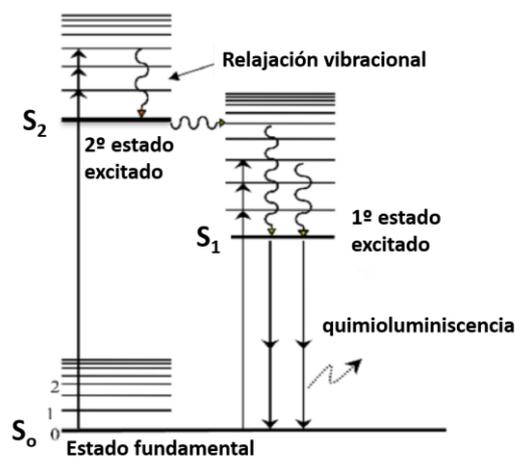


QUIMIOLUMINISCENCIA. EXPERIENCIA CON LUMINOL

Los átomos o moléculas pueden ser excitados por distintos procesos, sus electrones pasan a niveles de energía superiores y pueden retornar posteriormente al nivel fundamental con emisión de luz, proceso que recibe el nombre de luminiscencia. Según la forma de excitar los átomos o moléculas, la luminiscencia recibe distintos nombres:

- a) *Fotoluminiscencia si es por acción de la luz.*
- b) *Triboluminiscencia si es por fricción.*
- c) *Electroluminiscencia si es por impacto con partículas cargadas.*
- d) *Quimioluminiscencia si es por efecto de una reacción química (caso del luminol).*

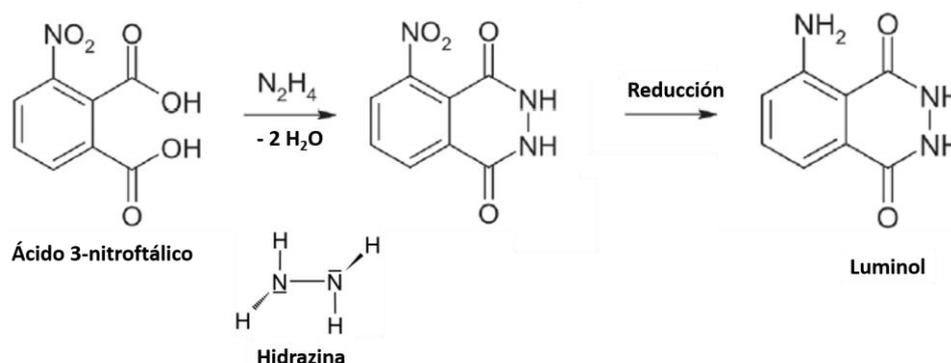


Esquema 1. Diagrama de niveles de energía implicados en la excitación y desactivación por quimioluminiscencia.

La **quimioluminiscencia** es un fenómeno que podemos reconocer fácilmente en algunos animales como las luciérnagas o también en las llamadas barras luminosas (*light stick*) que se utilizan en las acampadas o las que usan los pescadores.

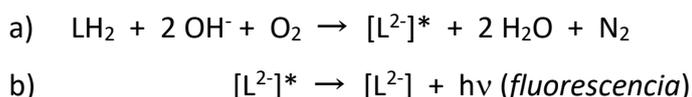
Una de las sustancias más empleadas para realizar reacciones luminiscentes es el **luminol**; su propiedad para producir una reacción quimioluminiscente en solución básica y en presencia de un agente oxidante al contacto con la sangre fue observada por primera vez por **H. O. Albrecht en 1928**.

El luminol ($C_8H_7N_3O_2$) es un derivado del ácido ftálico, sólido a temperatura ambiente, de color gris-amarillo pálido, soluble en la mayoría de disolventes orgánicos y ligeramente soluble en agua. Es una molécula sencilla, sin carbonos asimétricos, que se prepara comercialmente a partir del ácido 3-nitroftálico mediante la condensación de este ácido con hidracina (N_2H_4) y posterior eliminación de agua. La reducción del grupo nitro ($-NO_2$) a la amina primaria correspondiente permite la síntesis del luminol. Sin embargo, el luminol no exhibe luminiscencia por sí solo, sino que debe ser excitado por reacción química con un agente oxidante como se estudiará a continuación.

