

Estudio del efecto solvatocrómico en derivados fenólicos naturales

Study of the solvatochromic effect on natural phenolic compounds

ROMERO ALE, E; OLIVES, AI; MARTÍN, L; MARTÍN, MA;* DEL CASTILLO, B.; AGNESE, AM*.; ORTEGA, MG*; NÚÑEZ-MONTOYA, S*; CABRERA JL*

Laboratorio de Técnicas Instrumentales. S. D. de Química Analítica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid (España).

* Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, IMBIV, Ciudad Universitaria, 5000-Córdoba (Argentina).

RESUMEN

Se describen las características espectrofluorimétricas de dos derivados de quercetina aislados de las hojas de *Flaveria bidentis*, un derivado de 6-prenilpinocembrina, aislado de las raíces de *Dalea elegans* y un compuesto de estructura antraquinónica aislado de las hojas de *Heterophyllaea pustulata*. Todos ellos presentan espectros de absorción con máximos en la región UV-visible acordes con los grupos cromóforos presentes en su estructura. Los cuatro compuestos estudiados presentan fluorescencia nativa. La posición de los máximos de emisión de fluorescencia se modifica en función del disolvente. Los desplazamientos producidos están relacionados con el diferente grado de solvatación de las moléculas en estado excitado según la polaridad del disolvente. La adición de ácidos minerales provoca desplazamientos en los máximos de fluorescencia concordantes con los ya descritos para compuestos de estructura similar. Estas modificaciones espectrales tienen un gran interés analítico desde el punto de vista de la identificación y caracterización de productos naturales de estructura fenólica.

PALABRAS CLAVE: Quercetina. Flavonas. Fluorimetría. Solvatocromismo. Quimiotaxonomía.

ABSTRACT

The spectrofluorimetric behaviour of two derivatives of quercetin isolated from the leaves of Flaveria bidentis, a derivative of 6-prenylpinocembrin isolated from the roots of Dalea elegans and an anthraquinonic derivative isolated from the leaves of Heterophyllaea pustulata, is described. The UV-visible absorption spectra of these compounds exhibit the maximum values corresponding to the chromophores present in each structure. All of the compounds studied show native fluorescence in different solvents. The maximum shift in fluorescence emission to the red spectral region when the polarity of the solvents is increased, can be attributed to varying degrees of solvation in the excited state in the different solvents. Additions of small amounts of H₂SO₄ cause shifts in excitation and emission wavelengths, in agreement with those described for compounds with similar chemical structures. Such fluorescent spectral changes are of considerable analytical interest, given that they allow the presence of phenolic compounds in the extracts of natural plant material to be detected easily.

KEY-WORDS: Quercetin. Flavons. Fluorimetry. Solvatochromic effect. Chemotaxonomy.

INTRODUCCIÓN

Existen numerosos productos de origen natural, como proteínas, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos y alcaloides, que exhiben fluorescencia nativa. Entre estos se hallan los compuestos heterocíclicos oxigenados; muchos de ellos pre-

INTRODUCTION

Numerous products, exhibiting native fluorescence, such as proteins, aminoacids, vitamins, nucleic acids and alkaloids, exist in natural form. Among such products oxygenated heterocyclic compounds may be found. Many of these pre-

sentan fluorescencia y algunos tienen un particular interés debido a sus peculiares características espectrofluorimétricas y a la sensibilidad que presentan a su entorno molecular. La mayoría de estos compuestos presentan algún grupo hidroxilo unido a un anillo aromático, lo que las hace extremadamente sensibles a las variaciones del pH del medio. La identificación y cuantificación de estos compuestos fenólicos puede ser de gran ayuda para la clasificación botánica de las especies vegetales (quimiotaxonomía). Por ello, es importante disponer de métodos analíticos que permitan detectar y cuantificar los mencionados oxoheterociclos, ya que su concentración varía según las distintas especies vegetales.

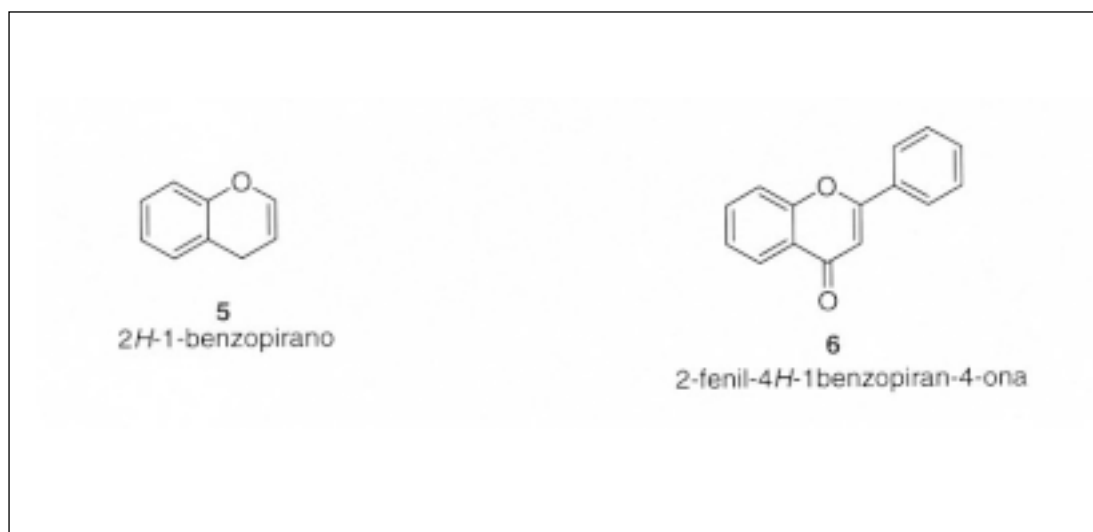
En la Figura 1 se presentan las estructuras químicas de algunos de estos oxoheterociclos. Todos ellos pueden suponerse derivados del 2*H*-1-benzopirano, o del 4-oxo-4*H*-1-benzopirano.

sent fluorescent properties, some of which are of particular interest due to their peculiar spectrofluorimetric characteristics and to the sensitivity that they present in their molecular environment. The majority of these compounds present some kind of hydroxyl group joined to an aromatic ring, making them extremely sensitive to pH variations in their environment. The identification and quantification of these phenolic compounds may be of great help for botanic classification purposes of vegetable species (chemotaxonomy). In order to carry out such processes, analytical methods that are capable of detecting and quantifying these oxoheterocyclics are of great importance, due to the fact that their concentrations vary in accordance with the different vegetable species in question.

The chemical structures of some of these oxoheterocyclics are presented in figure 1. All

FIGURA 1. Estructuras químicas de los oxócidos presentes en los componentes estudiados (benzopirano y flavona).

FIGURE 1. Chemical structures of the oxocyclics present in the studied compounds (benzopyran and flavon).



Estas estructuras fluorescen en la región visible, lo cual se puede observar a simple vista. Las primeras observaciones de la fluorescencia de las mismas en disolución de ácido sulfúrico se deben a Rangaswami (Rangaswami et al., en Wolfbeis (1985a y 1985b)). Otros autores (Gallivan (1970), Wolfbeis (1985a)) han descrito la fluorescencia de algunos análogos también en disolución de ácido sulfúrico. Los derivados de estructura de cumarina o de flavona (2-fenil-4*H*-1-benzopiran-4-ona) (Figura 1) también presen-

of them may be regarded as derivatives of either 2*H*-1-benzopyran, or of 4-oxo-4*H*-benzopyran. These fluorescent structures are present in the visible region, meaning that they are visible to the naked eye. The first observations of their fluorescent properties in sulphuric acid solutions are attributed to Rangaswami (Rangaswami et al., en Wolfbeis (1985a y 1985b)). Other authors (Gallivan (1970), Wolfbeis (1985a)), have also described fluorescent properties of other analogous substances in sulphuric acid solutio-

tan una notable fluorescencia nativa. La fluorescencia de las cumarinas es muy sensible a la posición y naturaleza de los sustituyentes sobre el anillo de benzopirano. Así, la cumarina presenta una fluorescencia muy débil, la 3- y la 4-hidroxycumarina fluorescen en la región UV (Yakatan et al.(1972a)), mientras que las 5-, 6- y 7-hidroxycumarinas fluorescen en el visible (Yakatan et al.(1972b)). La fluorescencia de todos los derivados de cumarinas es muy sensible a los cambios en la polaridad del entorno (disolventes) y al pH modificándose notablemente tanto la posición de los máximos de excitación y de emisión como la intensidad de fluorescencia.

