

FLUORESCENCIA EN AZUCARES

N. Martínez Díaz-Páez*

Laboratorio de Sucroquímica, Departamento de Cinética Química,

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 27 de junio de 1983

ABSTRACT. Many papers have been written about fluorescence, fluorescent compounds and fluorimetric analysis related to different types of organic compounds, but only a few reports refer to these aspects in the sugar field. The present work is a review of fluorescent derivatives and fluorimetric analysis in sugars, and in commercial products of sugar industry. Research about the formation of fluorescent compounds from sugars in different reaction conditions is included.

RESUMEN. Se han escrito numerosos artículos acerca de la fluorescencia, los compuestos fluorescentes y el análisis fluorimétrico relacionado con diversos tipos de compuestos orgánicos, pero son pocos los que se refieren a estos aspectos en el campo de los azúcares. El presente trabajo constituye una revisión de lo que se ha escrito acerca de los derivados fluorescentes y del análisis fluorimétrico de azúcares puros, así como de la fluorescencia en productos de la industria azucarera, incluyendo investigaciones relacionadas con la formación de compuestos fluorescentes a partir de azúcares en diferentes condiciones de reacción.

INTRODUCCION

A mediados del siglo XVII se encontró una de las primeras referencias del fenómeno de fluorescencia en solución¹, pero no fue hasta dos siglos después que Sir George Stokes² establece una distinción clara entre este fenómeno y los de dispersión de la luz, señalando que se fundamenta en una absorción y re-emisión a diferente longitud de onda. También a él se debe el nombre, derivado de la fluorita (F_2Ca), por presentar algunas de sus formas esta propiedad.

A partir de la década del 50, el desarrollo de la instrumentación y, en particular, de detectores suficientemente sensibles, permitió la aplicación del análisis de fluorescencia, tanto a compuestos que por su naturaleza presentan esta característica (fluorescencia nativa), como a aquéllos que la exhiben después de ser modificados químicamente (fluorescencia químicamente inducida).

La alta sensibilidad de los fotomultiplicadores modernos permite la estimación de la concentración de sustancias fluorescentes en un rango de valores por debajo de 10^{-10} mol/L.

En los últimos veinte años, se cuentan por cientos, anualmente, las referencias hechas sobre el análisis fluorimétrico, con alto grado de sensibilidad y selectividad, en el campo de los complejos metálicos, iones inorgánicos, lípidos, aminoácidos, proteínas, enzimas, esteroides, vitaminas, purinas, pirimidinas, porfirinas, medicamentos, drogas, hidrocarburos aromáticos y sus derivados, insecticidas, herbicidas, hormonas, alimentos, aditivos, colorantes y compuestos orgánicos oxigenados.

Según la teoría de la luminiscencia y los requerimientos para que un compuesto orgánico flurezca,

los carbohidratos en general, y los azúcares en particular, no pueden ser fluorescentes, es decir, no pueden exhibir fluorescencia nativa.

Por otro lado, existe una amplia información acerca de la aplicación del análisis de fluorescencia en el campo de los carbohidratos mediante la obtención de derivados que sí tienen esta propiedad, a partir de reacciones enzimáticas y químicas.

Es muy conocido el hecho de que los azúcares comerciales obtenidos a partir de la caña de azúcar presentan fluorescencia, debida ésta, desde luego, a impurezas presentes en el producto. Esta fluorescencia es generalmente atribuida a pigmentos naturales de la caña, que son fluorescentes.

Hasta hace pocos años, la formación de sustancias fluorescentes en reacciones de degradación de azúcares había sido muy poco abordada y a su vez, circunscrita a un tipo particular de reacción y a un tipo determinado de azúcares.

En trabajos más recientes se ha comprobado la formación de sustancias fluorescentes en reacciones de degradación de azúcares reductores, en medio ácido y en medio alcalino; se han observado importantes relaciones entre la medida de fluorescencia y la de color o la de formación de ácidos; se ha caracterizado la fluorescencia de estas complejas mezclas de reacción; se ha establecido la semejanza entre los sistemas modelo de degradación de azúcares y distintos productos intermedios de la industria azucarera, desde el punto de vista de las características de fluorescencia. Por último, se ha estudiado la aplicación del método fluorimétrico como análisis de alta sensibilidad en la determinación de la medida de degradación de azúcares reductores o de las impurezas presentes en productos de la industria azucarera.

