

FUNDAMENTOS DE LUMINISCENCIA. LUMINOL

Los átomos o moléculas pueden ser excitados por distintos procesos, sus electrones pasan a niveles de energía superiores y pueden regresar 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 o acción mecánica.

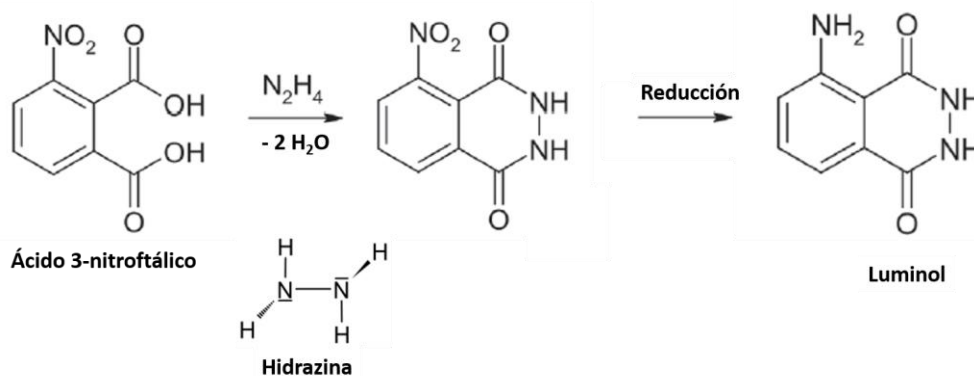
c) Electroluminiscencia si es por impacto con partículas cargadas.

d) Quimioluminiscencia si es por efecto de una reacción química (caso del luminol).

La **quimioluminiscencia** es un fenómeno que podemos reconocer fácilmente en algunos animales como las luciérnagas o también en las llamadas barras de luz (*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 más soluble a pH básico). Es una molécula sencilla, sin carbonos asimétricos (ópticamente inactivo), 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, en este caso, por reacción química con un agente oxidante como se analizará más adelante.



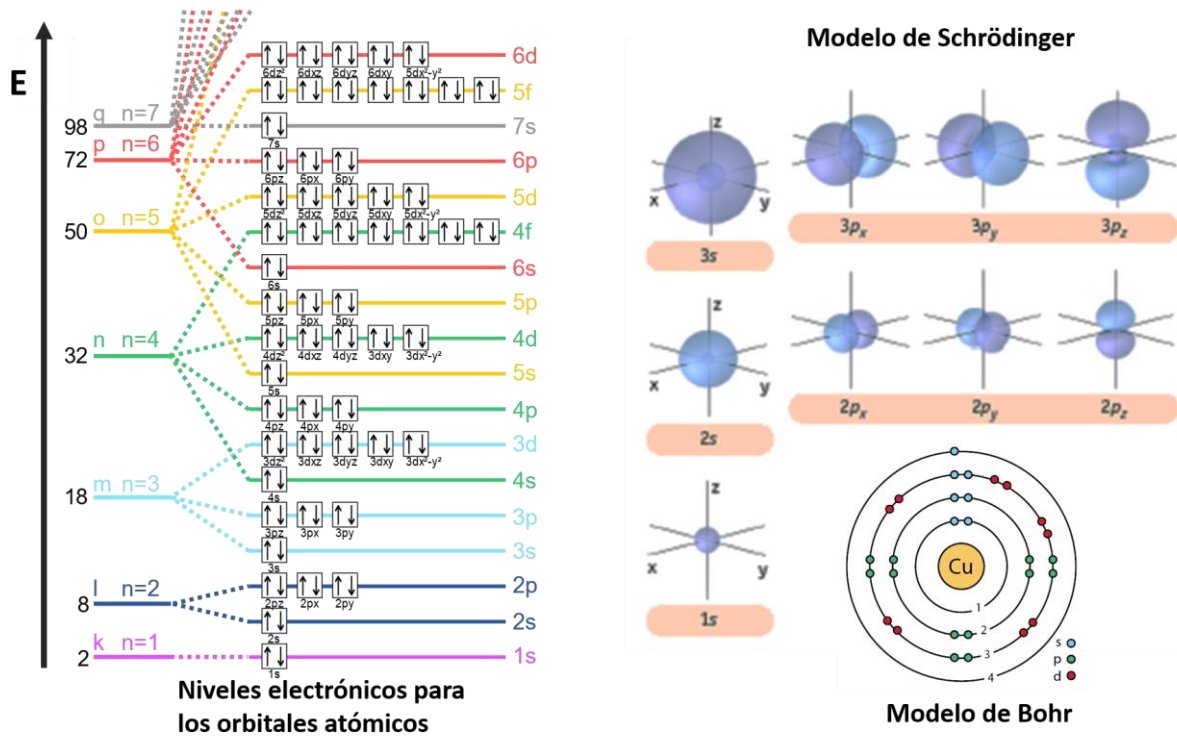
Esquema 1. Síntesis del luminol en dos pasos a partir del ácido 3-nitroftálico. El acoplamiento de la unidad [HN-NH] para cerrar el anillo produce la eliminación de dos moléculas de agua.

Antes de exponer los detalles del desarrollo experimental con luminol conviene realizar una revisión previa sobre algunos principios fundamentales para su comprensión y estudio.

- 1) Estados y niveles electrónicos, vibracionales y rotacionales. Energía de una molécula.
- 2) Estados excitados singlete y triplete. Estabilidad y correlación de espín.
- 3) Diagrama de Jablonsky. Vuelta al estado fundamental. Fluorescencia y fosforescencia.
- 4) Intensidad de la radiación. Integral del momento de transición. Regla de selección de espín $\Delta S=0$.
- 5) Mecanismo de desactivación del luminol por fluorescencia. Rendimiento cuántico.
- 6) Fluorescencia del luminol en agua. Características y condiciones.
- 7) Transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET).

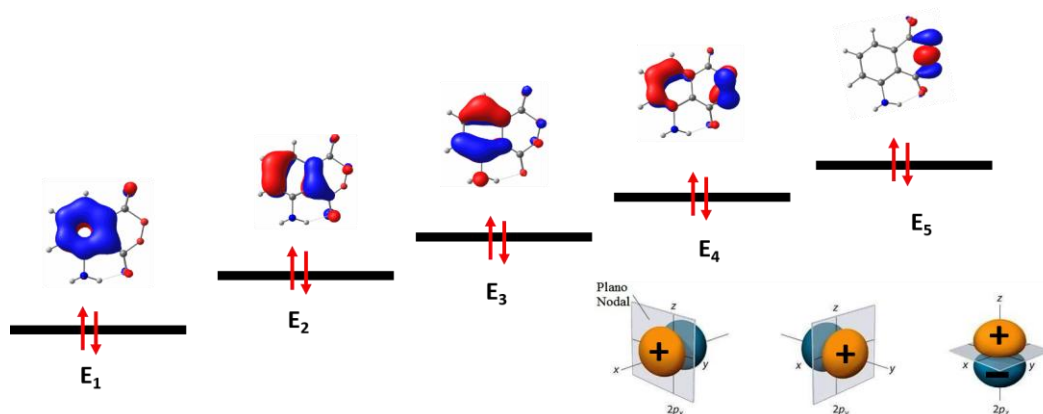
1) Estados y niveles electrónicos, vibracionales y rotacionales. Energía de una molécula.