Las flavonas, isoflavonas e hidroxiflavonas presentan fluorescencia nativa con un notable desplazamiento de Stokes. La fluorescencia de la 3-hidroxiflavona se ha estudiado en distintos disolventes (Sengupta et al. (1979)), con diferente viscosidad (Salman et al. (1981)) y variando el pH del medio (Wolfbeis et al. (1983)). Las 5-hidroxiflavonas presentan nula o muy débil fluorescencia y ello se explica teniendo en cuenta las reacciones de transferencia de protón o de fotodisociación que tienen lugar en estado excitado (Schipfer et al. (1981)).

Muchos compuestos que poseen en su estructura un grupo hidroxilo conjugado con un grupo cetona tienen distinta estructura en estado fundamental que en estado excitado. Así, no se observa la fluorescencia de las formas neutras presentes en metanol y, en cambio, en disolución acuosa alcalina o débilmente ácida se puede observar la emisión correspondiente al anión. En disoluciones acuosas fuertemente ácidas se aprecia la emisión del fototautómero que se genera en la excitación por vía radiante (Wolfbeis (1985b)).

Las modificaciones que se producen en los espectros de absorción y de excitación y emisión fluorescente para ciertas moléculas orgánicas dependiendo de las características de polaridad del entorno se conocen con el nombre de efecto solvatochrómico. Estas modificaciones están relacionadas con procesos de transferencia de carga, de protón, o con la formación de especies en estado excitado de distintas características químicas o de polaridad a las del estado fundamental. Así, diversos derivados de 1-naftil-etilbenzoatos muestran unas características de emisión muy dependientes de la polaridad del entorno y estas propiedades se pueden relacionar con su

ns. Derivatives of the coumarin structure or of flavon (2-phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-one) (Figure 1), also present marked native fluorescence. Coumarin fluorescence is very sensitive to the position and nature of substitutes on the benzopyran ring. Coumarin therefore, presents very weak fluorescence, 3- & 4-hydroxycoumarin are fluorescent in the UV region (Yakatan et al.(1972a)), while 5-,6- & 7- hydroxycoumarins are visibly fluorescent(Yakatan et al.(1972b)). The fluorescence of all types of coumarin derivative is very sensitive to environment (solvents), polarity changes and to pH, which produce marked modifications both in positions of maximum excitation and emission, and fluorescent intensity.

Flavons, isoflavons and hydroxyflavons show native fluorescence with marked stokes type displacement. The fluorescence of the 3-hydroxyflavon has been studied in differing solvents (Sengupta et al. (1979)), with differing viscosity (Salman et al (1981)), and with variations in the pH of the medium (Wolfbeis et al. (1983)). The 5-hydroxyflavons present either very weak or no fluorescence at all. This may be explained by the transfer of the proton or by a photo-dissociation taking place in its excited state (Schipfer et al. (1981)).

Many of the compounds in its structure possess a hydroxyl group combined with a ketone group which have different structures in fundamental states, in comparison with excited states. Fluorescence, is not therefore observed in the neutral forms present in methanol. However, in aqueous alkaline or weakly acid solutions, anion emissions may be observed. In strongly acidic aqueous solutions, photoautomer emissions that are produced in the excited state through radiance (Wolfbeis (1985b)) may be observed.

Modifications that are produced in the absorption and excited state spectra and fluorescent emissions of certain organic molecules, which depend on the polarity characteristics of the environment, are known as solvatochromic effects. These modifications are related to proton, or charge transfer processes, or to the formation of species in excited states of different chemical or polarity characteristics, to those which are present in the fundamental state. Several derivatives of 1-naftil-ethylbenzoates show emission characteristics that are very dependant on the polarity of the environment and these properties may have a relationship with their chemical reactivity (Mor-

reactividad química (Morley et al. (2001)). Para algunas sustancias colorantes como la merocianina, para la cual se ha demostrado que forma agregados en disolución acuosa, los dímeros muestran un efecto solvatochrómico mucho más intenso que los monómeros y ello puede explicarse teniendo en cuenta la formación de un complejo de transferencia de carga (Lu et al. (1999)). Asimismo se ha descrito la influencia de la polaridad de los disolventes sobre los desplazamientos presentes en los espectros de absorción de diversos derivados de benzimidazol (Sworakowski et al (1998), Verdasco et al. (1995)): Para las *o*-, *m*- y *p*-toluidinas se ha puesto de manifiesto que los procesos de transferencia de protón en estado fundamental y excitado son diferentes dependiendo del entorno y de la polaridad de los disolventes (Rajendiran (1999)).

En el presente trabajo se describe el efecto solvatochrómico de diversos compuestos recientemente aislados de plantas autóctonas argentinas (Caffaratti et al. (1994), Agnese et al. (1999)). Dos de ellos tienen en común la estructura de benzopirona. Además, se estudia la influencia de la adición de ácido sulfúrico sobre los procesos de transferencia de protón tanto en estado fundamental como en estado excitado.

EXPERIMENTAL

Todos los espectros de absorción fueron obtenidos con un espectrofotómetro de doble haz Kontron Uvikon 810 equipado con un "printer-plotter" modelo 800 también de la firma Kontron. Los espectros de excitación y emisión fluorescente se efectuaron con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer, modelo MPF-2A, equipado con un registrador Hitachi, modelo QPD33. La fuente de radiación fue una lámpara de Xenón de 150 W. En ambos casos se emplearon cubetas de paso óptico de 1 cm.

Todos los disolventes y reactivos empleados fueron de la máxima garantía y calidad p.a. y fueron suministrados por las firmas Merck, Carlo Erba y Panreac.

Los compuestos objeto de este estudio (Figura 2) fueron aislados y caracterizados en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Córdoba, Argentina. El 3-acetil-7,3',4'-trisulfato de quercetina (compuesto **1**) y el 3,7, 3',4'- tetrasulfato

ley et al. (2001)). For some colouring substances, such as merocyanine which have been demonstrated to form aggregates in aqueous solution, the dimers show a much more intense solvatochromic effect than the monomers. This may be explained after considering the possible formation of a charge transfer complex (Lu et al. (1999)). Similarly, the influence of solvent polarity on displacements present in the absorption spectra of several benzimidazol derivatives has been described, (Sworakowski et al (1998), Verdasco et al. (1995)): For *o*-, *m*- and *p*-toluidines it has become apparent that proton transfer processes in fundamental and excited states are different in accordance with the environment and polarity of the solvents (Rajendiran (1999)).

