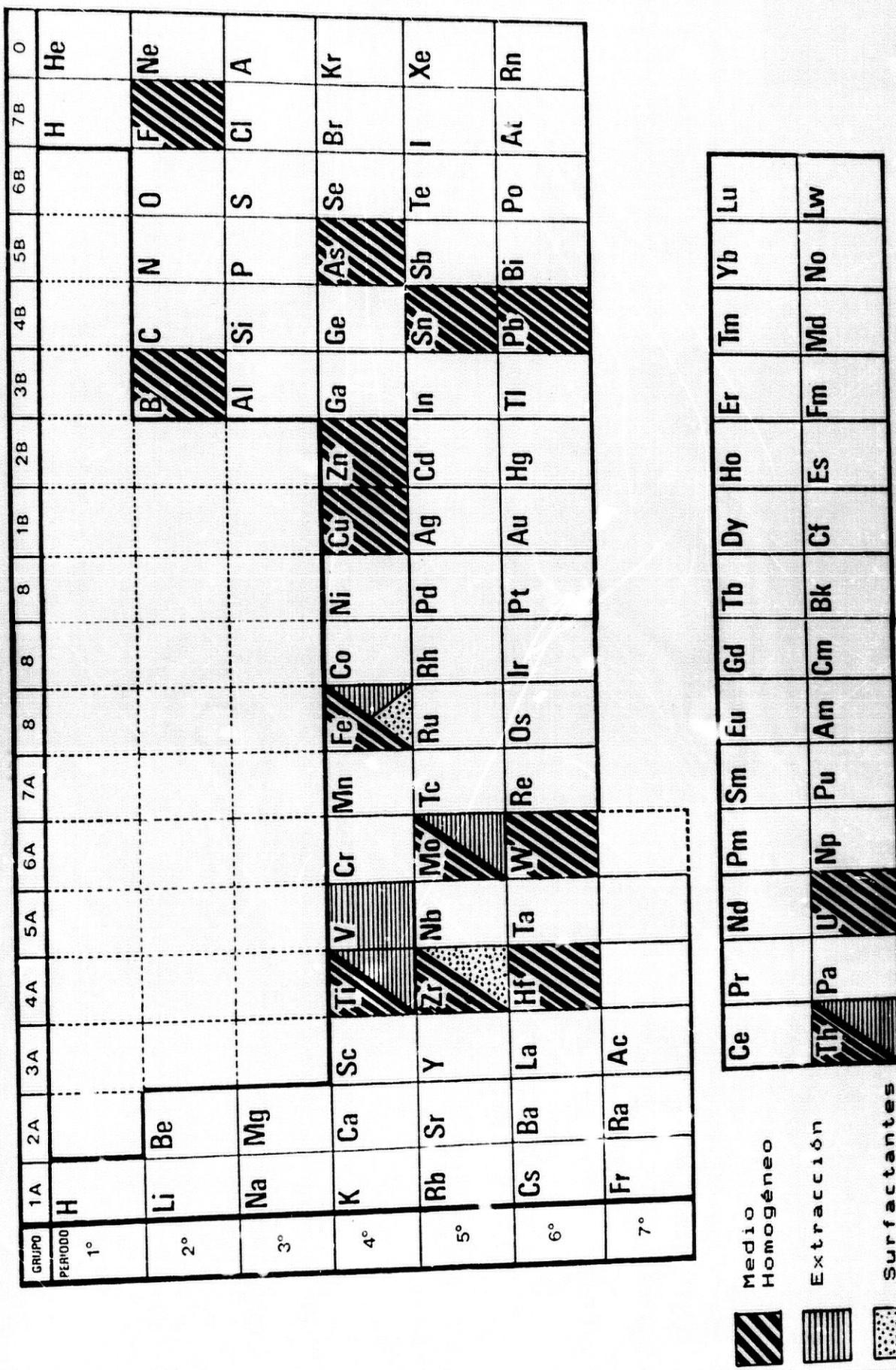


Figura 9. Determinaciones espectrofotométricas

Tabla 6

Elemento	Medida	pH	Medio	Rango Lim. Detec.	Referencia
			Cl3CH	$<2 \times 10^{-5}$ M	72
In			Cl3CH	0.02-2.5 mg.L ⁻¹	79
Ga			MEC	0.033 mg.L ⁻¹	105
Sc		1.2	Cl3CH	0.1 mg.L ⁻¹	83
TR		4.5	AIA	2.5×10^{-7} - 2.5×10^{-5} M	85
As	440		Homog.	<1.2 mg.L ⁻¹	106
Cu		5.8	Homog.	2.5-20.3 mg.L ⁻¹	107
Zn	470	5.5	Homog.	1.6×10^{-4} M	108
Th	410	2.0	Homog.	3.5 µg.L ⁻¹	89
Th	420	9	AIA	0.08-2.3 mg	109
U	470	9	Homog.	2-16 mg.L ⁻¹	110
Ti	420	1N AcH	Homog.	0.04-2 mg.L ⁻¹	111
Ti	420	3.2-4.1	AB	0.0012 mg.L ⁻¹	112
Zr	436	0.4N HCl	Homog.	<5 mg.L ⁻¹	96,97 113,114
Zr	420	0.2N H2SO4	Homog.	0.04-2.8 mg.L ⁻¹	115
Zr	430	9	AIA	0.04-1 mg.L ⁻¹	85
Hf	420	0.5N HCl	Homog.	0.02-0.8 mg.L ⁻¹	116,117
V	418		AIA	1-20 mg.L ⁻¹	118
Mo			Homog.	0.01 mg.L ⁻¹	119
Mo	430		BuOH	0.05 mg.L ⁻¹	119
W	413		Homog.	0.01 mg.L ⁻¹	120
Fe	400	3.5	Homog.	0.14-33.6 mg.L ⁻¹	121
Fe		3-5.5	AIA	0.01-0.7 mg.L ⁻¹	122

MEC: metiletilcetona

AIA: alcohol isoamilico

AB: alcohol bencílico

BuOH: butanol

La mayoría de estos complejos con morina son simples, variando la relación estequiométrica de 1:1 a 1:3, si bien en algunas ocasiones se forman complejos de ligando mixto tanto en medio acuoso como previa extracción en algún disolvente orgánico que le da la necesaria estabilidad.

Entre estos complejos podemos citar el 1:1:1 de B con morina y oxalato (50), el de Zr con morina y N-p-clorofenilbenzohidroxámico extraído en alcohol isoamílico (115), y el de Nb con morina y H₂C₂ de estequiometría 1:1:1 (100,101), que presenta igual estequiometría que el complejo de Ta con morina y H₂O₂ (102). Clásicos son los complejos de morina y antipirina con Al (72) o In (79) o Sc (83) o V (123) que se extraen como perclorato complejos en cloroformo o de Lu con diantipirilmetano (124). La anilina, por citar un caso más origina con Ti y morina un complejo de estequiometría 1:3:1 (Ti:Morina:Anilina) (112).

El empleo de agentes tensioactivos ha mejorado en muchos casos la sensibilidad y la selectividad de los métodos espectrofotométricos y espectrofluorimétricos. En lo que respecta al reactivo objeto de revisión, se han modificado métodos fluorimétricos por uso de agentes tensioactivos. Se ha estudiado el complejo de niobio (125,126) en presencia tanto de tensioactivos catiónicos como de no iónicos. Asimismo se ha estudiado el efecto de tensioactivos catiónicos y no iónicos sobre el complejo Al-morina (127) consiguiendo un aumento en la sensibilidad del orden de 8 a 10 veces, al igual que le ocurre al sistema Pb-morina. El método para la determinación de Zn en presencia de Genapol PF-20 aumenta su sensibilidad unas 75 veces.

8.- Métodos indirectos y catalíticos.

La oxidación de la morina por diversos reactivos ha dado lugar a diversos métodos. Así la oxidación de la morina por Cr(VI), provoca una atenuación de la fluorescencia del complejo Ga-morina y permite determinar cromo entre 0.02 y 2 mg.L⁻¹ (128).

Mucho más usadas han sido las determinaciones catalíticas. Podemos citar la oxidación del complejo de Be-morina por H₂O₂ catalizada por cobre y usada para la determinación de este último (49,129). También se ha estudiado el efecto catalítico del cobre sobre la oxidación atmosférica o con peróxido de hidrógeno de la morina sola (130). Se ha propuesto un método para el análisis de manganeso basado en su capacidad para catalizar la oxidación aérea del complejo Be-morina (131).

La acción de algunos aniones sobre diversos complejos con morina se ha utilizado para la determinación de aquellos. Se ha propuesto una determinación de fluoruros basada en la disminución de la señal de fluorescencia del complejo Al-morina (132), análogamente se ha propuesto un método basado en la medida de absorbancia (133). El sistema Al-morina también se ha empleado para la determinación de fosfatos por originar atenuación de fluorescencia (134,135). Para la determinación de sulfato se ha empleado el complejo Th-morina (136,137).

9.- Tendencias en el uso de morina.

Hasta aquí se han resumido las aplicaciones de la morina habidas hasta el año 1985, último año del que existen revisiones bibliográficas. Vamos a comentar a continuación las publicaciones que han aparecido sobre la morina hasta la fecha, lo que nos señalará las tendencias en el uso de este reactivo y las diferencias con la etapa anterior.

Se continúan las aplicaciones al análisis fluorimétrico, aunque insistiendo en las aplicaciones. Así se ha propuesto la determinación de europio en ZnS dopado con Eu, mediante la extracción del complejo de morina en 3-metilbutanol y tributilfosfato (138). Asimismo se ha propuesto un método para el análisis de escandio previa extracción en propanol (139). El efecto de diversos disolventes orgánicos en la fluorescencia del complejo Ga-morina ha sido estudiado por *Kostyshina y col.* (140). En la misma línea, aunque sin extracción, se ha propuesto el análisis de cadmio en lodos a un nivel comprendido entre 0.5 y 0.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (141). Un nuevo método para aluminio ha sido publicado empleando dos ligandos: morina y azul Pontachrome, de esta forma se pueden determinar entre 2 y 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de aluminio y ha sido aplicado al análisis de aluminio en soluciones de hemodialisis (142).

Se ha seguido utilizando la atenuación de fluorescencia que provocan determinados compuestos en complejos de morina para el análisis de aquellos. Tal es el caso del método propuesto para el análisis de As (V) a nivel de 10 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ basado en la atenuación del complejo Th-morina (143).

Se ha propuesto una determinación quimiluminiscente de aluminio que involucra la morina además de H_2O_2 y bis-(2,4-dinitrofenil) oxalato (144).

Sin embargo donde ha habido un mayor interés es en el uso de surfactantes que, como antes ya se ha señalado, provocarán interesantes cambios en las características espectrales y luminiscentes de los complejos de morina.

Así el uso de surfactantes no iónicos permite la determinación de cinc con morina, presentando un límite de detección de 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (145). Nuevamente se ha vuelto a estudiar el complejo Nb-morina en presencia de surfactantes, aplicándose el método propuesto a materiales geológicos (146). La presencia

de Genapol PF-20, un surfactante no iónico, permite poner a punto un método para la determinación de aluminio con morina que presenta un límite de detección de $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (147).

La atenuación que provoca el Fe (III) sobre la fluorescencia del complejo Zn-morina en presencia de Triton X-100, permite proponer un método para determinar hierro en concentraciones inferiores a $55 \mu\text{g.L}^{-1}$ (148).

Se ha estudiado la acción de diversos surfactantes sobre complejos de morina, proponiendo diversos métodos espectrofotométricos. Tal es el caso del circonio (149,150) y hierro (151,152).

Asimismo se ha continuado explotando la oxidación de la morina y la influencia de diversos catalizadores. En este sentido se ha estudiado la acción del manganeso sobre la morina, proponiéndose un método para éste, válido entre 0.5 y $70 \mu\text{g.L}^{-1}$ (153). El circonio, por su parte, actúa como activador de la oxidación aérea de la morina catalizada por manganeso, lo que permite la determinación de hasta $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Zr (154).

Se ha utilizado la morina como agente complejante para conseguir la extracción completa de protactinio en alcohol isoamílico (155).

Por último citar que se ha empleado la morina como reactivo que permite la detección fluorimétrica de derivados organoestánnicos mediante cromatografía líquida de alta resolución. Ello se basa en la formación de complejos de los organoestánnicos con la morina que se incorpora en la fase móvil (155).

C A P I T U L O I

ENSAYOS CUALITATIVOS

I.1. ENSAYOS CUALITATIVOS

En Fluorimetría de Cambio Iónico es necesario fijar el analito en un soporte sólido donde se concentrará y en el que se medirá su emisión fluorescente.

Con objeto de seleccionar el soporte adecuado donde fijar los complejos fluorescentes que se proponen estudiar estos, morina-Be(II) y morina-Al(III), se llevó a cabo en primer lugar un estudio cualitativo de la fijación de los mismos sobre varios soportes y a diferentes valores de pH.

I.1.1. Soportes empleados

Se han empleado en este estudio dos tipos de soportes: cambiadores de iones unos y adsorbentes los otros. En ambos casos se ha empleado como matriz Sephadex, una matriz polidextrano.

La razón del empleo de Sephadex radica en su mayor transparencia que los polímeros tipo poliestireno por una parte, y en su carácter hidrofílico por otra, pues en este caso al emplear un reactivo, como es la morina, con un gran número de grupos hidroxilo se favorece la fijación, tanto por cambio iónico como por adsorción.

El Sephadex es un gel formado por cadenas dextrano entrecruzadas mediante epíclorhidrina. Su estructura se muestra en la figura I.1. El gran número de grupos hidroxilo que posee la estructura favorece su carácter hidrofílico. Consecuentemente se hincha con facilidad en agua y en disoluciones de electrolitos.

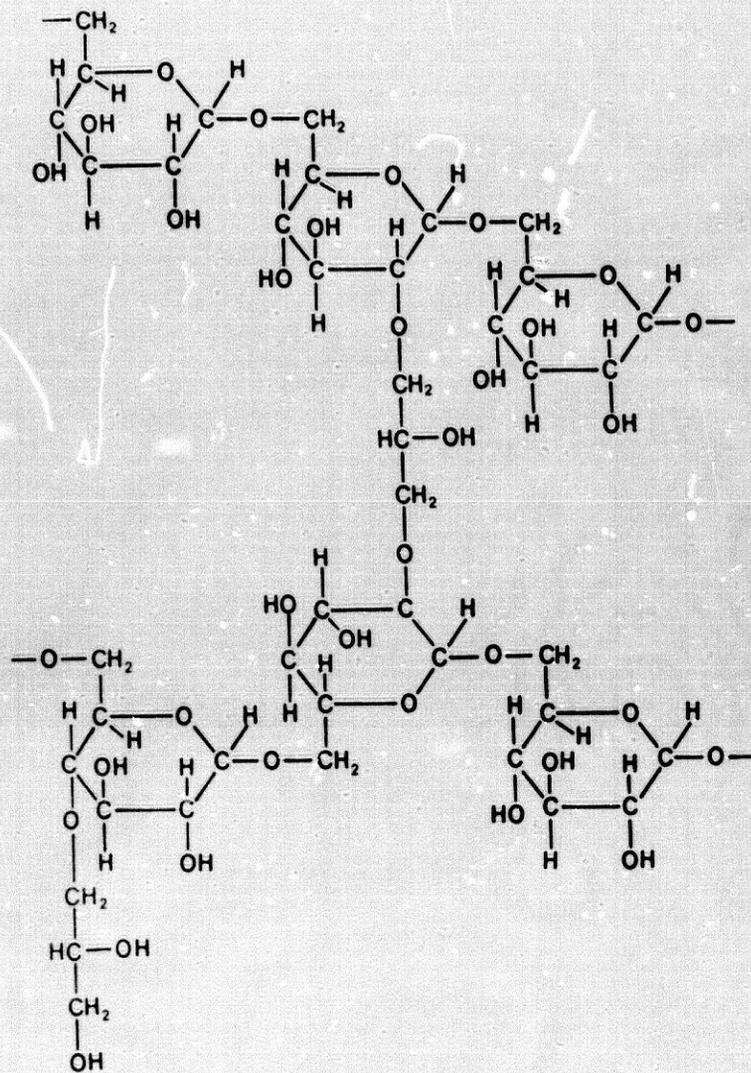


Figura I.1. Estructura parcial del Sephadex

Un cambiador de iones puede ser definido como una sustancia natural o sintética portadora de grupos iónicos fijos y capaz de intercambiar contraiones ligados a ella por cantidades equivalentes de otros iones de la disolución en la que está inmerso.

Estructuralmente un cambiador de iones consiste en una matriz insoluble que tiene, unidos por enlace covalente, ciertos grupos cargados que están asociados a contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar de forma reversible por otros iones de la misma carga sin alterar la matriz. Esta puede tener carácter orgánico o inorgánico. La naturaleza de la matriz determina sus propiedades físicas tales como su resistencia mecánica, densidad, características ópticas, etc...

En el caso del Sephadex los grupos iónicos están unidos a las unidades de glucosa mediante enlaces éter (-O-) que son muy estables.

En la tabla I.1 se resumen las principales propiedades en los cambiadores de iones SEPHADEX existentes en el mercado. Para su nomenclatura, según puede observarse, se emplean las iniciales del correspondiente grupo funcional responsable del carácter cambiador (DEAE, QAE, CM y SP) seguido de la letra A o C, según se trate de una resina aniónica o catiónica, y de un número que indica su porosidad (25 ó 50).

Todos estos geles se encuentran disponibles en dos grados de porosidad diferente que responden a la denominación 25 y 50 respectivamente. En las experiencias realizadas sólo se han empleado los de menor porosidad (25), pues los de mayor porosidad sufren mayor hinchamiento, presentando en consecuencia dificultades de empaquetamiento en la cubeta de medida utilizada.

La capacidad de estas resinas, que determina su actuación como cambiador iónico, depende de la porosidad, fuerza iónica y pH. Un incremento de la fuerza iónica disminuye la intensidad de las interacciones de los iones por competencia entre los iones por las posiciones de enlace. El conocimiento de este fenómeno es importante en los estudios de regeneración de la resina.

Tabla I.1. Cambiadores iónicos Sephadex

Tipo	Descripción	G. funcionales	contraión	Capacidad (neq/g)
DEAE-A,25	Cambiador aniónico débil	$ \begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{H} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array} $ dietilaminoetil	Cl ⁻ cloruro	3,5±0,5
QAE-A,25	Cambiador aniónico fuerte	$ \begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array} $ dietil-(2-hidroxi-propil) aminoetil	Cl ⁻ cloruro	3,0±0,4
CM-C,25	Cambiador catiónico débil	$ \begin{array}{c} \text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^- \\ \text{carboximetil} \end{array} $	Na ⁺ sodio	4,5±0,5
SP-C,25	Cambiador catiónico fuerte	$ \begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^- \\ \text{propilsulfónico} \end{array} $	Na ⁺ sodio	2,3±0,3

I.1.2. Elección del soporte para la fijación de los complejos Be(II)-morina y Al(III)-morina

Para la elección del soporte donde fijar los complejos morina-Be(II) y morina -Al(III) objeto de nuestro análisis, hemos llevado a cabo un estudio cualitativo en las siguientes condiciones.

Se prepararon tres matraces de 100 mL, uno de los cuales contenía 5 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 15 mL de disolución etanólica de morina de 0.02%, otro 5 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y 15 mL de disolución etanólica de morina de 0.02%, y un blanco que sólo contiene reactivo, enrasándose los tres matraces a continuación con agua bidestilada.

Posteriormente, en varios tubos de ensayo de cuarzo de 10 mL, se introdujeron en unos 5 mL de la disolución del complejo morina-Be(II), y en otros 5 mL de la disolución del complejo morina-Al(III), se ajusta el pH deseado mediante la adición de unas gotas de AcH, ClH ó NaOH y se añadieron unos 50 mg de cada soporte a ensayar. A continuación se sometió a cada sistema a una agitación manual que, por conveniencia, se fijó en 2 minutos. Tras decantar durante unos 5 minutos, seguidamente se observó bajo iluminación ultravioleta la fluorescencia emitida comparandose con 5 mL de la disolución de morina tratada de la misma forma.

En la tabla I.2, se resumen las observaciones del estudio cualitativo realizado. En cada caso se compara el problema con un blanco de morina.

Tabla 1.2. Estudio cualitativo de fijación del complejo Be(II)-morina y Al(III)-morina

Soporte	Sistema	intervalo de pH				
		1-3	3-5	5-7	7-10	10-13
Sephadex DEAE A-25	Be(II)-morina	N.F.	N.F.	N.F.	F.	F.
	Al(III)-morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.
	morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.
Sephadex QAE A-25	Be(II)-morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	F.
	Al(III)-morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.
	morina	N.F.	N.F.	N.F.	F.	F.
Sephadex SP C-25	Be(II)-morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.
	Al(III)-morina	N.F.	F.	F.	N.F.	N.F.
	morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.
Sephadex CM C-25	Be(II)-morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.
	Al(III)-morina	N.F.	F.	F.	N.F.	N.F.
	morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.
Sephadex G-15	Be(II)-morina	N.F.	N.F.	F.	F.	F.
	Al(III)-morina	N.F.	F.	F.	N.F.	N.F.
	morina	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.	N.F.

N.F. : No muestra fluorescencia
F. : Muestra fluorescencia

De la anterior tabla puede concluirse:

1) A pH fuertemente ácido (1-3) y como es de esperar de acuerdo con lo que ocurre en disolución, no se observa fluorescencia de los complejos fijados en ninguno de los soportes ensayados.

A pH debilmente ácido (3-5) sólo muestra fluorescencia amarillo-verdosa el complejo Al(III)-morina en los cambiadores catiónicos Sephadex SP C-25, CM C-25 y en el soporte G-15, haciendonos pensar que posee naturaleza catiónica.

A pH próximo a la neutralidad (5-7) muestra fluorescencia el complejo Al(III)-morina en los cambiadores catiónicos y además el complejo Be(II)-morina en Sephadex G-15.

En medio debilmente básico (7-10), se observa fluorescencia del complejo Be(II)-morina en los soportes Sephadex DEAE A-25 y G-15.

En medio fuertemente alcalino (10-13) muestra fluorescencia el complejo Be(II)-morina en los cambiadores aniónicos DEAE A-25 y QAE A-25 y en el soporte G-15, haciendonos pensar que posee naturaleza aniónica. La morina presenta también fluorescencia en el cambiador aniónico QAE A-25 presentando un color más amarillento y menos intenso que el complejo con berilio.

2) El complejo Be(II)-morina muestra máxima intensidad de fluorescencia cuando se fija sobre el cambiador aniónico Sephadex QAE A-25 en medio fuertemente básico.

3) El complejo Al(III)-morina muestra máxima fluorescencia cuando se fija sobre el cambiador catiónico SP C-25 en medio debilmente ácido.

4) Los complejos Be(II)-morina y Al(III)-morina muestran fluorescencia simultaneamente en el soporte G-15 y a un valor de pH próximo a la neutralidad.

Como consecuencia usaremos Sephadex QAE A-25 para el estudio del complejo Be-morina; Sephadex SP C-25 para el del complejo Al-morina y Sephadex G-15 para el estudio simultáneo de aluminio y berilio.

C A P I T U L O I I

ESTUDIO DE LA GEOMETRIA

DEL SISTEMA DE MEDIDA

II.1. ESTUDIO DE LA GEOMETRIA DEL SISTEMA DE MEDIDA

Como se ha indicado en la introducción, la medida de la intensidad de fluorescencia en un sólido se puede realizar por fluorescencia difusa reflejada o fluorescencia difusa transmitida, según se realice frontal o transversalmente respecto al haz de excitación.

En un espectrofluorímetro comercial el ángulo formado por el haz incidente y la línea imaginaria donde se sitúa el fotomultiplicador es de 90° , por lo que en espectrofluorimetría en disolución la geometría del sistema queda perfectamente definida al situar la cubeta de medida, de 10 mm de espesor, en la intersección de ambas líneas.

Sin embargo, en espectrofluorimetría de cambio iónico, al emplear cubetas de 1 mm de espesor, el plano que contiene a ésta puede adoptar diferentes ángulos con el haz de excitación, por lo que resulta imprescindible como experiencia previa, el estudio de su influencia sobre la intensidad de fluorescencia emitida. Por ello, se estudia en primer lugar la influencia que las diversas posiciones de la cubeta de medida ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del sistema.

Para optimizar el ángulo de medida (θ) se diseñó y construyó el dispositivo que se muestra en la figura II.1. Este dispositivo consiste en un portacubetas solidario con un círculo graduado que permite variar el ángulo que forma el plano de la cubeta con el haz incidente. Este círculo graduado se fija sobre

un soporte removible en el compartimento de cubetas del Espectrofluorímetro LS 5 de Perkin Elmer.