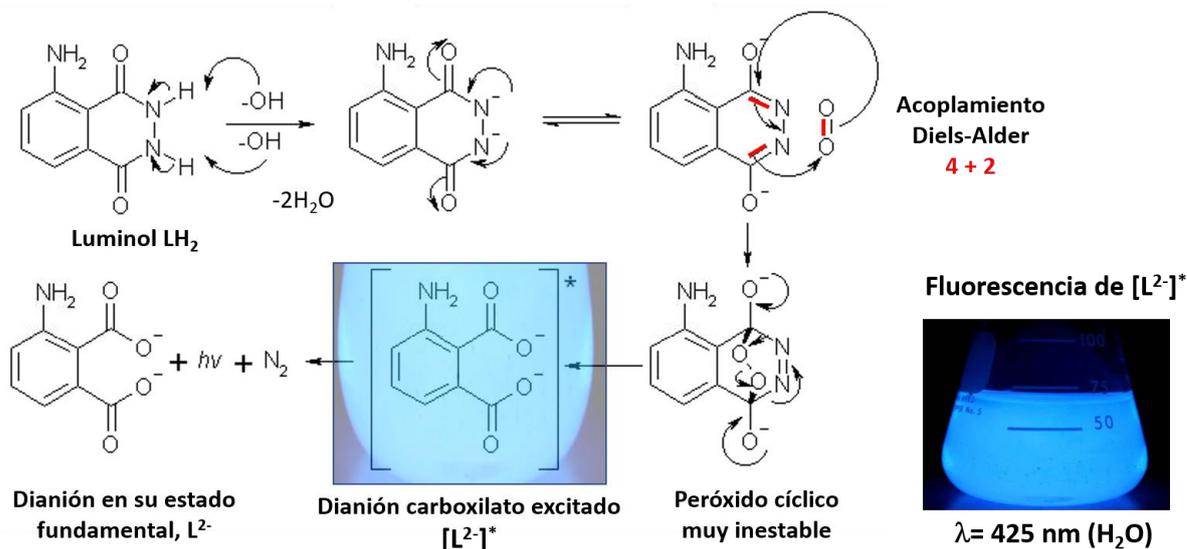


Esquema 1. Síntesis del luminol en dos pasos a partir del ácido 3-nitroftálico. El acoplamiento de la unidad [HN-NH] para cerrar el anillo produce la eliminación de dos moléculas de agua.

La molécula de luminol, en adelante **LH₂**, reacciona con oxígeno molecular y en medio básico para formar un dianión dicarboxilato como especie intermedia, en adelante **[L²⁻]***, en un estado excitado que se desactiva por fluorescencia de acuerdo con las siguientes etapas de reacción:

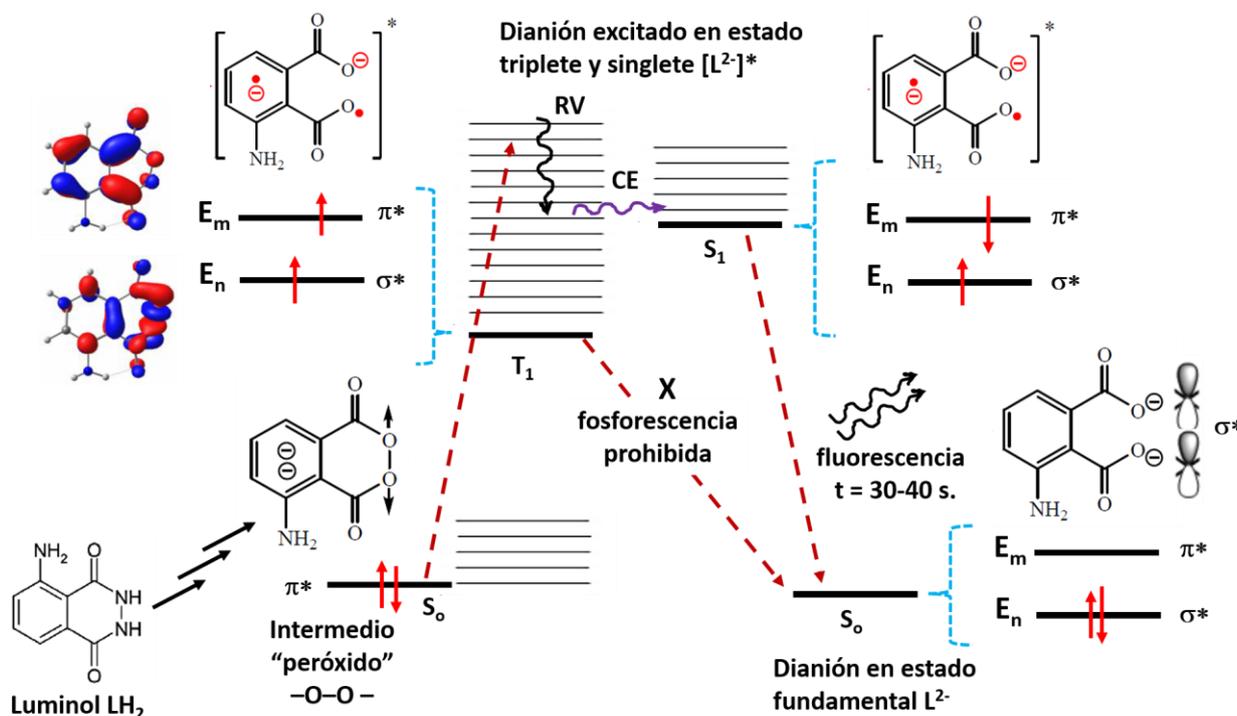


Siguiendo el Esquema 2, la molécula de partida **LH₂** experimenta una eliminación de dos hidrógenos, dejando una carga sobre los átomos de nitrógeno que se traslada después hacia el oxígeno de cada grupo carbonilo. Posteriormente, reacciona con **oxígeno molecular** (acoplamiento 4+2 Diels-Alder), generándose una especie intermedia muy inestable (de alta energía), un **peróxido cíclico** que rompe su enlace -O-O-, liberando nitrógeno molecular como buen grupo saliente. Esto produce un **dianión dicarboxilato** [L²⁻]* en un estado excitado que posteriormente se desactiva emitiendo luz. Como esta emisión tiene su origen en una reacción química, el fenómeno se denomina quimioluminiscencia. Las reacciones quimioluminiscentes a menudo implican la escisión de un peróxido orgánico ya que este enlace es particularmente débil y se puede ganar mucha energía mediante la escisión y la subsiguiente reorganización de los enlaces.