*Dirección actual: Dirección de Caña, Azúcar y Derivados, ACC, Ciudad de La Habana, Cuba

Principios básicos del fenómeno de luminiscencia^{1,3,4}

La emisión de luz por una molécula que ha sido previamente excitada mediante la absorción de cualquier tipo de radiación (luz UV, calor, rayos X o infrarrojos, etc.), se define con el término genérico de luminiscencia. Lo más común es que se produzca por absorción de luz UV aunque no todas las bandas del espectro de absorción UV son capaces de producir luminiscencia. Esta, por su naturaleza, se clasifica en dos formas diferentes: fluorescencia y fosforescencia.

A temperatura ambiente, la energía térmica es insuficiente para excitar las moléculas de una sustancia y éstas yacen en el estado base, es decir, que los electrones están distribuidos de tal forma que la energía es mínima.

En una molécula normal, con número par de electrones el estado base es singlete y se define por S_0 ; los electrones están apareados, o sea, que hay tantos electrones con spin $s = +1/2$ como con spin $s = -1/2$; el spin resultante es entonces 0. La multiplicidad relacionada con el spin resultante S por la expresión $2S + 1$, expresa el momento angular orbital de un estado dado de un átomo o de una molécula. En el estado base S_0 , la multiplicidad es 1.

Cuando una molécula absorbe cualquier forma de energía, por ejemplo, luz UV, se excita a un estado electrónico más alto; lo más probable es que ninguno de sus electrones varíe su spin, estando, en este caso, todos los electrones también apareados en el estado excitado, S_1 , siendo así, la multiplicidad 1 y el estado singlete. La transición del estado S_0 al primer estado excitado S_1 , transcurre en un tiempo muy corto, 10^{-15} s y dependiendo de la energía de los fotones puede terminar en cualquiera de los subniveles vibracionales de S_1 . En un sistema denso (sólido, líquido o gaseoso a alta presión), la energía vibracional es efectivamente disipada por interacción con el medio circundante, de tal forma que la molécula excitada, en un tiempo corto, de 10^{-13} a 10^{-12} s, alcanza el nivel vibracional más bajo de S_1 . El retorno al estado base S_0 puede ser una transición directa, con emisión de luz de una energía menor que la de absorción y, por tanto, en una longitud de onda mayor, (Ley de Stokes); ésta es la **fluorescencia**. Esta transición de S_1 a S_0 tiene lugar en un período de τ de 10^{-8} a 10^{-9} s.

Por otra parte, cuando por cualquier perturbación, un electrón invierte su spin en una transición, la molécula se encuentra entonces con dos electrones no apareados ($S = 1/2 + 1/2 = 1$), cada uno ocupando un orbital diferente; la multiplicidad, en este caso, tiene un valor de 3 y la molécula se encuentra en un nivel electrónico triplete que es un estado metaestable.

La fosforescencia envuelve una transición desde el estado triplete T_1 al estado base S_0 . La transición del estado base al estado triplete T_1 es altamente improbable (prohibida). Sin embargo, por un proceso de conversión interna en el estado excitado, (inversión de spin), la molécula puede sufrir una transición de S_1 a T_1 con alguna probabilidad, ya que la energía del subnivel vibracional más bajo de T_1 es menor que la de S_1 . Las moléculas en el estado excitado T_1 pueden retornar al estado base S_0 a través de S_1 solamente si adquieren energía del medio circundante, por ejemplo, calor; en este caso, la luz emitida es la misma que en la fluorescencia, pero el tiempo de vida del estado excitado es mayor que 10^{-8} s. Esto se denomina fluorescencia retardada.

A bajas temperaturas la energía térmica es insuficiente y el retorno al estado base sólo se efectúa a tra-

vés de la transición prohibida de T_1 a S_0 . Como esta transición tiene muy poca probabilidad, el estado excitado T_1 persiste por un tiempo relativamente largo, hasta varios segundos a temperaturas ordinarias. El tipo de emisión producida en este proceso es **fosforescencia**.

No todas las moléculas que absorben luz son capaces de fluorescer, es decir, retornar al estado base mediante la emisión fotónica desde el primer estado excitado S_1 . Para que este fenómeno tenga lugar se requieren determinadas propiedades estructurales moleculares que posibiliten el carácter de las transiciones electrónicas.

El conocimiento actual de los requerimientos estructurales para que una sustancia presente fluorescencia es eminentemente empírico y en los compuestos orgánicos se destacan tres factores fundamentales: la naturaleza del esqueleto de carbono, la disposición geométrica de la molécula y el tipo y posición de los sustituyentes.