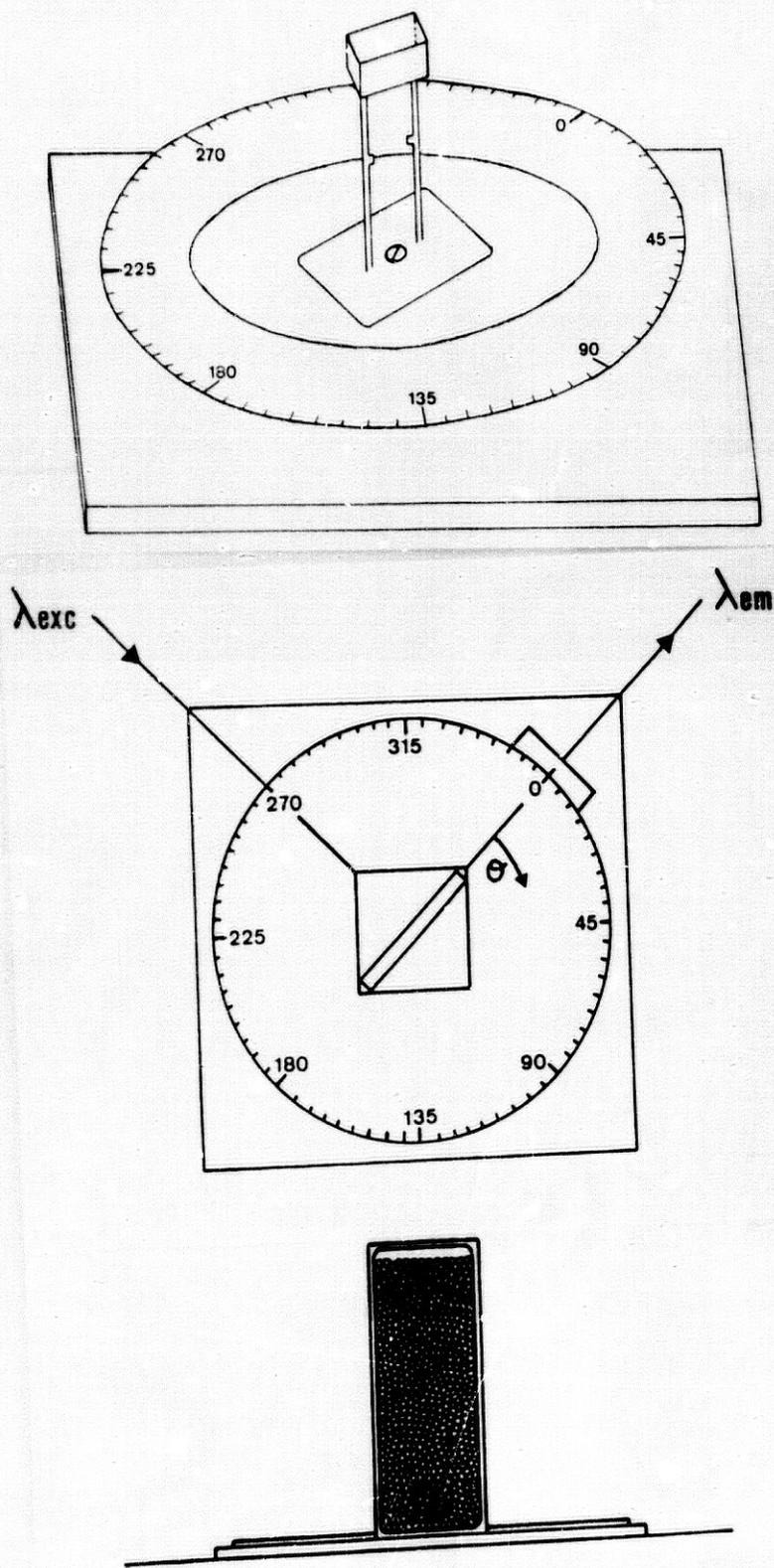


Figura II.1. Dispositivo empleado para el estudio del ángulo

Para llevar a cabo la experiencia se situó el sistema de tal forma que el plano de la cubeta coincidiese con la dirección de la ventana de medida (θ). A continuación se registraron los espectros de emisión incrementando éste ángulo de 5° en 5° en el sentido de las agujas del reloj, hasta realizar un giro completo de 360° .

Como soportes sobre los que fijar una sustancia fluorescente se han seleccionado los siguientes: Sephadex DEAE A-25, Dowex 1X-8 (100-200 malla), Dowex 1X-8 (200-400 malla) y gel de sílice (0,2-0,5mm; 30-70 mesh ASTM). Como patrón de fluorescencia se emplea fluoresceína.

La muestra se preparó en todos los casos añadiendo a 2 ml de disolución de fluoresceína de 1 mg.L^{-1} , 10 ml de tampón Tris (1 M) de pH = 5.80 y enrasando con agua bidestilada hasta 500 ml. A continuación se transfirió la disolución a los correspondientes frascos de polietileno y se añadió 500 mg de cada uno de los soportes indicados en cada caso.

Para optimizar las longitudes de onda de excitación y emisión de cada una de las muestras se ha realizado un "pre-scan" secuencial de excitación y emisión, obteniéndose valores para la longitud de onda de excitación y emisión hasta conseguir una pareja de valores que se repitiera un número de veces representativo.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia en cada caso fueron: Sephadex DEAE, $\lambda_{exc} = 484 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$, factor de sensibilidad 1; Dowex 1X-8 (100-200 malla), $\lambda_{exc} = 489 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 523 \text{ nm}$, factor de sensibilidad 0,4; Dowex 1X-8 (200-400 malla), $\lambda_{exc} = 489 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 523 \text{ nm}$, factor de sensibilidad 0,4; Gel de sílice, $\lambda_{exc} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 509 \text{ nm}$, factor de sensibilidad 10. Se midieron todos a una rendija de excitación y de emisión de 2.5 nm y temperatura de 20°C .

Los resultados obtenidos se indican en la tabla II.1 y se representan en las figuras II.2, II.3, II.4 y II.5.

Tabla II.1. Influencia del ángulo de incidencia de la radiación.

<i>Soporte</i>	<i>DEAE A-25</i>	<i>Dowex 1X-8 (100-200)</i>	<i>Dowex 1X-8 (200-400)</i>	<i>gel de sílice</i>
<i>Angulo (θ)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>
0	1.2	1.3	1.8	2.1
5	2.3	2.0	2.8	3.0
10	10.8	8.3	11.7	19.4
15	18.5	15.9	22.9	51.1
20	24.1	21.6	31.4	71.1
25	30.3	27.0	40.4	102.1
30	37.1	33.1	50.0	139.1
35	41.5	35.5	54.9	151.0
40	44.5	36.2	56.8	168.3
45	46.1	36.8	57.0	195.0
50	46.1	35.2	55.4	183.4
55	42.8	33.1	52.6	162.3
60	40.8	34.6	49.1	158.4
65	34.4	32.4	46.0	106.5
70	33.1	29.0	45.3	83.2
75	31.7	25.9	37.8	49.8
80	10.1	9.4	13.7	35.2
85	6.2	4.9	7.8	8.5
90	0.8	0.7	1.0	0.8
95	2.1	1.7	2.8	1.8
100	6.5	5.3	8.4	10.8
105	17.7	14.1	20.2	22.8
110	28.7	26.3	39.1	36.4
115	30.0	31.5	48.0	46.0
120	58.8	45.1	85.9	73.8
125	57.7	91.7	140.7	138.0
130	89.5	145.1	204.8	195.5

<i>Soparte</i>	<i>DEAE A-25</i>	<i>Dowex 1X-8 (100-200)</i>	<i>Dowex 1X-8 (200-400)</i>	<i>gel de silice</i>
<i>Angulo (θ)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>
135	115.2	203.5	229.6	196.2
140	106.1	200.8	213.1	175.1
145	79.8	155.4	169.7	123.9
150	58.0	109.7	122.4	91.6
155	44.6	76.9	100.1	76.8
160	29.4	44.2	62.6	51.3
165	15.5	23.6	33.1	23.0
170	8.6	11.0	17.0	9.6
175	4.2	4.4	6.4	4.6
180	1.7	1.7	2.3	2.5
185	2.5	2.3	3.6	3.4
190	7.5	6.7	10.8	13.4
195	16.9	14.7	21.1	36.7
200	26.8	22.3	31.0	85.0
205	34.3	29.5	42.0	118.9
210	41.7	33.6	50.4	150.0
215	43.4	38.5	55.7	173.9
220	44.3	36.1	57.0	193.5
225	46.4	36.9	58.1	195.6
230	46.1	36.1	56.2	185.1
235	46.6	37.3	53.9	189.6
240	40.8	32.6	43.7	122.0
245	27.8	22.1	31.9	86.5
250	29.1	18.4	23.7	66.3
255	15.1	12.7	18.0	33.6
260	9.8	5.9	9.2	10.5
265	3.5	3.7	4.8	5.8
270	0.7	0.8	1.0	1.2
275	1.6	1.7	2.2	3.4

Soporte	DEAE A-25	Dowex 1X-8 (100-200)	Dowex 1X-8 (200-400)	gel de sílice
Angulo (θ)	IFR (%)	IFR (%)	IFR (%)	IFR (%)
280	3.5	3.7	4.6	8.3
285	8.5	8.5	12.0	16.1
290	20.8	19.9	27.7	31.0
295	32.9	40.3	58.5	45.7
300	48.9	65.7	78.4	87.9
305	60.4	95.0	122.8	103.5
310	97.3	174.3	200.4	153.7
315	115.5	203.0	228.9	195.7
320	85.9	192.0	182.0	155.2
325	56.8	139.8	128.9	82.9
330	40.6	105.8	84.4	47.5
335	29.0	65.5	63.2	30.3
340	22.3	45.0	44.9	19.9
345	15.1	15.5	22.3	14.6
350	10.2	10.0	14.1	7.8
355	5.0	4.5	7.1	5.5
360	1.2	1.2	1.8	1.3

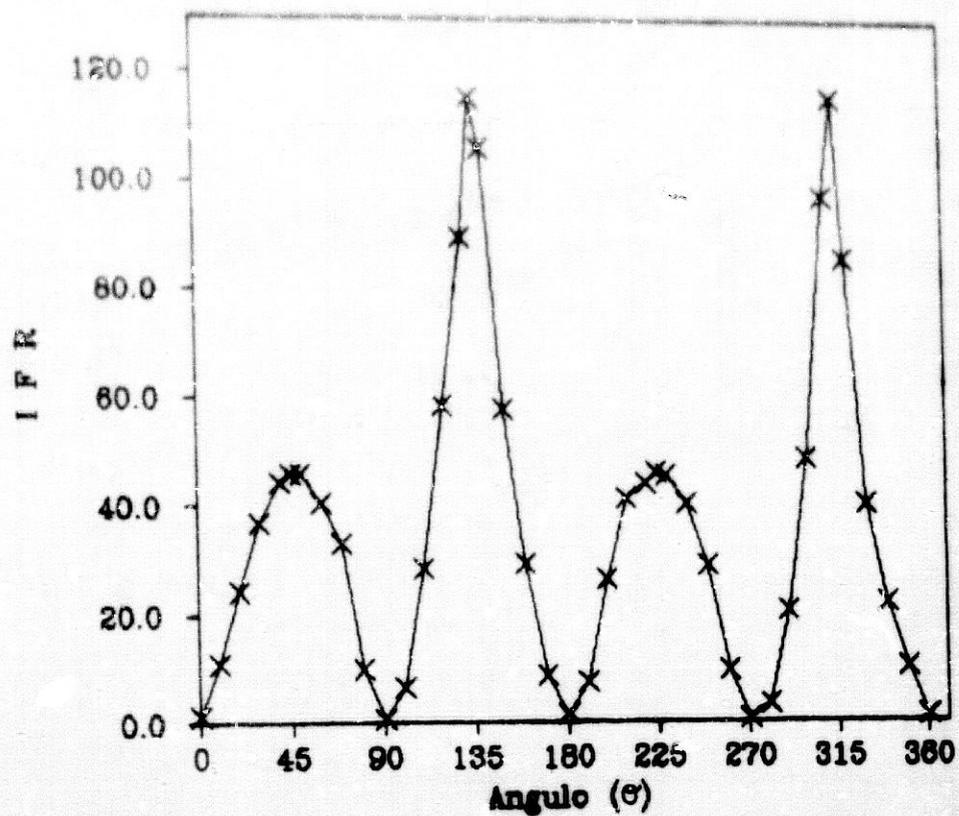


Figura II.2. Influencia del ángulo. Fluoresceína-Sephadex DEAE A-25

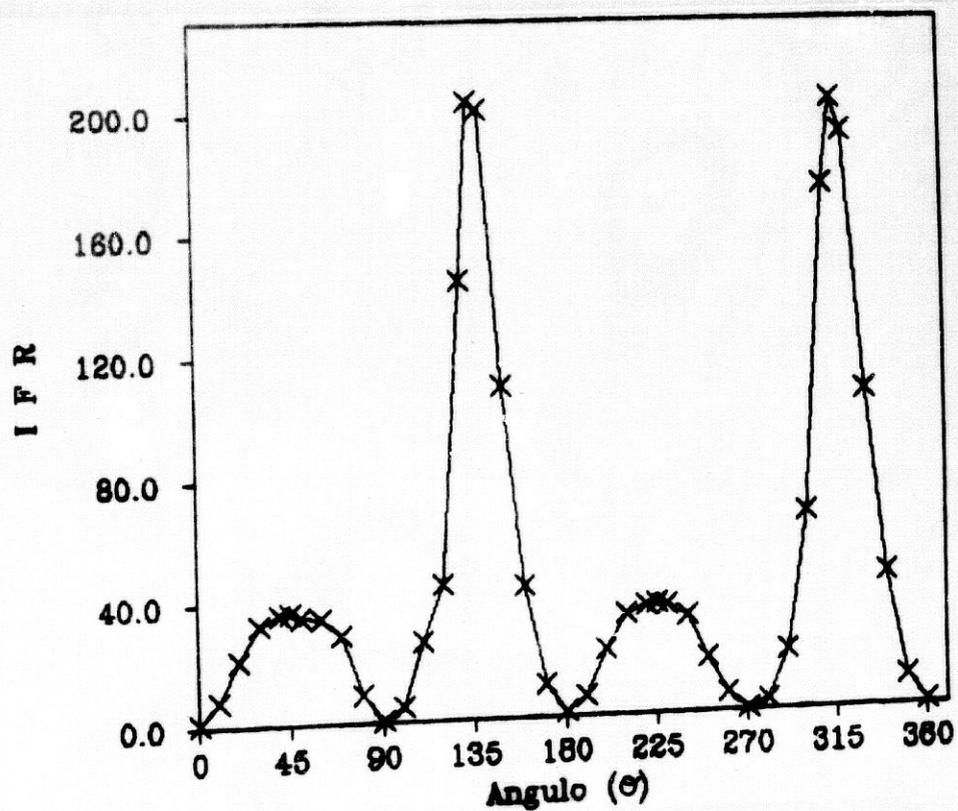


Figura II.3. Influencia del ángulo. Fluoresceína-Dowex 1X-8 (100-200 malla)

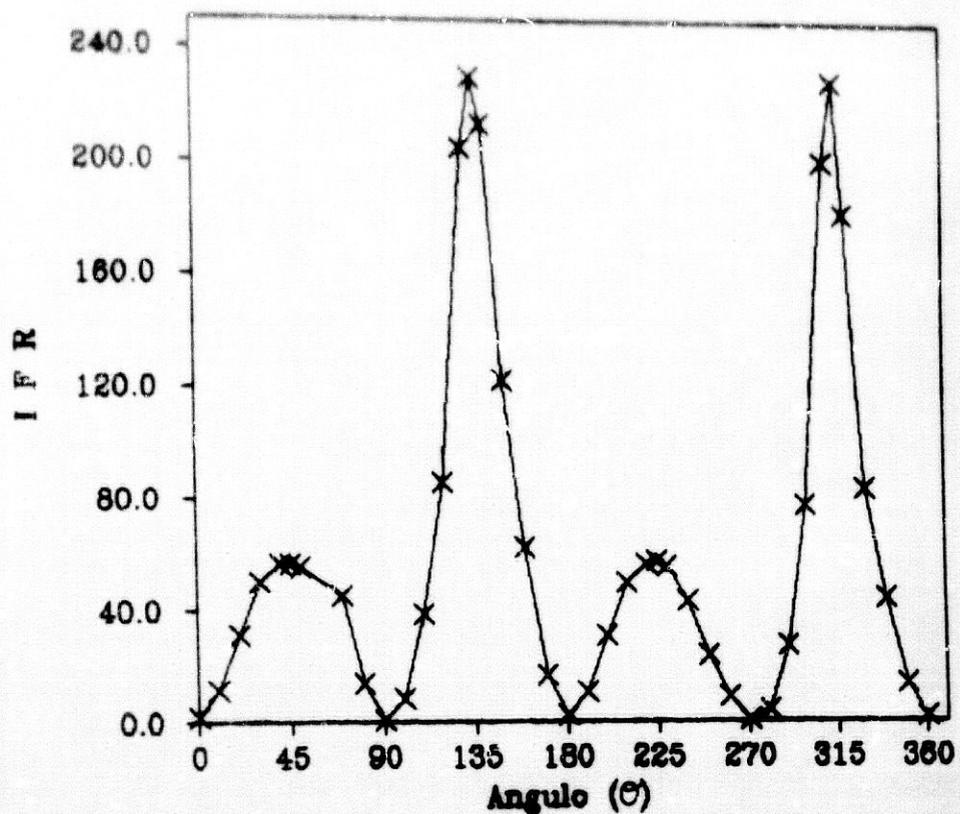


Figura II.4. Influencia del ángulo. Fluoresceína-Dowex 1X-8 (200-400 malla)

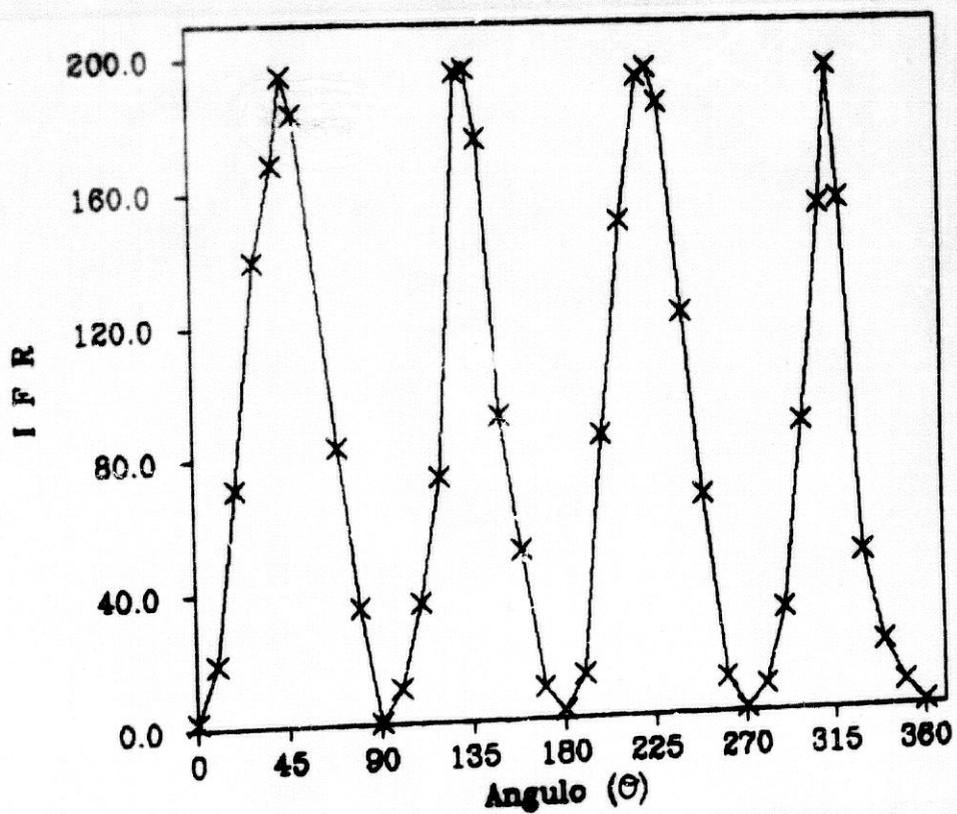


Figura II.5. Influencia del ángulo. Fluoresceína-Gel de sílice

La observación de las anteriores figuras II.2, II.3, II.4 y II.5, nos permite comprobar:

- 1) La existencia de cuatro posiciones de la cubeta perfectamente definidas correspondientes a $\theta_1 = 45^\circ$; $\theta_2 = 135^\circ$; $\theta_3 = 225^\circ$ y $\theta_4 = 315^\circ$, donde la intensidad de emisión es máxima.
- 2) Los valores de la intensidad de fluorescencia de los máximos son iguales dos a dos en el caso de los soportes Sephadex DEAE A-25 y Dowex 1X-8, coincidiendo las medidas más altas con las posiciones $\theta_2 = 135^\circ$ y $\theta_4 = 315^\circ$ en las que la cubeta recibe el haz de excitación por una cara y se efectúa la medida de luminiscencia por la otra (luminiscencia difusa transmitida).
- 3) Cuando la excitación y medida de la fluorescencia se realiza en la misma cara de la cubeta que contiene el fluorógeno sobre Sephadex ó Dowex 1X-8, lo que ocurre para $\theta_1 = 45^\circ$ y $\theta_3 = 225^\circ$, se observa asimismo dos máximos de menor intensidad (luminiscencia difusa reflejada).
- 4) Cuando el soporte empleado es el gel de sílice, la intensidad de fluorescencia es máxima y del mismo valor para las cuatro posiciones indicadas, lo que podría estar relacionado con la menor transparencia de este soporte respecto a los anteriores.
- 5) Los valores con intensidad mínima coincide con $\theta = 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, 270^\circ$ y 360° .

En la tabla II.2, se muestra la relación entre las señales de fluorescencia para las cuatro posiciones de la cubeta en las que aquella es máxima, en los cuatro soportes estudiados.

Tabla II.2

soporte	IFR_{135} / IFR_{45}	IFR_{45} / IFR_{225}	IFR_{135} / IFR_{215}
DEAE	2.50	1.00	1.00
Dowex 1X-8 (100-200)	5.53	1.00	1.00
Dowex 1X-8 (200-400)	4.02	0.98	1.00
Gel de Sílice	1.00	1.00	1.00

Se concluye por una parte, que es ventajoso el empleo de polímeros orgánicos sobre silicagel y, por otra, que es conveniente realizar la medida de fluorescencia difusa transmitida.

Por último, dado que el soporte empleado puede influir en la geometría óptima del sistema será conveniente, para cada sistema, realizar un estudio previo de la posición de la cubeta de medida.

C A P I T U L O I I I

ESTUDIO DE LA FIJACION DE LA MORINA
SOBRE SOPORTES SOLIDOS.
CARACTERISTICAS ESPECTROFLUORIMETRICAS

III.1. INTRODUCCION

Previamente al estudio de la fijación sobre soportes sólidos de complejos fluorescentes de la morina con iones metálicos, es necesario conocer el comportamiento de este reactivo frente a esos mismos soportes.

Por ello, este capítulo de la presente Memoria de Doctorado, se dedica al estudio de la fijación de morina en un adsorbente y en dos cambiadores de iones, catiónico y aniónico respectivamente, seleccionados en el estudio cualitativo previo.

Tras ello se establecen las características luminiscentes de esta hidroxiflavona fijada sobre un soporte sólido y, por último, la influencia de diversos factores (pH, concentración de morina, tiempo) sobre esta emisión luminiscente.

Estos datos nos permitirán conocer el comportamiento del reactivo, lo cual es necesario para abordar en los siguientes capítulos los objetivos específicos de esta Memoria de Doctorado.

III. 2. EXPERIMENTAL

Reactivos

- Resina de cambio catiónico Sephadex SP C-25, en ciclo sodio.

- Resina de cambio aniónico Sephadex QAE A-25, en ciclo cloruro.

- Polímero Sephadex G-15.

De forma general todas las resinas se han utilizado sin tratamiento previo, ya que se observó que el proceso de acondicionamiento con NaCl, HCl u otros y posterior lavado con agua bidestilada, originaba una contaminación que se traducía en un incremento en la señal fluorescente de los blancos al ser tratados con morina.

- Disolución de morina (2',3,4',5,7-pentahidroxi-flavona) en etanol del 99.5%.

La morina empleada en este estudio se purificó basándose en el tratamiento, modificado por nosotros, de *Berkley y Smith* (156). Según este procedimiento se disuelve la morina en etanol y se mantiene la disolución durante un tiempo en carbón activo y tras filtrar se reprecipita la morina por adición de éter. Sin embargo, nosotros hemos precipitado la morina con agua

bidestilada fría, tal y como lo hacen *Laitinen y Kivalo* (157), ya que al añadir éter no se observó precipitado alguno.

El tratamiento seguido por nosotros en la purificación de la morina empleada, calidad reactivo análisis, consiste en disolver 5 g de la misma en el mínimo volumen de etanol del 99,5% necesario para su solubilización (unos 30 mL). A continuación se le añadió 0.5 g aproximadamente de carbón activo y se mantuvo a una temperatura de 5°C durante 24 horas. Se filtró la disolución a través de una membrana de papel de filtro (Millipore) de 0.45 μm de poro, y se añade lentamente al filtrado un volumen de agua bidestilada fría del mismo orden que la disolución de morina, con lo que precipita el reactivo. Se mantiene a una temperatura de 5°C durante 24 horas y a continuación se filtra el precipitado de morina a través de una membrana de Millipore de 0.45 μm . Se repite la operación, disolviendo nuevamente la morina en etanol y reprecipitándola por adición de agua bidestilada fría. Se filtra nuevamente y se mantiene en un desecador a vacío hasta pesada constante. El rendimiento de la operación es de 4.1 g de un polvo amarillo cuyo punto de fusión es de 290°, valor que está de acuerdo con el aportado por la bibliografía (157).

Las disoluciones de morina aquí empleadas se prepararon a partir de 0.02 g de esta morina purificada por disolución en etanol del 99.5%. Se comprobó que es necesario prepararla semanalmente, debido a la pérdida de intensidad de fluorescencia que presentaban las muestras que contenían disolución de morina de más tiempo. Se prepararon diariamente las correspondientes diluciones en etanol del 99.5%, debido a la escasa estabilidad del reactivo.

- Disoluciones reguladoras de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de diversos valores de pH, preparadas a partir de una disolución de Na_3PO_4 0.4 M (76.024 g en 500 mL de agua bidestilada) y la cantidad de H_3PO_4 concentrado necesaria para la obtención del pH deseado.

- Disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de diversos valores de pH, preparadas a partir de una disolución de CH_3COONa 0.1M (6.804 g en 500 mL de agua bidestilada) y la cantidad de CH_3COOH necesaria para la obtención del pH deseado.

Todos los reactivos empleados en este estudio han sido de calidad reactivo análisis en unos casos y suprapuros cuando fué necesario.