Esquema 2. Reacción del luminol en medio acuoso. Fluorescencia emitida con $\lambda = 425 \text{ nm}$.

Los datos experimentales, así como los cálculos teóricos, han demostrado para el luminol el siguiente proceso de desactivación ilustrado en el Esquema 3.



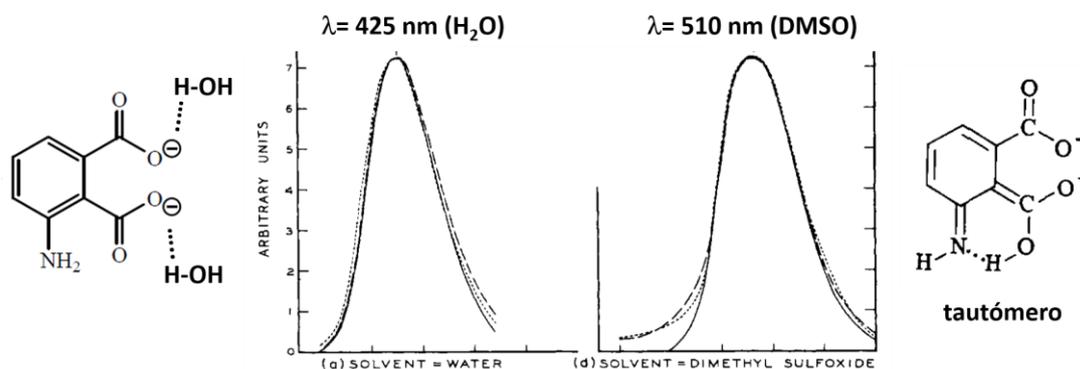
Esquema 3. Secuencia de pasos para la desactivación por fluorescencia de la especie intermedia [L²⁻]*.

Inicialmente, el **peróxido cíclico** formado como especie intermedia [-O-O-], contiene **dos electrones apareados en un anillo aromático**. Esta especie intermedia alcanza rápidamente un estado **triplete T₁** de más energía, con un electrón localizado en un **orbital π antienlazante del anillo aromático**, y el otro,

sobre un oxígeno de uno de los grupos carboxilatos asociado a un orbital con carácter antienlazante σ^* (léase sigma antienlazante) del enlace O---O que se está empezando a romper. Como la desactivación por fosforescencia está prohibida, el intermedio experimenta rápidamente un cruce de estados (CE) y pasa a un estado singlete S_1 . En este caso, la regla de selección de espín, $\Delta S=0$, permite la vuelta al estado fundamental entre dos estados singletes, $S_1 \rightarrow S_0$. El orbital antienlazante σ^* se completa ahora con dos electrones, promoviendo así la rotura del enlace O—O que terminará finalmente en la transformación de dos orbitales atómico p_x en cada átomo de oxígeno.

Fluorescencia en DMSO y en agua.

Se ha demostrado que la longitud de onda de la fluorescencia emitida varía con el disolvente utilizado. En dimetilsulfóxido (DMSO), CH_3SOCH_3 , un disolvente aprótico, se ha observado un pico máximo a 510 nm, mientras que en disolventes próticos como el agua, el máximo se desplaza a 425 nm (Esquema 4). En DMSO la especie responsable de la fluorescencia es un tautómero (*ceto-enol*) del dianión L^{2-} que se forma por interacción del grupo amino con un grupo carbonilo. En agua, la interacción de los grupos carboxilatos con estas moléculas, hace que el grupo carbonilo sea menos básico, por lo que no interacciona con el grupo $-\text{NH}_2$ y no se forma el tautómero.



Esquema 4. Longitud de onda emitida por fluorescencia para dos disolventes: agua y DMSO. Una mezcla de agua-DMSO mostrará dos picos con intensidades relativas en función de la relación agua:DMSO empleada.

Rendimiento cuántico.

El rendimiento cuántico del proceso Φ_{QL} se utiliza para cuantificar el rendimiento de fluorescencia de manera aproximada, en relación con la intensidad I de la señal y la durabilidad del proceso quimioluminiscente. Este depende de varios factores donde $\Phi_{\text{QL}} = \Phi_{\text{R}} \cdot \Phi_{\text{ES}} \cdot \Phi_{\text{FL}}$

Φ_{R} = fracción de moléculas que reaccionan. (Reacting)

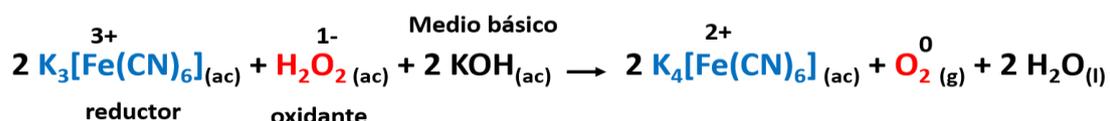
Φ_{ES} = fracción de moléculas que alcanzan el estado excitado. (Excited State)

Φ_{FL} = fracción de moléculas que se desactivan por fluorescencia.