Los compuestos orgánicos saturados no son normalmente fluorescentes en estado sólido o líquido, en el UV cercano o en el visible.

Por lo general, los compuestos fluorescentes contienen, en su estructura, un sistema conjugado de dobles enlaces, pero no todos los compuestos que tienen conjugación son fluorescentes. Al aumentar la extensión de la conjugación se producen dos factores fundamentales: desplazamiento de la longitud de onda de absorción y, por tanto, también la de fluorescencia hacia el rojo del espectro.

Las moléculas que contienen los dobles enlaces en estructuras cíclicas fluorescen con mayor intensidad que aquéllas que los contienen en una cadena abierta.

Un mayor cantidad de anillos aromáticos en la estructura conlleva también un aumento de intensidad de fluorescencia.

La planaridad del sistema conjugado parece ser esencial para que tenga lugar una máxima fluorescencia. Cuando existen factores estéricos que entorpecen la planaridad y con ello, la libre movilidad de los electrones π la fluorescencia disminuye. La rigidez molecular es también un factor necesario para lograr un máximo de intensidad de fluorescencia. Si la molécula no es rígida, la energía absorbida puede disiparse en forma de calor. Esta necesaria rigidez explica también la mayor fluorescencia que se le atribuye a los sistemas cíclicos frente a los sistemas de cadena abierta.

La medida en la cual un sustituyente particular afecta o modifica las propiedades fluorescentes de un sistema conjugado, depende mayormente de su efecto en la estructura electrónica de la molécula. En general, los sustituyentes electrodonantes (positivamente mesoméricos), aumentan la movilidad de los electrones y aumentan la fluorescencia, mientras que los grupos que atraen electrones la disminuyen.

Otros requerimientos para que exista el fenómeno de fluorescencia son de carácter electrónico. La longitud de onda más larga dentro del espectro de absorción es la que corresponde a la transición $n \rightarrow \pi$ o $\pi \rightarrow \pi^*$. Además, cuando las moléculas absorben radiaciones de frecuencias de alta energía (longitud de onda corta), están propensas a la predisiociación (ruptura de enlaces). Por otra parte se sabe que las sustancias en las cuales la longitud de onda de absorción mayor corresponde a una transición $n \rightarrow \pi^*$, (moléculas que contienen un heteroátomo como el oxígeno, el nitrógeno, azufre) también pueden ser fosforescentes.

El estado excitado singlete es relativamente sensible a los procesos de desactivación por lo que debe tener una vida media (τ) de alrededor de 10^{-8} s. Una

vida media mayor favorece los procesos de cruzamiento entre sistemas al estado triplete; una vida media más corta implica que existan procesos eficientes de desactivación de la molécula.

La fluorescencia de una sustancia puede también afectarse por factores externos, tales como la influencia de otras moléculas, el pH, la temperatura. Los factores instrumentales también afectan la percepción de la fluorescencia.

La expresión matemática que permite calcular la intensidad de fluorescencia de una sustancia está relacionada con la definición de ésta, la cual establece que la luz es absorbida en una longitud de onda y emitida en otra.

$$I = I_0 Q$$

donde:

I intensidad de la luz emitida o intensidad de fluorescencia

I_0 intensidad de la luz absorbida

Q rendimiento cuántico de fluorescencia el que está dado por:

$$Q = \frac{\text{número de cuantos emitidos}}{\text{número de cuantos absorbidos}}$$

Los valores de Q fluctúan entre 0 y 1. Pocos compuestos tienen un rendimiento cuántico con valor cercano a 1. Por lo general, el valor del rendimiento cuántico en los compuestos fluorescentes es bajo.

Para muchos compuestos el valor de Q no ha sido determinado porque en la práctica es muy difícil obtener una medición exacta, ya que la luz emitida no es igual en todas las direcciones y para las moléculas se obtiene una banda ancha que tiene que ser medida con fotodetectores cuya respuesta no es igual en todas las longitudes de onda. Además, la intensidad de la luz emitida (I) y la intensidad de la luz excitadora (I_0), corresponden a distintas longitudes de onda y son de diferentes órdenes de magnitud. Por esta razón, en la práctica, se utiliza un patrón y se expresa la intensidad de fluorescencia en unidades relativas (I_r). Este procedimiento cancela, además, los efectos que puedan introducir los factores geométricos del equipo utilizado. Generalmente, se emplea como patrón el sulfato de quinina en solución acuosa ácida en concentraciones hasta de 10^{-9} g/mL que tiene un rendimiento cuántico hasta 0,8.