Aparatos utilizados

- Las medidas fluorimétricas se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia LS-5 de la casa Perkin Elmer, equipado con una lámpara de xenon pulsante de 9.9 W, monocromadores F/3 Monk-Gillieron, contador cuántico de Rodamina 101 para corregir el espectro de excitación, un fotomultiplicador Hamamatsu R-928, un registrador X-Y Houston mod. Omnigraphic y un termostato-criostato Braun-Melgusen Frigomix U.

Para comparar todas las medidas de fluorescencia y asegurar la reproducibilidad en las condiciones experimentales, el fluorímetro LS 5 se comprobó diariamente. Para ello se empleó un patrón de polímero fluorescente de p-terfenilo (10^{-7} M) que muestra una intensidad de fluorescencia relativa de 98 % a $\lambda_{em} = 340$ nm, $\lambda_{exc} = 295$ nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm y factor de sensibilidad 0.594.

- pH-metro digital CRISON mod. 501, provisto de un electrodo INGOLD combinado de vidrio y calomelanos saturado.

- Agitador rotatorio de botellas AGITASER mod. 2000.

- Placa agitadora-calefactora HEIDOLPH mod. 2002.

- Cubetas de cuarzo THERMAL SYNDICATE de 1 mm de paso óptico.

- Embudos filtrantes de diseño propio provistos de placa de vidrio sinterizado nº 3, de diseño propio, para la recogida de la resina.

- Espectrofotómetro BAUSCH & LOMB mod. Spectronic 2000, provisto de registrador X-Y HOUSTON mod. 33-35-08.

- Ordenador personal IBM PC XT-286 microcomputer de 512 KB de memoria RAM provisto de disco duro de 20 MBytes, unidad de disco flexible de 5 1/4 pulgadas, tarjeta gráfica Hércules y CGA, impresora Olivetti DM 100, interface RS232C para establecer la comunicación con el espectrofluorímetro y un programa FLUOPACK 1.00.

La recogida y tratamiento de datos se ha realizado mediante un paquete de programas FLUOPACK 2.00 diseñado por F. García Sanchez y V. Cerdá (158), para el modelo de espectrofluorímetro empleado por nosotros. La representación gráfica se ha llevado a cabo con el programa GOLDEN SOFTWARE 3.00 (1986), previamente adaptado y modificado por nosotros.

III.3. CARACTERISTICAS ESPECTRALES

III.3.1. Espectros de fluorescencia total de la morina fijada sobre Sephadex QAE A-25

La disponibilidad de dos monocromadores en los espectrofluorímetros, permite registrar dos tipos de espectros. Haciendo variar la longitud de onda de excitación (por la variación de la posición del correspondiente monocromador), a una longitud de onda de emisión fija, obtenemos el espectro de excitación, mientras que al variar la longitud de onda de emisión (moviendo el monocromador de emisión), a una longitud de excitación fija, obtenemos el espectro de emisión.

Así, los espectros de emisión y excitación convencionales, no son descripciones completas de las características fluorescentes de un determinado compuesto, pues para cada longitud de onda de excitación habría un espectro de emisión diferente. Una descripción completa requiere un espectro tridimensional en el cual uno de los ejes es la escala de la longitud de onda de excitación; un segundo eje, representa la longitud de onda de emisión, y el tercer eje es el eje de intensidades. Tales espectros son conocidos como matriz de excitación-emisión o espectros de luminiscencia total.

Este espectro es una proyección que contiene N espectros individuales superpuestos. En nuestro caso la obtención

de los mismos ha sido posible gracias a la comunicación establecida entre el espectrofluorímetro y un ordenador; a un programa de recogida y tratamiento de datos (FLUOPACK) y a un programa de representación tridimensional (GOLDEN SOFTWARE).

El programa FLUOPACK utilizado (158) tiene, entre otras opciones, la posibilidad de realizar 50 barridos de emisión, cada uno de ellos a una longitud de onda de excitación que se va aumentando en incrementos constantes para cada barrido de emisión, de manera que el intervalo de excitación se divide entre 50. Los espectros son archivados y así posteriormente se pueden realizar operaciones con ellos tales como resta, suma, multiplicación y división de espectros.

La representación de los datos con el "software" original indicado requiere un conjunto "red" de datos regularmente espaciados. En este sentido el Golden contiene una opción denominada GRID que crea una red regularmente espaciada a partir de otra irregularmente espaciada. Esta consiste en una rejilla XY cuya densidad puede establecerse determinando el número de líneas en cada dirección, y en la cual el valor de la coordenada Z se sitúa en los puntos de intersección de las líneas, calculados a partir de los datos reales (irregularmente espaciados) por un proceso de interpolación.

El tiempo de ejecución de esta operación depende del número de datos y de la densidad de la rejilla, pudiendo variar desde pocos minutos a varias horas.

Cuando se trabaja con un número de datos considerable, como los que se obtienen de los espectros tridimensionales, el número de cálculos que el programa debe realizar es muy grande, de tal forma que para una red de tan solo 15 x 12 (que contendría 180 valores obtenidos por interpolación de una cantidad mucho mayor de datos reales (entre 5000 y 10000)) el tiempo de ejecución es de más de 10 horas y al final solo se obtiene una representación que no es más que una aproximación a

los espectros reales, lo que supone serias limitaciones en la aplicación práctica del programa.

El hecho, por otro lado, de que los datos obtenidos de los espectros tridimensionales constituyen un sistema regularmente espaciado, nos hizo pensar en la posibilidad de evitar los cálculos para la obtención del Grid, puesto que estos datos se adquieren de tal forma que a cada punto de intersección de una rejilla de $50 \times A$ (donde A es el barrido de emisión empleado) le corresponde un valor determinado de la intensidad de fluorescencia relativa, limitandose la operación de creación de la rejilla (grid) a una simple "ordenación" de los datos con objeto de darles el formato que la opción Grid emplea en el programa original, para que así puedan ser interpretados correctamente por las opciones de representación que vamos a utilizar. De esta manera no hace falta realizar ningún tipo de interpolación de valores vecinos.

Esto se consiguió con un programa BASIC desarrollado por nuestro Grupo de Investigación.

Con esto se tienen en cuenta la totalidad de los datos recogidos en los espectros y la representación de los mismos es el espectro tridimensional real del sistema, que se obtienen con una mayor resolución que con el programa Grid original.

El espectro tridimensional de la morina se ha establecido solamente en Sephadex QAE A-25 que es, como se ha indicado anteriormente en el estudio cualitativo, el único soporte donde el reactivo se fija presentando máxima intensidad de fluorescencia y a un valor de pH alrededor de 10. Cuando se trata de registrar el espectro tridimensional en otros soportes (Sephadex SP C-25 y G-15) no se pudo establecer debido a la escasa fijación de la morina que tiene lugar.

Para ello, se preparó un matraz aforado que contenía 500 mL de agua bidestilada. Se trasvasó a una botella de polietileno de 1 L y se añadieron 2.5 mL de disolución etanólica de morina $2 \times 10^{-3}\%$, la cantidad de NaOH necesaria para la obtención del pH necesario y 200 mg de resina Sephadex QAE A-25. Se preparó asimismo un blanco que no contenía morina y se sometió al mismo tratamiento.

Después de agitar durante 10 minutos, se filtraron las disoluciones bajo succión a través de un embudo troncocónico filtrante descrito en la figura III.1, provisto de una placa de vidrio sinterizado del nº 3, y conectado al vacío que origina una trompa de agua unida a la tabuladura lateral del kitasatos. A continuación, se recogió la resina con la ayuda de un capilar de vidrio estirado y se empaquetó en la cubeta de medida junto con un pequeño volumen de disolución.

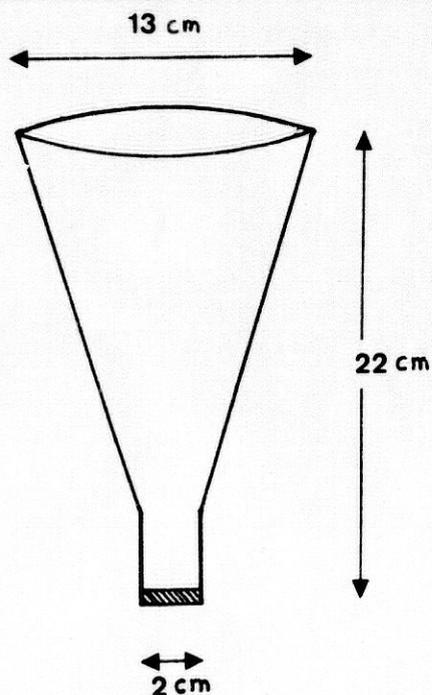


Figura III.1. Embudo filtrante

Se procedió al registro de los espectros en las siguientes condiciones: intervalo de emisión entre 500 y 600 nm; intervalo de excitación: entre 400 y 500 nm variando de 2 en 2 nm para cada barrido de emisión (pues el programa Fluopack realiza 50 barridos); rendijas de excitación y emisión 2.5 nm y factor de sensibilidad 0.1. Los espectros obtenidos se representaron haciendo uso del programa Golden antes comentado. Los resultados se muestran en la figura III.2.

Como puede observarse en la figura III.2, debido a los intervalos de longitudes de onda empleados para la excitación y emisión, aparece la línea Rayleigh en aquellos casos en que coinciden ambas longitudes de onda (es decir las posiciones de los monocromadores).

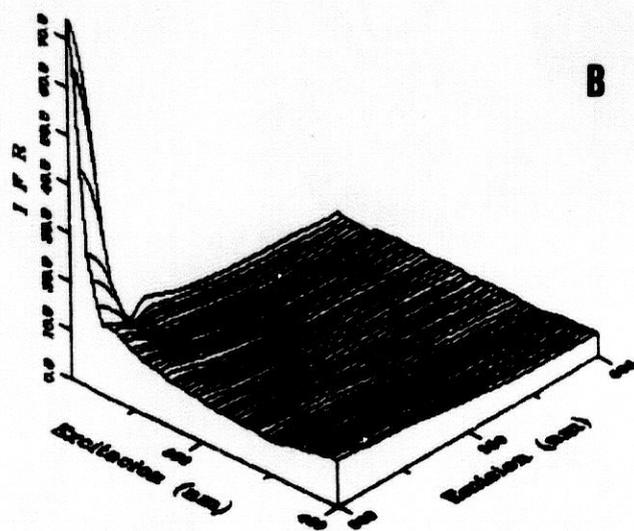
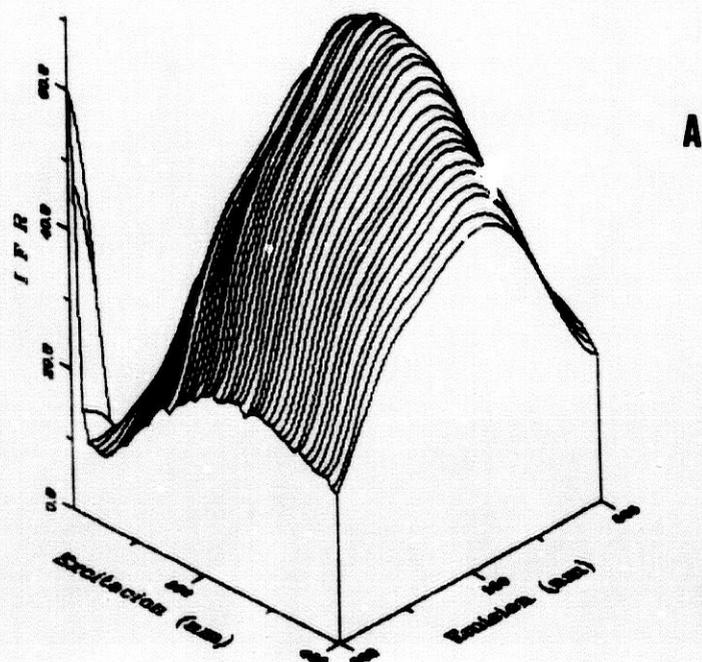


Figura III.2. Espectro tridimensional de la morina fijada en Sephadex QAE A-25 (A) y del blanco (B)

III.3.2. Espectros diferencia

Con objeto de hacer desaparecer la línea Rayleigh de la representación y obtener el espectro de luminiscencia total del sistema, se restó, utilizando la opción correspondiente del programa Fluopack, el espectro del blanco al del sistema y el espectro resultante se representa en la figura III.3.

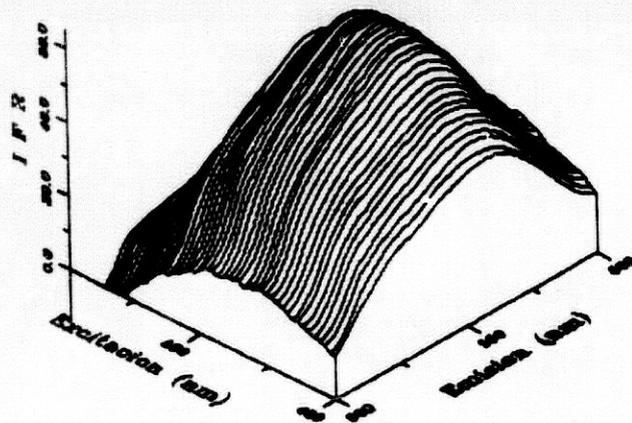


Figura III.3. Espectro de luminiscencia total del sistema morina-QAE

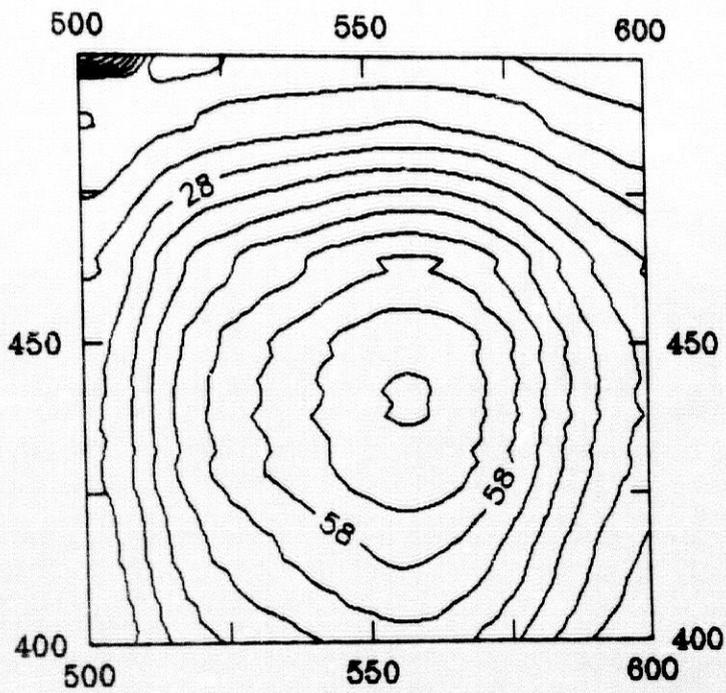
III.3.3. Curvas de nivel

Un segundo método para representar los espectros de luminiscencia total es en forma de curvas de nivel o topogramas. Esta posibilidad también está contemplada en las opciones del Golden. En la figura III.4, se representan los topogramas del sistema y de su diferencia con el blanco. Como puede observarse los dos ejes normales representan las longitudes de onda de excitación y de emisión mientras que las intensidades se expresan con una serie de curvas de nivel.

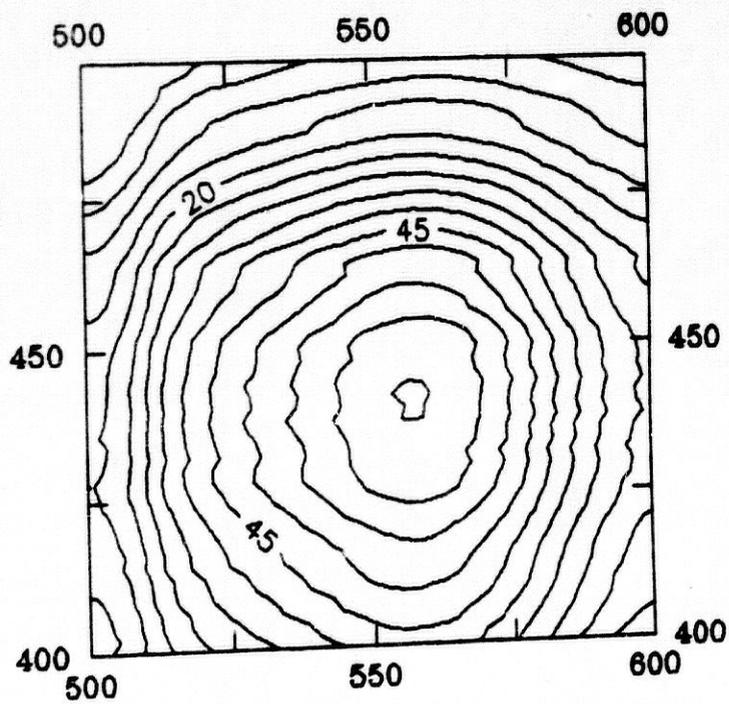
Este sistema presenta ventajas importantes pues permite determinar el máximo del sistema con gran precisión y calcular, como veremos y usaremos posteriormente, el intervalo de longitud de onda óptimo para la obtención de espectros sincrónicos.

El sistema morina-QAE presenta un máximo de emisión a 558 nm y un máximo a una longitud de onda de excitación de 439 nm.

En disolución (159) la morina presenta un máximo de emisión a 545 nm excitando a una longitud de onda de 460 nm, para el mismo valor de pH que éste estudio. Se observa un desplazamiento de la longitud de onda de excitación hacia valores inferiores y del máximo de emisión hacia valores superiores al fijar el reactivo sobre el cambiador catiónico.



A



B

Figura III.4. Topograma del sistema QAE A.25-morina (A) y de la diferencia del sistema con el blanco (B)

III.3.4. Espectros bidimensionales en fase resina

El espectro de luminiscencia total, como se ha indicado anteriormente, nos permite tener una visión global del comportamiento fluorescente del sistema y poder elegir las características espectrales óptimas extrayendo, mediante la opción correspondiente del programa utilizado, los espectros de excitación y emisión más intensos del conjunto. Los espectros obtenidos se representan en la figura III.5 y III.6.

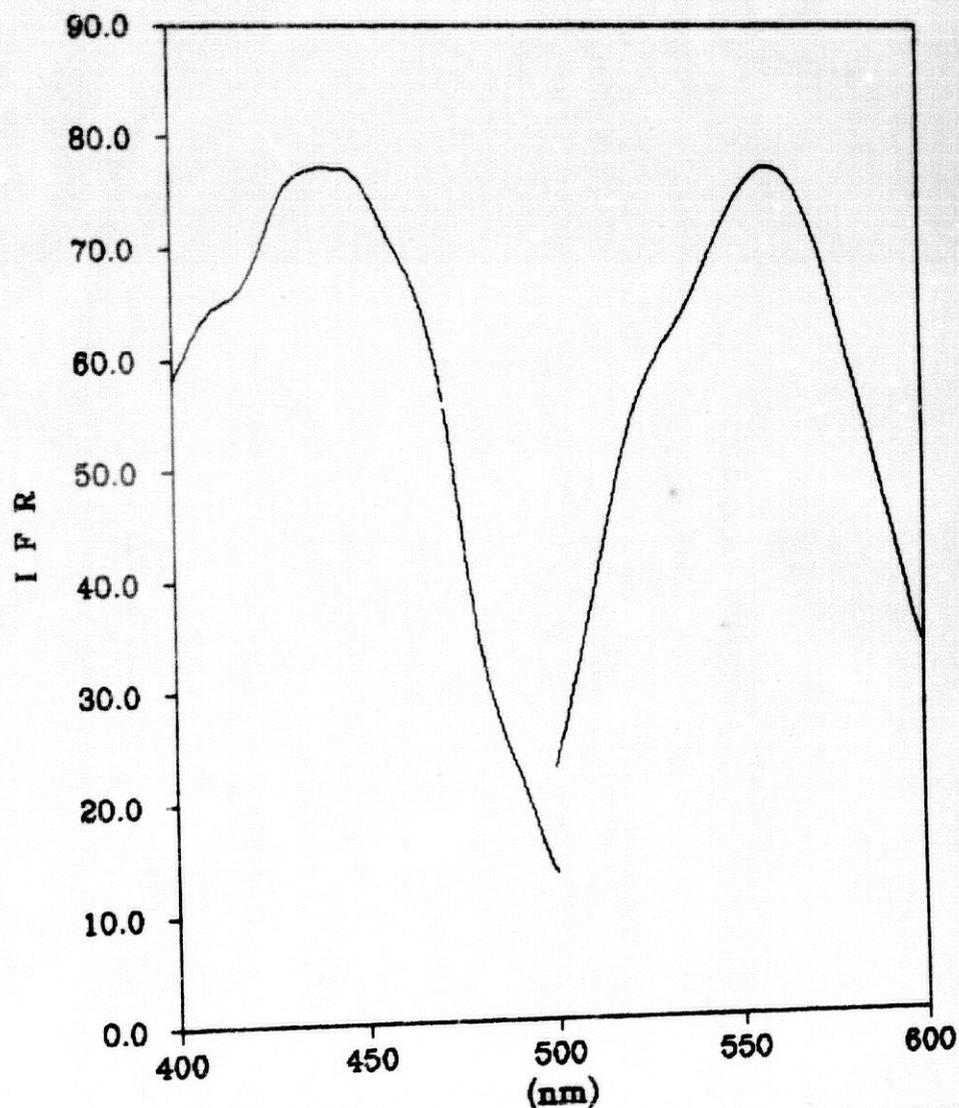


Figura III.5. Espectros de excitación y emisión del sistema QAE-morina

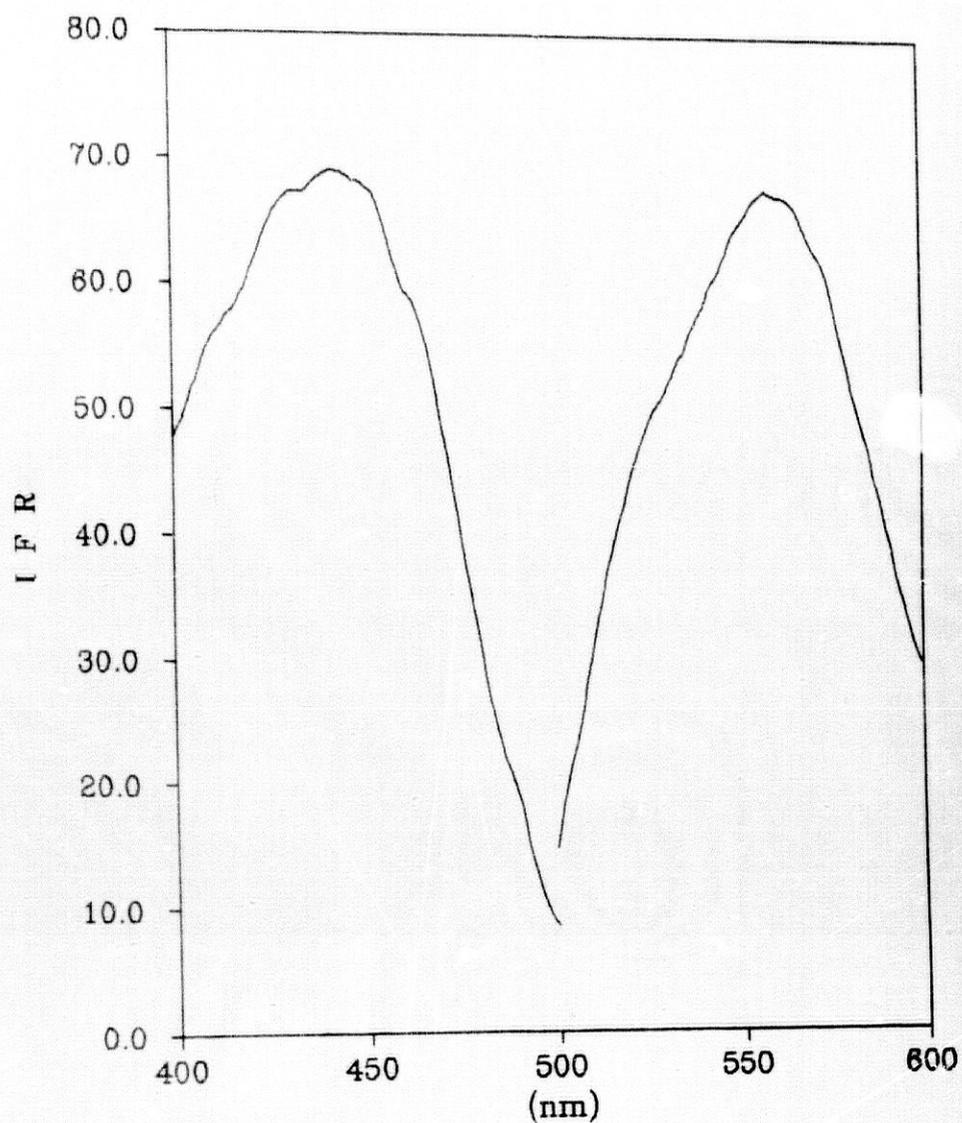


Figura III.6. Espectros diferencia de excitación y emisión del sistema QAE-morina

III.3.5. Espectros bidimensionales en disolución

Con objeto de estudiar las variaciones que en sus características espectrales pueda sufrir el sistema como consecuencia de su fijación en el gel se han obtenido también los espectros de excitación y emisión de la morina en disolución a pH básico y ácido.

Para ello, en un matraz aforado de 50 mL se introdujeron 2 mL de disolución etanólica de morina al 0.02%, la cantidad de NaOH necesaria para la obtención de un pH alrededor de 10 y agua bidestilada hasta enrasar.

Las longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión se han obtenido realizando un "pre-scan" secuencial de excitación y emisión, lo que nos permite conocer las longitudes de onda de dichos máximos. Se obtuvieron valores para la longitud de onda de excitación y emisión hasta conseguir una pareja de valores que se repitiera un número de veces representativo.

Las condiciones operatorias para el registro de los espectros fueron: $\lambda_{exc} = 472 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 547 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm y factor de sensibilidad 0.9.

Asimismo, a un matraz aforado de 50 mL se adicionaron 5 mL de disolución etanólica de morina al 0.02%, la cantidad de ácido acético necesario para la obtención de un pH alrededor de 5.00 y agua bidestilada hasta enrasar.