La configuración electrónica (Esquema 2) de un átomo (Ej.: $1s^2, 2s^2 2p^6, 3s^2 \dots$) establece la distribución de sus electrones alrededor del núcleo atómico en unas zonas donde existe una alta probabilidad de localizarlos (orbitales atómicos). Según el *principio de exclusión de Pauli* los electrones van ocupando, dos en dos, con espines apareados (+1/2, -1/2), los diferentes orbitales atómicos y por orden creciente de energía (*principio de construcción de Aufbau*). Los electrones más cercanos al núcleo son fuertemente atraídos y ocupan niveles de energía inferiores, representando esto una situación de mayor estabilidad. En cambio, los electrones serán menos atraídos cuando estén situados en niveles de energía más altos, resultando así una situación de menor estabilidad.



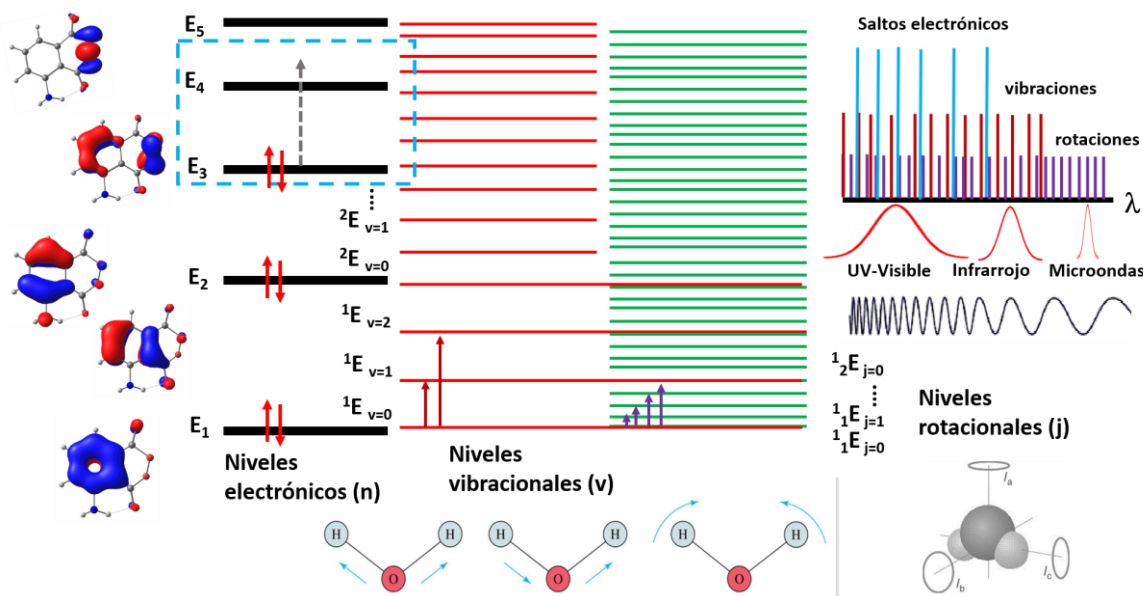
Esquema 2. Configuración electrónica asociada a los niveles de energía de un átomo. Distribución de los electrones por capas (modelo de Bohr) o por orbitales atómicos (modelo de Schrödinger).

De la misma manera, cuando los átomos se enlazan entre sí para formar moléculas, los electrones de valencia aportados por cada uno de ellos para la formación de los distintos enlaces, se colocan por pares en los denominados orbitales moleculares (Esquema 3). Estos orbitales representan las distintas zonas de la molécula donde hay una mayor probabilidad de encontrarlos y se forman por combinación o, en otras palabras, a partir de "la suma de cada uno de los orbitales atómicos de valencia que ponen en juego cada uno de los átomos implicados".



Esquema 3. Listado de algunos orbitales moleculares del luminol ordenados en orden creciente de energía. Al igual que ocurre con la función matemática de un orbital atómico p_x , la función matemática de un orbital molecular también pueden tomar valores positivos y negativos, coloreados en azul y rojo, respectivamente.

Ahora bien, mientras los electrones de valencia se mueven muy rápidamente por las distintas zonas de la molécula (rojo y azul), es decir, por sus orbitales moleculares cuyos **niveles electrónicos** son $E_1, E_2, E_3, E_4, E_5 \dots$ (véase Esquema 4), los núcleos atómicos están vibrando, aunque con una menor rapidez (**aproximación de Born-Oppenheimer**), lo que conduce a que los enlaces entre los átomos A-B-C-D... están continuamente alargándose y estrechándose. En una molécula podemos encontrar muchas maneras o “modos de vibración” y cada uno de ellos tendrá una energía distinta, lo que dará lugar a los llamados **niveles energéticos vibracionales**, E_v . Así, para cada nivel electrónico E_n se establecen, a su vez, sus correspondientes niveles de vibración con $v=0,1,2,3 \dots$. Por último, debemos incluir además el movimiento de rotación (“modos de rotación”) que poseen las moléculas sobre distintos ejes según su simetría, dando lugar a los denominados **niveles energéticos rotacionales**, E_j .

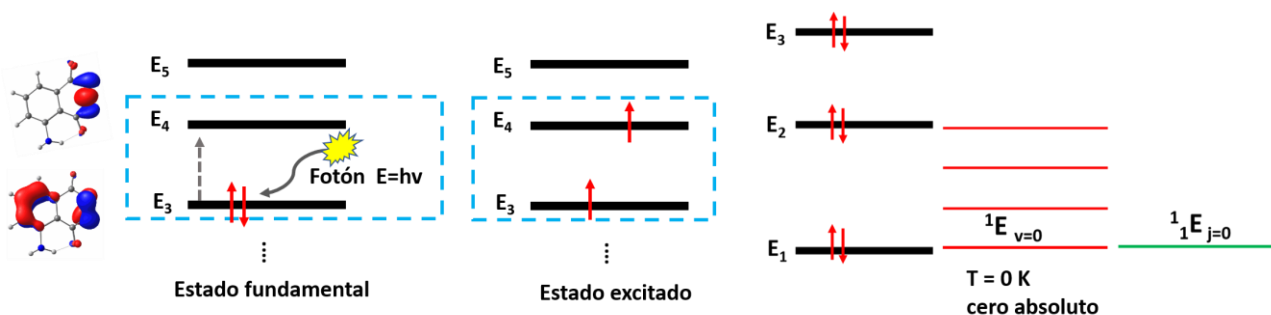


Esquema 4. Niveles de energía de una molécula. Los saltos entre niveles electrónicos promocionan un electrón de un orbital molecular a otro; en los saltos vibracionales, los núcleos atómicos de las moléculas cambian su forma de “vibrar”; y en los saltos rotacionales se producen cambios en la forma de rotación.