Comparando las tres ecuaciones básicas para calcular la intensidad de fluorescencia:

$$I = I_0 Q \quad (1)$$

$$I_0 = I_0 (1 - T) \quad (2)$$

$$(1 - T) = 2,3 \epsilon cd \quad (3)$$

donde:

I_0 intensidad de la luz absorbida

T transmitancia

c concentración de la solución

d longitud del paso óptico

ϵ coeficiente de extinción molar

Se tiene que:

$$I = I_0 2,3 \epsilon cd \quad (4)$$

En un equipo particular y para una sustancia fluorescente determinada ϵ , d y Q son constantes, por lo que la ecuación (4) se puede expresar en la forma:

$$I = I_0 k o \quad (5)$$

Así, la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de la sustancia fluorescente dentro del rango de 10^{-6} a 10^{-10} g/mL.

En los espectrofluorímetros, cuyos elementos discriminadores de las longitudes de onda de excitación y de emisión respectivas (primaria y secundaria), pueden ser filtros o monocromadores, la luz que llega al detector es la luz emitida o fluorescencia y el espectrograma de fluorescencia es un diagrama de intensidad contra longitud de onda; si por otra parte, se fija el analizador en la longitud de onda correspondiente al máximo de fluorescencia y la luz excitadora es variada dentro del rango de absorción, se obtiene el espectrograma de excitación.

Derivados fluorescentes y análisis fluorimétrico aplicado en el campo de los carbohidratos

Existe una amplia información acerca de la aplicación del análisis de fluorescencia en el campo de los carbohidratos mediante la obtención de derivados a partir de reacciones enzimáticas y químicas.

La detección fluorimétrica de glucosa en sangre, en orina o en otros medios biológicos, previa reacción enzimática, ha sido descrita⁶⁻¹³ con frecuencia.

De la misma forma, otros carbohidratos (cetosas, oligosacáridos y polisacáridos) se han hecho accesibles al análisis por fluorescencia^{14,15}.

Diversos métodos químicos han sido empleados para obtener derivados fluorescentes de carbohidratos, fundamentalmente de monosacáridos y lograr su detección en papel, capa delgada¹⁶⁻¹⁸, columna¹⁹, así como disuelto en el mismo medio químico e incluso biológico²⁰.

La combinación de los métodos enzimático y químico ha sido empleada en el análisis fluorimétrico de glucosa en sangre²¹.

Algunos autores han observado que la glucosa en solución de hidróxido de sodio al 5 %, calentando en baño de agua, produce una fluorescencia verde después de 5 min, sin embargo, en solución al 10 % de ácido clorhídrico, aún después de 5 h, no produce fluorescencia, la que si aparece en cuanto se alcaliniza la solución^{22,23}. (Esto se explica por el efecto "apagador" que ejerce el ion cloruro sobre la fluorescencia, pues como se expone más adelante, algunas investigaciones han demostrado que los azúcares se degradan tanto en medio ácido como en medio alcalino, dando compuestos fluorescentes). También en ácido clorhídrico, al que se le haya adicionado una solución al 1 % de orcinol, la glucosa produce un color amarillo-rojizo que una vez extraído con alcohol produce una fluorescencia verde^{23,24}.

Por otra parte, la fructosa, la arabinosa y la ramnosa, al ser calentadas en una solución de oxícloruro de zirconio producen una fluorescencia verde, mientras que los alditos no reaccionan.

Las aldosas y metil-pentosas, al ser calentadas con ácido clorhídrico y resorcinol, producen un compuesto, que al disolverse en alcohol, produce fluorescencia verde^{23,24}.

La fructosa, al calentarse con partes iguales de resorcinol y ácido clorhídrico produce un precipitado rojo que se disuelve en alcohol; al añadir carbonato de sodio da una solución naranja que al ser extraída con

alcohol amílico, produce una fluorescencia que varía entre el rojo y el verde^{23,24}.

Para la detección de sacarosa en leche, Radley y Grand emplearon la técnica de resorcinol en ácido clorhídrico; al calentar se produjo una fluorescencia rojiza, cuya intensidad correspondió con la cantidad de sacarosa presente²⁵.

Amati y Bolzano²⁶ examinaron distintos azúcares, tanto en estado cristalino como disueltos en agua, alcohol y éter y plantearon que las diferencias observadas podrían servir como un medio para realizar su identificación.

Déribère²⁷ observó que la fluorescencia azul de la sacarosa se desviaba hacia la región amarilla en un grado que dependía del contenido de azúcares invertidos.