Las condiciones operatorias para el registro de los espectros fueron: $\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 531 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm y factor de sensibilidad 0.9.

Las figuras III.7 y III.8 muestran los espectros obtenidos. De su observación puede deducirse que el espectro de excitación de la morina en medio básico presenta un máximo a la longitud de onda de 472 nm, mientras que el de emisión tiene un máximo a una longitud de onda de 547 nm, por lo que representa un desplazamiento Stokes de 133333.4 cm^{-1} . El espectro de excitación de la morina en medio ácido presenta un máximo a la longitud de onda de 455 nm, mientras que el de emisión tiene un máximo a una longitud de onda de 531 nm, por lo que representa un desplazamiento Stokes de 131578.9 cm^{-1} .

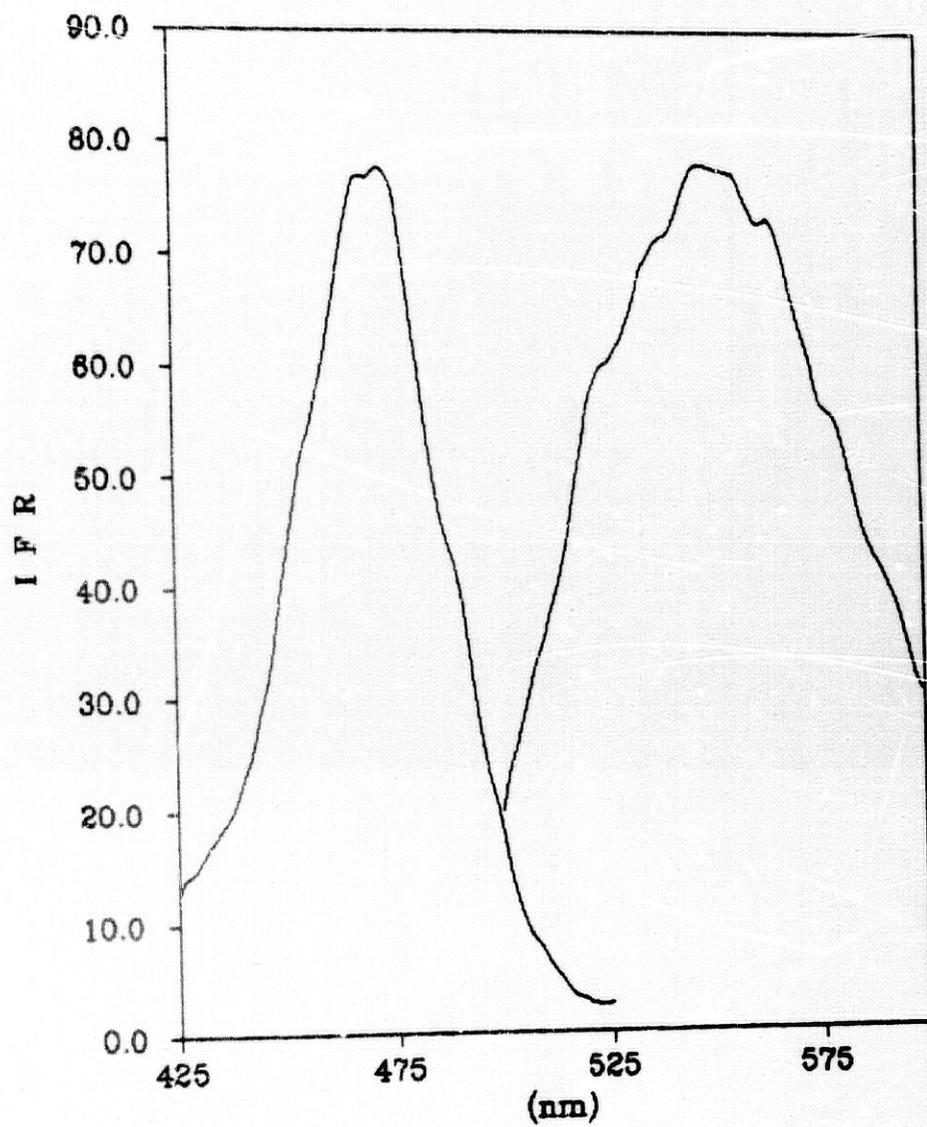


Figura III.7. Espectros de excitación y emisión de la morina en disolución y en medio básico

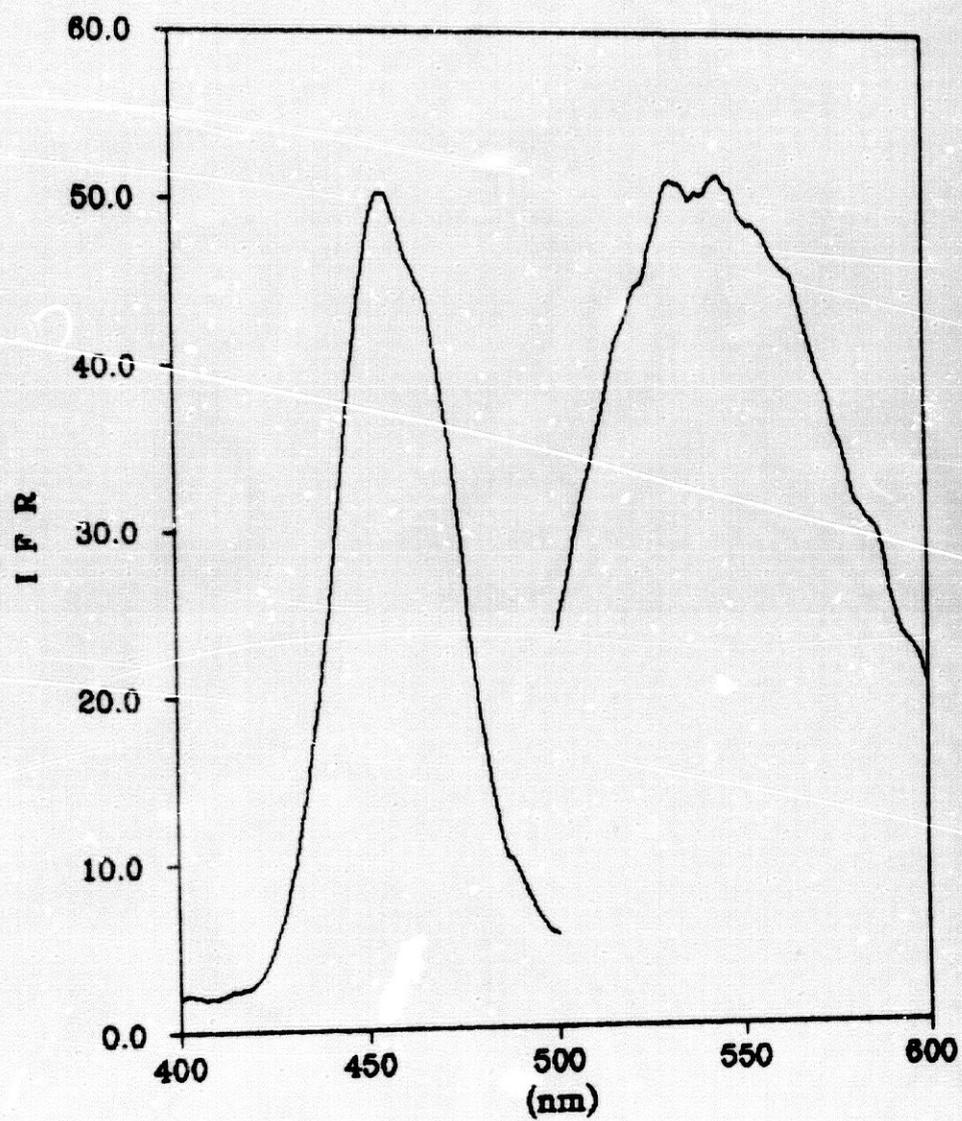


Figura III.8. Espectros de excitación y emisión de la morina en disolución y en medio ácido

III.3.6. Espectros uv-vis

Se registran los espectros uv-vis de la morina en fase sólida y se establecen sus diferencias con respecto a disolución.

III.3.6.1. Espectros uv-vis en disolución

Se han establecido los espectros uv-vis de la morina en disolución tanto a pH básico (11.00) como ácido (5.00). Para ello, se toman un matraz de 50 mL y se añade una concentración de morina (superior a la que se emplea en fase sólida) de 2 mL de disolución etanólica al 0.02% y la cantidad de NaOH necesaria hasta obtener un pH = 11.00 y en otro matraz de 50 mL se añaden 5 mL de disolución etanólica de morina 0.02%, la cantidad de ácido acético necesario para la obtención de un pH = 5.00. Se registran los espectros que se representan en la figura III.9.

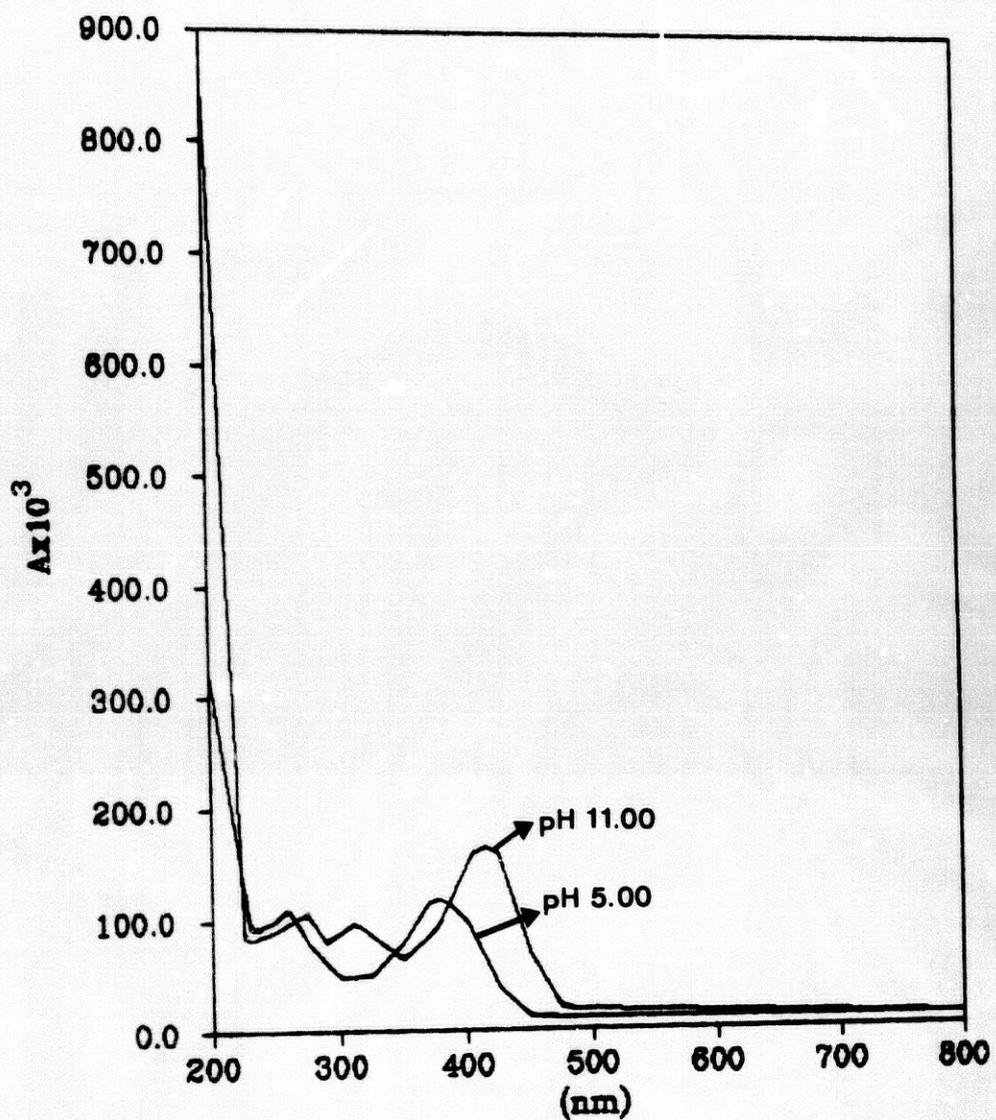


Figura III.9. Espectros uv-vis de la morina en disolución

III.3.6.2. Espectros uv-vis en fase sólida

Se han registrado el espectro uv-vis de la morina en medio básico fijada sobre Sephadex QAE 4-25.

Para ello, 500 mL de agua bidestilada se transvasan a una botella de polietileno y se añaden 10 mL de disolución etanólica de morina 0.02%, la cantidad de NaOH necesaria para la obtención de un pH = 11.00 y 100 mg de Sephadex QAE A-25. Se agita durante 10 minutos, se filtra y se procede al registro del espectro que se representa en la figura III.10.

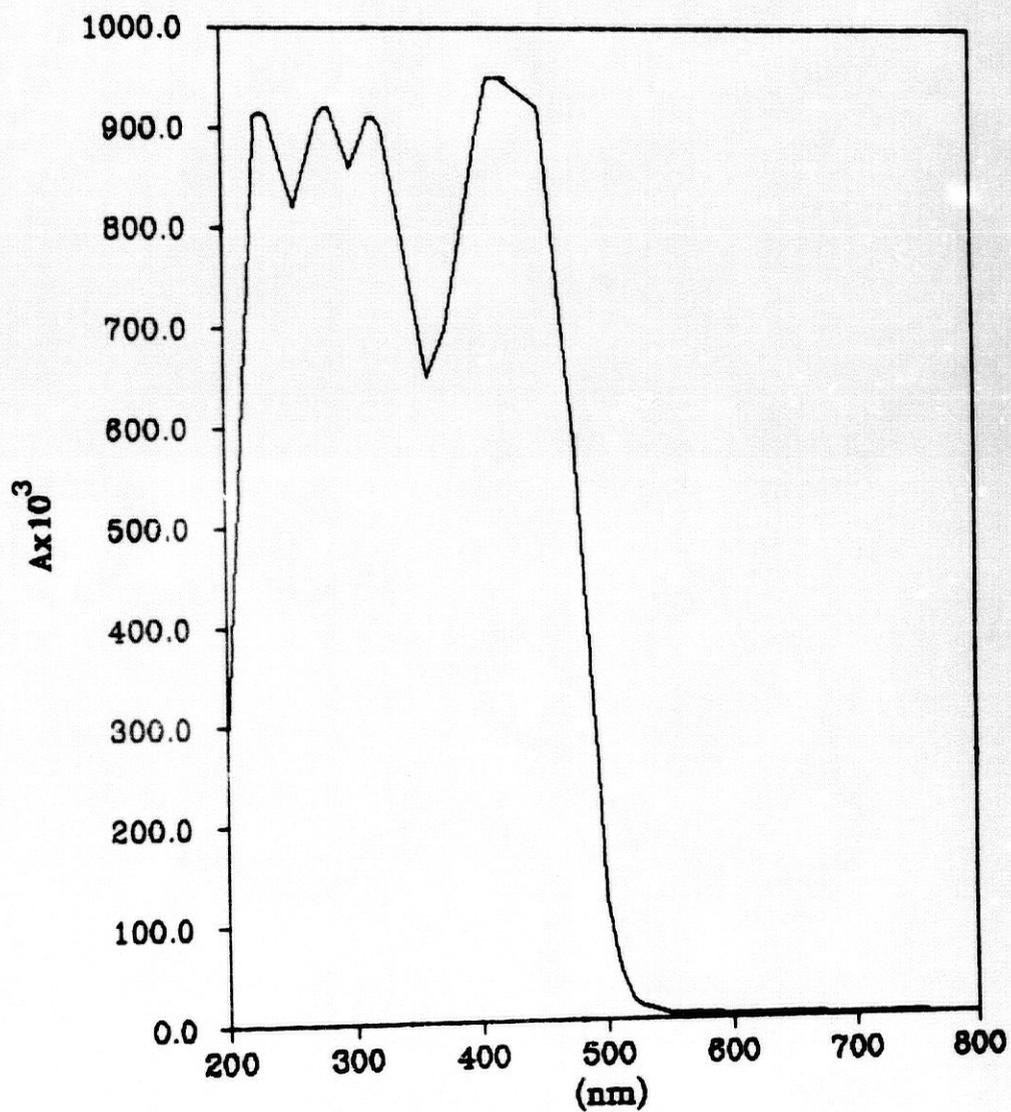


Figura III.10. Espectros uv-vis de la morina fijada en Sephadex QAE

Los valores de longitud de onda máxima y absorptividades molares se relacionan en las tablas III.1 y III.2.

Tabla III.1. Morina en disolución

pH	λ (nm)	ϵ (l. mol ⁻¹ . cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (l. mol ⁻¹ . cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (l. mol ⁻¹ . cm ⁻¹)
11.00	275.7	5833.4	316.5	4166.7	415.0	6833.4
5.00	260.8	5500.0	386.9	4291.7		

Tabla III.2. Morina fijada en Sephadex QAE A-25

pH	λ (nm)	ϵ (l. mol ⁻¹ . cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (l. mol ⁻¹ . cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (l. mol ⁻¹ . cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (l. mol ⁻¹ . cm ⁻¹)
11,50	241,3	76333,4	288,5	78333,4	321,3	77583,4	430,2	82000,0

Es de destacar que:

- 1) Las longitudes de onda de los máximos de los espectros de excitación de la morina en disolución (455, 472) se desplazan hacia longitudes de onda superiores con respecto a las máximas del espectro uv-vis del reactivo en disolución.
- 2) Las longitudes de onda del máximo del espectro de excitación de la morina fijada sobre Sephadex QAE A-25 (439 nm) es del orden del máximo del espectro uv-vis de la misma.

INFLUENCIA DE VARIABLES

III.4.1. INFLUENCIA DEL pH

Se ha realizado el estudio de la influencia del pH sobre la fijación de la morina en los tres soportes Sephadex anteriormente seleccionados: los cambiadores QAE A-25, SP C-25 y el adsorbente G-15, en el intervalo de pH comprendido entre 2 y 12, ajustado con HCl y NaOH.

Para ello se preparó tres series de matraces aforados de 500 mL de agua bidestilada. Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 2,5 mL de disolución etanólica de morina 2×10^{-3} %, las cantidades de HCl y NaOH necesarias para la obtención de pH deseado y 100 mg del correspondiente soporte Sephadex.

Después de una agitación de 10 minutos, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se midió su intensidad de fluorescencia. La proporción de etanol en todos los casos es de 0.05%.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 439$ nm, $\lambda_{em} = 558$ nm, cuando la resina empleada era QAE A-25, $\lambda_{exc} = 400$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, cuando la resina empleada era SP C-25 y $\lambda_{exc} = 443$ nm, $\lambda_{em} = 497$ nm cuando se utilizaba como soporte Sephadex G-15. En todos los casos las rendijas de excitación y emisión de 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.05 y temperatura 20°C.

Los espectros de emisión obtenidos para la morina fijada en Sephadex QAE A-25, se representan en las figuras III.11 y III.12.

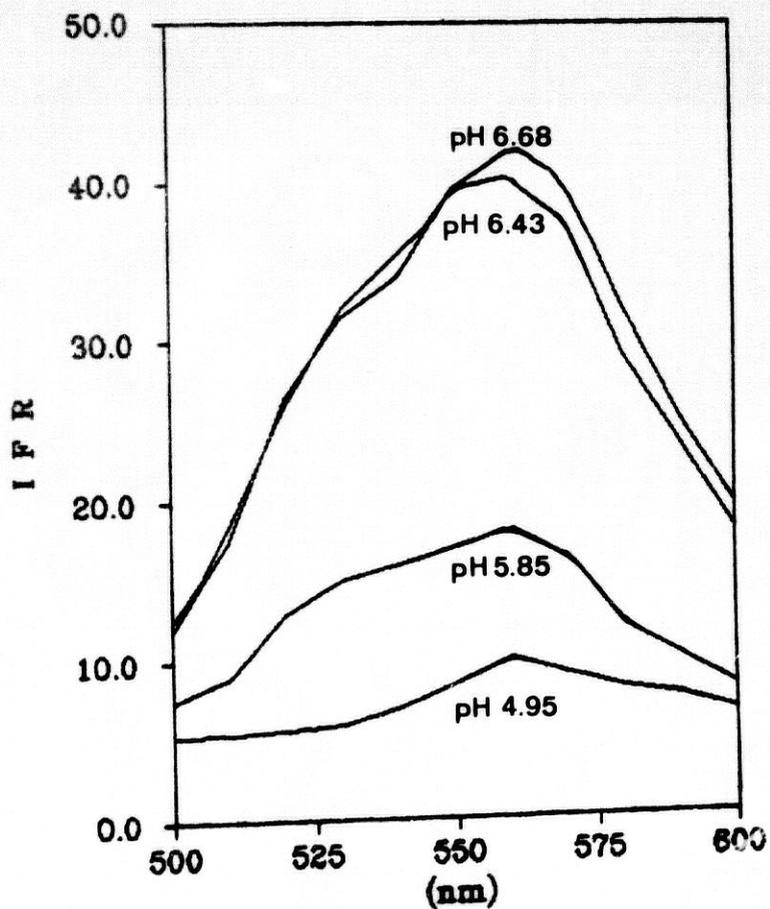
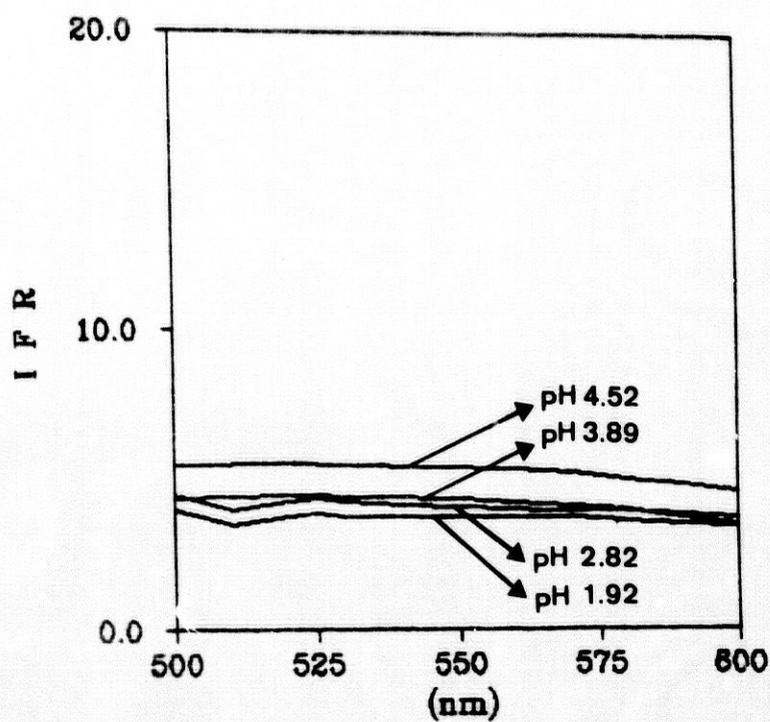


Figura III.11. Espectros de emisión de la morina fijada en Sephadex QAE A-25 en función del pH

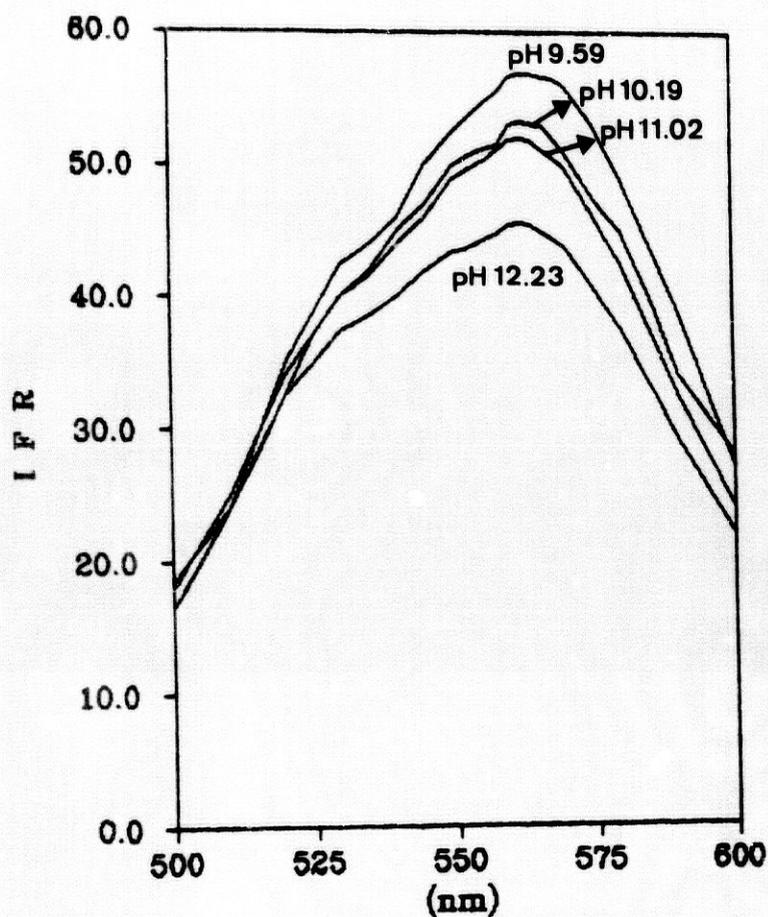


Figura III.12. Espectros de emisión de la morina fijada en Sephadex QAE A-25 en función del pH

Los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del pH sobre la morina en disolución y sobre la fijación de la morina en los tres soportes Sephadex seleccionados, se recogen en la tabla III.3 y se han representado gráficamente en las figuras III.13, III.14 y III.15.