Así pues, cuando una molécula tiene sus electrones colocados en los niveles de energía más bajos posible, se dice que se encuentra en su estado fundamental. Supongamos que una molécula tiene tres niveles energéticos, E_1, E_2 y E_3 , ocupados cada uno de ellos con **2 electrones**. La energía total de la molécula en su estado fundamental se calcula como sigue:

$$E_{\text{total}} = 2 \times E_1 + 2 \times E_2 + 2 \times E_3 = \dots \text{ KJ/molécula}$$

Si la radiación recibida tiene energía suficiente para promocionar un electrón desde el último nivel ocupado (o incluso desde niveles inferiores) hasta a un nivel superior no ocupado, se dice que la molécula se encuentra en un estado excitado (Esquema 5).



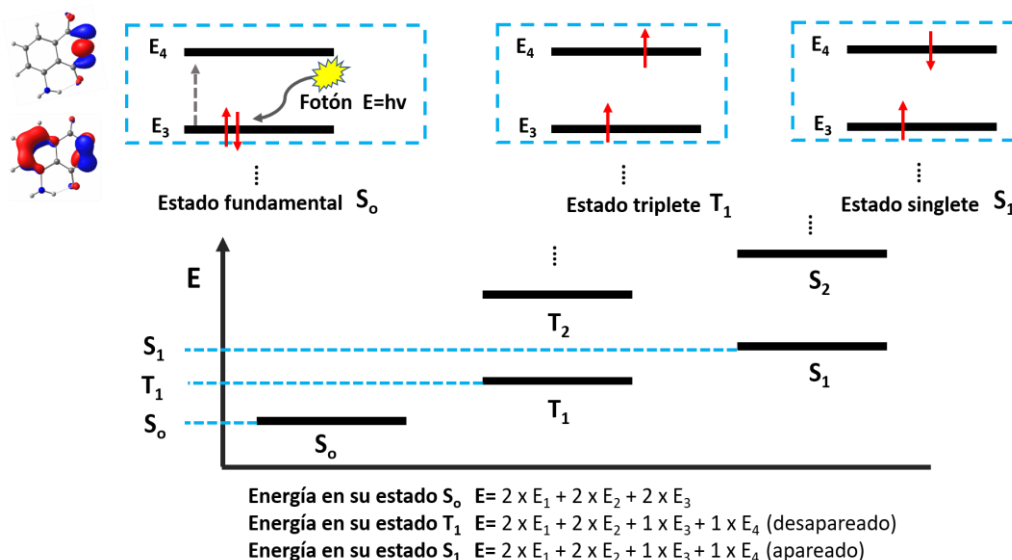
Esquema 5. La fracción de moléculas que experimenta la absorción de un fotón (un fotón por molécula) conlleva la promoción de un electrón hasta un nivel superior, por ejemplo: $E_3 \rightarrow E_4$. Esto implica que el electrón pasa de localizarse en una zona de la molécula a otra zona. Igualmente, la energía total de la molécula en su estado excitado sería: $E_{\text{total}} = 2 \times E_1 + 2 \times E_2 + 1 \times E_3 + 1 \times E_4 = \dots \text{ KJ/molécula}$.

Lo mismo puede ocurrir con los estados vibracionales y rotacionales. Las moléculas se encontrarán en los estados de vibración y de rotación más estables (de más baja energía) si la radiación no tiene suficiente energía como para promocionarlas hasta unos estados de rotación o vibración de niveles superiores. *En términos aproximados, los saltos rotacionales son promovidos por fotones de longitudes de onda que están en la región del microondas, mientras que los saltos vibracionales comprenden la región del infrarrojo. Los saltos entre niveles electrónicos están en la zona del ultravioleta-visible.*

Es más, la mecánica cuántica demuestra que, en el cero absoluto, las moléculas de una sustancia se encuentran en su estado fundamental (ocupando los niveles más bajos de energía), vibrando en su estado vibración más bajo posible con una energía mínima $E_{v=0}$, pero con un estado rotacional nulo. A medida que la temperatura aumenta o incide radiación de la zona del microondas, encontraremos en la muestra una fracción de moléculas que empezarán a rotar, ocupándose niveles rotacionales superiores. Si continúa el aumento de temperatura o se hace incidir radiación infrarroja, las moléculas empezarán a vibrar en otros modos y con más energía, ocupándose niveles vibracionales superiores. Finalmente, si la radiación tiene suficiente energía o de la zona UV-Visible, podemos encontrar saltos electrónicos que lleven a las moléculas a estados excitados.

2) Estados excitados singlete (S) y triplete (T). Correlación de espín y estabilidad.

Cuando una molécula en su estado fundamental recibe un fotón para promocionar un electrón a un nivel superior, se pueden dar dos posibilidades (Esquema 6). La primera tiene un electrón en un nivel superior desapareado y recibe el nombre de estado triplete, representado con la letra T_1 ; la otra alternativa lleva al electrón con un espín apareado con el electrón del nivel inferior y recibe el nombre de estado singlete, S_1 (*multiplicidad de espín de un estado electrónico, $S: n+1$, siendo n el número de electrones desapareados*). Si el electrón es excitado a niveles aún más altos se pueden dar los distintos estados tripletes (T_2, T_3, \dots) y singletes (S_2, S_3, \dots) de más energía. Nótese que, si la molécula en su estado fundamental tiene todos sus electrones apareados ($S=n+1=1, n=0$), el estado electrónico de energía más baja se representa por un singlete S_0 , siendo su valor de energía $E_{\text{total}} = 2 \times E_1 + 2 \times E_2 + 2 \times E_3 \dots$



Esquema 5. Energía total de la molécula para los estados fundamental S_0 , primer triplete T_1 y primer singlete.

Hay que resaltar que los *estados tripletes tienen energías ligeramente inferiores a los estados singletes*. Un electrón excitado a un nivel superior con un estado singlete (*apareado*), tiene más fácil regresar al orbital de partida puesto que no incumpliría el principio de exclusión de Pauli. Esto lleva a que el electrón excitado experimente más cerca al otro electrón (*mayor correlación de espín*), y experimente *mayor repulsión* y, por tanto, sea menos estable y con energía más alta. Sin embargo, en el estado triplete (*desapareado*), el electrón excitado incumpliría el principio de exclusión si regresara al nivel inferior, lo que hace que esté siempre más alejado del otro electrón (*menor correlación de espín*) y, por tanto, experimente una *menor repulsión*, con lo que estará más atraído por el núcleo, esto es, más estabilizado y con un nivel de energía algo más bajo respecto al singlete.

3) Diagrama de Jablonsky. Vuelta al estado fundamental. Fluorescencia y fosforescencia.