El rendimiento cuántico del luminol en agua es de $\Phi_{\text{QL}} = 0.01 \times 100 = 1\%$, esto es, de 100 moléculas, solo una se desactiva por fluorescencia. El resto se desactiva por relajación vibracional (RV) hasta el estado fundamental. En DMSO, el rendimiento cuántico es del 5%.

Reacción del luminol en medio acuoso. Características y condiciones.

Hemos visto que solo la presencia de O_2 (como agente oxidante) en medio básico (OH^-) es suficiente para producir la fluorescencia en las moléculas de luminol. Si empleamos agua destilada como disolvente, la concentración de oxígeno disuelto es muy baja como para producir un rendimiento adecuado. Por esta razón se ha de generar más oxígeno en el medio, empleándose la siguiente reacción redox:



El catión de hierro 3+ del hexacianoferrato(III) de potasio reacciona con peróxido de hidrógeno para producir oxígeno, el cual se aprecia por la formación de burbujas en la disolución. Este oxígeno reaccionará con luminol, en medio básico, para dar lugar a la secuencia de pasos que produce finalmente la especie activada responsable de la fluorescencia como ya se ha visto en el Esquema 2.

Demostración experimental.

Para llevar a cabo la experiencia quimioluminiscente a partir de las especies implicadas (luminol, medio básico y agente oxidante) se han de preparar las siguientes disoluciones:

Disolución A, 500 mL:

- **4 g de NaOH en unos 500 mL de agua destilada + 0.40 g de luminol (sólido gris-amarillo).**

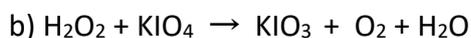
El luminol se hace más soluble a pH básico. También se necesita una base para extraer los protones de la unidad [HN-NH]. Estas disoluciones son relativamente estables (varios meses) pero han de mantenerse cerradas en la oscuridad y en un bote de plástico (el vidrio contiene trazas de metales que activan la descomposición con el oxígeno que haya disuelto en la disolución).

Para estudios cuantitativos y con objeto de obtener un rendimiento óptimo (mejor solubilidad del luminol) se ajusta el pH de la disolución a un valor de 10,5-11 con el empleo de otras combinaciones de sales, por ejemplo: $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$; $\text{Na}_2\text{CO}_3 + (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$...

Disolución B, 500 mL:

- **4 g de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, hexacianoferrato(3+) de potasio en 500 mL de agua destilada.**

Algunas sales de cobre, hierro o de cobalto como por ejemplo: CuSO_4 , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $(\text{Co}(\text{NO}_2)_2)$, son utilizadas para descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular (el agente oxidante de la reacción) y agua. La cuestión es utilizar una reacción que produzca oxígeno en el medio de reacción de forma adecuada. Los metales también lo hacen, pero algunos experimentan una reacción fuertemente exotérmica, liberando oxígeno vigorosamente, por ejemplo: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Pb}$. También se emplean otras reacciones para generar oxígeno en el medio de reacción, por ejemplo:



Ahora solo falta incluir el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , el cual se añade justo en el momento de la demostración. Para ello se procede de la siguiente manera:

-1º PASO. En una probeta de 100 mL se añaden unos 40 mL de la **disolución A** (Luminol + NaOH)

-2º PASO. En vaso de precipitado de 100 mL, se añaden unos 40 mL de la **disolución B** (sal hierro) y unas gotas (1 mL aprox.) de H_2O_2 al 30 % y se remueve hasta homogeneizar. ATENCIÓN: muy corrosivo.

-3º PASO. Se oscurece el lugar de la demostración experimental y se añade la disolución **B sobre A**.

NOTA: para la IUPAC el término agua oxigenada no está reconocido desde 2005. Se puede emplear como nombre comercial del producto químico, pero no en nomenclatura química.

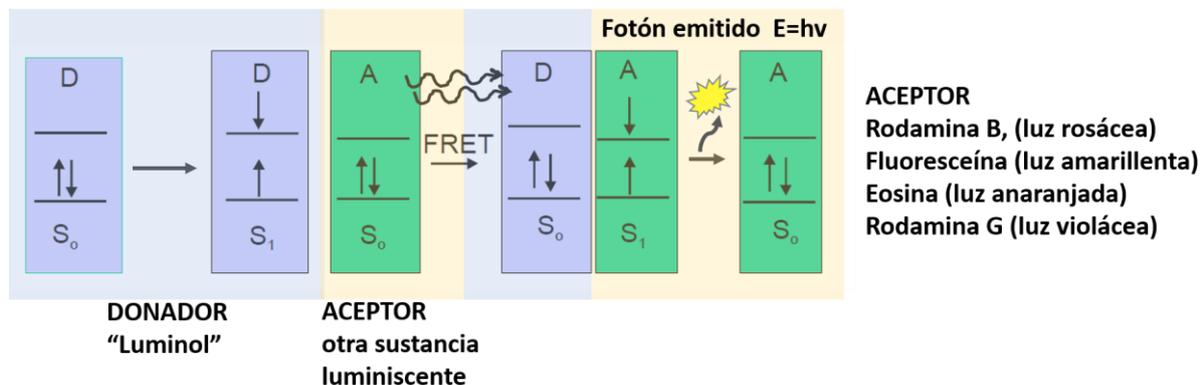
Transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET).