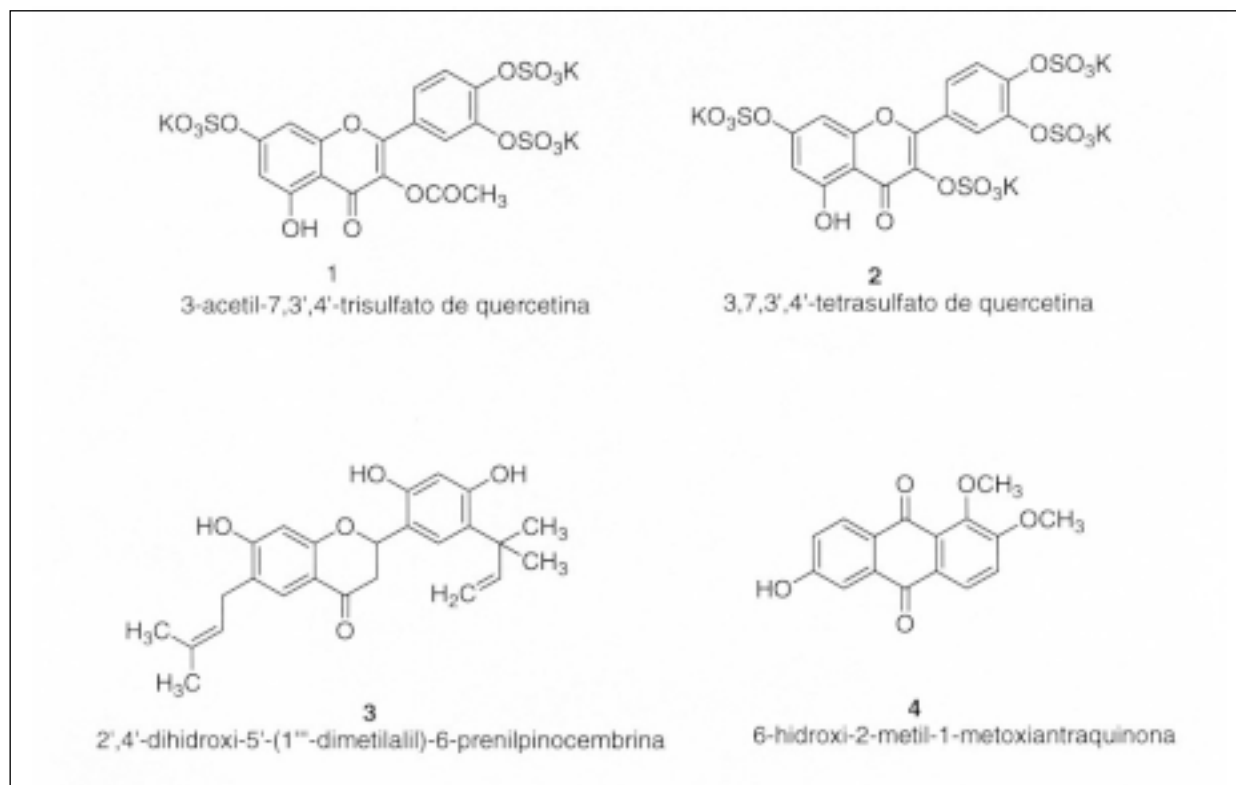
In this paper the solvatochromic effect of several compounds that have recently been isolated from autochthonous plants in Argentina are described (Caffaratti et al. (1994), Agnese et al. (1999)). Two of these compounds have a common benzopyrone structure. Furthermore, the influence of the addition of sulphuric acid upon proton transfer processes, both in fundamental state and in excited state, have been studied.

EXPERIMENTAL TRIALS

All absorption spectra were obtained using a Kontron Uvikon 810 double beam spectrophotometer equipped with a Kontron 800 printer-plotter. Excitation spectra and fluorescent emission were performed with an MPF-2A Perkin-Elmer spectrofluorimeter equipped with a Hitachi QPD33 recording system. The radiation source was a Xenon 150W lamp. In both cases optical pathway cuvettes of 1cm were used.

All of the solvents and reagents used were of the highest guarantee and quality for analysis purposes, and were supplied by the companies Merck, Carlo Erba and Panreac.

The compounds that were the object of this study (Figure 2) were isolated and characterised at the Pharmacy Department of the Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Córdoba, Argentina. 3-acetyl-7,3', 4'-trisulphate of quercetine (compound **1**) and 3,7, 3',4'-tetrasulphate of quercetine (compound **2**) were isolated from the leaves of *Flaveria bidentis*, 2',4'-dihydroxy-5'- (1''-dimetilalil)-6-prenylpinocembrin (compound **3**) was isolated from the roots of *Dalea*

FIGURA 2: Estructuras químicas de los derivados fenólicos estudiados.**FIGURE 2:** Chemical structures of the phenolic derivatives studied.

de quercetina (compuesto 2) fueron aislados de las hojas de *Flaveria bidentis*, el 2',4'-dihidroxi-5'-(1''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina (compuesto 3) fue aislado de las raíces de *Dalea elegans*, la 6-hidroxi-2-metil-1-metoxiantraquinona (compuesto 4) se aisló de las hojas de *Heterophyllaea pustulata*.

Para el estudio absorciométrico UV-visible y espectrofluorimétrico así como del efecto solvatochrómico, se preparó para cada compuesto una disolución madre de concentración $2,0 \times 10^{-4}$ M en etanol para la 3-acetil-7,3',4'-trisulfato de quercetina y la 3,7,3',4'-tetrasulfato de quercetina, y en metanol en el caso de la 2',4'-dihidroxi-5'-(1''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina y de la 6-hidroxi-2-metil-1-metoxiantraquinona. Se eligieron estos disolventes por sus buenas características de solubilidad para los compuestos estudiados y por su tensión de vapor que facilita la rápida evaporación de los mismos. Para favorecer la disolución de los compuestos objeto de estudio, estas disoluciones se someten a agitación ultrasónica durante 30 minutos, después de lo cual se dejan reposar durante tres días y de nuevo se introducen en un baño de ultrasonidos

elegans, 6-hydroxy-2-methyl-1-methoxyanthraquinone (compound 4) was isolated from the leaves of *Heterophyllaea pustulata*.

For the UV-visible absorption metric and spectrofluorimetric study as well as for the solvatochromic effect, a mother solution of a concentration of $2,0 \times 10^{-4}$ M in ethanol for 3-acetyl-7,3',4'-trisulphate of quercetin and 3,7,3',4'-tetrasulphate of quercetin, was prepared for each sample. In the case of 2',4'-dihydroxy-5'-(1''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrin and 6-hydroxy-2-methyl-1-methoxyanthraquinone the same solution in methanol was prepared. These solvents were chosen for their good solubility characteristics with regard to the compounds studied and for their vapor tension properties facilitating fast evaporation. In order to dissolve the compounds in the study more efficiently, the solutions were subjected to ultrasonic shaking for 30 minutes, then left to stand for three days, after which, they were once again, treated in an ultrasound bath for ten minutes. Subsequently, aliquots of 250 μ L and 500 μ L were taken and the solvent was left to evaporate in conditions of darkness, at atmospheric pressure and at 35°C

durante diez minutos. A continuación se tomaron alícuotas de 250 μL y 500 μL y se deja evaporar el disolvente en la oscuridad, a la presión atmosférica y a 35 $^{\circ}\text{C}$ hasta la completa evaporación del etanol o metanol. Seguidamente se añade a cada uno de los matraces el volumen correspondiente de cada uno de los disolventes que aparecen reflejados en la Tabla 1, siendo la concentración de cada uno de los compuestos fenólicos en los distintos disolventes $1,0 \times 10^{-5}$ M. Los espectros de absorción y de fluorescencia se obtuvieron para disoluciones de esta concentración. Seguidamente se adicionó a alícuotas de 5 mL de las distintas disoluciones 500 μL de ácido sulfúrico registrándose los espectros de absorción UV-visible y fluorescencia de las mismas.

until complete evaporation of the ethanol or methanol had taken place. Immediately afterwards, the corresponding volume of each one of the solvents as shown in table 1 were added to each one of the flasks. The concentration of each one of the phenolic compounds in the different solvents was 1.0×10^{-5} M. The absorption and fluorescence spectra were obtained for solutions at this concentration. Subsequently, 500 μL of sulphuric acid were added to the aliquots of 5mL of the different solutions. The UV-visible absorption spectra and fluorescence of these were recorded.

TABLA I. Máximos de absorción UV-visible de los derivados fenólicos obtenidos en los distintos disolventes estudiados. ϵ : constante dieléctrica, μ_D : momento dipolar (Debye), DMSO: dimetilsulfóxido.