En un tiempo posterior, o cuando la radiación deja de incidir, los electrones vuelven a caer a niveles inferiores. La *desexcitación* de una molécula puede ocurrir de diferentes maneras. Los distintos procesos de desactivación se recogen en el llamado *diagrama de Jablonsky* (Esquema 6).

Supongamos que una fracción de moléculas en su estado fundamental S_0 **absorbe radiación** pasando a otros niveles superiores (S_1 , S_2 , S_3 ...) según la energía de estos fotones. En general, será excitada también vibracional y rotacionalmente. La **absorción** es seguida por una rápida *relajación vibracional (RV)*, debido a las colisiones con otras moléculas, lo que lleva a la molécula al estado vibracional más bajo del estado excitado en el que se encuentre. A partir de aquí varios procesos de desactivación pueden ocurrir entonces. Supongamos que inicialmente la molécula se promociona hasta un nivel vibracional excitado del segundo singlete S_2 , seguida de una relajación vibracional. Posteriormente, puede ocurrir:

A) **Conversión interna, CI**. La molécula continúa el proceso de relajación, *sin emitir luz*, a través de un estado vibracional altamente excitado del estado S_1 que solapa con un estado de vibración del nivel superior, en este caso S_2 . La conversión interna desde S_1 hasta S_0 puede seguir ocurriendo igualmente de la misma manera, llegando finalmente a su estado electrónico fundamental S_0 por relajación vibracional.

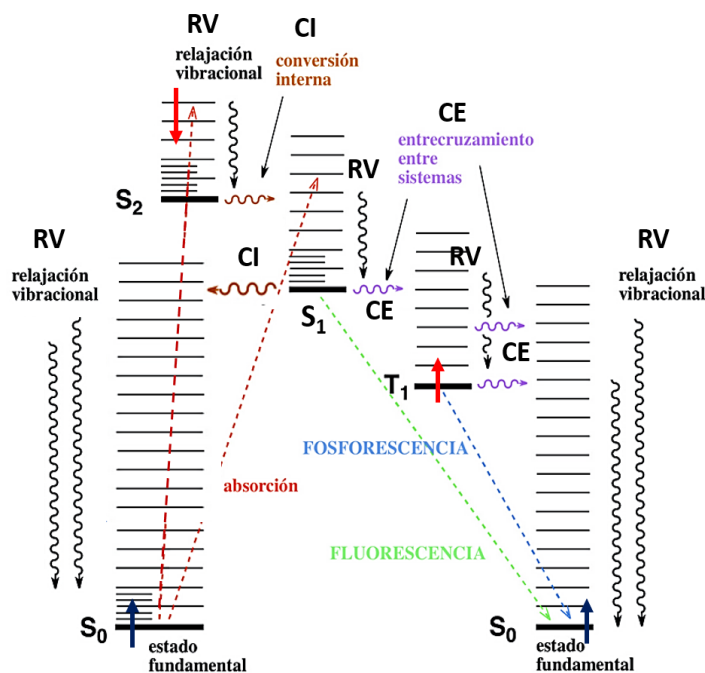
B) **Cruce de estados, CE**. La molécula puede pasar a otro estado electrónico de distinta multiplicidad (sin emitir luz), seguido de una relajación vibracional, hasta el nivel más bajo del estado electrónico en el que se encuentre. Por ejemplo, puede cruzar del estado singlete S_1 al estado triplete T_1 seguido de una rápida relajación vibracional. Desde este nivel T_1 puede ocurrir de nuevo otro cruce de estados (CE) con el estado fundamental a través de un estado de vibración solapado entre estos dos estados, y relajarse o desactivarse por colisiones hasta el nivel más bajo del estado fundamental S_0 .

Estos procesos son *no radiativos* (no emiten luz) y compiten con los procesos radiativos como la *fluorescencia* o *fosforescencia*. La emisión de luz se produce solo desde los estados excitados más bajos de cada multiplicidad, S_1 o T_1 (**regla de Kasha**).

La **fluorescencia** ocurre cuando la desactivación tiene lugar entre los estados S_1 y S_0 , emitiendo luz de energía correspondiente a la diferencia energética entre estos dos estados. La **fosforescencia** ocurre cuando la emisión de luz tiene lugar desde T_1 hasta S_0 . Cuando estos estados S_1 y/o T_1 son posibles según la naturaleza química de la molécula, tienen que cumplirse algunas reglas para que ocurra uno u otro fenómeno radiativo. Estas condiciones se analizarán con detalle en el siguiente apartado.

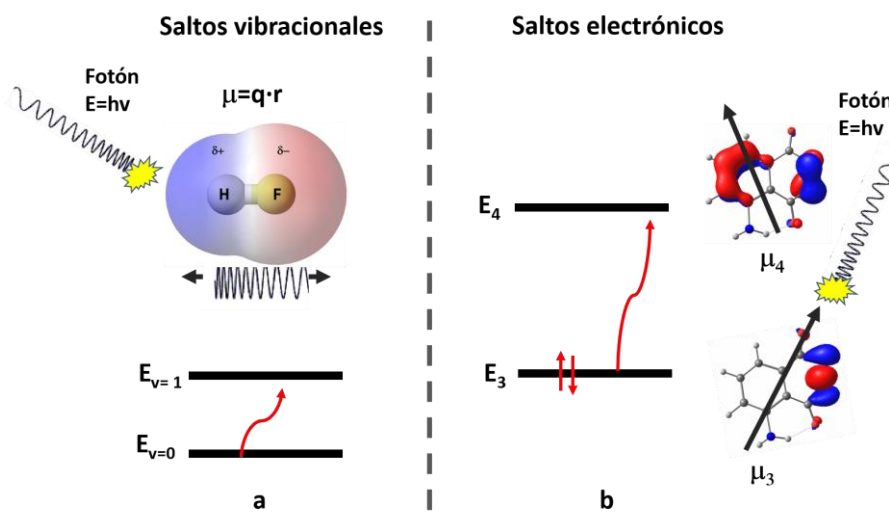
4) Intensidad de la radiación. Integral del momento de transición. Regla de selección de espín ΔS .

Una molécula diatómica AB (véase Esquema 7a), cuyo enlace A-B se alarga y se acorta continuamente, se comporta un dipolo eléctrico oscilante $\mu=q \cdot r$ (cargas vibrando con una frecuencia concreta). Si esta frecuencia tiene el mismo valor que la frecuencia de los fotones de una radiación determinada, se produce la absorción de energía por resonancia, esto es, porque se acoplan ambos procesos oscilantes, promocionando a la molécula a otros estados de vibración de más energía. Esta forma de interacción de la materia con la radiación recibe el nombre de **mecanismo de dipolo eléctrico**. **La mecánica cuántica establece que una transición entre dos estados electrónicos será posible cuando haya una variación en el tiempo del momento dipolar eléctrico de una molécula.**



Esquema 6. Procesos de desactivación. Diagrama de Jablonsky.