Transmisión de energía de resonancia o transferencia de energía de resonancia de Förster, habitualmente abreviado como FRET por sus siglas en inglés *Förster Resonance Energy Transfer*, es un mecanismo de transferencia de energía entre moléculas de dos sustancias distintas. Se basa en que la energía que lleva a una molécula (sustancia 1: DONADORA) al estado excitado puede transferirse a otra molécula cercana (sustancia 2: ACEPTORA) mediante un mecanismo dipolo-dipolo. Fue descrita por el científico alemán Theodor Förster en 1948.

Esto suele ser útil para el estudio de aquellas moléculas (aceptoras) que no tienen un mecanismo sencillo de activación y se utilizan las moléculas de otra sustancia cuyo mecanismo es bien conocido.

Cuando se induce por reacción química la activación de las moléculas de luminol para promocionarlas a un estado excitado, se ha observado la emisión de luz de una especie química intermedia cuando esta decae a su estado fundamental. El exceso de energía se ha emitido en forma de luz. Justo antes

de la emisión de luz, (Esquema 5) si las moléculas de luminol (DONADOR) están rodeadas de otras moléculas de otra sustancia (ACEPTOR), también luminiscentes, se puede transferir el exceso de energía a las moléculas aceptoras, lo que induce la emisión de fluorescencia en ellas y la desaparición de fluorescencia en las moléculas donadoras (luminol). Esta transferencia depende de la distancia entre las moléculas donador-aceptor, sus tamaños y la orientación de sus dipolos. Si la distancia es lo suficientemente corta, y la orientación de los momentos dipolares de las moléculas implicadas es la apropiada, el donador, una vez excitado, puede transferir la energía al aceptor.



Esquema 5. Mecanismo de transferencia de energía por fluorescencia. Desaparece la luminiscencia del luminol (donador de energía) y aparece la luminiscencia de una segunda sustancia (aceptora).

En una demostración de laboratorio (Esquema 6) se pueden utilizar las moléculas aceptoras de las siguientes sustancias: rodamina B, fluoresceína, eosina, rodamina G, timolftaleína, entre otras. Las disoluciones de estos cromóforos se preparan al 0,5 % en agua excepto la de rodamina G que es una disolución alcohólica. Antes de añadir la disolución B, se ponen 0,5 mL de disolución de estos cromóforos a la **disolución A** que contiene luminol + NaOH.

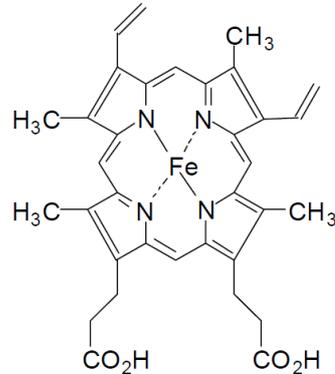


Esquema 6. FRET del luminol con otras sustancias fluorescentes. (1) Luminol; (2) fluoresceína; (3) Rodamina G; (4) Eosina.

APLICACIONES

1) El uso del luminol en el análisis forense.

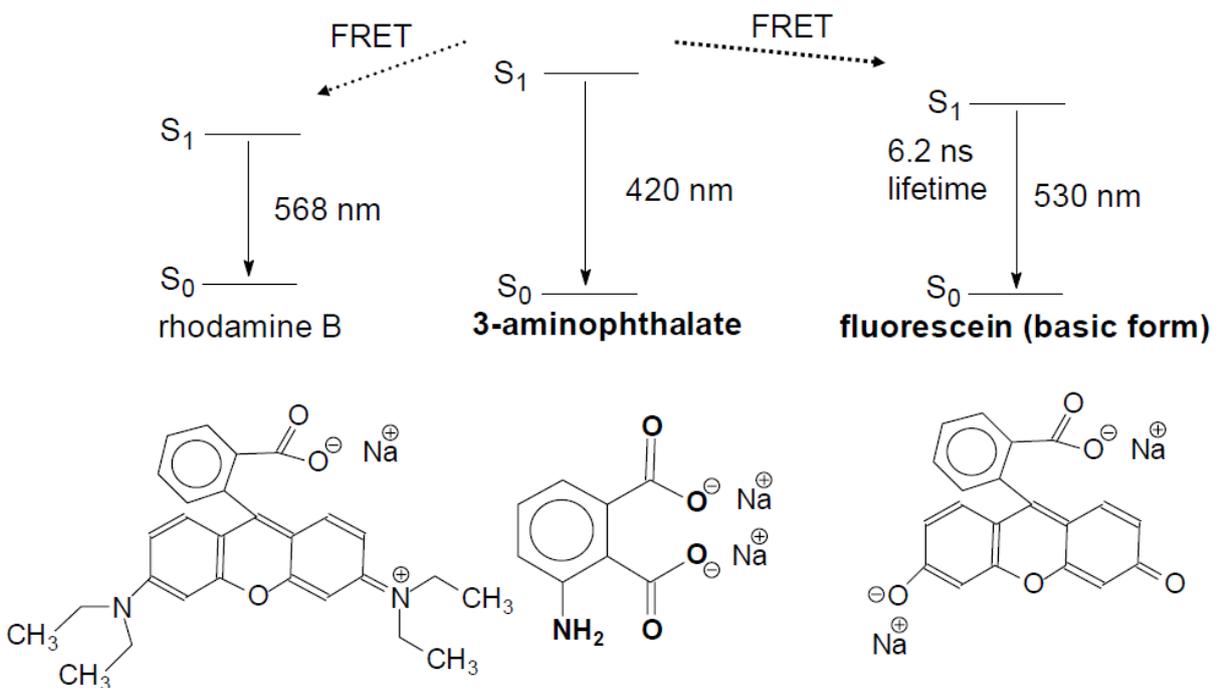
La hemoglobina presente en la sangre contiene un catión de hierro(2+) que es capaz de catalizar la descomposición de H_2O_2 en oxígeno. Cuando en la escena de un crimen se pulveriza una disolución de luminol con peróxido de hidrógeno sobre una superficie que pudiera contener trazas "imperceptibles" de sangre, se observarán señales de luminiscencia si aún sigue quedando restos de sangre.