Recientemente, algunos investigadores desarrollaron técnicas analíticas de azúcares basadas en su reacción con etilendiamina²⁸⁻³⁰. Los azúcares reductores, al reaccionar con sulfato de etilendiamina en solución amortiguadora de fosfato, producen una fluorescencia con máximos de excitación y de emisión en 400 y 465 nm respectivamente. Estas reacciones han sido aplicadas en la microdeterminación de azúcares reductores³¹.

Los ácidos urónicos, por otro lado, cuando reaccionan con sulfato de etilendiamina en solución de acetato, en distintas condiciones, producen fluorescencia con máximos de excitación y de emisión en 328 y 406 nm respectivamente. La microdeterminación de ácidos urónicos se hace posible en un rango de $0,5 \cdot 10^{-2}$ a $2 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{mol/mL}$ sin interferencia de otros carbohidratos³².

La formación de sustancias fluorescentes en las soluciones de fructosa, tratadas con ácido para la formación de hidroximetilfurfural, fue descrita por Yoshihiro y Hashimoto³³, quienes observaron la formación de una sustancia fluorescente verde fundamentalmente a partir de azúcares que tenían en su estructura la forma furanósica, tales como: fructosa, sacarosa y rafinosa. Hashimoto caracterizó las sustancias fluorescentes por métodos espectroscópicos y cromatográficos y comprobó la similitud de ellas aún proveniente de distintos azúcares de estructura furanósica³⁴. Estudió el efecto de algunos alcoholes en la formación de las sustancias fluorescentes en condiciones de reacción de los azúcares³⁵ en medio ácido. Encontró correlación entre la fluorescencia y el color en las soluciones de fructosa a $\text{pH} < 2$. El resultado de estos experimentos sin embargo, no permitió definir claramente si las sustancias fluorescentes son precursoras de las sustancias coloreadas³⁶.

Continuando las experiencias, Hashimoto comprobó la formación de una sustancia fluorescente verde en el tratamiento de la fructosa con ácido clorhídrico 3 mol/L, la cual mostró un máximo de absorción entre 410 y 420 nm y un pico de fluorescencia alrededor de 510 nm. La sustancia fluorescente, aislada por cromatografía de capa delgada, mostró una reducción de su intensidad de fluorescencia, ("apagamiento"), al ser tratada con hidroxilamina, así como en la hidrogenación con paladio, lo que sugiere al autor la presencia de grupos carbonilo³⁷ en la molécula de aquella. Soluciones acuosas de la sustancia fluorescente, también muestran una disminución de la intensidad de fluorescencia en presencia de distintos agentes³⁸, tales como: aire, oxígeno, agua oxigenada e incluso el ion Fe(III) en medio ácido.

Posteriormente, Carpenter y Roberts³⁹ llegaron a la conclusión de que la sustancia fluorescente verde que se forma conjuntamente con hidroximetilfurfural en la reacción de fructosa en medio ácido, descrita por

Yoshihiro y Hashimoto³³, es la misma 3,4-dideoxiglucosulosa-3-eno (DGU) que Anet⁴⁰ demostró que existía —en sus dos configuraciones *cis* y *trans*—, en las mezclas de la degradación de fructosa en medio ácido y que evaluó como precursores inmediatos de hidroximetilfurfural.

Se ha discutido también la formación de sustancias fluorescentes, a partir de la reacción de azúcares con aminoácidos a bajos valores de pH ^{41,42}.

El fenómeno de la fluorescencia en productos de la industria azucarera

La fluorescencia que se produce por irradiación ultravioleta de las fracciones separadas por electroforesis de alto voltaje, en distintos productos de la industria azucarera ha sido descrita en los trabajos de Gross^{43,44}, de Farber y col.⁴⁵ y Farber y Carpenter⁴⁶.

Wall y Carpenter⁴⁷ realizaron un estudio exploratorio con la finalidad de caracterizar la fluorescencia de distintos productos de la industria azucarera y decidir la posible sustitución del método colorimétrico por el fluorimétrico. En estos trabajos, la fluorescencia observada, es generalmente atribuida a los pigmentos naturales de la caña que son fluorescentes y que persisten después de la refinación. Posteriormente, Charles⁴⁸ describió distintos tipos de colorantes fluorescentes, su comportamiento con el pH y su correlación con el color.