A modo de ejemplo, en el Esquema 7b se muestra un salto electrónico que implica una redistribución de los electrones desde una zona de la molécula (orbital molecular de partida con energía E_3) a otra zona (orbital molecular de llegada con energía E_4), proporcionando un cambio en el momento dipolar. Es por ello que todas las moléculas presentan espectros electrónicos de absorción y emisión.



Esquema 7. Una distribución de cargas en una molécula, oscilando con una frecuencia ν , puede interactuar por resonancia con los fotones de una radiación de la misma frecuencia, produciendo tránsitos vibracionales (izquierda) y/o electrónicos (derecha).

Por su parte, la **intensidad I_{nm} de la radiación emitida** depende de otros factores además de la variación del momento dipolar μ . El siguiente factor a considerar es la multiplicidad de espín (singlete o triplete).

Para una transición electrónica $n \rightarrow m$, la intensidad de la señal I es proporcional al cuadrado del momento de transición, μ_{nm}^2 , que se corresponde, a su vez, con la siguiente integral:

$$I_{nm} \propto \mu_{nm}^2 = \left[\int \psi_n \hat{\mu} \psi_m d\tau \right]^2$$

donde ψ_n y ψ_m representan las funciones de ondas (orbital molecular) de los estados inicial y final, respectivamente, y μ el "operador" momento dipolar que vincula las distribuciones de cargas de los estados implicados. Esta integral no se anula si se produce una variación en el momento dipolar durante la transición. Ahora bien, si en la función de onda separamos la **contribución del espín χ_n** de la **parte orbital**, tenemos: $\psi_n = \phi_n \cdot \chi_n$, donde

$$I \propto \mu_{nm}^2 = \left[\int \phi_n \cdot \chi_n \hat{\mu} \phi_m \cdot \chi_m d\tau \right]^2$$

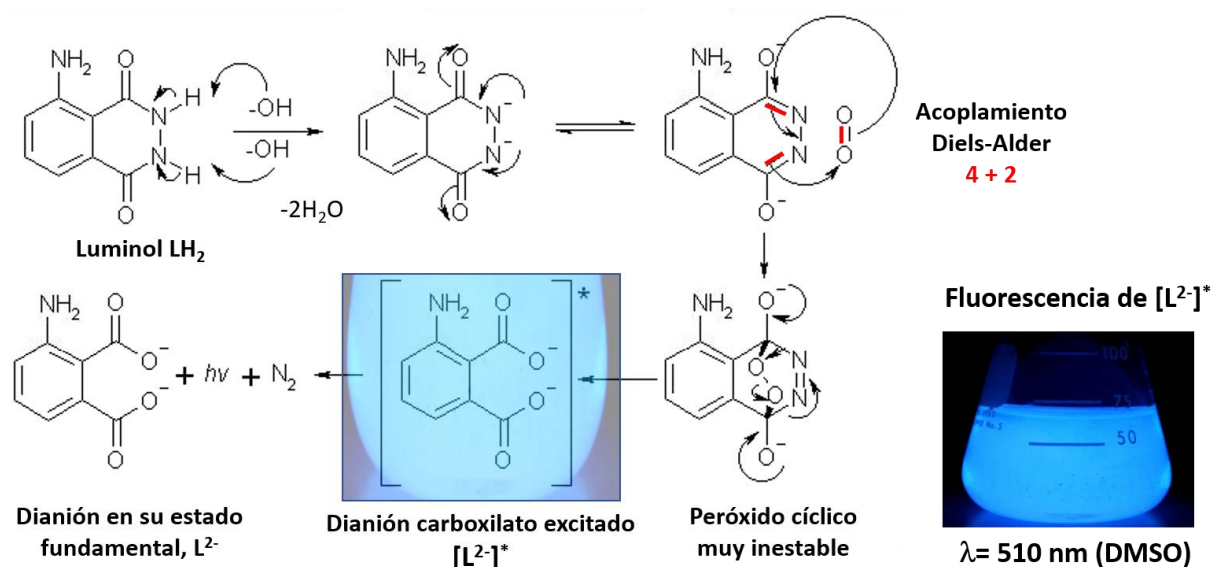
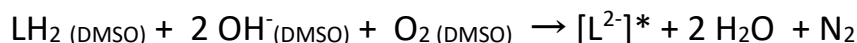
$$I \propto \mu_{nm}^2 = \left[\int \phi_n \hat{\mu} \phi_m d\tau \right]^2 \cdot \left[\int \chi_n \cdot \chi_m d\tau \right]^2$$

La integral $\int \chi_n \cdot \chi_m d\tau$ será nula, si las funciones de partida y final tienen distinto estado de espín (similar a los términos independientes en un determinante que hacen que este sea distinto de cero) como por ejemplo ocurre en la fosforescencia. De ahí que un tránsito desde el estado triplete T_1 (con 2e- desapareados) hasta el estado fundamental S_0 (con cero e- desapareados) esté prohibido, siendo $\Delta S = 3 - 1 = 2$. En cambio, la integral $\int \chi_n \cdot \chi_m d\tau$ tendrá el valor de 1 (similar a las funciones dependientes en un determinante) para un tránsito $S_1 \rightarrow S_0$ correspondiente a la fluorescencia, lo que indica que está permitido por el mecanismo de dipolo eléctrico, siendo $\Delta S = 1 - 1 = 0$. Hay que subrayar que el carácter prohibido de la transición correspondiente a la fosforescencia no significa que no tenga lugar, más bien, que la desactivación no es inmediata, resultado un estado metaestable que tarda más tiempo en desactivarse. Por ello, la fosforescencia persiste durante un tiempo después de que la radiación de excitación cese, sin embargo, la fluorescencia es inmediata y finaliza rápidamente una vez cesa la radiación de excitación.