Hemos visto además que la lejía también reacciona con H_2O_2 para producir oxígeno. Se ha observado en otras ocasiones que la escena de un crimen ha sido limpiada con lejía de forma contundente para eliminar posiblemente restos de sangre. Esto produce luminiscencia con mucha claridad o falso positivo, aunque no haya restos de sangre, lo que puede indicar, por otra parte, que algo sospechoso se intentaba ocultar.

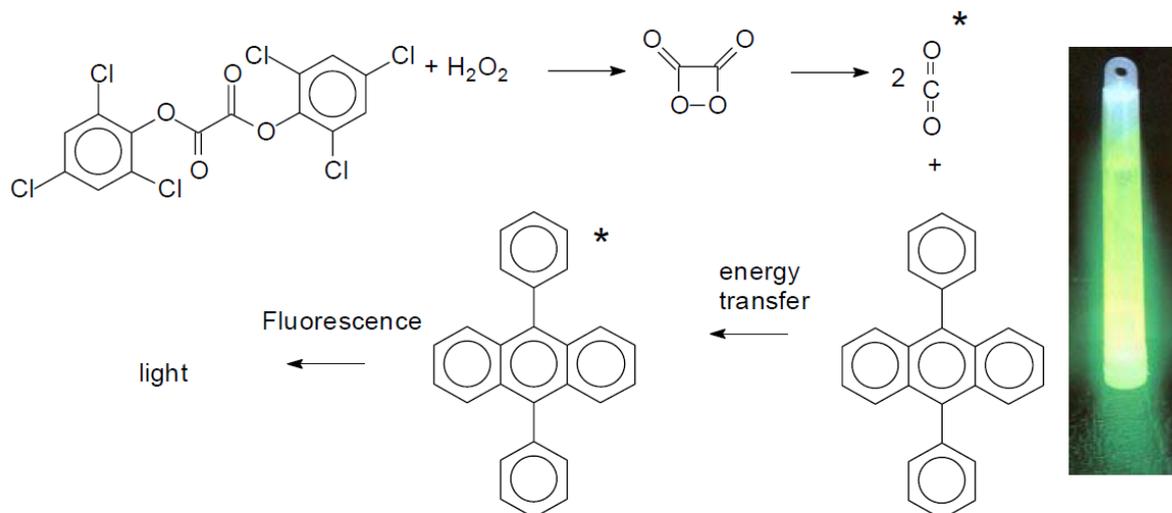
2) Ejemplo de FRET con luminol.

En este documento también se ha analizado que cuando se combina luminol con otros agentes cromóforos se puede producir la transferencia de energía desde el estado excitado del luminol a las moléculas del cromóforo. De esta manera se induce en estas moléculas una fluorescencia que se exhibe con la emisión de luz de distintos colores según el cromóforo utilizado. Aquí se muestran dos ejemplos: uno con rodamina B y el otro con fluoresceína.



3) Barritas luminosas (light stick)

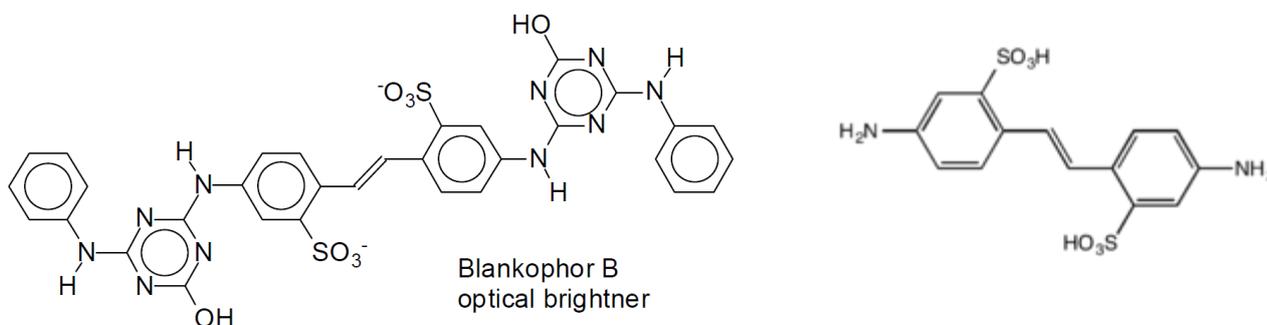
Algunas de las barras de luz que se comercializan actualmente contienen TCPO, el bis-(2,4,6-triclorofenil) oxalato. Al reaccionar con H_2O_2 (contenido en un compartimento interno de la barra) se forma una especie intermedia muy inestable de muy alta energía, el 1,2-dioxetanonida, en un estado excitado, que se descompone en dos moléculas de CO_2 , transfiriendo el exceso de energía al agente cromóforo que se utilice. Este cromóforo se excita por el mecanismo FRET visto con anterioridad, emitiendo luz durante unas 12 horas aprox. con un rendimiento cuántico del 25 %.