Los pigmentos naturales están constituidos generalmente por compuestos fenólicos polisustituídos con cadenas insaturadas y terminales carboxílicos. De esta naturaleza son los ácidos siguientes: clorogénico, cafeico, resultante de la hidrólisis del primero; p-hidroxicinámico, sináptico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico); así como la umbeliferona, que es la lactona correspondiente al ácido *cis*-2,4-dihidroxicinámico y otros como los derivados del ácido benzoico, tales como el p-hidroxibenzoico y el vanílico (4-hidroxi-3-metoxibenzoico).

Muchos años antes, varios autores^{49,50} se habían referido a la fluorescencia observada en azúcares comerciales, al ser excitados con luz UV. Lewis advirtió⁵⁰ que toda fluorescencia observada en azúcares debía ser juzgada muy críticamente, a menos que la muestra hubiera sido de antemano rigurosamente purificada.

Sandera⁵¹ atribuyó la causa de la fluorescencia observada en los productos de la industria azucarera a la destrucción de los azúcares invertidos.

Mezzadrolí y Vareton⁵² investigaron una gama de productos azucareros desde el crudo hasta el refino, pero no dieron detalles de todas las características de fluorescencia.

Lunden⁵³ examinó la fluorescencia de un número de azúcares comerciales, tanto en estado sólido como en solución, por medio de una serie de filtros diferentes. En azúcares, con menos de 0,003 % de ceniza, no se apreciaba fluorescencia, sin embargo, ésta se intensificaba en un tono violeta con la adición de otra sustancia coloreada no fluorescente.

En un trabajo posterior⁵⁴, analizó la fluorescencia de varios productos azucareros y correlacionó ésta con la concentración de protones, el contenido de ceniza y las características espectroscópicas correspondientes.

Otros autores^{27,55-57} han trabajado en azúcar y en mieles.

Investigaciones recientes en el estudio de la fluorescencia en productos de la industria azucarera y en reacciones de degradación de azúcares reductores.

Estudios realizados recientemente⁵⁸⁻⁶³ han demostrado la similitud que existe en las características de la fluorescencia observada en productos intermedios y finales de la industria azucarera y en reacciones de degradación de azúcares reductores; tanto en medio ácido como alcalino.

El guarapo clarificado, la meladura, la miel final y el crudo presentan un máximo de excitación en 390 nm y una banda ancha de poca intensidad entre 300 y 350 nm, cuyos máximos de fluorescencia se encuentran en 440 y 490 nm. Estas mismas características espectrales se observan como resultado de la degradación ácida de sacarosa y de glucosa (pH 5; 90 a 100 °C) y de la degradación alcalina de glucosa (pH 8 a 10; 70 a 90 °C). La presencia de aminoácidos en estos sistemas modelo no altera las características de fluorescencia observada en los casos anteriores.

Estas experiencias demuestran que en la fluorescencia observada en productos intermedios y finales de la industria azucarera (además de la fluorescencia debida a los pigmentos) hay una contribución apreciable que proviene de la degradación de azúcares reductores en las condiciones del proceso fabril.

La degradación alcalina de otros azúcares reductores (DL-gliceraldehído, D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa y D-galactosa) ha mostrado similares características espectrales de fluorescencia a las observadas en el caso de la glucosa, lo que demuestra que se forman sustancias fluorescentes con características similares independientemente del tamaño de la cadena, (triosa, pentosa, hexosa), de la configuración y de la función carbonilo (aldosa o cetosa). Esta similitud de una propiedad (fluorescencia), lograda en condiciones tan diversas, sugirió la posible participación de un intermediario proveniente del azúcar que es capaz de existir tanto en medio ácido como alcalino, como es el caso de la 3-deoxiglicosulosa.

Para probar la hipótesis anterior, se tomó como modelo de la 3-deoxiglicosulosa, la cual después de ser sintetizada y purificada se sometió a condiciones de reacción ácida y alcalina, observándose, en ambos casos, la similitud de características de fluorescencia con las observadas en los casos anteriores.

El sistema modelo de degradación de glucosa en medio alcalino, se estudió más detenidamente en relación con el fenómeno de la fluorescencia, observándose los aspectos siguientes:

La presencia de distintas especies o sustancias fluorescentes, siendo las fundamentales las que tienen sus máximos de excitación en 310; 350; 360 y 390 nm con los correspondientes máximos de emisión o de fluorescencia en 350; 420; 440 y 430 a 480 nm, respectivamente.