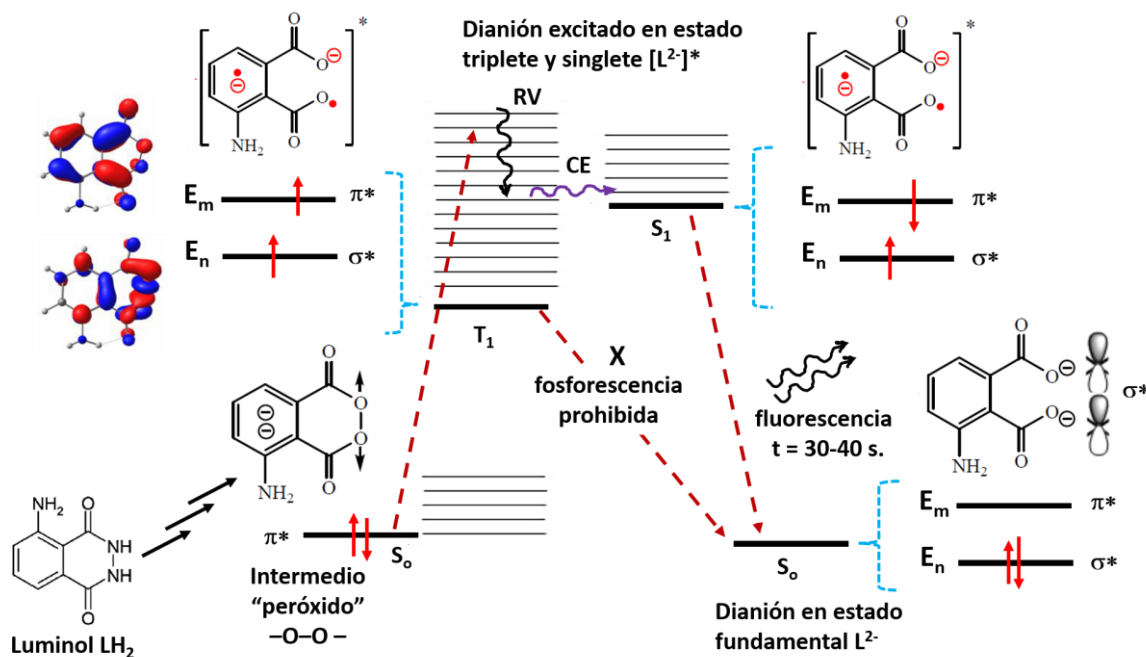
Así pues, los tránsitos permitidos son aquellos que cumplen la denominada **regla de selección de espín $\Delta S = 0$** , esto es, los tránsitos de tipo singlete \leftrightarrow singlete, pero no los tránsitos triplete \leftrightarrow singlete.

5) Mecanismo de desactivación del luminol por fluorescencia. Rendimiento cuántico.

La molécula de luminol, en adelante LH_2 , en disolventes apróticos como el DMSO (dimetilsulfóxido), reacciona con oxígeno molecular y en medio básico para dar un dianión $[L^{2-}]^*$ en un estado excitado que se desactiva por fluorescencia de acuerdo con la secuencia de pasos mostrada en el Esquema 8:



Esquema 8. Secuencia confirmada con ^{18}O marcado para la excitación del luminol por reacción con oxígeno molecular en medio básico y posterior desactivación de su dianión dicarboxilato por emisión espontánea luz.



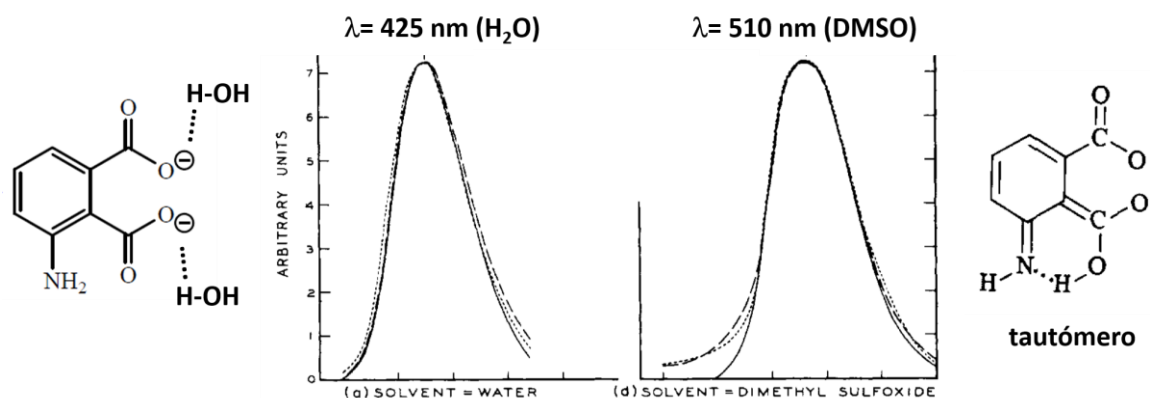
Esquema 9. Secuencia de pasos para la desactivación por fluorescencia de la especie intermedia $[L^{2-}]^*$.

Siguiendo el Esquema 8, la molécula de partida LH_2 experimenta una reacción con **oxígeno molecular (acoplamiento 4+2 Diels-Alder)** que la lleva a una especie intermedia muy inestable (de alta energía), un **peróxido cíclico** que rompe el enlace $-O-O-$, liberando nitrógeno molecular como buen grupo saliente. Esto produce un **dianión dicarboxilato $L^{2-}]^*$** 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.

Tanto los datos experimentales como los cálculos teóricos han demostrado para el luminol el siguiente proceso de desactivación ilustrado en el Esquema 9. Inicialmente, el **peróxido cíclico** formado como especie intermedia, 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 S₁. En este caso, la regla de selección de espín, ΔS=0, permite la vuelta al estado fundamental entre dos estados singletes, S₁→S₀. 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 (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 10). En DMSO la especie responsable de la fluorescencia es un tautómero (*ceto-enol*) del dianión L²⁻ que se forma por interacción del grupo amino con el 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 -NH₂ y no se forma el tautómero.



Esquema 10. 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:

Φ_R = fracción de moléculas que siguen el proceso que conduce a la especie L²⁻. (Reacting)

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

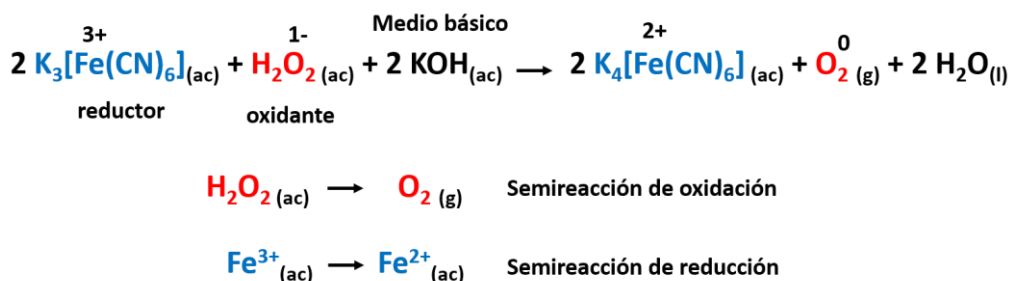
Φ_{FL} = fracción de moléculas que se desactivan por fluorescencia.