Otros ejemplos de barras luminosas utilizan oxalatos similares $[\text{R}-\text{O}-\text{CO}-\text{CO}-\text{O}-\text{R}]$, pero los productos formados suelen ser irritantes, y muchos de ellos se consideran carcinógenos potenciales. Por lo que no es recomendable utilizarlas para demostraciones de laboratorio en caso de extraerse los componentes químicos de estas barras de luz.

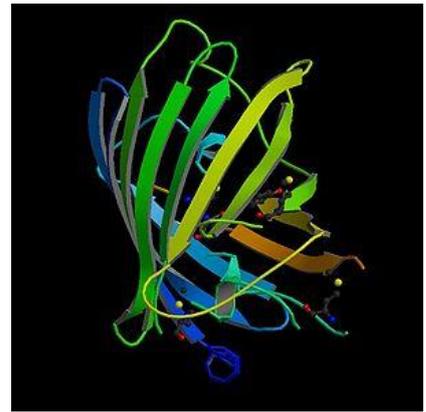
4) Blanqueadores para el material textil y el papel.

Los abrillantadores ópticos o agentes blanqueadores fluorescentes, son sustancias que se añaden a los detergentes o directamente a los materiales y fibras textiles, también al papel, que absorben luz en la región ultravioleta y violeta (usualmente 340-370 nm) del espectro electromagnético (es decir, por fotoluminiscencia promocionan a un estado excitado), y re-emiten luz en la región azul (típicamente 420-470 nm) cuando vuelven a su estado fundamental. Estos aditivos son usados frecuentemente para mejorar la apariencia del color de textiles y papeles, causando un efecto percibido de "blanqueamiento o un blanco muy brillante", haciendo que los materiales parezcan menos amarillos al incrementar la cantidad total de luz azul reflejada. Un ejemplo de ellos es el *Blankophor B* derivado del estilbencenodisulfónico.



5) Las proteínas verdes fluorescentes, GFP.

La proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, green fluorescent protein) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible. El gen que codifica esta proteína está aislado y se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador. Permiten ver procesos previamente invisibles, como el desarrollo de neuronas, cómo se diseminan las células cancerosas, el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, el crecimiento de bacterias patogénicas, la proliferación del virus del sida, entre otros.



El interés de la GFP desde el punto de vista biotecnológico reside en que esta proteína se comporta como una señal luminosa capaz de expresarse en aquellas células donde se ha introducido el gen que la codifica. Al llevar la fluorescencia incorporada en su estructura, la fluorescencia de la GFP puede producirse y mantenerse espontáneamente en aquellas células vivas que incluyan el gen que la codifica, sin necesidad de añadir otros agentes o cromóforos.

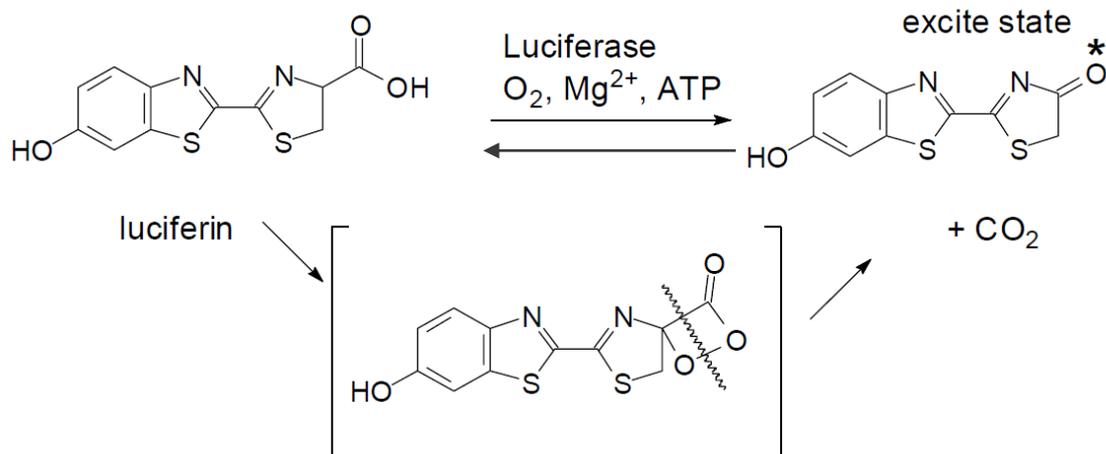
La GFP se puede codificar en el ADN de ratones salvajes, o transgénicos con expresión de la GFP en todas las células. Cuando los ratones son iluminados con luz azul las células cancerosas pueden ser fácilmente detectadas y seguidas permitiendo la localización de las metástasis y el fenómeno de angiogénesis en tumores en proliferación.