A una de las especies predominantes (excitación en 310 nm, fluorescencia en 350) aislada en Biogel P-2, se le determinó el tiempo de vida media τ , obteniéndose dos valores: 3,5 ns $\pm$ 1 ns y 10 ns $\pm$ 1 ns. Este hecho indicó que la fracción estaba en realidad compuesta por dos sustancias fluorescentes, con idénticas características espectrales.

Una correlación lineal entre la medida de la intensidad relativa de fluorescencia y la medida de forma-

ción de ácidos, así como entre aquella y la absorbancia en 420 nm, como medida de color en el transcurso de la reacción.

Cada uno de estos tres parámetros, medidos en intervalos iguales durante el transcurso de la reacción, demuestran que responden a una cinética de primer orden con distintas constantes de velocidad aparentes.

Como se demostró que la fluorescencia es una medida de la degradación de azúcares reductores, se abre una perspectiva de estudio hacia la aplicación del método fluorimétrico a una amplia gama de procesos donde se encuentran presentes estos productos naturales.

BIBLIOGRAFIA

1. Bowen E. J. "Luminiscence in Chemistry". 77 D. Van Nostrand Co. Ltd. London, 1968.
2. Stokes G. *Phil. Trans.*, 143, 63, 1952.
3. Parker C. A. "Fluorescence of solutions", Elsevier Publishing Co. Amsterdam, London, New York.
4. Florkin M. *Comprehensive Biochem.*, 3, 169, 1962.
5. Underfriend S. Fluorescence assay in Biology and Medicine. Academic Press, London, New York, 1962.
6. Seiter C. W., Hill H. D. and Summer G. K. *Clin. Chem.* 19, 1 296, 1973.
7. Nishi H. H. and Kestner J. S. *Clin. Chem.* 17, 647, 1971.
8. Hochalla N. J. and Hill J. B. *Clin. Chem.* 15, 949, 1969.
9. Williams D. C. and Huff G. F. *Clin. Chem.*, 22, 372, 1976.
10. Maitra P. K. and Estabrook R. W. *Anal. Biochem.* 7, 472, 1964.
11. Schersten B. and Tibbling G. *Clin. Chem.* 14, 243, 1968.
12. Ibid, *Clin. Chem. Acta.*, 18, 383, 1967.
13. Phyllis R. E. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 49, 622, 1968.
14. Guibault O. G., Sadni M. H. and Pérez K. *Anal. Biochem.*, 31, 91, 1968.
15. Passonneau J. V., Gatfield P. D., Schulz D. W. and Lawry O. H. *Anal. Biochem.*, 19, 315, 1967.
16. Smith B. G. *J. Chromatog.*, 82, 95, 1973.
17. Garraway J. L. and Cook S. E. *J. Chromatog.* 46, 134, 1970.
18. Nakni T., Koyama M. and Demura H. *J. Chromatog.* 50, 338, 1970.
19. Weber P., Bernstein I. and Wingler R. J. *Anal. Biochem.* 14, 100, 1966.
20. Ohkura Y., Watanabe Y. and Momose T. *Chem. Farm. Bull.* 19, 1 842, 1971.
21. Bostick D. T. and Hercules D. M. *Anal. Lett.* 7, 347, 1974.
22. Kein G. und Linser M. *Osterr. Bet. Zeit.*, 79, 125, 1930.
23. Dhery C. Abderhalden's "Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden". II, 3,4 (Berlin) Urban und Schwarzenberg, 1930.
24. Abderhalden E. *Biochem. Handlex.*, 2, 313, 1911.