DISOLVENTE	ϵ	μ_D	COMPUESTO (λ_{max} , nm)			
			1	2	3	4
hexano	1,9	-	220, 270	205	275	210, 260, 280
ácido acético	6,2	1,74	250, 290	250	240, 290	265, 280, 350
n-propanol	20,1	1,68	-	-	255, 290	215, 240, 260, 280, 340
acetona	20,7	2,88	350, 370	205, 325	210, 280	220, 350
etanol	24,3	1,69	270, 370	-	210, 230, 290	210, 240, 280, 350
metanol	33,6	1,70	230, 250, 270, 340, 350	205, 225, 270	210, 230, 290	210, 250, 270, 290, 350
acetonitrilo	38,3	3,92	220, 240, 270, 340	205, 240, 270	230, 295, 330	210, 270, 290, 350
DMSO	45,0	3,96	270, 340, 370	260, 370	290, 335	275, 290, 350
agua	80,3	1,85	220, 240, 270, 340	200, 270, 310	230, 290	220, 240, 260, 280, 310, 350
formamida	109,3	3,37	260, 270, 290, 330	270, 310	290	250, 270, 290, 350

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En La Tabla 1 se presentan los máximos de absorción UV-visible de los compuestos estudiados en los distintos disolventes. Los máximos son concordantes con los descritos en la bibliografía para compuestos derivados de flavona. Asimismo, los espectros del compuesto 4 muestran un mayor número de máximos atribuibles a la estructura de antraquinona. No se observan desplazamientos ($\approx 5-10$ nm) significativos en los máximos de absorción como consecuencia de la variación de la polaridad del disolvente. Así, el compuesto **1** en hexano muestra λ_{max} a 220 nm y 270 nm y en agua estos máximos se sitúan a 220 nm y 270 nm. Sin embargo, sí cabe

RESULTS AND DISCUSSION

In table 1 maximum UV-visible absorption of the compounds studied in the different solvents are presented. The maximum values coincide with those described in the bibliography for flavon derived compounds. Similarly, the spectra of compound 4 show a greater number of maximum values, this being attributed to the anthraquinone structure. No significant displacements ($\approx 5-10$ nm) in the maximum absorption values are observed, this being a consequence of the variation in polarity of the solvent. So compound **1** shows λ_{max} at 220 nm and 270 nm in hexane. In water these maximums are also situated at 220 nm and 270 nm. However, it should

TABLE I. Maximum values of UV-visible absorption of phenolic derivatives obtained from the different solvents studied. ϵ : dielectric constant, μ_D : dipolar moment (Debye), DMSO: dimethylsulphoxide.

SOLVENT	ϵ	μ_D	COMPOUND (λ_{max} , nm)			
			1	2	3	4
hexane	1,9	-	220, 270	205	275	210, 260, 280
acetic acid	6,2	1,74	250, 290	250	240, 290	265, 280, 350
n-propanol	20,1	1,68	-	-	255, 290	215, 240, 260, 280, 340
acetone	20,7	2,88	350, 370	205, 325	210, 280	220, 350
ethanol	24,3	1,69	270, 370	-	210, 230, 290	210, 240, 280, 350
methanol	33,6	1,70	230, 250, 270, 340, 350	205, 225, 270	210, 230, 290	210, 250, 270, 290, 350
acetonitrile	38,3	3,92	220, 240, 270, 340	205, 240, 270	230, 295, 330	210, 270, 290, 350
DMSO	45,0	3,96	270, 340, 370	260, 370	290, 335	275, 290, 350
water	80,3	1,85	220, 240, 270, 340	200, 270, 310	230, 290	220, 240, 260, 280, 310, 350
formamide	109,3	3,37	260, 270, 290, 330	270, 310	290	250, 270, 290, 350

destacar que en los disolventes de mayor polaridad (agua, polares próticos y polares apróticos) aparecen un mayor número de máximos de absorción que en los disolventes de baja constante dieléctrica (hexano o ácido acético). Los valores de absorbancia más altos se obtuvieron en el caso de las disoluciones acuosas, lo cual se explica teniendo en cuenta la mayor solubilidad de los compuestos **1** y **2** en agua por el hecho de tener la mayor parte de los grupos hidroxilo sulfatados o acetilados.

Todos los compuestos estudiados presentan fluorescencia nativa, si bien en algunos disolventes de baja polaridad, como hexano o propanol, la señal es muy débil, o bien queda enmascarada por las líneas de dispersión Raman llegando incluso a no poderse detectar. Este hecho puede estar relacionado con la baja solubilidad de estos compuestos en dichos disolventes. Tanto el compuesto **1** como el compuesto **2** muestran cambios muy significativos en la posición de los máximos de emisión al variar la polaridad del disolvente. Así, para el compuesto **1** en hexano, la emisión aparece a $\lambda_{em} = 310$ nm mientras que en los polares próticos (alcoholes) se sitúa a $\lambda_{em} = 330$ nm y en agua a $\lambda_{em} = 400$ nm. En los disolventes polares apróticos (acetona, acetonitrilo, DMSO y formamida) además del máximo a $\lambda_{em} = 330$ nm aparece un hombro o pico de débil intensidad a 400 nm. Este desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia al aumentar la polaridad del disolvente puede explicarse teniendo en cuenta que el estado excitado es de mayor polaridad que el estado fundamental (Wehry (1990)) y la posibilidad de establecer puentes de hidrógeno con los disolventes polares próticos o por la formación de complejos de transferencia de carga con los disolventes polares apróticos que contribuye a hacer descender la energía del estado excitado y, por tanto, se produce un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión de fluorescencia.

Como se ha descrito por otros autores (Wolfbeis (1985a y b)), la adición de ácidos minerales a las disoluciones metanólicas de este tipo de compuestos provoca un desplazamiento batocrómico del máximo de fluorescencia a $\lambda_{em} \approx 500$ nm. Como se puede apreciar en la Tabla 2 para los compuestos **1** y **2**, la adición de ácido sulfúrico conlleva el desplazamiento batocrómico, para los alcoholes a $\lambda_{em} \approx 400$ nm, mientras que para los polares apróticos el máximo se desplaza a

be pointed out that in solvents of higher polarity (water, polar protic and polar aprotic) a higher number of absorption maximums appear than those found for solvents of low dielectric constant (hexane or acetic acid). The highest absorption values were obtained for aqueous solutions. This may be explained by the higher solubility of compounds **1** & **2** in water due to the fact that these solutions contain the greater part of the Hydroxyl, sulphate, or acetylate groups.

All of the compounds studied present native fluorescence, even though in some of the solvents of low polarity, such as hexane or propanol, the signal is very weak, or is masked by the Raman dispersion lines, on occasions, reaching the point where no signal can be detected. Such a finding may be associated with the low solubility of these compounds in such solvents. Both compounds **1** and **2** show significant changes in the position of maximum emission with changes in solvent polarity. So for compound **1** in hexane, emission appears at $\lambda_{em} = 310$ nm, while in polar protics (alcohols) they appear at $\lambda_{em} = 330$ nm, and in water at $\lambda_{em} = 400$ nm. In polar aprotic solvents (acetone, acetonitrile, DMSO and formamide), in addition to the maximum at $\lambda_{em} = 330$ nm, a shoulder or peak of low intensity at 400 nm appears. The displacement of maximum fluorescent emission is concurrent with an increase in solvent polarity. This could be explained by the fact that in the excited state, polarity is higher than that in the fundamental state (Wehry (1990)). The possibility of establishing hydrogen bridges with the polar protic solvents may exist or charge transfer complexes may be formed with polar aprotic solvents, contributing to a decrease in energy in the excited state. Consequently, a bathochromic displacement of maximum fluorescent emission is produced.

As described by other authors (Wolfbeis (1985a y b)), the addition of mineral acids to the methanolic solutions of this type of compound causes a bathochromic displacement of maximum fluorescence to $\lambda_{em} \approx 500$ nm. For compounds **1** & **2**, as may be observed in table 2, the addition of sulphuric acid involves a bathochromic displacement for the alcohols at $\lambda_{em} \approx 400$ nm, while for the polar aprotic solvents the maximum is displaced at $\lambda_{em} = 520$ nm, as a consequence of the addition of this acid. Displacements do not occur when aqueous solvents are used. This behaviour is presented graphically in Figure 3a.