El 8 de octubre de 2008 los profesores Martin Chalfie (estadounidense), Osamu Shimomura (japonés radicado en los Estados Unidos) y Roger Y. Tsien (estadounidense) fueron galardonados con el Premio **Nobel de Química 2008** "por su descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde (GFP)", herramienta indispensable para la biología y la medicina moderna.

6) Bioluminiscencia. Luciérnagas.

La bioluminiscencia (con rendimiento cuántico en torno al 25 %) es el proceso a través del cual los organismos vivos producen luz, dando como resultado una reacción bioquímica en la que comúnmente interviene una enzima llamada luciferasa. Se produce como resultado de una reacción bioquímica en la que interviene el oxígeno, el ATP, una proteína llamada luciferina y la enzima luciferasa.

El proceso simplificado tiene lugar como sigue: la enzima luciferasa cataliza la interconversión de la luciferina reducida en la luciferina oxidada, consumiendo ATP y O_2 . Para su actividad se requiere además de iones Mg^{2+} . La luciferina oxidada alcanza un estado excitado que al desactivarse emite luz, la cual es muy notoria durante la noche. Se trata de una conversión directa de la energía química en energía lumínica. Es un fenómeno muy extendido en todos los niveles biológicos: bacterias, hongos, gusanos, moluscos, crustáceos, insectos, peces, medusas...



Bibliografía:

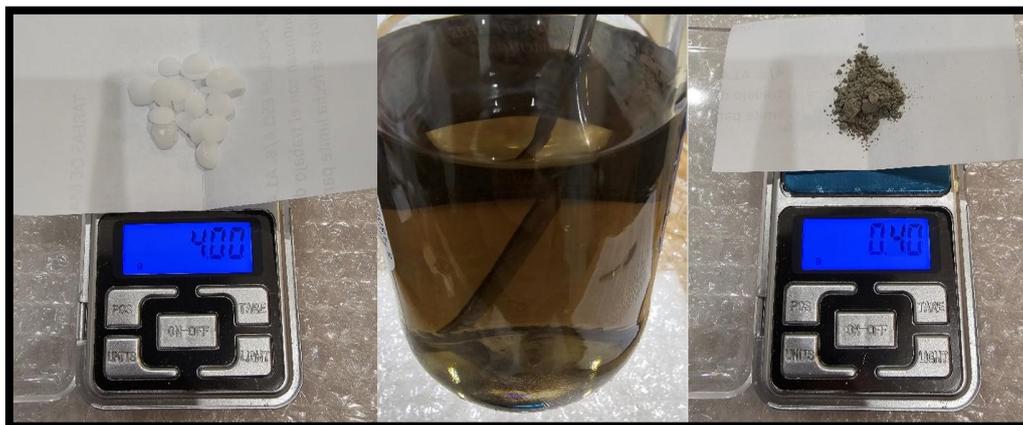
- [1] Bertrán R. J.; Nuñez D. J., Química Física. *Ed Ariel Ciencias*, Vol I (2002).
- [2] Experimentos de Química Clásica. The Royal Society of Chemistry. Ed Síntesis, 2002.
- [3] Ling Y.; Ya-Jun L., *J. Chem. Theory Comput.* 2019, 15, 3, 1798–1805. + Supporting Information.
- [4] Science in School. Spring 2016. Vol 35, pág. 30.
- [5] Science in School. Summer 2011. Vol 19.
- [6] Emil H. W.; Oliver Z.; Heinz H. K.; John H. M., *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 5, 940–941.
- [7] Cedrón, J.C., *Revista de Química PUCP*, 2011, Vol. 25, nº 1-2.
- [8] David F. Roswell, Emil H. White, *Methods in Enzymology*, Vol. 57, 1978, Pages 409-423.
- [9] Zomer, G.; Hastings, J. W.; Berthold, F.; Lundin, A.; Garcia Campana, A. M.; Niessner, R.; Christopolous, T. K.; Lowik, C.; Branchini, B.; Daunert, S.; Blum, L.; Kricka, L. J.; Roda, A. *Chemiluminescence and Bioluminescence*; The Royal Society of Chemistry, London, 2011.
- [10] Application of bioluminescence and chemiluminescence in biomedical sciences. *Methods Enzymol.* 2000; 305:333-45.
- [11] Chemical generation of excited states: the basis of chemiluminescence and bioluminescence. *Methods Enzymol.* 2000; 305:3-47.
- [12] Electronic Structure of the Chromophore in Green Fluorescent Protein (GFP) *J. Am. Chem. Soc.*, 1998:120 (36), 9370 -9371.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

- Material para la experiencia con luminol



Disolución A (Luminol con NaOH y 500 mL de agua destilada)



Disolución B (sal de hierro con peróxido de hidrógeno). Extremar la precaución con el peróxido de hidrógeno al 30 %. Uso de gafas de seguridad y guantes.