donde $\Phi_{QL} = \Phi_R \cdot \Phi_{ES} \cdot \Phi_{FL}$

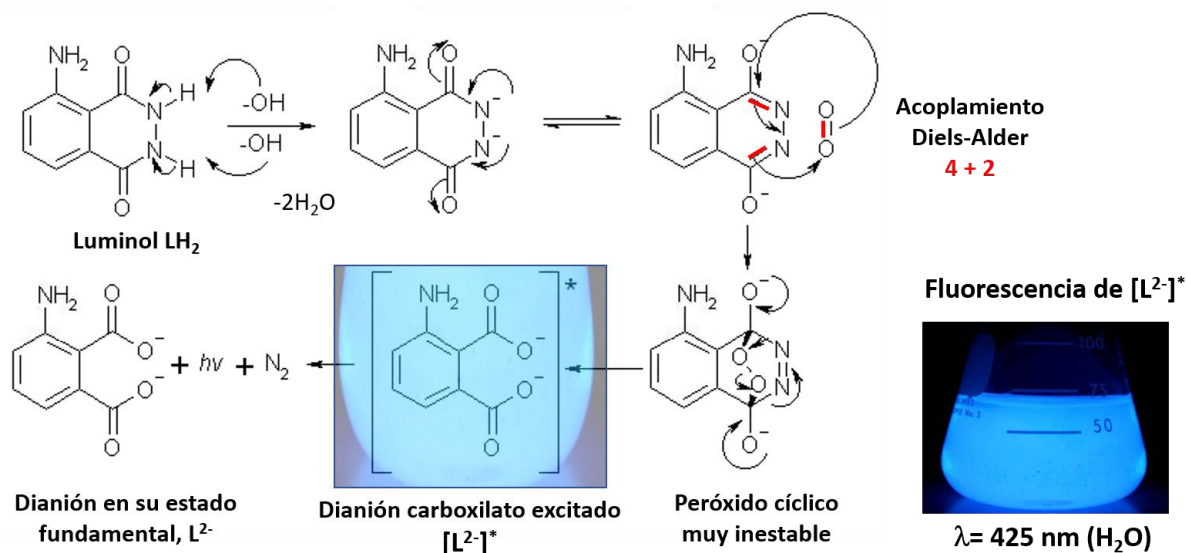
El rendimiento cuántico del luminol en agua es de $\Phi_{QL} = 0.01 \times 100 = 1\%$, esto es, de 100 moléculas, solo una se desactiva por fluorescencia. El resto se desactiva por relajación vibracional (RV) hasta el estado fundamental sin emisión de luz. En DMSO, el rendimiento cuántico es del 5%.

6) Reacción del luminol en medio acuoso. Características y condiciones.

Hemos visto que solo la presencia de O₂ (como agente oxidante) en medio básico (OH⁻) es suficiente para producir la fluorescencia en las moléculas de luminol, por ejemplo, empleando dimetilsulfóxido como disolvente. El medio básico es necesario para extraer los protones del grupo [HN-NH]. Si empleamos agua destilada como disolvente, la concentración de oxígeno disuelto es también 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 [L²⁻]* de la fluorescencia (Esquema 11).



Esquema 11. Reacción del luminol en medio acuoso. Fluorescencia emitida con $\lambda = 425 \text{ nm}$.

Para llevar a cabo una demostración experimental con las especies implicadas (luminol, medio básico, agente oxidante...) se han de preparar las siguientes disoluciones:

Disolución A, 500 mL:

- **0.40 g de luminol (400 mg de sólido gris-amarillo) + 4 g de NaOH en 500 mL de agua destilada.**
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 (por 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).

Disolución B, 500 mL:

- **4 g de K₃[Fe(CN)₆], hexacianoferrato(3+) de potasio en 500 mL de agua destilada.**
Algunas sales de cobre, hierro o cobalto 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 forma adecuada. Los metales también lo hacen, pero la reacción es fuertemente exotérmica y libera oxígeno vigorosamente, por ejemplo: H₂O₂ + Pb

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 % (ATENCIÓN: muy corrosivo).

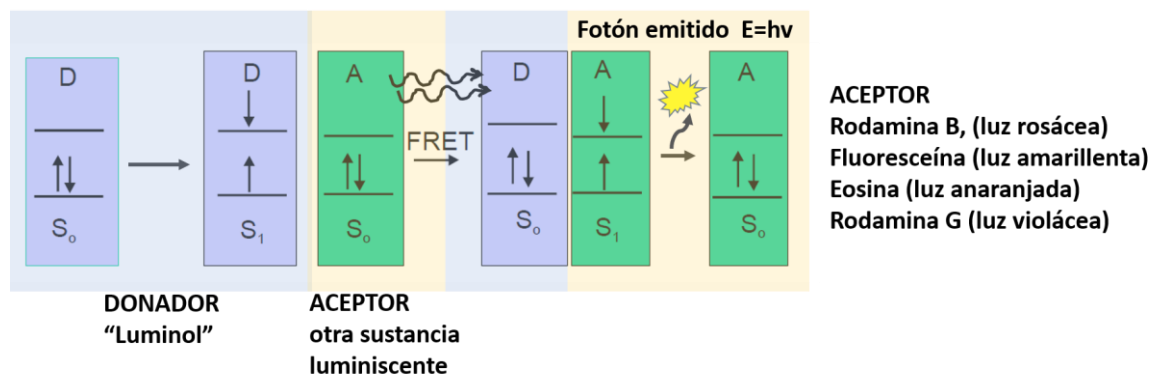
-3º PASO. Se oscurece el lugar de la demostración experimental y se añade la disolución **B sobre A**.

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

7) 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 acoplador 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.



Esquema 12. Mecanismo de transferencia de energía por fluorescencia. Desaparece la luminiscencia del luminol (donador de energía) y aparece la luminiscencia de una segunda sustancia (aceptora).

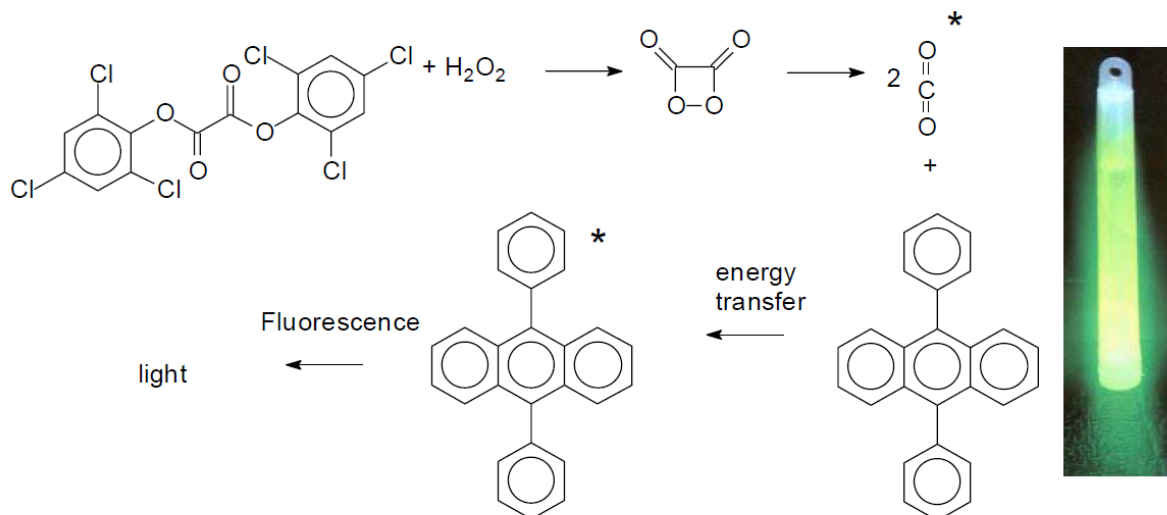
Cuando se induce por reacción química la activación de las moléculas de luminol para promocionarlas a un estado excitado, se ha observado la emisión de luz de una especie química intermedia cuando esta decae a su estado fundamental. El exceso de energía se ha emitido en forma de luz. Justo antes de la emisión de luz, (Esquema 12) 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, su tamaño 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 13. FRET del luminol con otras sustancias luminiscentes. (1) Luminol; (2) fluoresceína; (3) Rodamina G; (4) Eosina.