TABLA 2: Máximos de excitación (λ_{ex}) y emisión fluorescente (λ_{em}) de los derivados fenólicos obtenidos en los distintos disolventes estudiados. Los máximos correspondientes a las soluciones a las que se ha adicionado ácido sulfúrico aparecen entre paréntesis. (-) Señales no medibles o que aparecen enmascaradas con la dispersión Raman.

DISOLVENTE	COMPUESTO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
hexano	260,280,290 (280)	310 (310)	250,290 (-)	315 (-)	- (290,310)	- (310,330)	250 (230, 280)	310 (310)
ácido acético	280,310 (-)	340 (-)	290, 320 (280, 310, 465)	370 (400, 510)	300, 350 (330,350)	370, 400 (410)	260,320,350 (260, 320, 350)	320,410 (410)
n-propanol	- (300,340)	- (310,420)	- (-)	- (-)	250,280,330 (260, 300,	320,350,370 (330, 430)	250,300,320 (250, 290,	320,350,360 (420)
acetona	360) 330,370 (360)	420 (410)	- (470)	- (510)	- (320,360)	- (380,420)	330 (370)	420 (430, 450)
etanol	- (280,310)	- (340)	- (300, 340, 370)	- (330, 430)	250,290,330 (260, 290, 360)	310,330,350 (300, 320, 420)	250,320,380 (250, 320, 350)	350,360,410 (410)
metanol	280 (280)	330 (320)	280, 310 (330)	320 (430)	280, 320 (230, 280)	320, 340 (330)	250,300,320 (250, 320, 380)	310,360,400 (330, 410)
acetonitrilo	290,340 (270, 300, 440)	310,390 (360, 410, 510)	- (440)	- (520)	280, 310 (250, 290, 350)	330,350,430 (320,430)	250,330,350 (260, 320, 350)	350,410 (410)
DMSO	310,360,390 (300, 360)	330,440 (430)	340 (-)	420 (-)	300,360 (270, 300, 360)	350, 430 (430)	270,320,350 (300, 320, 350)	320,410 (430)
agua	250,290,320 (300, 330, 350)	320,400 (330,410)	250,300,370 (250, 300, 370)	340,430 (430)	300 (240, 270, 320)	440 (440)	250,310,340 (250, 320, 350)	350,410 (420)
formamida	300,320 (330)	410 (350,420)	- (340)	- (420)	300 (320)	330, 400 (420)	300,330 (320)	340,400 (410)

$\lambda_{em} = 520$ nm como consecuencia de la adición del citado ácido, no produciéndose desplazamientos cuando el disolvente utilizado es agua. Este comportamiento queda expuesto gráficamente en la Figura 3a.

En el caso del compuesto 3, en los alcoholes el máximo se sitúa a $\lambda_{em} = 320-350$ nm, en el agua $\lambda_{em} \approx 400$ nm, al igual que en los disolventes polares apróticos. La adición de ácido sulfúrico no provoca la aparición del máximo de 500-520 nm, si bien logra desplazar el pico de emisión en el caso del propanol y del etanol a 440 nm. Para el compuesto 4, con estructura de antraquinona, pero con un comportamiento influenciado por la presencia del OH fenólico de la posición 6, puede apreciarse un comportamiento muy semejante al descrito para el compuesto 3. Así, al incrementarse la polaridad del disolvente se produce un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión. En los disolventes polares apróticos aparece $\lambda_{em} \approx 400-410$ nm al igual que en el agua. La adición de ácido sulfúrico no da lugar a la aparición de la banda de 500 nm y sólo en el caso de los alcoholes tras esta adición se produce un desplazamiento del máximo desde $\lambda_{em} = 360$ nm a $\lambda_{em} \approx 400-410$ nm, tal y como se puede apreciar en la Figura 3b y en la Tabla 2. En las Figuras 4a y 4b se muestran los desplazamientos observados en los máximos de emisión al variar la polaridad de los disolventes para los cuatro compuestos estudiados, tanto en el caso de los compuestos puros disueltos en cada uno de los disolventes como tras la adición de ácido sulfúrico.

La diferencia de comportamiento entre los compuestos 1 y 2, por una parte, y 3 y 4 por otra, con respecto a la aparición de la banda de 500-510 nm puede explicarse considerando las diferencias estructurales. Así, según Wolfbeis (1985b), la presencia de dicha banda a 500 nm puede explicarse teniendo en cuenta la formación de un fototautómero que se genera por vía radiante en compuestos cuya estructura química presenta un OH fenólico conjugado con el grupo cetona. En el caso de los compuestos aquí descritos sería posible la formación de dicho fototautómero. Tanto en el caso del compuesto 3 como del compuesto 4 es posible la existencia de los fototautómeros; no obstante, para el compuesto 4, la pérdida de la estructura quinónica conjugada, junto con la de la aromaticidad de uno de los anillos, como consecuencia de la for-

In the case of compound 3 the maximum in alcohols is situated at $\lambda_{em} = 320-350$ nm, in water at $\lambda_{em} \approx 400$ nm, as is the case in polar aprotic solutions. The addition of sulphuric acid does not produce the appearance of the maximum of 500-520nm, even though displacement of the emission peak does occur in the case of propanol and ethanol at 440nm. For compound 4, with the antraquinone structure, but with a behaviour influenced by the presence of phenolic OH of position 6, a very similar behaviour to that described for compound 3 may be observed. On increasing the polarity of the solvent, a bathochromic displacement of maximum emission is produced. In polar aprotic solvents, as in the case of water, the value of $\lambda_{em} \approx 400-410$ nm was found. The addition of sulphuric acid does not give rise to the appearance of the bandlength 500nm, and only in the case of the alcohols, after adding this acid, does a displacement of the maximum from $\lambda_{em} = 360$ nm to $\lambda_{em} \approx 400-410$ nm occur. These results are represented in figure 3b and in Table 2. Figures 4a & 4b show the displacements observed in maximum emission values obtained with variations in polarity of the solvents for the four compounds studied, both in the case of the dissolved pure compounds in each of the solvents, and after the addition of sulphuric acid.

The difference in behaviour, with respect to the appearance of the band 500-510nm, between compounds 1 and 2, on the one hand, and 3 and 4 on the other, may be explained after considering structural differences. According to Wolfbeis (1985b), the presence of such a band at 500nm may be explained by the formation of a photoautomer which is generated through radiance in compounds whose chemical structures possess an phenolic OH combined with the cetone group. In the case of the compounds described in this paper, the formation of such a photoautomer would be possible. As much in the case of compound 3, as for compound 4, the existence of photoautomers may be possible. However, in compound 4 the loss of the combined quinonic structure in conjunction with the loss of the aromatic structure of one of the rings as a consequence of the formation of photoautomer, leads to the conclusion that such a photoreaction would be seriously inhibited. For compound 3, the absence of the double bond of positions 2-3 of the benzopyrone ring makes the combined sys-

FIGURA 3: Espectros de excitación y emisión fluorescente de dos de los compuestos estudiados.

(a) Compuesto **2**: - - - en metanol, espectro de excitación $\lambda_{ex} = 284$ nm para $\lambda_{em} = 320$ nm; y espectro de emisión $\lambda_{em} = 320$ nm para $\lambda_{ex} = 284$ nm.

•••• en agua, espectro de excitación $\lambda_{ex} = 298$ nm para $\lambda_{em} = 430$ nm; y espectro de emisión $\lambda_{em} = 430$ nm para $\lambda_{ex} = 298$ nm.

•••- en acetonitrilo con adición de 10 ml de H_2SO_4 , espectro de excitación $\lambda_{ex} = 440$ nm para $\lambda_{em} = 520$ nm; y espectro de emisión $\lambda_{em} = 520$ nm para $\lambda_{ex} = 440$ nm.