Tabla III.3. Influencia del pH en la fijación de la morina sobre los diferentes soportes

Disolución		Sephadex QAE		Sephadex SP		Sephadex G	
pH	%IFF	pH	%IFR	pH	%IFR	pH	%IFR
2.00	0.5	1.92	3.8	1.65	7.0	2.04	6.4
3.00	1.1	2.82	4.1	2.39	6.8	2.59	6.6
4.00	0.6	3.89	4.3	3.55	6.4	4.03	7.0
5.00	0.2	4.52	5.4	5.01	6.8	5.12	8.5
6.00	0.2	4.95	10.0	5.77	6.8	6.01	8.6
7.00	0.4	5.85	18.2	6.54	6.4	6.68	6.6
8.00	0.8	6.43	40.3	7.25	5.9	7.45	6.5
9.00	2.0	6.68	41.9	7.52	6.2	8.00	6.3
10.00	4.7	9.59	56.2	8.78	6.2	9.68	6.6
11.00	5.4	10.19	53.2	10.28	6.4	10.20	6.7
12.00	5.4	11.02	52.0	11.19	6.3	11.14	6.5
13.00	5.1	12.23	45.6	12.16	6.2	12.36	7.0

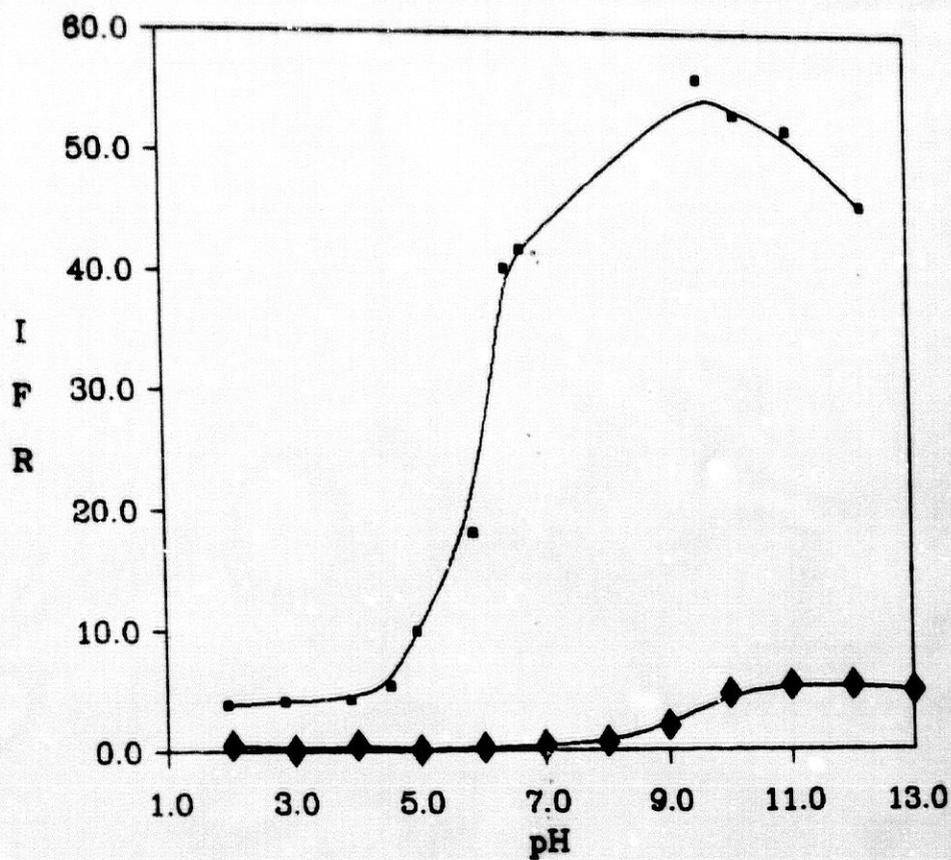


Figura III.13. Influencia del pH sobre la morina en disolución (●) y sobre la morina fijada en Sephadex QAE A-25 (◆)

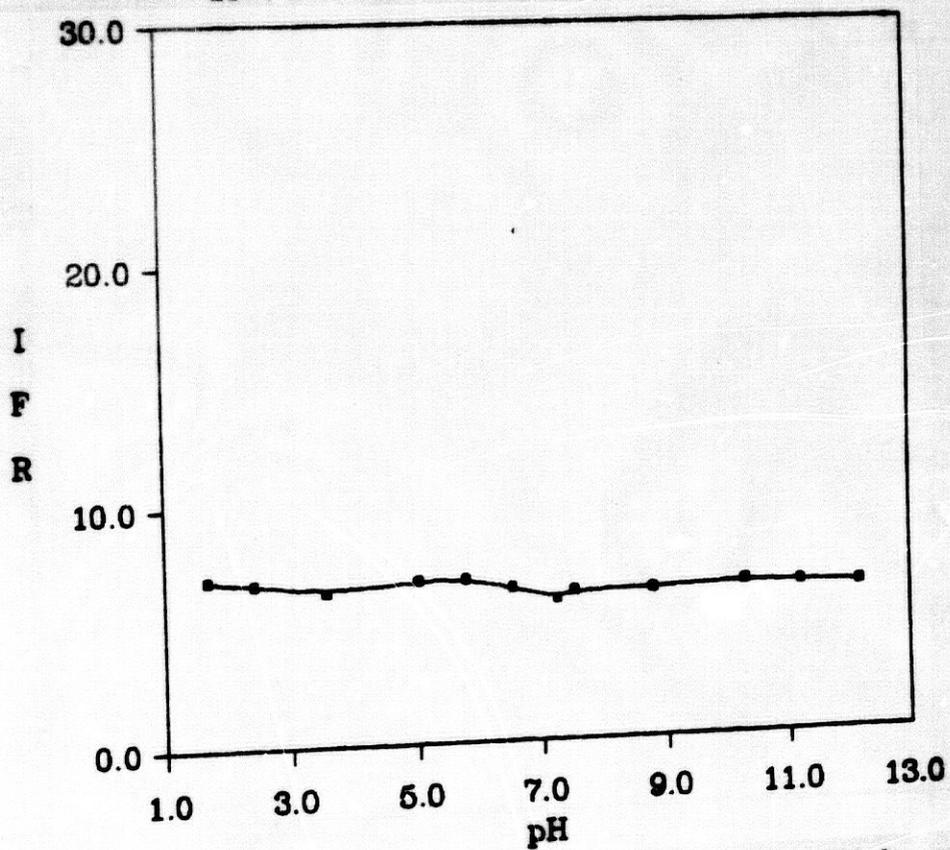


Figura III.14. Influencia del pH sobre la morina fijada en Sephadex SP C-25

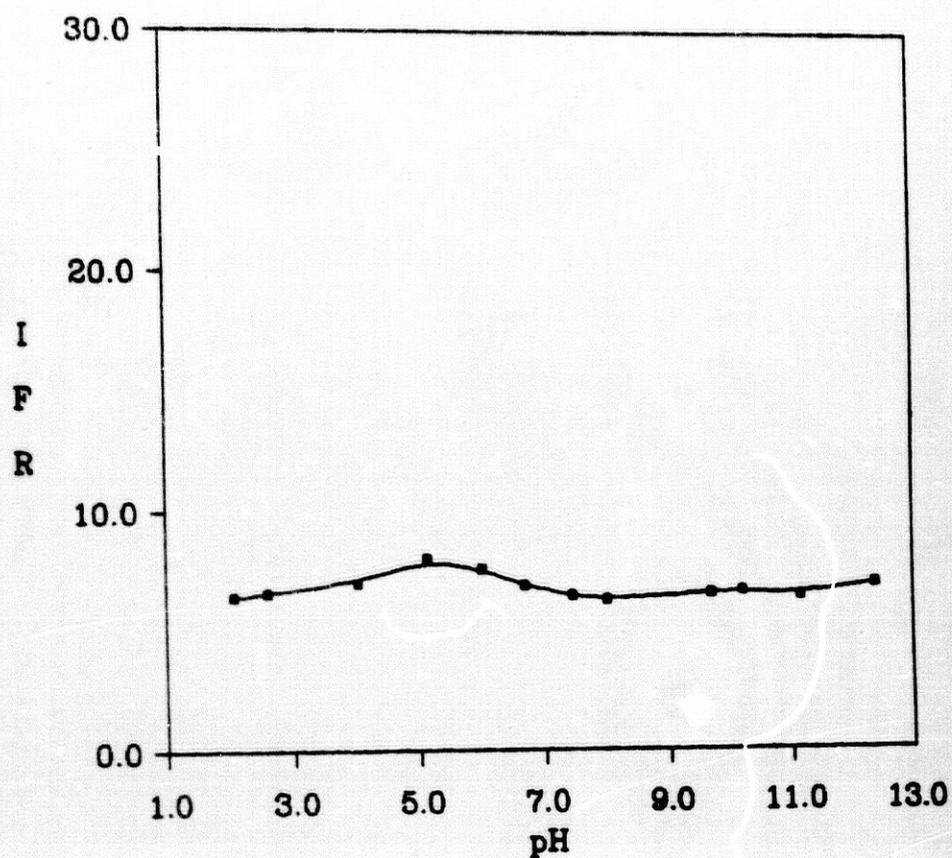


Figura III.15. Influencia del pH sobre la morina fijada en Sephadex G-15

De la observación de los espectros de emisión de la morina en Sephadex QAE para los distintos valores de pH ensayados (figuras III.11 y III.12), así como de la representación de la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de los correspondientes máximos de emisión de la morina en disolución y fijada en varios soportes en función del pH (figuras III.12, III.13, III.14 y III.15), puede concluirse:

- 1.- De los tres soportes ensayados, sólo en la resina QAE A-25 se observa una fuerte fijación a todos los valores de pH experimentados. Este resultado

es lógico si tenemos en cuenta que se trata de un cambiador aniónico, en contraste con la naturaleza catiónica de la resina SP C-25 y la ausencia de grupos cambiadores en la G-15. Por esta razón, la pequeña fluorescencia que se observa en estas dos últimas resinas, que es del mismo orden, puede ser atribuido a un proceso de adsorción.

- 2.- En la resina QAE A-25 el máximo de emisión de la morina fijada (558 nm) permanece constante e independiente del pH del medio. Este resultado contrasta con el encontrado en bibliografía (159) para la morina en disolución, la cual presenta un desplazamiento en los máximos de excitación y emisión hacia valores mayores al aumentar el pH del medio. Así a pH 2 las longitudes de onda de los máximos son 418 nm y 495 nm, mientras que a pH 13 pasan a ser 455 y 548 nm respectivamente.
- 3.- Existe gran dependencia de la intensidad de fluorescencia del sistema morina-QAE-A.25 con el pH. El valor de aquella es máximo dentro del amplio intervalo comprendido entre 8 y 11, decreciendo para valores superiores e inferiores.
- 4.- El reactivo en disolución presenta un comportamiento similar, aunque el intervalo de máxima intensidad de fluorescencia es algo más estrecho 11-13 (159).
- 5.- El comportamiento fluorescente de la morina con el pH tanto en disolución como fijada en fase resina Sephadex QAE A-25 puede justificarse por la diferente fluorescencia de sus formas iónicas. En ambos casos la similitud de su comportamiento nos hace pensar que sean las mismas.

III.4.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Se ha estudiado la influencia que ejerce la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia de la morina fijada sobre los cambiadores Sephadex QAE A-25, SP C-25 y el adsorbente G-15.

Para ello se han tomado tres series de matraces aforados que contenían 500 mL de agua bidestilada a los que se han añadido 2,5 mL de disolución etanólica de morina al $2 \times 10^{-3}\%$, y a continuación a la primera serie se le añade la cantidad de NaOH necesaria para obtener un pH = 10.00 y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25, a la segunda serie se le añade la cantidad de acético necesario para la obtención de un pH = 5.00 y 100 mg de resina Sephadex SP C-25 y la tercera serie la cantidad de AcH necesario para obtener un pH = 5.00 y 100 mg de resina Sephadex G-15.

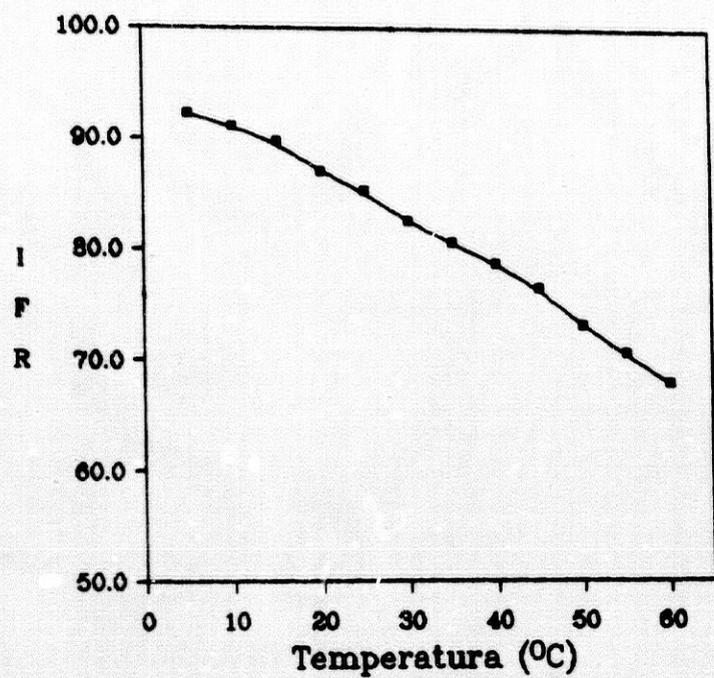
Después de una agitación de 10 minutos, se filtraron las muestras y se llenó la cubeta procediéndose a la medida de la señal de fluorescencia de cada una de las series.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia en la primera serie fueron: $\lambda_{exc} = 439$ nm, $\lambda_{em} = 558$ nm, rendija de excitación y de emisión de 2.5 nm, factor de sensibilidad de 0.1 y temperatura variable.

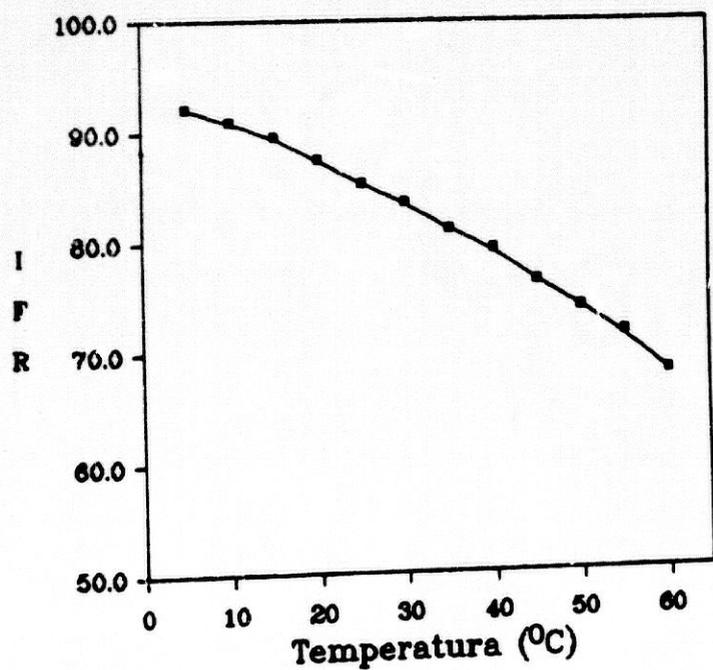
Los resultados se indican en la tabla III.4 y se han representado en la figura III.16.

Tabla III.4. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-QAE

<i>calentamiento</i>		<i>enfriamiento</i>	
<i>T₂</i> (°C)	<i>%IFR</i>	<i>T₂</i> (°C)	<i>%IFR</i>
5	92.2	60	67.9
10	91.0	55	71.5
15	89.7	50	73.9
20	87.0	45	76.3
25	85.2	40	79.2
30	82.5	35	81.0
35	80.6	30	83.5
40	78.7	25	85.2
45	76.5	20	87.4
50	73.1	15	89.5
55	70.6	10	90.9
60	67.9	5	92.1



a



b

Figura III.16. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-QAE. a) calentamiento; b) enfriamiento

De la observación de la figura III.16, puede deducirse que la intensidad de fluorescencia decrece cuando la temperatura del sistema se incrementa. Este decrecimiento corresponde a un 8% hasta 25°C, a un 8% hasta 40°C y a un 14% hasta 60°C. La ecuación experimental obtenida es $IFR = 95.82 - 0.45 T (^{\circ}C)$ ($r = 0.992$).

Este efecto observado en fase sólida es reversible, es decir enfriando nuevamente el sistema, la intensidad de fluorescencia recupera el valor inicial. Sin embargo, en disolución apenas influye la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia de la morina (159), sólo se observa una pequeña disminución de la señal, alrededor de un 10%, en el intervalo estudiado comprendido entre 15 y 40°C. Este comportamiento nuevamente apunta hacia el diferente ambiente que rodea a la morina en medio homogéneo y en fase sólida.

Las condiciones operatorias para la medida de la segunda serie fueron: $\lambda_{exc} = 400$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, rendija de excitación y de emisión de 2.5 nm, factor de sensibilidad de 0.1 y temperatura variable. Los resultados obtenidos se indican en la tabla III.5 y se han representado en la figura III.17.

Tabla III.5. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-SP

<i>calentamiento</i>		<i>enfriamiento</i>	
<i>T^a (°C)</i>	<i>%IFR</i>	<i>T^a (°C)</i>	<i>%IFR</i>
5	10.3	75	11.2
10	8.0	70	11.1
15	8.0	65	11.4
20	12.9	60	11.1
25	13.4	55	11.1
30	13.3	50	11.5
35	13.2	45	11.5
40	13.2	40	11.4
45	12.5	35	11.4
50	12.1	30	11.4
55	11.9	25	11.3
60	11.7	20	11.3
65	11.6	15	11.3
70	11.0	10	10.7
75	11.2	5	8.5

De la observación de la figura III.17 puede deducirse que cuando la fijación es por adsorción, como sería este caso, la influencia de la temperatura es muy pequeña, mientras que cuando lo es por cambio iónico es muy considerable.

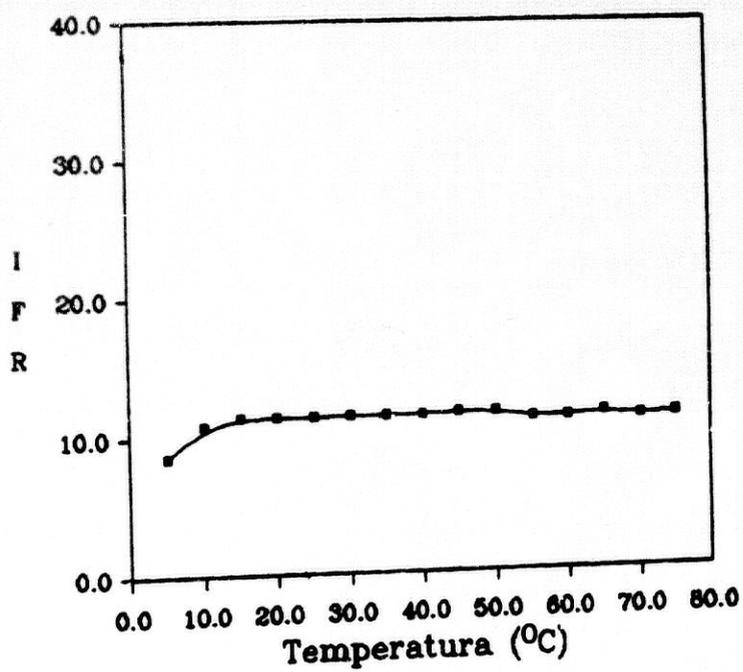
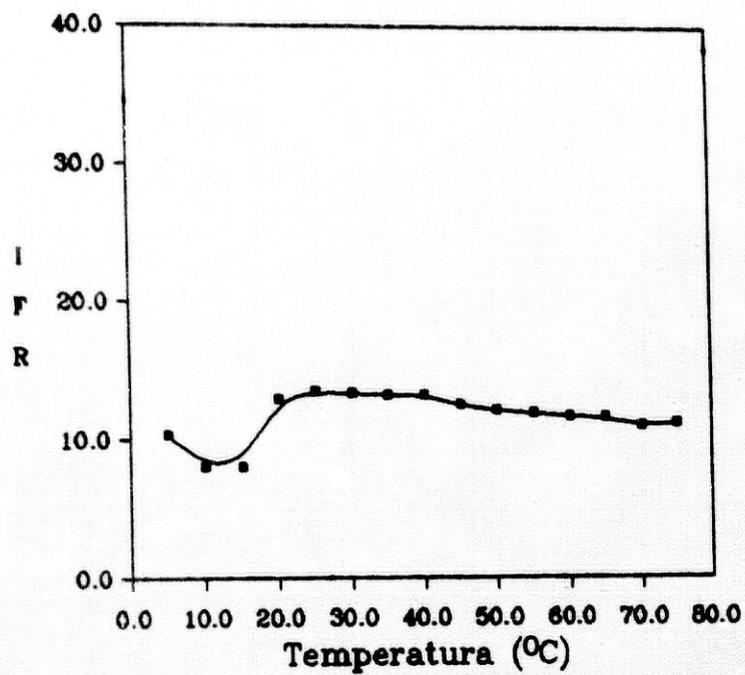


Figura III.17. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-SP. a) calentamiento; b) enfriamiento

Las condiciones operatorias en las que se mide la señal de fluorescencia de la tercera serie son: $\lambda_{exc} = 443$ nm, $\lambda_{em} = 497$ nm, rendija de excitación y de emisión de 2.5 nm y factor de sensibilidad de 0.1. Los resultados se indican en la tabla III.6. y se han representado en la figura III.18.

Tabla II'6. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-G.15

<i>calentamiento</i>		<i>enfriamiento</i>	
$T^{\circ} ({}^{\circ}C)$	%IFR	$T^{\circ} ({}^{\circ}C)$	%IFR
5	10.2	75	10.7
10	7.4	70	10.8
15	7.2	65	10.9
20	7.3	60	11.0
25	11.5	55	11.3
30	13.4	50	11.3
35	12.9	45	11.4
40	12.6	40	11.4
45	12.1	35	11.6
50	11.9	30	11.7
55	11.5	25	11.5
60	11.4	20	11.4
65	11.2	15	11.3
70	10.6	10	9.2
75	10.7	5	7.7

De la observación de la figura III.18 puede deducirse que la intensidad de fluorescencia de la morina fijada por adsorción sobre una resina neutra es poco afectada por la modificación de la temperatura.

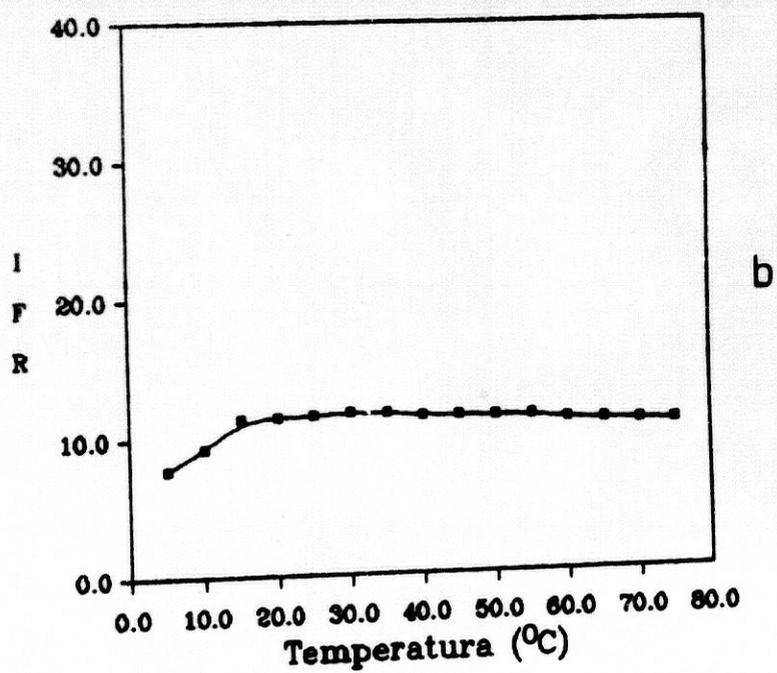
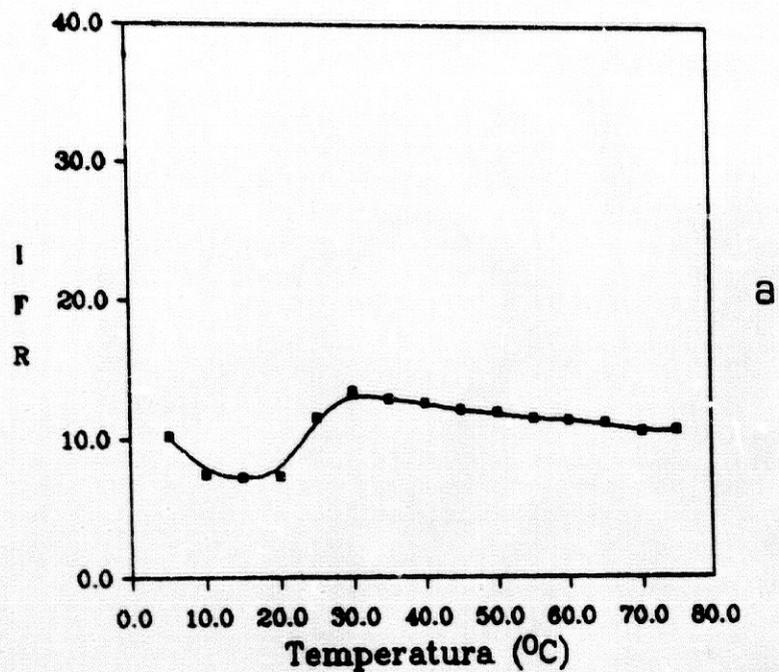


Figura III.18. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-G.15. a) calentamiento; b) enfriamiento

III.4.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE MORINA

Se realizó el estudio de la influencia que ejerce la concentración de morina sobre la intensidad de fluorescencia de la misma fijada sobre el cambiador aniónico Sephadex QAE A-25, el cambiador catiónico Sephadex SP C-25 y el adsorbente Sephadex G-15.