25. Radley J. A. and Grand J. "Fluorescence Analysis in Ultraviolet light". 3rd ed. Van Nostrand Co. Inc. New York, 1949.
26. Amati A. and Bolzano G. *Chimica*, 7, 152, 1931
27. Dériberé M. *Bull. Assoc. Chim.* 55, 2, 1938.
28. Honda S., Kakimoto K., Kakehi K. and Takiura K. *Anal. Chim. Acta*, 64, 310, 1973.
29. Honda S., Matsuda Y., Takahashi M. and Kakehi K. *Anal. Chem.* 52, 1 079, 1980.
30. Mopper K., Dawson K., Liebezeit G. and Hansen H.P. *Anal. Chem.* 52, 2 018, 1980.
31. Honda S., Kakimoto K., Kakehi K. and Takiura K. *Anal. Chim. Acta*, 70, 133, 1974.
32. Honda S., Sudo K., Kakehi K., Yuki H. and Takiura K. *Anal. Chim. Acta*, 77, 199, 1975.
33. Yoshihiro Y. and Hashimoto J. *Nippon Kagaku Zashi*, 87, 1 339, 1969, *Chem. Abstr.*, 67, 91, 047 t, 1969.
34. Hashimoto J. *Nippon Kagaku Zashi* 89, 1 266, 1968.
35. Ibid. 90, 320, 1969, *Chem. Abstr.* 71, 3 596a, 1969.
36. Ibid. 90, 920, 1969, *Chem. Abstr.* 72, 79 366 s, 1970.
37. Ibid. 90, 1 275, 1969, *Chem. Abstr.* 72, 90 762 p, 1970.
38. Hashimoto J. and Yoshihiro Y. *Nippon Kagaku Zashi*, 92, 804, 1971. *Chem. Abstr.* 76, 71 630 k, 1972.
39. Carpenter F. G. and Roberts E. J. *Proc. Tech. Sess. Cane Sugar Ref. Res.*, 106, 1974.
40. Anet E. F. L. J. *Austr. J. Chem.* 18, 240, 1965.
41. Adhikari H. R. and Tappel A. L. *J. Food Sci.*, 38, 486, 1973. *Chem. Abstr.*, 78, 146 383, 1973.
42. Shimisu Y. and Bito M. *Nippon Suissan Cokkaishi*, 39, 551, 1973. *Chem. Abstr.*, 79, 51 913 p, 1973.
43. Gross D. *International Sugar J.*, 69, 323, 1967.
44. Ibid., 69, 360, 1967.
45. Farber L., McDonald S. J., Carpenter F. G. *Proc. Tech. Sess. Cane Sugar Ref. Res.*, 85, 1968.
46. Farber L. and Carpenter F. G. *Proc. Tech. Sess. Cane Sugar Ref. Res.*, 157, 1971.
47. Wall J. H. and Carpenter F. G. *Proc. Tech. Sess. Cane Sugar Ref. Res.* 157, 1971.
48. Charles D. F. *Proc. Tech. Sess. Cane Sugar Ref. Res.*, 93, 1974.
49. Popp G. *Zeit. Unters. Lebensm.*, 52, 165, 1926. *Chem. Ze.tg.* 50, 588, 1926.
50. Lewis S. J. *Nature* 143, 316, 1939.
51. Sandera K. *Zeit. Zuckerind. Czechoslov.*, 51, 237, 1927.
52. Mezzadrolí G., Vareton E. Cong. Naionale Chim. pura o appl., (Firenze, Tuscans), 1929.
53. Lunden H. *Zeit. Angew., Chem.*, 41, 199, 1928.
54. Lunden H. Reuters Riöld S. Store, Svensk. Sucker-fabr. Forenings. Mar. 22nd., 3, 1927.
55. Bruère P. *Ann. Jan.*, 1932.
56. Brieghel-Müller A. Z. *Var. Deut. Zuckerind.*, 82, 141, 1932.
57. Górárd G. *Ann.* 25, 212, 1932.
58. Martínez N. Proc. XVII Simposio Internacional de ISSCT, Filipinas, 1980.
59. Martínez N. *Revista de Ciencias Químicas*, 12, 119, 1981.
60. Ibid. 13, 19, 1982.
61. Ibid., 13, 25, 1982.
62. Martínez Díaz-Páez N. Ibid, 16, 117, 1985.
63. Martínez Díaz-Páez N. Ibid, 16, 127, 1985.

PUBLICACIONES

El análisis de trazas orgánicas requiere la realización de pasos previos con la matriz bajo análisis con el objetivo de enriquecer estos componentes para su análisis cromatográfico. En la obra se discuten los procedimientos que lo permiten: extracción con solventes, técnicas de destilación, extracción gaseosa (headspace), extracción/destilación simultáneas (Linkens-Nickerson) y diferentes métodos de concentración: desorción líquida y técnica de adsorbentes sólidos, congelamiento y fusión por zonas.

La discusión incluye el análisis de las ventajas y desventajas de cada método, técnica experimental, equipos y estudios de recobrado en el rango de trazas.

Consta de 112 páginas, 256 referencias bibliográficas, 14 figuras y 6 tablas.



Editorial CENIC

ASLAMIENTO Y CONCENTRACION DE TRAZAS ORGANICAS VOLATILES EN CROMATOGRAFIA GASEOSA CAPILAR

Alberto J. Núñez Sellés



Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Playa
Apartado Postal 6880 y 6990
Teléf. 21-8066. Ciudad de La Habana, Cuba
Telex: 51-1582 CNIC CU