(b) Compuesto **4**: - - - en metanol, espectro de excitación $\lambda_{ex} = 280$ nm para $\lambda_{em} = 340$ nm; y espectro de emisión $\lambda_{em} = 340$ nm para $\lambda_{ex} = 280$ nm.

•••• en agua, espectro de excitación $\lambda_{ex} = 310$ nm para $\lambda_{em} = 410$ nm; y espectro de emisión $\lambda_{em} = 410$ nm para $\lambda_{ex} = 310$ nm.

•••- en metanol con adición de 10 μ l de H_2SO_4 , espectro de excitación $\lambda_{ex} = 320$ nm para $\lambda_{em} = 410$ nm; y espectro de emisión $\lambda_{em} = 330, 410$ nm para $\lambda_{ex} = 240$ nm.

FIGURE 3: Excitation and fluorescent emission spectra of two of the compounds studied.

(a) Compound **2**: - - - in methanol, spectra of excitation $\lambda_{ex} = 284$ nm for $\lambda_{em} = 320$ nm; and spectra of emission $\lambda_{em} = 320$ nm for- $\lambda_{ex} = 284$ nm.

•••• in water, spectra of excitation $\lambda_{ex} = 298$ nm for $\lambda_{em} = 430$ nm; and spectra of emission $\lambda_{em} = 430$ nm for- $\lambda_{ex} = 298$ nm.

•••- in acetonitrile with the addition of 10 ml of H_2SO_4 , spectra of excitation $\lambda_{ex} = 440$ nm for $\lambda_{em} = 520$ nm; and spectra of emission $\lambda_{em} = 520$ nm for $\lambda_{ex} = 440$ nm.

(b) Compound **4**: - - - in methanol, spectra of excitation $\lambda_{ex} = 280$ nm for $\lambda_{em} = 340$ nm; and spectra of emission $\lambda_{em} = 340$ nm for- $\lambda_{ex} = 280$ nm.

•••• in water, spectra of excitation $\lambda_{ex} = 310$ nm for $\lambda_{em} = 410$ nm; and spectra of emission $\lambda_{em} = 410$ nm for- $\lambda_{ex} = 310$ nm.

•••- in methanol with the addition of 10 μ l of H_2SO_4 , spectra of excitation $\lambda_{ex} = 320$ nm for $\lambda_{em} = 410$ nm; and spectra of emission $\lambda_{em} = 330, 410$ nm for- $\lambda_{ex} = 240$ nm.

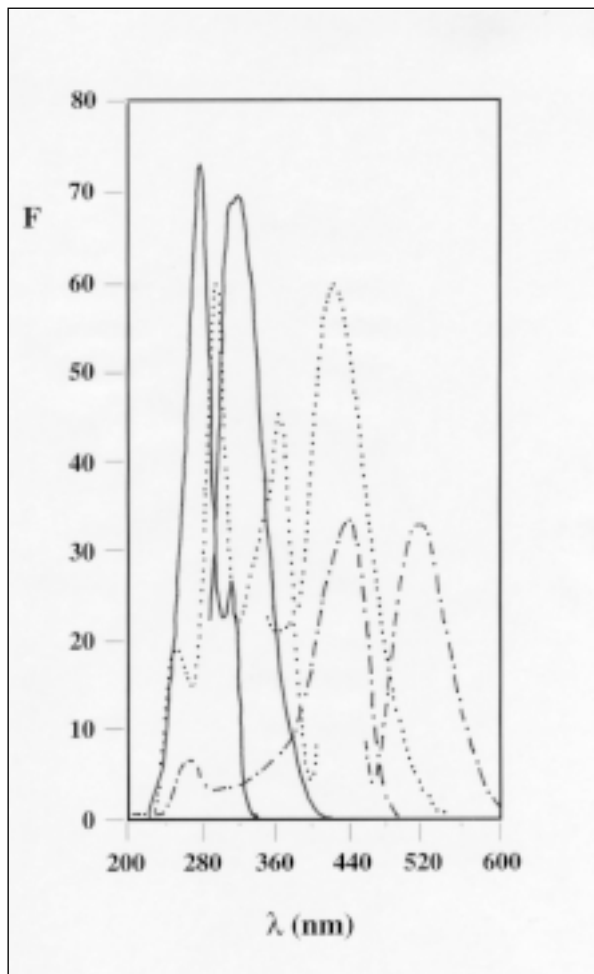


FIGURA 3 (a)

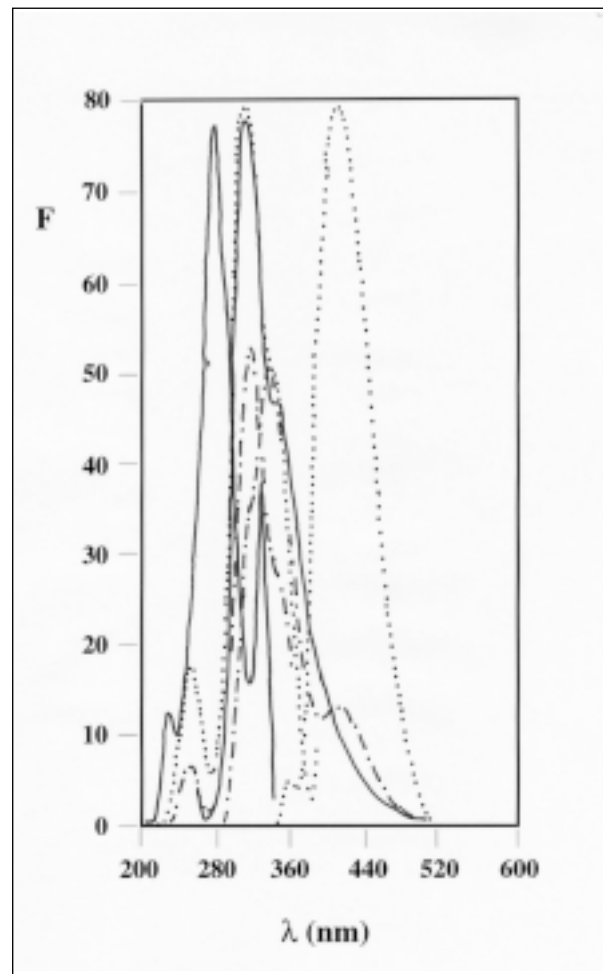


FIGURA 3 (b)

FIGURA 4 : Variación de la posición de los máximos de emisión de fluorescencia de los compuestos fenólicos estudiados. a) En función de la polaridad del disolvente (momento dipolar). b) Efecto de la adición de ácido sulfúrico sobre la emisión fluorescente. ■ Compuesto 1, ● Compuesto 2, ▲ Compuesto 3, ✕ Compuesto 4.

FIGURE 4: Variation of the position of maximum values of fluorescent emission of the phenolic compounds studied. a) In accordance with solvent polarity (dipolar moment). b) Effect of the addition of sulphuric acid on fluorescent emission. ■ Compound 1, ● Compound 2, ▲ Compound 3, ✕ Compound 4.