Para ello se prepararon tres series de frascos de polietileno que contienen todos ellos 500 mL de agua bidestilada. A continuación a la primera serie se les añadieron las cantidades de etanol del 99.5%, disolución etanólica de morina del $5 \times 10^{-3}\%$, de la forma en que se especifica en la tabla III.7, a la segunda y tercera serie las cantidades de etanol y morina del 0.02% que se indican en la tabla III.8 y III.9, respectivamente, al objeto de mantener el porcentaje etanólico del medio y con ello el pH.

Tabla III.7

<i>Matraz</i>	<i>Vol. Morina</i> (mL)	<i>Vol. Etanol</i> (mL)
1	0.25	4.75
2	0.50	4.50
3	0.80	4.20
4	1.00	4.00
5	1.50	3.50
6	2.00	3.00
7	2.50	2.50
8	3.00	2.00
9	5.00	----

Tabla III.8

<i>Matraz</i>	<i>Vol. Morina</i> (mL)	<i>Vol. Etanol</i> (mL)
1	0.15	4.85
2	0.30	4.70
3	0.40	4.60
4	0.50	4.50
5	0.60	4.40
6	0.70	4.30
7	0.80	4.20
8	1.00	4.00
9	1.30	3.70
10	1.50	3.50
11	1.80	3.20
12	2.00	3.00
13	2.50	2.50
14	3.00	2.00
15	3.50	1.50
16	4.00	1.00

Tabla III.9

Matraz	Vol. Morina (mL)	Vol. Etanol (mL)
1	0.15	4.85
2	0.40	4.60
3	0.60	4.40
4	0.80	4.20
5	1.00	4.00
6	1.50	3.50
7	2.00	3.00
8	2.50	2.50
9	3.00	2.00
10	3.50	1.50
11	4.00	1.00

A continuación, se añadieron a cada uno de los frascos de la primera serie, NaOH hasta obtener un pH = 10.00 y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25; a los de la segunda serie ácido acético hasta obtener un pH = 5.00 y 100 mg de Sephadex SP C-25 y por último, a la tercera serie ácido acético hasta obtener un pH = 5.00 y 100 mg de Sephadex G-15.

Tras agitar durante 10 minutos, filtrar y llenar las cubetas, se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia de la primera serie fueron: $\lambda_{exc} = 439 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 558 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.15 y temperatura 20°C.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia de la segunda serie fueron: $\lambda_{exc} =$

400 nm, λ_{em} = 496 nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.15 y temperatura 20°C.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia de la tercera serie fueron: λ_{exc} = 443 nm, λ_{em} = 497 nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.15 y temperatura 20°C.

En las tablas III.10, III.11 y III.12 se muestran los resultados obtenidos y se representan en las figuras III.19, III.20 y III.21.

Tabla III.10. Influencia de la concentración de morina sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-QAE

[morinal]x10 ⁷ M	%IFR
0.74	41.1
1.50	54.9
2.40	57.0
3.00	66.0
4.40	82.5
5.90	84.9
7.40	92.7
8.90	92.6
14.70	92.7

Tabla III.11. Influencia de la concentración de morina sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-SP

[Morinalx10 ⁶ M	%IFR
0.18	17.8
0.36	18.6
0.47	19.5
0.59	21.6
0.71	24.4
0.83	25.3
0.95	26.3
1.18	28.1
1.54	29.9
1.77	30.8
2.13	32.2
2.36	33.9
2.96	35.0
3.55	34.6
4.14	34.9
4.73	35.4

Tabla III.12. Influencia de la concentración de morina sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-G

[Morina]x10 ⁶ M	%IFR
0.18	18.6
0.47	19.2
0.71	23.4
0.95	26.2
1.18	27.5
1.77	30.0
2.36	30.9
2.96	31.6
3.55	31.4
4.14	32.2
4.73	32.1

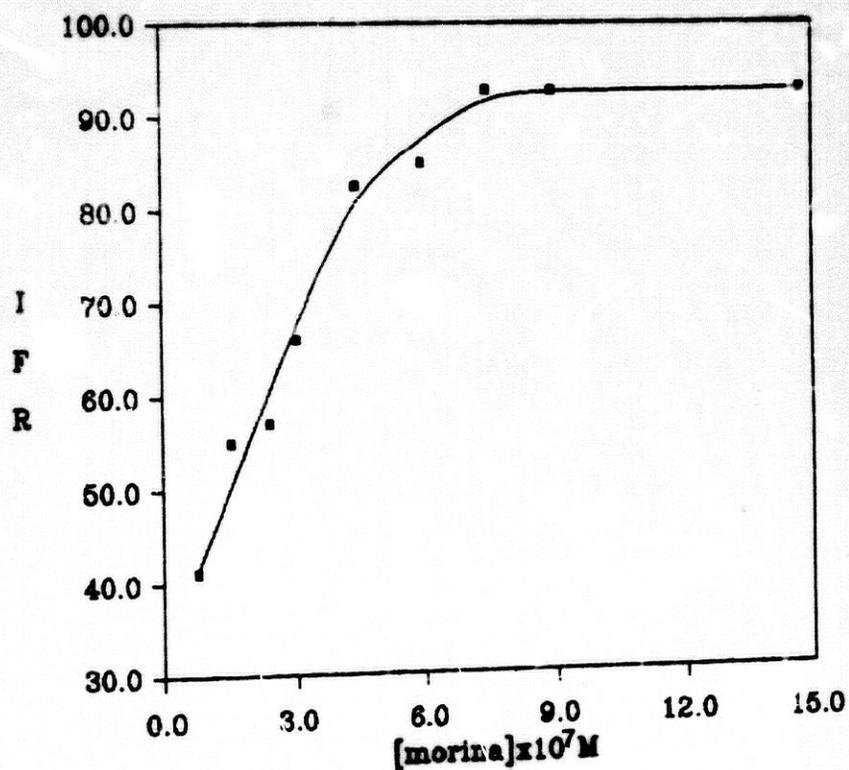


Figura III.19. Influencia de la concentración de morina sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-QAE

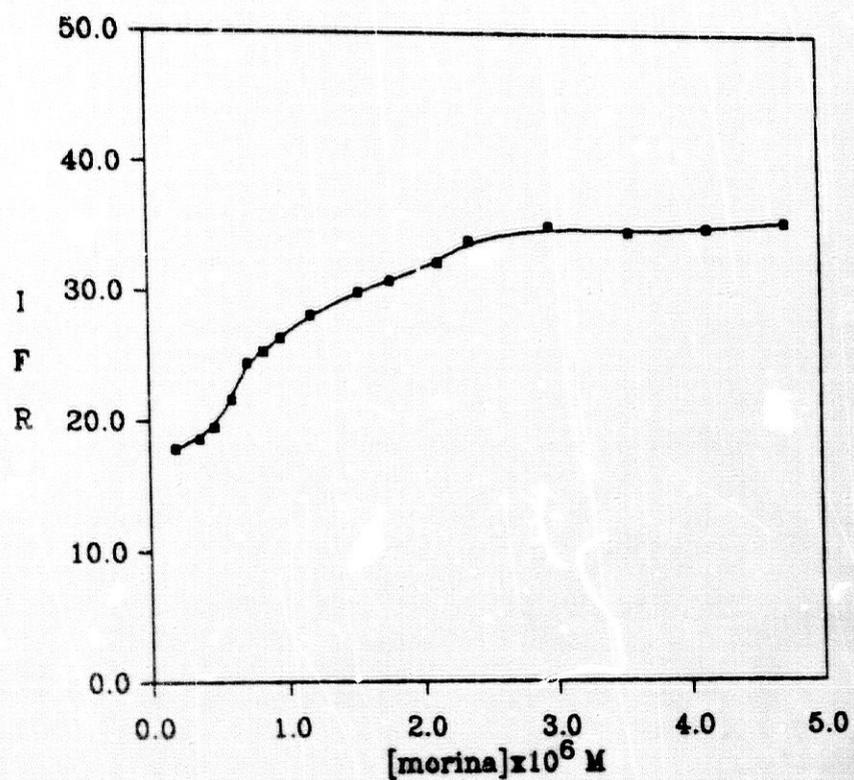


Figura III.20. Influencia de la concentración de morina sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-SP

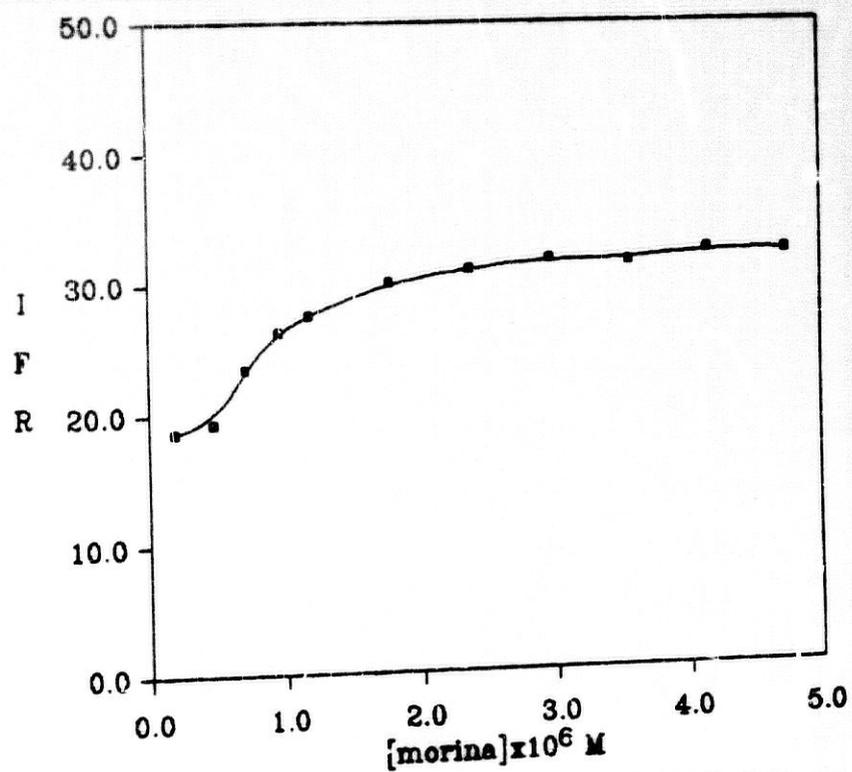


Figura III.21. Influencia de la concentración de morina sobre la intensidad de fluorescencia del sistema morina-G

De la observación de las figuras III.19, III.20 y III.21, puede deducirse que al aumentar la concentración de morina se incrementa la señal de fluorescencia en los tres casos estudiados, hasta un determinado valor a partir del cual permanece constante. Este hecho concuerda con el estudio en disolución de la morina (35,157,159), en el que a altas concentraciones de la misma se satura y permanece constante la intensidad de fluorescencia.

Es de resaltar que la saturación de la morina se dá a una concentración inferior cuando la resina ensayada es un cambiador aniónico, como es el caso de Sephadex QAE A-25.

Por otra parte, señala la bibliografía que en disolución (159) los espectros de excitación de la morina muestran una variación importante en la forma dependiendo de la concentración de reactivo.

La causa es debida a fenómenos de asociación intermolecular (formación de dímeros y polímeros) que tienen lugar al aumentar la concentración de reactivo y que favorecen el establecimiento de enlaces de hidrógeno. En el estudio realizado (159) para concentraciones comprendidas entre 2×10^{-4} % hasta 5×10^{-4} %, aparece un máximo de excitación a 415 nm el cual empieza a desdoblarse a partir de esta concentración. La aparición de dos máximos se aprecia ya claramente para una concentración de reactivo de 2×10^{-3} % que corresponden a las longitudes de onda 390 nm y 455 nm. A medida que aumenta la concentración de reactivo por encima de éste valor, el primer máximo se desplaza hacia longitudes de onda menores y el segundo hacia longitudes de onda mayores. Así, para una concentración de morina de 0.02 %, los máximos de excitación se encuentran a 352 nm y 475 nm, siendo el segundo máximo el que produce mayor fluorescencia.

En nuestro estudio en fase sólida no se observa desdoblamiento de los espectros de excitación debido a que la concentración de morina empleada es hasta 1.6×10^{-4} %, valor inferior al que comienza a observarse el desdoblamiento.

Sin embargo el máximo del espectro de emisión de la morina en disolución (159) no sufre desplazamientos al variar la concentración de reactivo, tal y como ocurre en fase resina.

III.4.4. ESTABILIDAD DE LA MORINA EN FASE RESINA

Se ha establecido la influencia que el tiempo ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del sistema QAE Sephadex A.25-morina, SP Sephadex C.25-morina y Sephadex G.15-morina, siguiendo el procedimiento operatorio que se describe a continuación.

Se toman tres botellas de polietileno que contienen 500 mL de agua bidestilada, se añaden 5 mL de disolución etanólica de morina 2×10^{-3} %, y a continuación a la primera se adiciona la cantidad de NaOH necesaria para obtener un pH = 10.00 y 100 mg de QAE Sephadex A-25, a la segunda la cantidad de ácido acético hasta obtener un pH = 5.00 y 100 mg de Sephadex SP C-25y a la última de ellas ácido acético hasta obtener un pH = 5.00 y 100 mg de Sephadex G-15.

Tras agitar la mezcla durante 10 minutos, filtrar y llenar la cubeta se midió la intensidad de fluorescencia de cada muestra a intervalos de tiempo.

Las condiciones operatorias para cada una de ellas fueron: $\lambda_{exc} = 439$ nm, $\lambda_{em} = 558$ nm, para el sistema morina-QAE, $\lambda_{exc} = 400$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, para el sistema morina-SP y $\lambda_{exc} = 443$ nm, $\lambda_{em} = 497$ nm para el sistema morina-G, y en todos los casos se empleó: rendija de excitación y emisión 2.5nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

En la tabla III.13 se recogen los valores obtenidos y se han representado graficamente en la figura III.22.

Tabla III.13. Estabilidad de los sistemas

<i>t</i> (min)	<i>morina-QAE</i> IFR (%)	<i>morina-SF</i> IFR (%)	<i>morina-G</i> IFR (%)
0	87.0	13.6	10.8
5	87.0	13.6	10.8
10	86.8	13.5	10.6
15	87.0	13.5	10.6
20	86.9	13.6	10.3
30	86.9	13.6	10.4
40	86.9	13.5	10.4
50	86.9	13.5	10.4
60	86.7	13.5	10.4
70	86.5	13.4	10.4
90	86.3	13.4	10.3
100	85.8	13.4	10.2
120	84.8	12.6	10.2
140		12.3	10.1
200			10.2

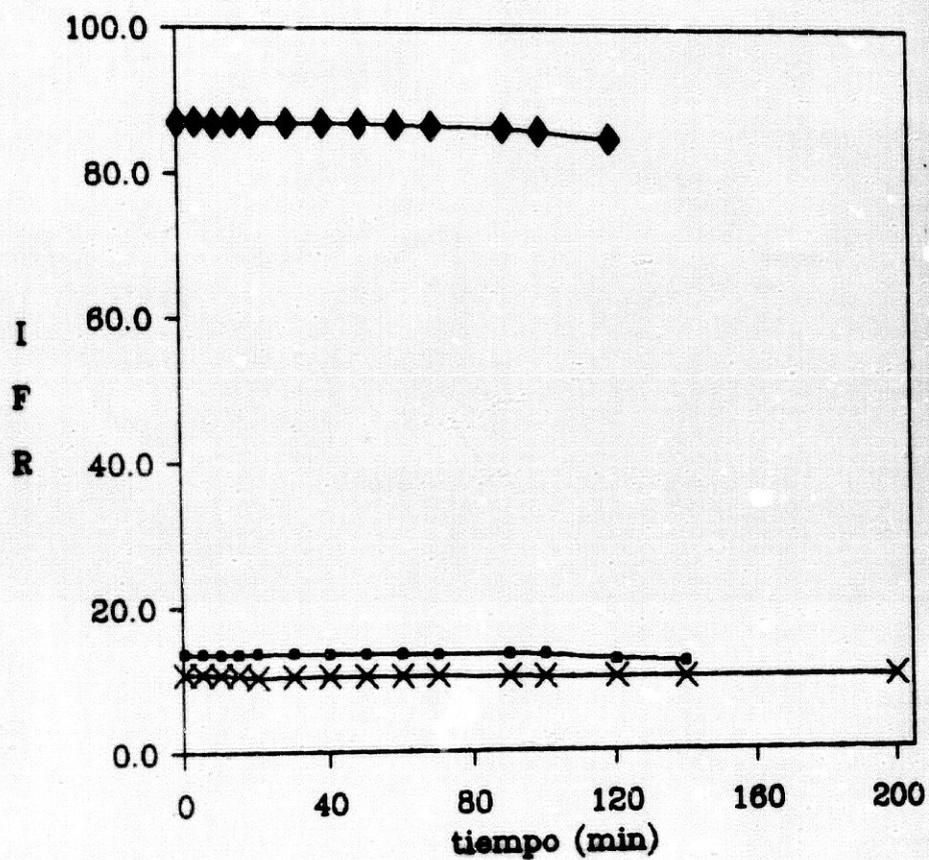


Figura III.22. Estabilidad de los sistemas morina-QAE (♦), morina-SP (•) y morina-G (X)

La intensidad de fluorescencia permanece constante en todos los sistemas al menos durante 90 minutos. En disolución (159) la morina es estable durante al menos 45 minutos.

C A P I T U L O I V

ESTUDIO DEL SISTEMA

MORINA-Be(II)-SEPHADEX QAE A-25

MEDIANTE ESPECTROFLUORIMETRIA DE

CAMBIO IONICO (F.C.I.)

IV.1. INTRODUCCION

Son múltiples los aspectos que justifican el análisis y control del ión Be(II) destacando entre ellos el de índole higienico-sanitario que se expone muy brevemente.

El empleo de compuestos de berilio en metalurgia y tecnología nuclear y su alta toxicidad, sugieren la necesidad de métodos más sensibles y fidedignos para la determinación de bajas concentraciones de berilio (165). Las lesiones en la piel son el signo más frecuente de la enfermedad industrial. Se han descrito tres tipos de lesiones en la piel: dermatitis, ulceración y granulomas. La dermatitis, a menudo acompañada de conjuntivitis aguda y ulceración corneal, se considera como una reacción de hipersensibilidad. El hecho de que en los pacientes con enfermedad pulmonar crónica por berilio se encuentre reacción positiva de los tests de parche apoya esta hipótesis e indica el posible componente inmunológico de la enfermedad crónica.

Para que se produzca ulceración es necesario que exista erosión cutánea previa. Los granulomas son excepcionales, porque su causa más frecuente radicaba en la absorción a través de la piel, del berilio contenido en las lámparas fluorescentes, en las cuales actualmente no se utiliza este elemento.

Pueden aparecer lesiones dermatológicas crónicas (granulomas subcutáneos), tras un largo período de latencia, en conjunción con la enfermedad pulmonar crónica.

La beriliosis, a nivel pulmonar, puede adoptar dos formas de presentación clínica: una aguda, potencialmente muy grave, que es infrecuente y cursa con: nasofaringitis, traqueobronquitis y, en los casos más severos, neumonitis fulminante así como edema pulmonar; y otra en forma de granulomatosis pulmonar crónica, más frecuente y de carácter sistémico y pluriorgánico.

Los métodos propuestos en la bibliografía para la determinación fluorimétrica de berilio con morina en disolución, están aplicados a muestras biológicas (orina, hígado, hueso) (35,157,160). La mayoría de los métodos son largos de realización y frecuentemente emplean de forma combinada la precipitación, electrolisis y/o extracción para aislar el berilio de las muestras. *Klemperer y Martin* (160) una vez destruida la materia orgánica, llevan a cabo dos coprecipitaciones cuantitativas de fosfato de berilio que requieren la centrifugación de los precipitados. La interferencia de calcio la eliminan precipitando el sulfato de calcio, y el hierro y otros cationes interferentes se eliminan por electrolisis con cátodo de mercurio.

Alternativamente, *Laitinen y Kivalo* (157), intentan simplificar el método y proponen una extracción del berilio como acetilacetato complejo en benceno. La adición de AEDT según *Sill y Willis* (35), evita la coextracción de pequeñas cantidades de otros cationes que normalmente se extraen y afectan, por tanto, a la extractibilidad del quelato de berilio y a la selectividad del método. Particularmente en el caso de análisis de orina y hueso, es importante la adición de AEDT ya que evita la precipitación del fosfato de calcio al pH requerido para la extracción del complejo de berilio, con lo que se simplifica el método al no tener que eliminar el calcio.

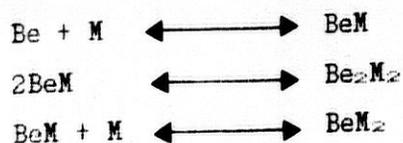
Las interferencias en disolución, principalmente Ca(II) y Zn(II) , se eliminan añadiendo un agente complejante como AEDT. La fluorescencia en disolución es más reproducible si se añade

tristanolamina, ya que probablemente previene la interferencia de trazas de hierro presente en los reactivos (35).

La mayoría de los procedimientos fluorimétricos para la determinación de berilio(II) en disolución que emplean morina como reactivo, añaden una solución de estannito sódico para estabilizar la fluorescencia, previniendo la oxidación aérea de la morina. Si todos los compuestos capaces de oxidar la morina o catalizar su oxidación (el cobre, por ejemplo, cataliza la oxidación por el aire) se eliminan y se emplea AEDT o ADTP (161) como enmascarante, se incrementa la selectividad de la fluorescencia y el complejo de berilio(II) con morina no se afecta. En otros casos se emplea junto con la adición de agentes complejantes la extracción como técnica separativa (35).

Reacción de Be(II) con morina

La morina reacciona con el Be(II) originando en disolución varios complejos fluorescentes a altos valores de pH (>11), dependiendo de la relación molar [morina]/[Be(II)]. El sistema Be(II)-morina es un sistema metaestable en el que tienen lugar tres reacciones principales que conducen a tres complejos de fórmulas: BeM, Be₂M₂ y BeM₂, que corresponden a los siguientes equilibrios de formación:



La carga de los complejos varía con el estado de ionización de la morina, mientras que la fluorescencia varía no sólo con la ionización de la morina, sino con su hidrólisis y quizás aún, con su estado de degradación (162).

La formación de estos complejos con Be(II) y las interesantes características analíticas que presenta la reacción, justifica que la morina haya sido empleada por diversos autores (35,157,161-164) para la determinación espectrofluorimétrica de Be(II) en disolución. Los métodos propuestos presentan características muy similares y sólo difieren en las condiciones experimentales en las que se lleva a cabo la determinación (tabla IV.1).

Tabla IV.1. Métodos propuestos en disolución

<i>variables</i>	<i>Laitinen y Kivalo (157)</i>	<i>Bril y col. (163)</i>	<i>Sill y col (161)</i>
Límite de detección ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1		0.5
pH óptimo	NaOH 0,05N y 2,5% etanol		11,50
Tampón	NaOH 0,05N	NaOH 0,1N	DPTA/Piperidina
λ_{exc} (nm)	436	480	365 y 443
λ_{em} (nm)	564		550
Interferencias	Ca, Fe, PO_4^{3-} , Cl^-	Ce, Pr, Nd, Sm, Fe, Bi, Hg, Ag, Cu, Ni, Co, U, Mo	Ce, Pr, Nd, Sm, Fe, Bi, Hg, Ag, Cu, Ni, Co, U, Mo

En presencia de un cambiador aniónico de tipo Sephadex, se fija fuertemente una especie fluorescente. Especie que no se fija en los cambiadores catiónicos, tal y como se observa del estudio cualitativo previo. En ésta Memoria nos propusimos abordar el estudio de la formación y fijación de la especie fluorescente que origina la morina con el berilio (II) en presencia de cambiadores aniónicos. Todo ello, con vistas a su posible aplicación a la determinación de este elemento a bajos niveles de concentración, tal y como hace prever la elevada sensibilidad y aceptable selectividad que presenta este reactivo en su reacción con Be(II) en presencia de cambiadores iónicos.

IV.2. EXPERIMENTAL

Reactivos

- Gel de cambio aniónico Sephadex QAE A-25, en ciclo cloruro.

- Disolución patrón de Be(II) de 0.1 g.L^{-1} , a partir de $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en HClO_4 $6 \times 10^{-2} \text{ M}$ y contrastada gravimétricamente por el método del fosfato (166).

Para ello, se añaden a la disolución 5 g de dihidrógeno fosfato amónico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) junto con 20 g de nitrato amónico (NH_4NO_3) y 30 mL de disolución saturada y caliente de acetato amónico ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$). Se calienta hasta ebullición y se disuelve el precipitado por adición de unas gotas de HNO_3 6N. Entonces se añade lentamente desde una bureta disolución acuosa de amoníaco 1.5 N, hasta que precipite el fosfato de amonio y berilio (BeNH_4PO_4). A continuación se hace amoniacal la disolución lo que se comprueba con fenoftaleína. Se espera un tiempo después de filtrar y se lava el precipitado con disolución caliente de nitrato amónico (NH_4NO_3) al 5%. Se calienta hasta 700°C y se pesa el residuo como $\text{Be}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Se conserva la disolución de Be(II) en un frasco de polietileno para evitar el intercambio iónico que se observa en la botella de vidrio (161).

Todas las demás disoluciones de Be(II) se obtuvieron a partir de ésta por dilución con agua bidestilada. Se prepararon diariamente para asegurar la estabilidad de la disolución diluida.

- Disolución de morina (2',3,4',5,7-pentahidroxiflavanona) purificada según se describe en el capítulo 3.0.02 % en etanol del 99.5 %.

Las demás disoluciones de morina se prepararon a partir de ésta por dilución en etanol del 99.5 %, siendo necesario prepararlas diariamente.

- Disoluciones reguladoras de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de diversos valores de pH, preparadas a partir de una disolución de Na_3PO_4 0.4 M (76.024 g en 500 mL de agua bidestilada) y la cantidad de H_3PO_4 concentrado necesaria para la obtención del pH deseado.

- Disolución de iones de 1 g.L⁻¹ en ión, preparadas por disolución de las sales que se indican en la tabla IV.2.