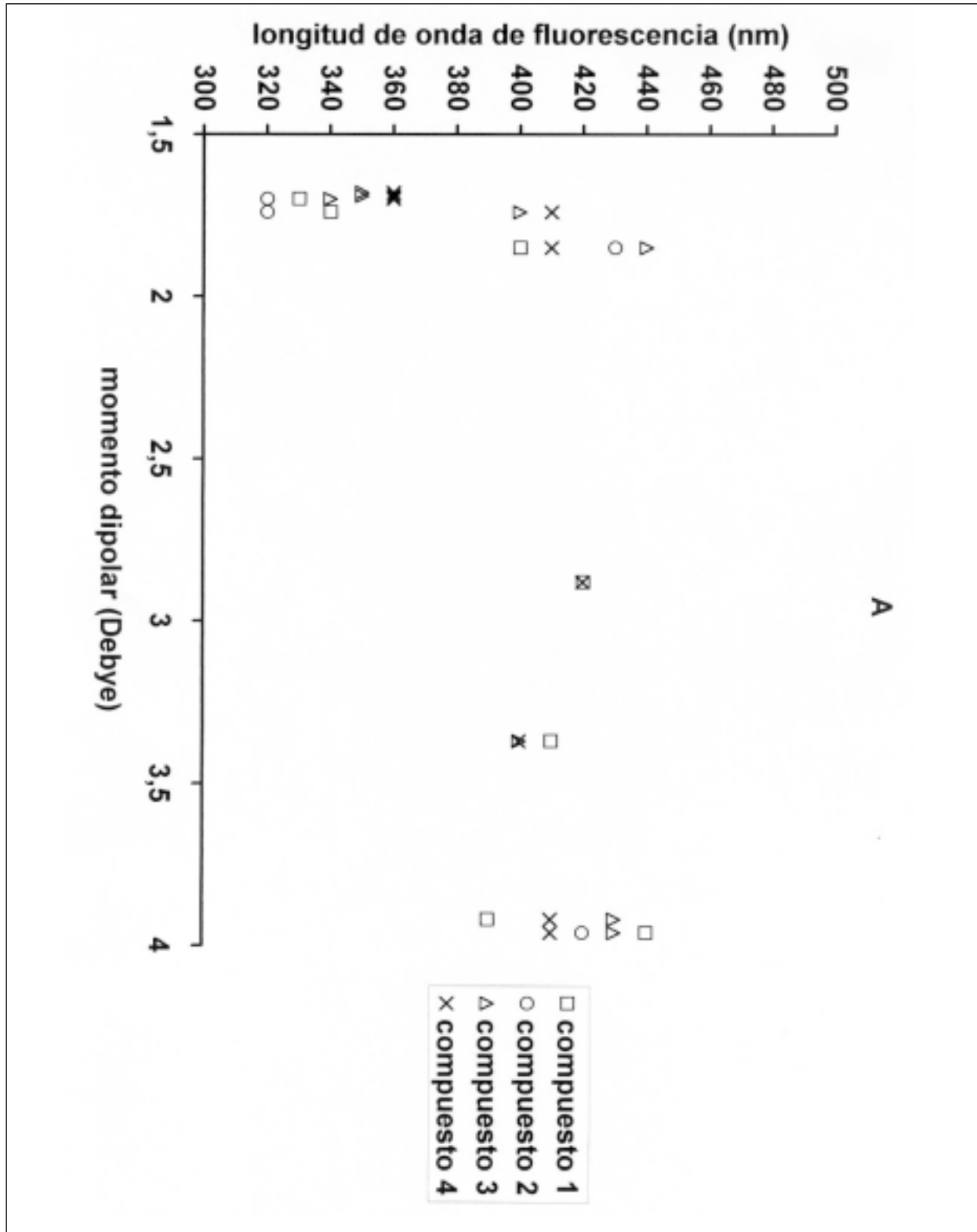


FIGURA 4 (a)

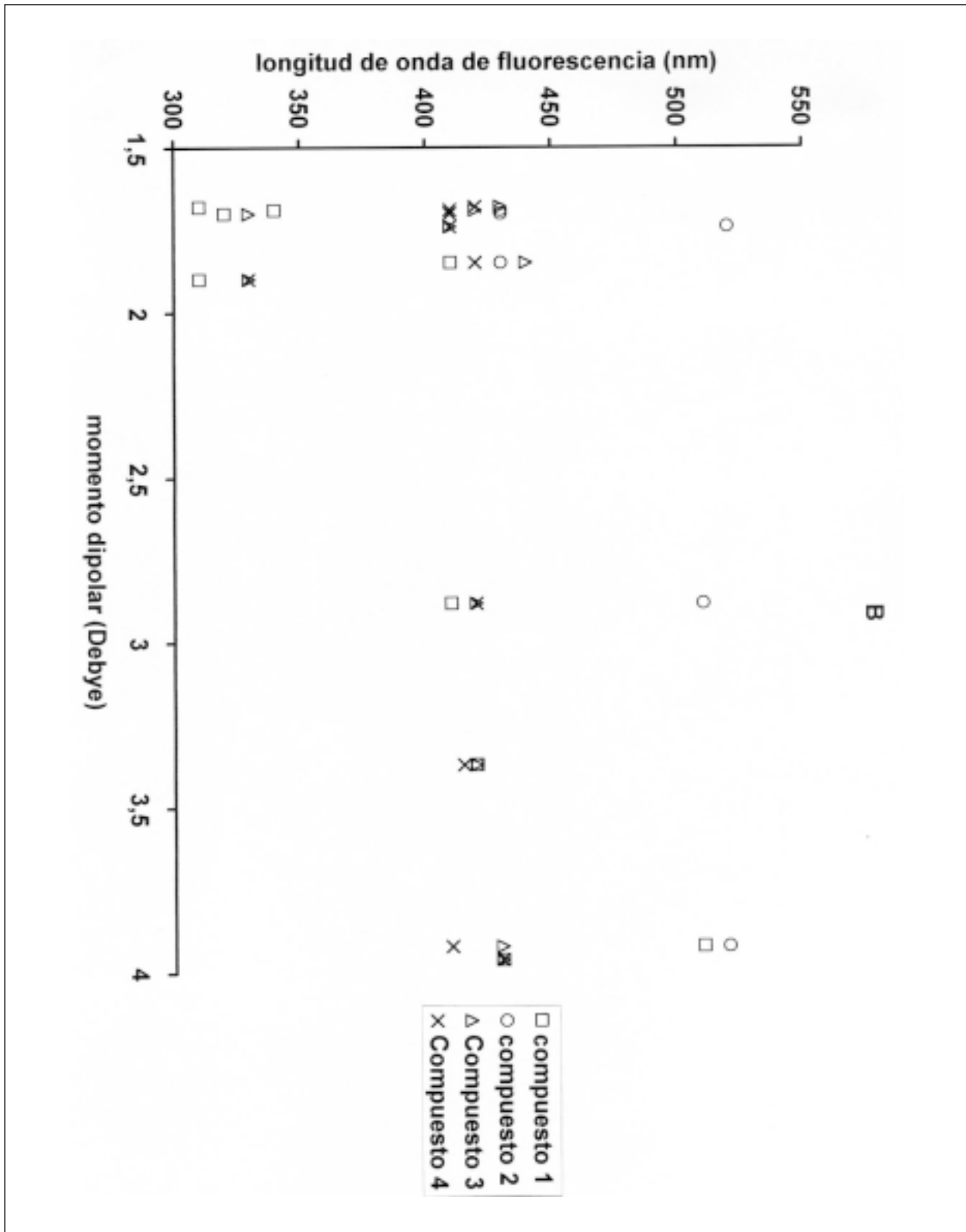


FIGURA 4 (b)

mación del fototautómero hace pensar que tal fotorreacción estaría seriamente dificultada. Para el compuesto **3**, la ausencia del doble enlace de las posiciones 2-3 del anillo de benzopirona hace que el sistema conjugado en el tautómero obtenido por vía radiante sea menos extenso, lo que dificulta su formación. El esquema propuesto para estos procesos se muestra en la Figura 5, donde se pone de manifiesto la conjugación del anillo mediante los enlaces señalados en negrita. La pérdida de aromaticidad y conjugación en los anillos de los compuestos **3** y **4** es mucho más significativa que en los compuestos **1** y **2**.

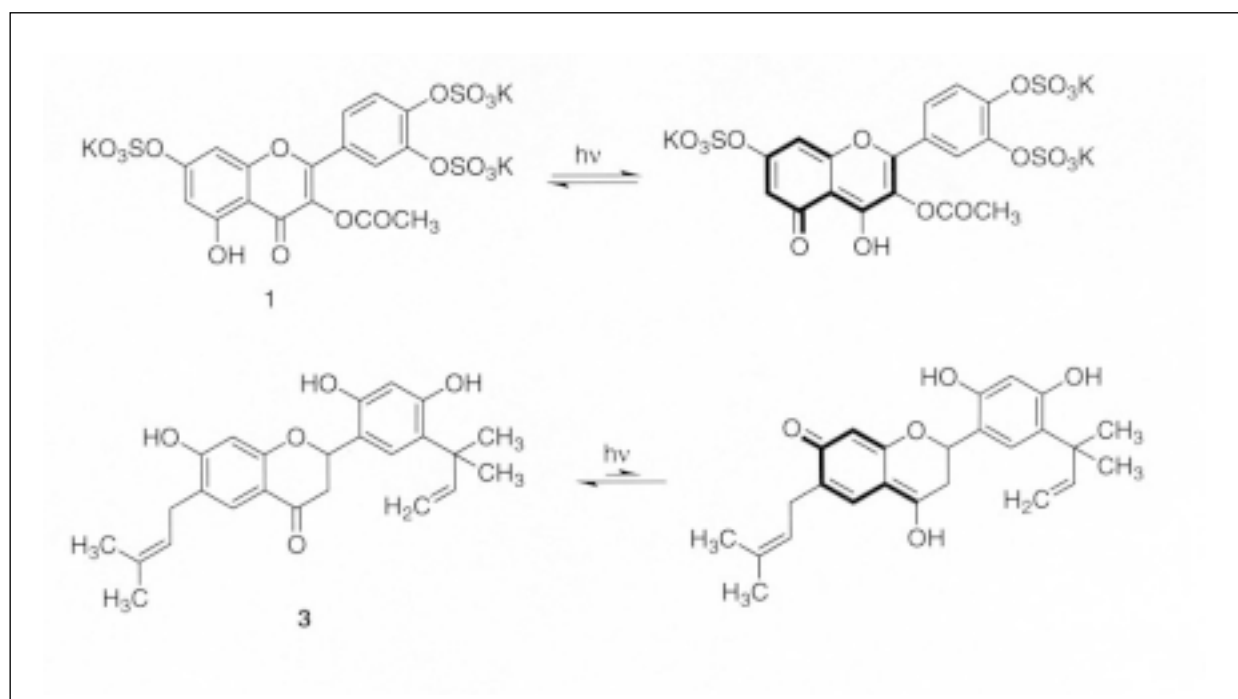
En conclusión, el estudio de la influencia de la polaridad de los disolventes sobre los espectros de absorción y emisión puede suministrar información valiosa acerca de las características de reactividad y espectroscópicas de numerosas moléculas. Estos cambios espectrales pueden resultar de gran utilidad en la identificación de productos naturales y en ningún caso pueden ignorarse, ya que el cambio de un disolvente en la determinación analítica de numerosos compuestos puede afectar notablemente a la sensibilidad de la técnica utilizada.

tem in the tautomer obtained through radiance less extensive, thus inhibiting its formation. The outline proposed for these processes are shown in Figure 5, where the combination of the ring through the bonds marked in black are highlighted. The loss of aromatic qualities and conjugation in the rings of compounds **3** and **4** is much more apparent than that in compounds **1** and **2**.

In conclusion, the study of the influence of polarity of the solvents on absorption and emission spectra can provide valuable information concerning reactivity and spectroscopic characteristics of numerous molecules. These spectral changes could be highly useful in the identification of natural products and should never be ignored, given that a change in solvent in analytical processes for the determination of numerous compounds can notably affect the sensitivity of the technique used.

FIGURA 5 : Esquema de reacción propuesto para la formación de los tautómeros de los compuestos **1** y **3** en estado excitado. Los enlaces que aparecen en negrita indican la extensión del anillo aromático.

FIGURE 5: Outline of the proposed reaction for the formation of tautomers of compounds **1** & **2** in excited state. The bindings appearing in boldface, indicate the expanse of the aromatic ring.



AGRADECIMIENTOS

Programa de Cooperación Interuniversitaria/
AL.E. Convocatoria 2001 de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).

ACKNOWLEDGEMENTS

Program for University Co-operation convened in 2001 by Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).

BIBLIOGRAFÍA

1. Agnese, A. M.; Núñez-Montoya, S.; Ariza-Espinar, L.; Cabrera, J. L. Chemotaxonomic Features in Argentinian Species of *Flaveria* (*Compositae*). *Biochem. Syst. Ecol.* 1999, **27**: 739-742.
2. Caffaratti, M.; Ortega, M. G.; Scarafia, M. E.; Ariza-Espinar, L.; Juliani, H. R. Prenylated Flavanones from *Dalea Elegans*. *Phytochemistry*, 1994. **36**, 1083-1084.
3. Gallivan, J. B. Spectroscopic Studies of Some Chromones *Can. J. Chem.* 1970, **48**: 3928-3936.
4. Lu, L.D.; Lachicotte, R. J.; Penner, T. L.; Perlstein, J.; Whitten, D. G. Exciton and Charge-Transfer Interactions in Nonconjugated Merocyanine Dye Dimers: Novel Solvatochromic Behaviour for Tethered Bichromophores and Excimers. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, **121**: 8146-8156.
5. Morley, K.; Pincock, J. A. The Photochemistry of 2-(1-naphthyl)ethyl benzoates : Cycloaddition and Intramolecular Exciplex Formation. *J. Org. Chem.* 2001, **66**: 2995-3003.
6. Rajendiran, N. Solvatochromism and Prototropism of Toluidines. *Afinidad*, 1999. **56**: 170-174
7. Schipfer, R.; Wolfbeis, O. S.; Knierzinger, A. pH Dependent Fluorescence Spectroscopy. Part 12. Flavones, 7-Hydroxyflavones and 7-Methoxyflavones *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1981. 1443-1448
8. Sengupta, P.; K. Kasha, M. Excited State Proton Transfer Spectroscopy of 3-Hydroxyflavone and Quercetin. *Chem. Phys. Lett.* 1979, **68**: 382-385.
9. Sworakowski, J.; Lipinski, J.; Palewska, K.; Nespurek, S.; Ziolk, L. Effect of the Substituents on the Solvatochromic Behaviour of Benzimidazole-based Betaine Dyes. *J. Mol. Struct.* 1998, **471**: 27-35.
10. Verdasco G., Martín, M. A., del Castillo, B., López-Alvarado, P., Menéndez, J. C. Solvent Effects on the Fluorescent Emission of some New Benzimidazole Derivatives. *Anal. Chim. Acta*, 1995. **303**: 73-78.
11. Wehry, E. L. Effects of Molecular Environment on Fluorescence and Phosphorescence. In: Guilbault, G. G. (Ed.) *Practical Fluorescence*, 2nd Edition, Marcel Dekker Inc., Nueva York, 1990. pp. 127-184.
12. Wolfbeis, O. S. The Fluorescence of the Organic Natural Products. In: Schulman, S. G. (Ed.), *Molecular Luminescence Spectroscopy*, Part I, John Wiley and Sons, Nueva York, 1985a. pp. 219-221.
13. Wolfbeis, O. S. The Fluorescence of the Organic Natural Products. In: Schulman, S. G. (Ed.), *Molecular Luminescence Spectroscopy*, Part I, John Wiley and Sons, Nueva York, 1985b. pp. 229-239.
14. Wolfbeis, O. S.; Knierzinger, A.; Schipfer, R. pH Dependent Fluorescence Spectroscopy. XVII: First Excited Singlet State, Dissociation Constants, Phototautomerism and Dual Fluorescence Flavonol. *J. Photochem.* 1983, **21**: 67-79.
15. Yakatan, G. J.; Juneau, R. J.; Schulman, S. G. Phototautomerism in the Lowest Excited Singlet State of 4-Methylumbelliferone. *Anal. Chem.* 1972, **44**: 1044-1046.
16. Yakatan, G. J.; Juneau, R. J.; Schulman, S. G. Phototautomerism of Warfarin Cation in the Lowest Excited Singlet State Via an Intramolecular Hydrogen Bridge. *J. Pharm. Sci.* 1972, **61**: 749-753.