Tabla IV.2.

ión	sal empleada
NO_3^-	NaNO_3
SO_4^{2-}	Na_2SO_4
Cl^-	NaCl
F^-	NaF
CO_3^{2-}	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
BF_4^-	NaBF_4
Si(IV)	Na_2SiO_3
AEDT	AEDT- Na_2
Ca(II)	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Mg(II)	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Al(III)	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
Fe(III)	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

Todos los reactivos empleados son de calidad reactivo análisis unos y suprapuros cuando fué necesario.

IV.3. GEOMETRIA DEL SISTEMA DE MEDIDA

IV.3.1. Estudio del ángulo de incidencia de la radiación

Como se señaló en el capítulo II, se procedió a estudiar la influencia de la posición de la cubeta en el compartimento de medida del espectrofluorímetro sobre la intensidad de fluorescencia. Se opera empleando el dispositivo ya citado y la medida se realizó para diferentes valores de la rendija de excitación.

Para llevar a cabo la experiencia se situó el sistema de tal forma que el plano de la cubeta coincidiese con la dirección de la ventana de medida (θ) (figura II.1, pag 94). A continuación se registraron los espectros de emisión incrementando éste ángulo de 5° en 5° en el sentido de las agujas del reloj, hasta realizar un giro completo de 360° .

La muestra se preparó añadiendo 1.5 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} , a un matraz aforado de 500 mL y enrasando con agua bidestilada. A continuación, se trasvasó la disolución a un frasco de polietileno de 1 L de capacidad y se adicionaron 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3} \%$, la cantidad de NaOH necesaria para la obtención de un pH alrededor de 11.50, zona en la que según se deduce del estudio cualitativo previo (capítulo I), el sistema presenta máxima intensidad de fluorescencia y 100 mg de resina Sephadex QAE A-25.

Tras agitar durante 30 minutos, filtrar y llenar la cubeta se procedió a la medida de la intensidad de fluorescencia en las diferentes posiciones.

Las condiciones operatorias para la medida de su intensidad de fluorescencia fueron $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$; rendija de excitación 2.5; 5; 10 y 15 nm, rendija de emisión 2.5nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.3 y se han representado graficamente en las figuras IV.1, IV.2, IV.3 y IV.4.

Tabla IV.3. Influencia del ángulo

Rendija exc. (nm)	2.5	5	10	15
Angulo (θ)	IFR (%)	IFR (%)	IFR (%)	IFR (%)
0	1.5	1.0	1.0	1.1
5	1.6	1.6	1.2	1.2
10	3.5	3.2	2.5	2.5
15	6.8	6.5	5.3	4.9
20	9.0	8.9	8.0	7.6
25	11.4	12.5	10.3	10.0
30	13.6	13.8	13.0	11.8
35	15.1	15.0	14.1	13.3
40	15.4	15.6	14.6	14.3
45	15.5	16.0	14.8	14.5
50	15.5	15.5	14.8	14.2
55	14.3	14.3	13.1	12.6
60	11.8	12.1	10.8	10.4
65	9.0	10.0	8.5	8.8

<i>Rendija exc. (nm)</i>	2.5	5	10	15
<i>Angulo (θ)</i>	<i>IFR (%)</i>	<i>IFR (%)</i>	<i>IFR (%)</i>	<i>IFR (%)</i>
70	5.9	8.6	7.0	7.0
75	3.0	6.8	5.5	5.4
80	2.1	4.0	3.4	3.4
85	1.7	2.1	2.0	2.2
90	1.3	1.3	1.1	1.0
95	1.3	1.8	2.5	2.0
100	4.0	6.3	6.8	4.6
105	7.8	15.4	10.0	8.5
110	15.2	21.1	16.7	12.9
115	25.3	28.7	22.2	17.1
120	30.7	36.1	28.0	24.9
125	35.6	42.9	34.1	31.6
130	43.0	49.8	43.0	36.7
135	52.5	51.8	44.1	38.4
140	46.0	43.8	41.8	38.0
145	37.6	34.0	34.3	30.7
150	29.3	35.1	28.0	22.4
155	23.2	22.3	19.6	18.6
160	17.0	17.9	12.8	14.9
165	11.8	12.5	8.8	10.8
170	5.5	6.5	5.7	5.7
175	2.6	3.0	3.0	2.9
180	1.8	1.6	1.2	1.1
185	2.0	3.0	2.6	2.0
190	3.0	5.3	5.3	4.0
195	5.3	8.6	8.2	6.7

<i>Rendija exc.(nm)</i>	2.5	5	10	15
<i>Angulo (θ)</i>	<i>IFR (%)</i>	<i>IFR (%)</i>	<i>IFR (%)</i>	<i>IFR (%)</i>
200	8.2	11.0	10.8	9.5
205	10.3	13.7	12.5	12.1
210	12.6	14.4	14.0	13.6
215	14.1	15.5	15.1	15.1
220	14.9	15.8	15.6	16.0
225	14.9	15.8	15.3	16.3
230	15.0	15.4	14.9	15.8
235	14.2	14.1	14.1	14.0
240	13.0	12.4	11.6	12.4
245	11.2	9.9	9.0	10.0
250	9.1	8.3	7.4	8.6
255	6.5	6.2	5.0	6.5
260	4.0	4.0	3.6	4.9
265	1.7	2.9	2.2	3.0
270	1.7	2.0	2.0	2.1
275	2.3	3.0	2.5	2.3
280	4.6	5.4	4.2	4.8
285	9.3	10.0	7.6	8.4
290	15.9	17.1	13.2	13.2
295	24.0	23.4	19.9	18.0
300	35.8	29.5	27.9	27.6
305	43.3	38.9	33.2	32.6
310	50.2	47.0	40.0	37.5
315	52.1	51.0	44.1	38.6
320	48.5	51.4	41.6	38.3
325	41.7	48.1	36.7	36.0

Rendija exc. (nm)	2.5	5	10	15
Angulo (θ)	IFR (%)	IFR (%)	IFR (%)	IFR (%)
330	31.5	34.4	28.6	30.8
335	23.6	26.3	23.6	25.0
340	16.0	20.6	18.6	19.6
345	11.6	13.8	13.9	13.4
350	7.6	9.3	9.0	9.0
355	5.0	5.6	5.2	4.9
360	2.1	2.1	2.4	2.3

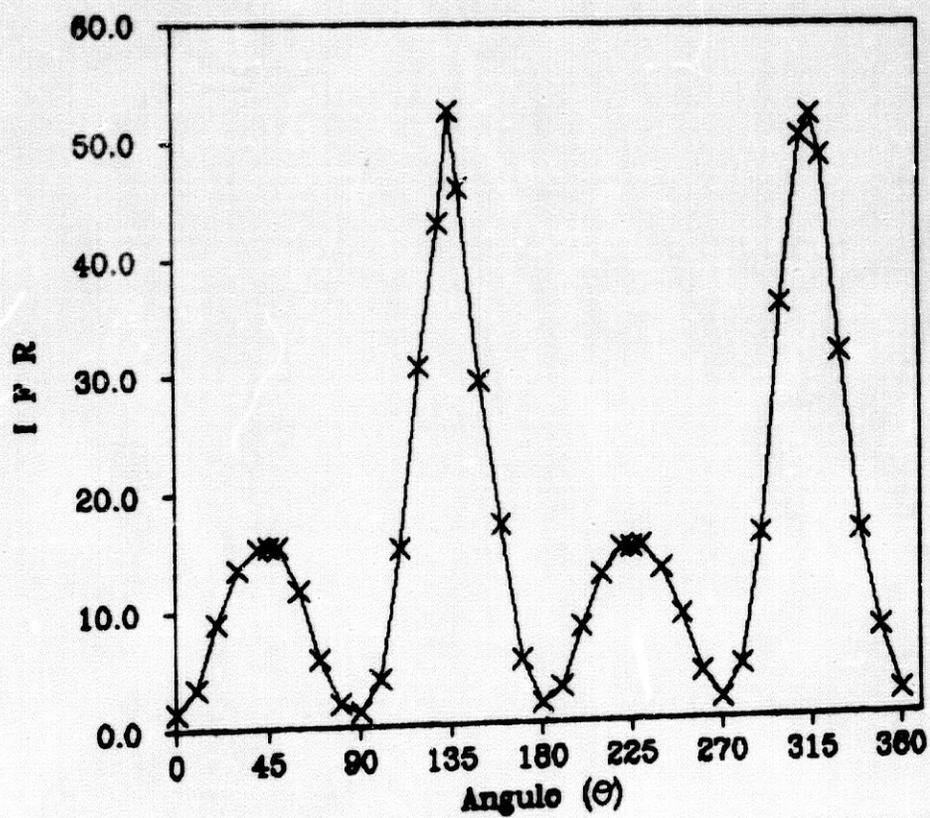


Figura IV.1. Influencia del ángulo. Rendija de excitación 2.5 nm

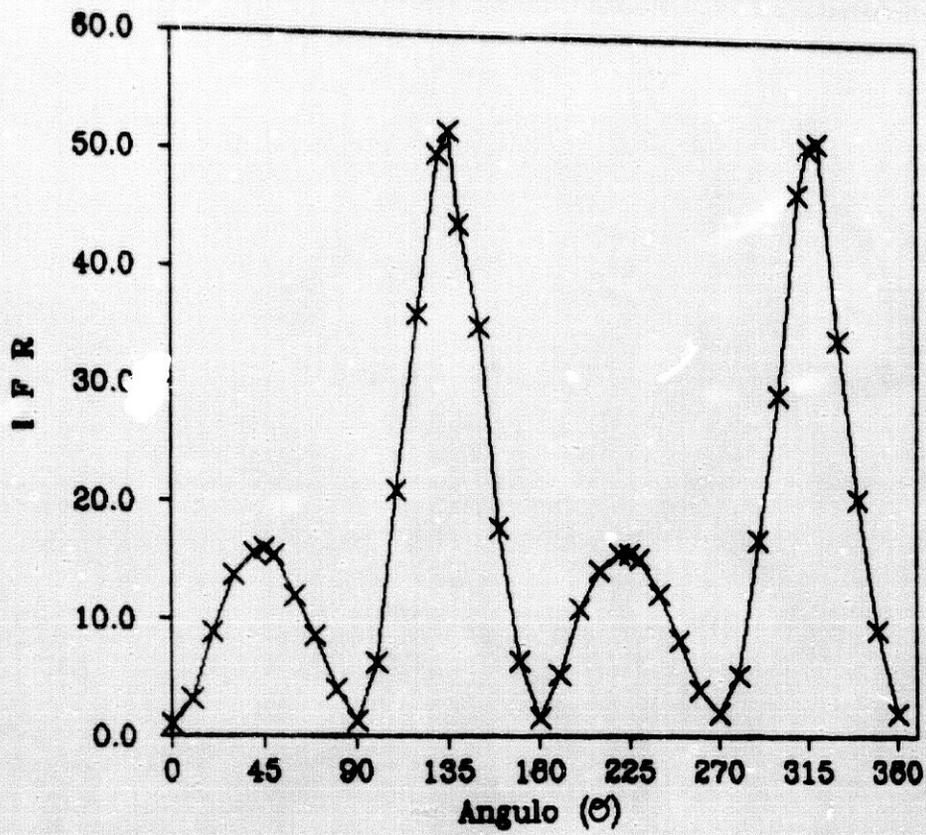


Figura IV.2. Influencia del ángulo. Rendija de excitación 5 nm

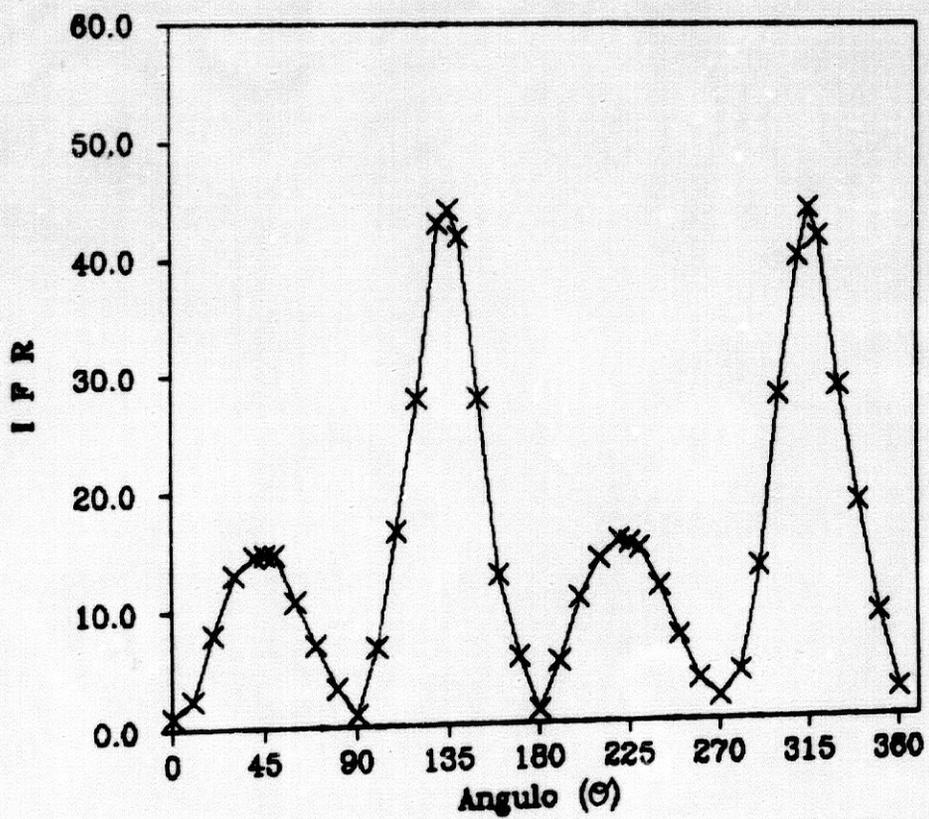


Figura IV.3. Influencia del ángulo. Rendija de excitación 10 nm

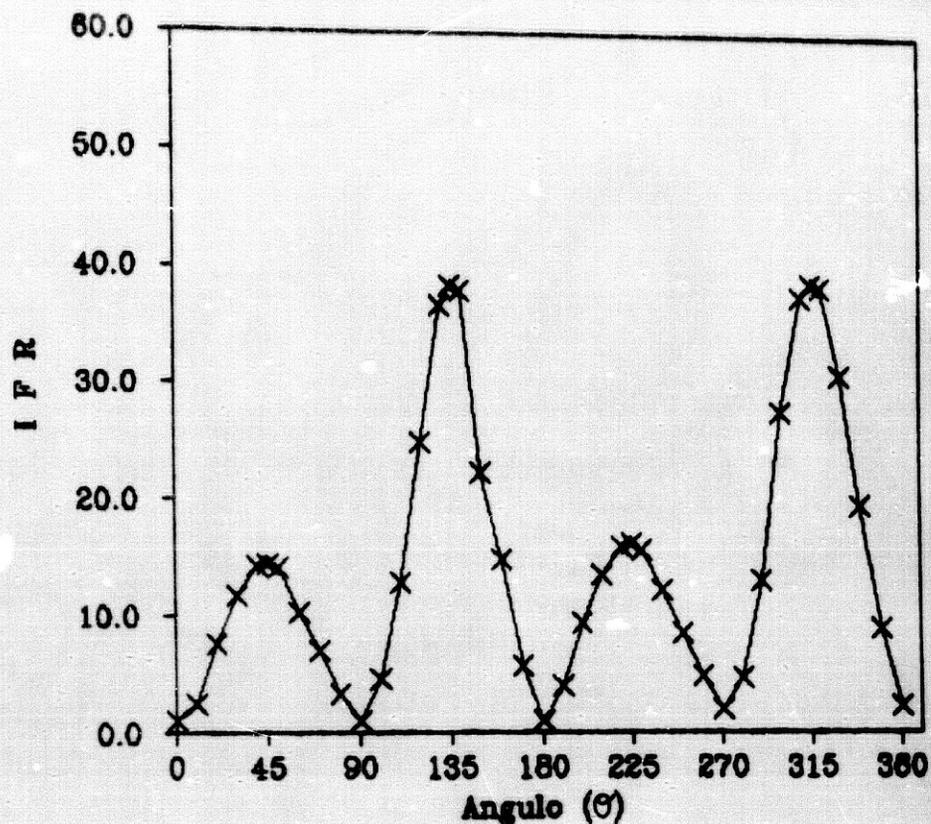


Figura IV.4. Influencia del ángulo. Rendija de excitación 15 nm

La observación de las anteriores figuras IV.1, IV.2, IV.3 y IV.4 nos permite comprobar:

- 1) La existencia de cuatro posiciones de la cubeta perfectamente definidas correspondientes a $\theta_1 = 45^\circ$; $\theta_2 = 135^\circ$; $\theta_3 = 225^\circ$ y $\theta_4 = 315^\circ$, donde la intensidad de emisión es máxima.
- 2) Los valores de la intensidad de fluorescencia de los máximos son iguales dos a dos, coincidiendo las medidas más altas con las posiciones $\theta_2 = 135^\circ$ y $\theta_4 = 315^\circ$ en las que la cubeta recibe el haz de excitación por una cara y se efectúa la medida de

luminiscencia por la otra (luminiscencia difusa transmitida).

- 3) Cuando la excitación y medida de la fluorescencia se realiza en la misma cara de la cubeta, lo que ocurre para $\theta_1 = 45^\circ$ y $\theta_2 = 225^\circ$, se observa asimismo dos máximos de menor intensidad (luminiscencia difusa reflejada).
- 4) Los valores con intensidad mínima coincide con $\theta = 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, 270^\circ$ y 360° .
- 5) Al variar las rendijas de excitación se observa que al aumentar ésta, disminuye la intensidad de luminiscencia.

En consecuencia será conveniente medir la fluorescencia difusa transmitida para asegurar la máxima intensidad.

IV.4. ESTUDIO DE LAS RENDIJAS DE EXCITACION Y EMISION

Para el estudio de la influencia que ejerce la anchura de la rendija de excitación y emisión sobre la intensidad de fluorescencia, se preparó una muestra que contenía 1 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada hasta 500 mL.

Se transfirió a un frasco de polietileno y se añadió 1.5 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, la cantidad de NaOH necesaria hasta obtener un pH = 11.50 y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Tras agitar durante 30 minutos, filtrar y llenar la cubeta se midió su intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones operatorias: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5, 5, 10 y 15 nm y rendija de emisión de 2.5 y 5 nm (pues para anchuras superiores se satura el fotomultiplicador), factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C .

En la tabla IV.4 se indican los resultados obtenidos que se representan en la figura IV.6.

Tabla IV.4. Anchura de las rendijas.

$r_{em} = 2.5 \text{ nm}$		$r_{em} = 5 \text{ nm}$	
r_{exc} (nm)	%IFR	r_{exc} (nm)	%IFR
2.5	23.5	2.5	86.5
5	22.0	5	84.0
10	19.5	10	76.5
15	18.0	15	70.0

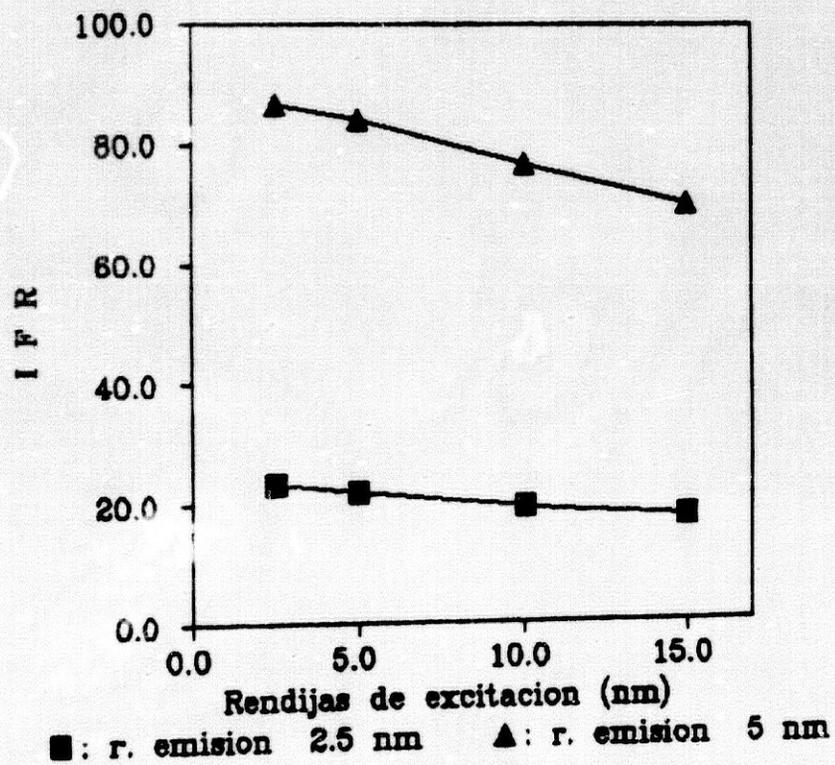


Figura IV.6. Influencia de las rendijas de excitación y emisión sobre la intensidad de luminiscencia

Se observa en la anterior figura que:

- 1) Al aumentar la anchura de la rendija de excitación, disminuye la intensidad de luminiscencia.
- 2) Al aumentar la anchura de la rendija de emisión, aumenta la intensidad de luminiscencia.

Este comportamiento, que está de acuerdo con las previsiones teóricas (26,167), nos induce a fijar en 2.5 nm la anchura de la rendija de excitación, valor que al mismo tiempo que origina la máxima señal de fluorescencia, posee menor ancho de banda y, por tanto, menor dispersión de la radiación luminiscente emitida. Por esta última razón, la rendija de emisión se fijó en 2.5 nm aunque el valor de la señal luminiscente medido sea el más bajo.

IV.5. CARACTERISTICAS ESPECTRALES

IV.5.1 Espectros de fluorescencia total del complejo morina-Be(II) en disolución y en fase resina Sephadex QAE A-25

Como ya se ha indicado en el capítulo III, la obtención de los espectros de fluorescencia total ha sido posible gracias a la comunicación establecida entre el espectrofluorímetro y un ordenador; al empleo de un programa de recogida y tratamiento de datos (FLUOPACK) y a un programa de representación tridimensional (GOLDEN SOFTWARE).

Para la obtención del espectro tridimensional del sistema Sephadex QAE-morina-Be(II) se preparó un matraz aforado de 500 mL en el que se introdujeron 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada.

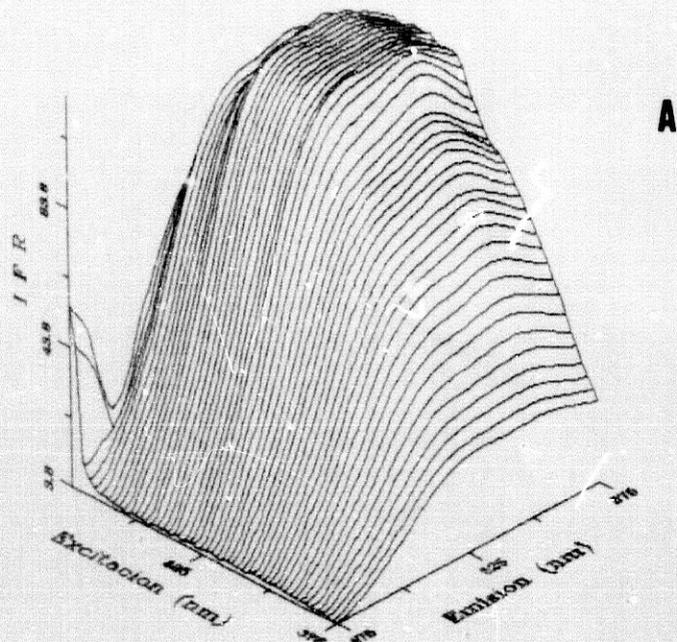
Se trasvasó a una botella de polietileno de 1 L y se añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3} \%$, la cantidad de NaOH para la obtención de un pH = 11.50 y 100 mg de resina QAE A-25.

Análogamente se introdujeron 500 mL de agua bidestilada en otra botella de polietileno añadiéndose los mismos volúmenes de reactivos indicados anteriormente.

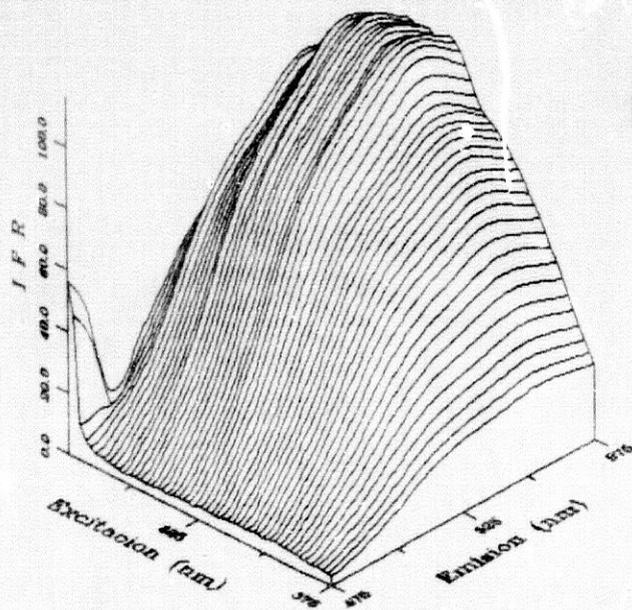
Después de agitar ambas botellas durante 30 minutos, se filtró la disolución, se llenaron las cubetas y se procedió al

registro del espectro en las siguientes condiciones: intervalo de emisión entre 475 y 575 nm; intervalo de excitación: entre 375 y 475 nm variando de 2 en 2 nm para cada barrido de emisión (pues el programa Fluopack realiza 50 barridos); rendijas de excitación y emisión 2.5 nm y factor de sensibilidad 0.1.

Los espectros obtenidos de la muestra y el blanco se representaron haciendo uso del programa Golden comentado en el capítulo III. Los resultados se muestran en la figura IV.7.



A



B

Figura IV.7. Espectros tridimensionales de la muestra (A) y del blanco (B)

Como puede observarse en la figura IV.7, debido a los intervalos de longitudes de onda empleados para la excitación y emisión, aparece la línea Rayleigh en aquellos casos en que coinciden ambas longitudes de onda (es decir las posiciones de los monocromadores).

IV.5.2. Espectros diferencia

Con objeto de hacer desaparecer la línea Rayleigh de la representación y obtener el espectro de luminiscencia total del sistema, se restó, utilizando la opción correspondiente del programa Fluopack, el espectro del blanco al del sistema y el espectro resultante se representa con distintas vis'as (figuras IV.8 y IV.9) por rotación alrededor del eje Z.

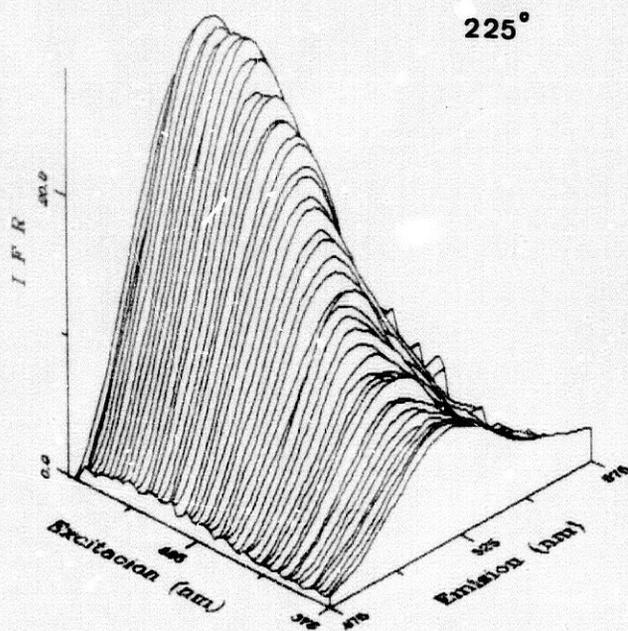
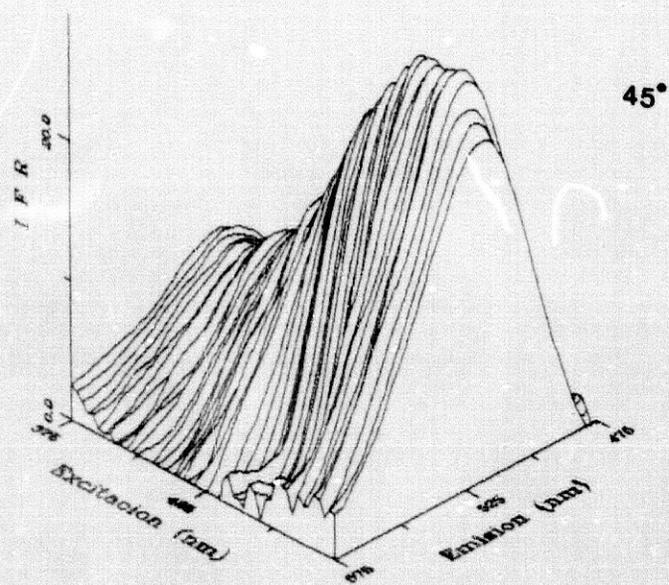
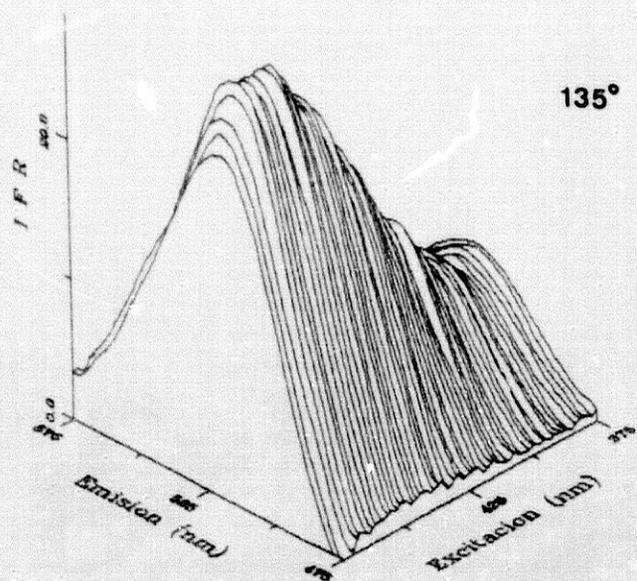
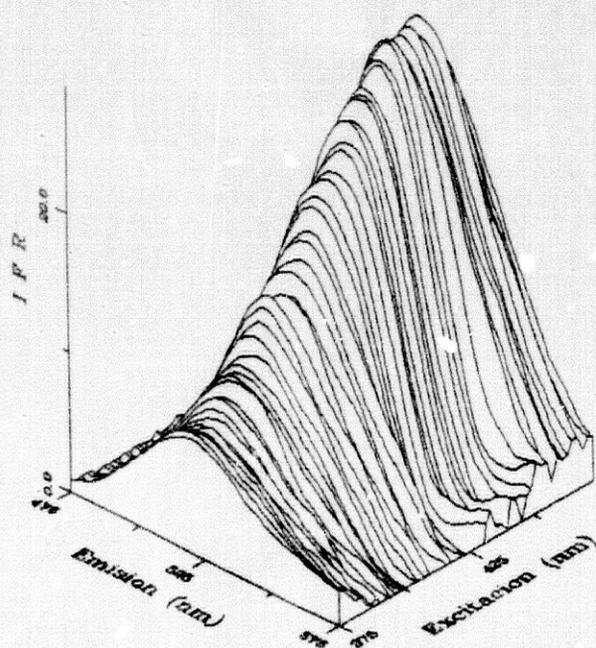


Figura IV.8. Espectro de luminiscencia total del sistema visto según diferentes ángulos de rotación alrededor del eje Z.



135°



315°

Figura IV.9. Espectro de luminiscencia total del sistema visto según diferentes ángulos de rotación alrededor del eje Z

IV.5.3. Curvas de nivel

Un segundo método para representar los espectros de luminiscencia total es en forma de curvas de nivel o topogramas. Esta posibilidad también está contemplada en las opciones del Golden. En las figuras IV.10 y IV.11, se representan los topogramas del sistema una vez restado del blanco y del blanco. Como puede observarse los dos ejes normales representan las longitudes de onda de excitación y de emisión mientras que las intensidades se expresan con una serie de curvas de nivel.

Este sistema presenta ventajas importantes pues permite, entre otras cosas, determinar el máximo del sistema con gran precisión.

Como puede observarse en la figura IV.10, el sistema presenta un máximo de emisión a 525 nm y un máximo a una longitud de onda de excitación de 457 nm.

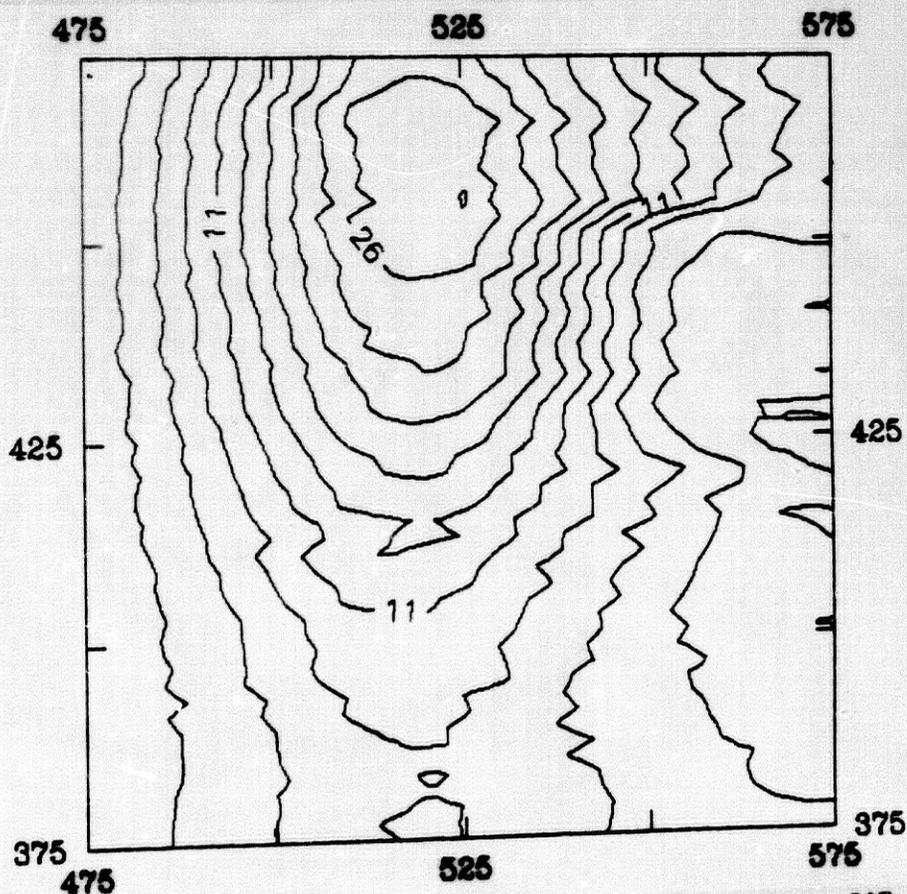


Figura IV.10. Topograma de la diferencia del sistema QAB A.25-morina-Be(II)

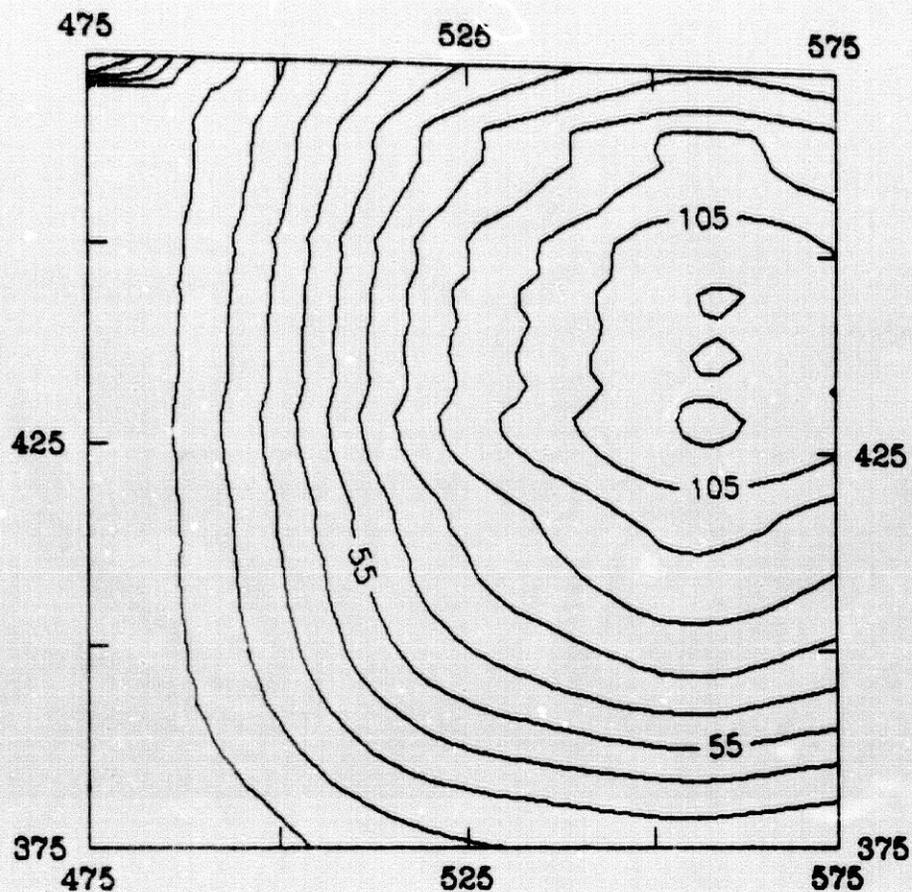


Figura IV.11. Topograma del blanco

IV.5.4. Espectros bidimensionales en fase resina

El espectro de luminiscencia total, como se ha indicado anteriormente, nos permite tener una visión global del comportamiento fluorescente del sistema y poder elegir las características espectrales óptimas extrayendo, mediante la opción correspondiente del programa utilizado, los espectros de excitación y emisión más intensos del conjunto. En nuestro caso según se observa en la figura anterior esto coincide con el espectro de excitación y emisión que se representan en la figura IV.12.

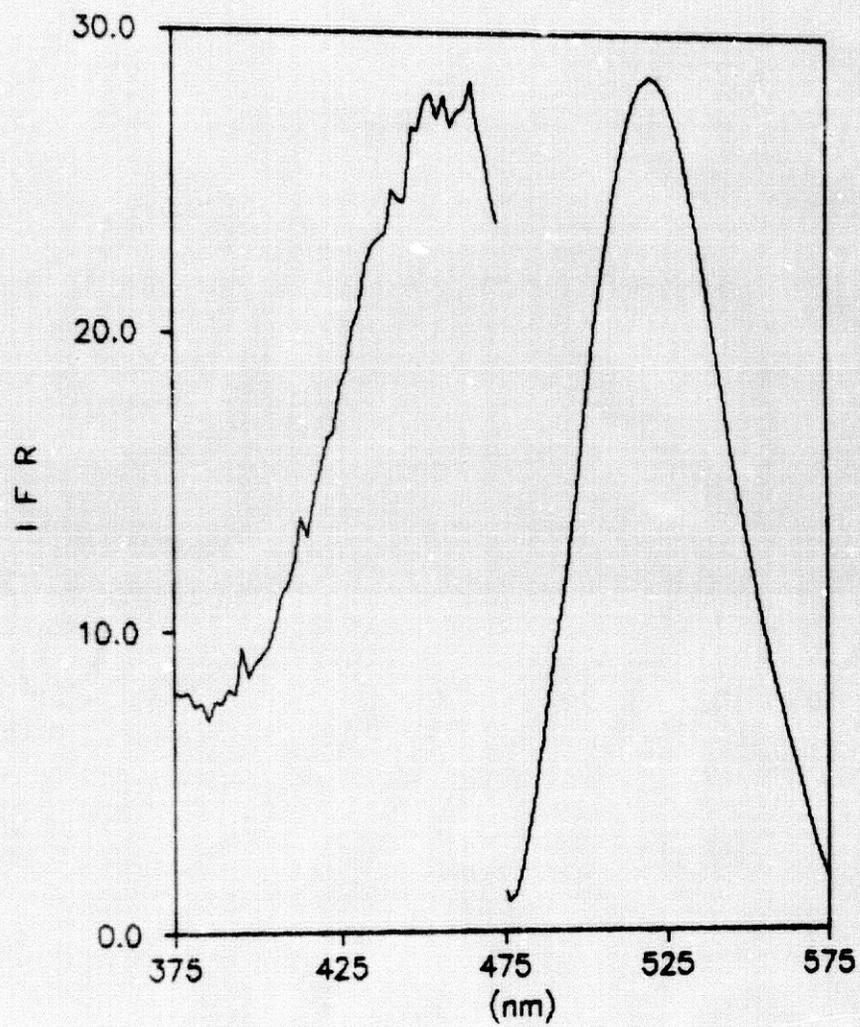


Figura IV.12. Espectros de excitación y emisión del sistema QAE-morina-Be(II)

IV.5.5. Espectros bidimensionales en disolución

Con objeto de estudiar las variaciones que en sus características espectrales pueda sufrir el sistema como consecuencia de su fijación en la resina se han obtenido también los espectros de excitación y emisión del sistema morina-Be(II) en disolución.

Para ello, en un matraz aforado de 50 mL se introdujeron 2.5 mL de disolución de Be(II) de 1 mg.L^{-1} , 2 mL de disolución etanólica de morina al 0.02 %, la cantidad de NaOH necesaria para obtener un pH = 11.50 en agua bidestilada hasta enrasar. Se preparó asimismo un blanco que no contenía berilio.

Las longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión se han obtenido realizando un "pre-scan" secuencial de excitación y emisión, lo que nos permite conocer las longitudes de onda de dichos máximos. Se obtuvieron valores para la longitud de onda de excitación y emisión hasta conseguir una pareja de valores que se repitiera un número de veces representativo.

Las condiciones operatorias para el registro de los espectros fueron: $\lambda_{exc} = 443 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm y factor de sensibilidad 0.8.

La figura IV.13 muestra los espectros obtenidos. De su observación puede deducirse que el espectro de excitación presenta un máximo a la longitud de onda de 443 nm, mientras que el de emisión tiene un máximo a una longitud de onda de 525 nm, por lo que representa un desplazamiento de Stokes 3525.74 cm^{-1} .

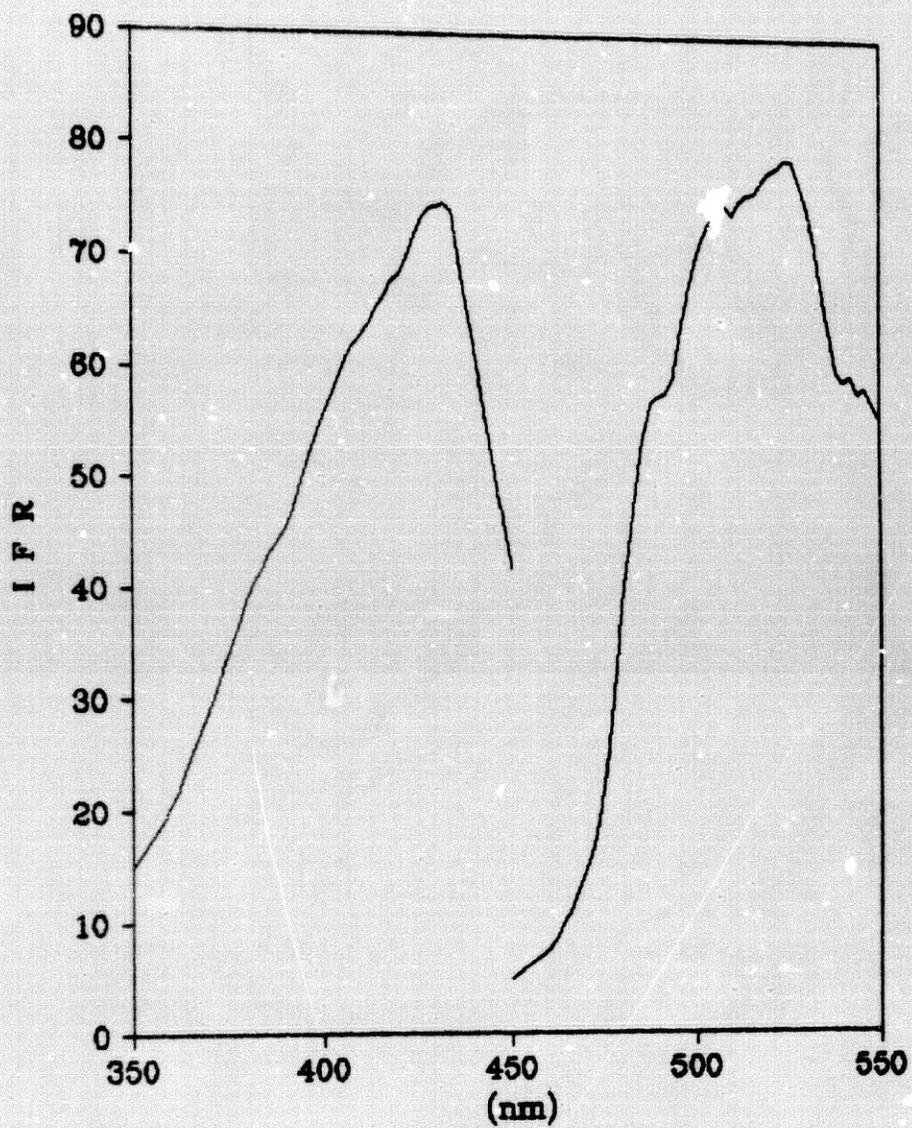


Figura IV.13. Espectros de excitación y emisión del sistema morina-Be(II) en disolución

La comparación de las anteriores figuras IV.12 y IV.13, donde se muestran los espectros de excitación y emisión del sistema morina-Be(II) en disolución y en fase resina, nos permite obtener las siguientes conclusiones:

1) Las longitudes de onda de los máximos de emisión son idénticos para el sistema en disolución y en fase resina (525 nm). Esto nos hace pensar que el complejo es relativamente insensible a su ambiente.

2) La longitud de onda del máximo del espectro de excitación en fase resina ($\lambda_{exc} = 457$ nm) sufre un ligero desplazamiento hacia longitudes de onda mayores con respecto a la observada en disolución ($\lambda_{exc} = 443$ nm).

Este comportamiento es similar al observado por M.A. Ditzler y col., en la fijación de quelatos de aluminio en silicagel (25).

IV.6. DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DEL ESTADO EXCITADO

La fluorescencia se distingue experimentalmente de la fosforescencia por la duración del tiempo de vida media del proceso de relajación. Así, para la fluorescencia los valores están comprendidos entre 10^{-9} y 10^{-7} segundos, mientras que para la fosforescencia el intervalo varía entre 10^{-6} y 10^{-2} segundos, generalmente dependiendo de la estructura de la molécula.

Si consideramos la excitación de una sustancia fluorescente con un destello de luz de duración infinitesimal, la variación del número de moléculas excitadas en el tiempo viene dado por (26):

$$dN(t)/dt = -(\gamma + k) \cdot N(t)$$

donde: γ es la velocidad del proceso de relajación radiativo
 k es la velocidad del proceso de relajación no radiativo.

Integrando la anterior ecuación, teniendo en cuenta que para $t = 0$, $N = N_0$, queda:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{ó} \quad I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

donde $\tau = (\gamma + k)^{-1}$ es el tiempo de vida media del estado excitado.

Representando $\ln N$ ó $\ln I$ (puesto que son proporcionales) frente a t , se obtiene una línea recta, cuya pendiente negativa coincide con la inversa de τ .

$$\ln I = \ln I_0 - t/\tau$$

Para la determinación experimental del tiempo de vida media se ha empleado el mismo espectrofluorímetro que hemos utilizado en experiencias anteriores (PERKIN-ELMER Mod. LS 5), aparato provisto de una lámpara de Xenon de baja potencia pulsante.

En la figura IV.14 se representa la luminiscencia del destello de la lámpara y la luminiscencia de la muestra. Hemos fijado el tiempo de vida media del fotomultiplicador en 0.1 milisegundo.

Para variar la fluorescencia de la muestra a distintos tiempos, basta con variar t en el intervalo de 0.01 milisegundo a varios milisegundos.

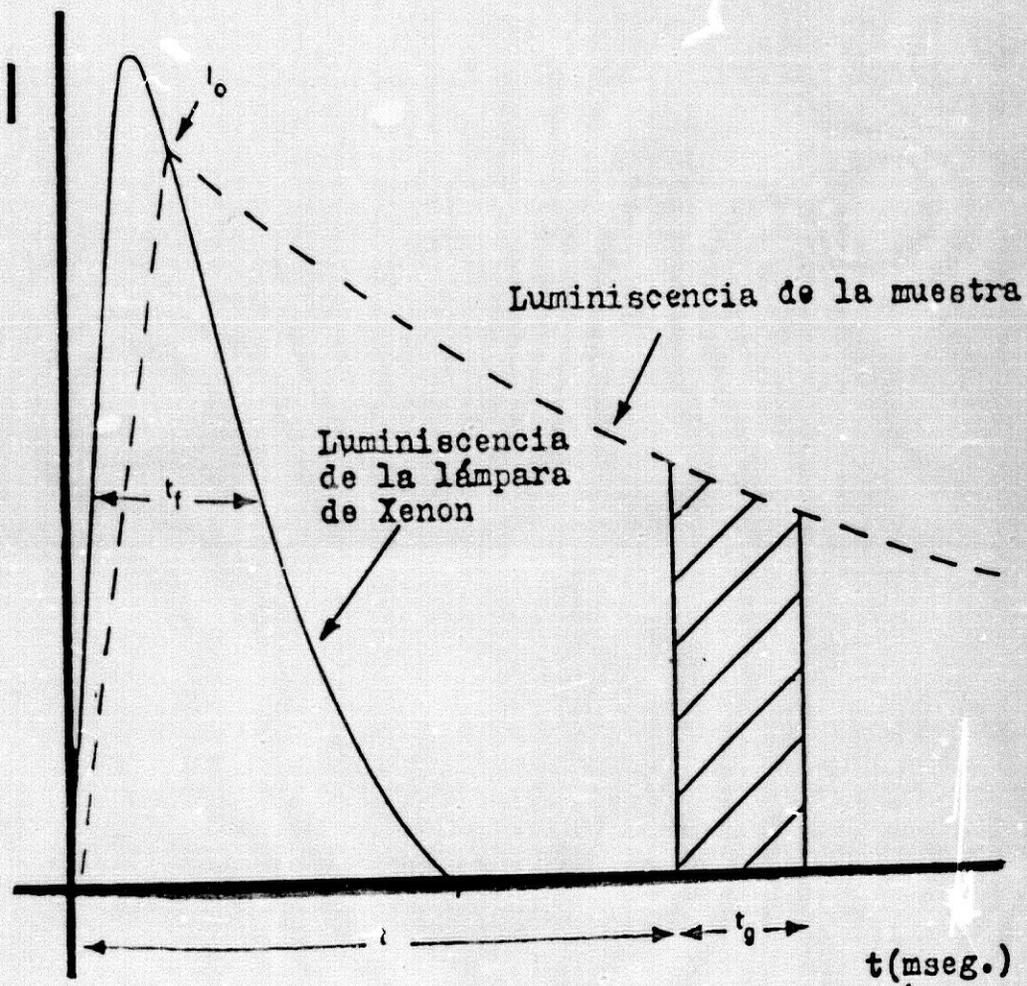


Figura IV.14. Diagrama de los fenómenos que tienen lugar durante la excitación de una muestra con una lámpara de Xenon pulsante

t : Tiempo de comienzo de la medida.

t_g : Tiempo de medida del detector.

t_r : Anchura del pico de la lámpara de Xenon a la intensidad mitad de la máxima.