3) Barritas luminosas (*light stick*)

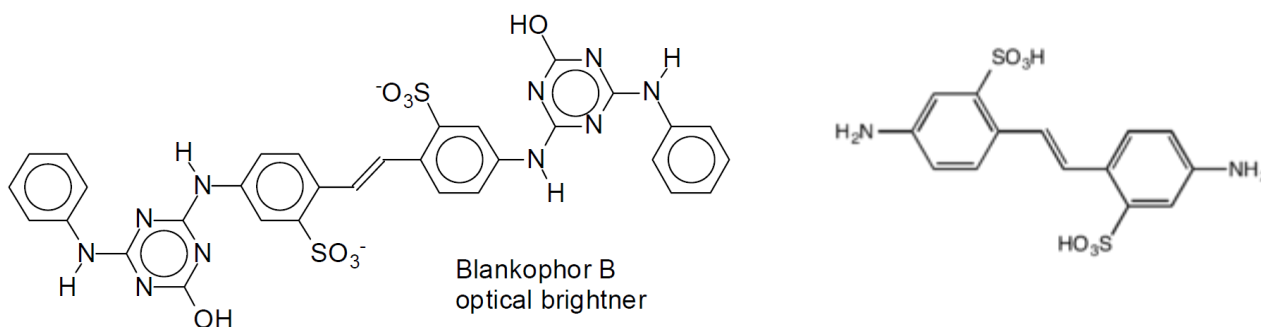
Algunas de las barras de luz que se comercializan actualmente contienen TCPO, el bis-(2,4,6-triclorofenil) oxalato. Al reaccionar con H_2O_2 (contenido en un compartimento interno de la barra) se forma una especie intermedia muy inestable de muy alta energía, el 1,2-dioxietanodiona, en un estado excitado, 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.

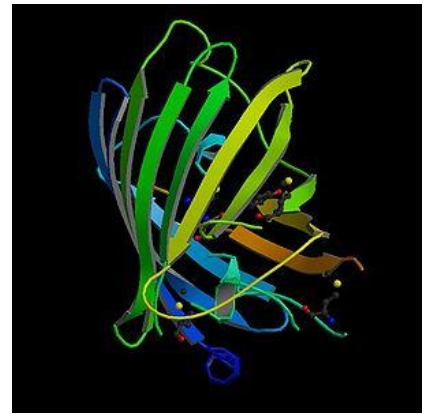
4) Blanqueadores para el material textil y el papel.

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 reemiten 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.

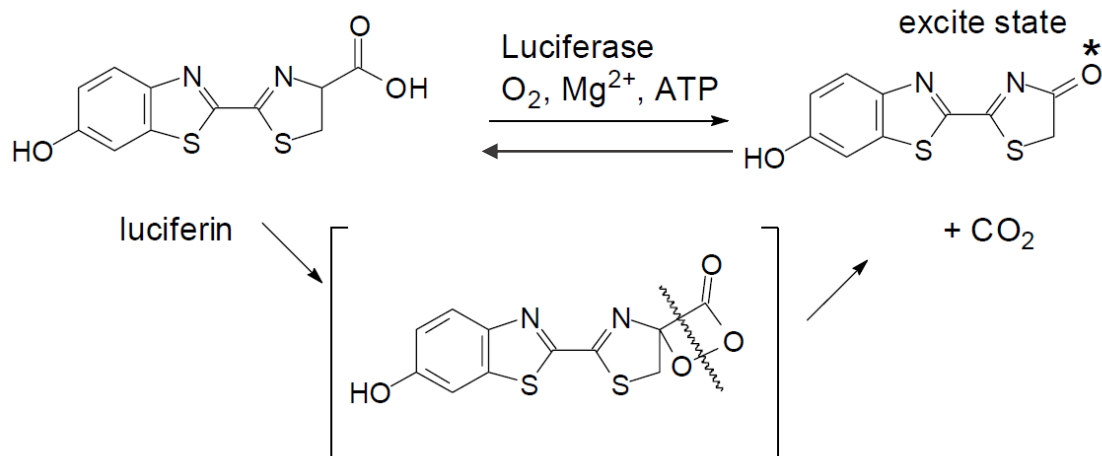
La GFP se puede codificar en el ADN de ratones salvajes, o transgénicos con expresión de la GFP en todas las células. Cuando los ratones son iluminados con luz azul las células cancerosas pueden ser fácilmente detectadas y seguidas permitiendo la localización de las metástasis y el fenómeno de angiogénesis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

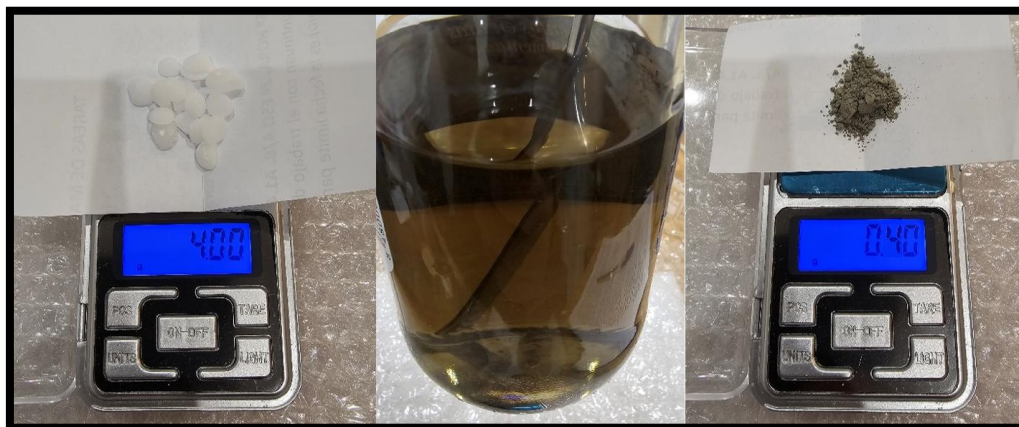
- [1] Bertrán R. J.; Núñez D. J., Química Física. *Ed Ariel Ciencias*, Vol I (2002).
- [2] Experimentos de Química Clásica. The Royal Society of Chemistry. Ed Síntesis, 2002.
- [3] Ling Y.; Ya-Jun L., *J. Chem. Theory Comput.* 2019, 15, 3, 1798–1805. + Supporting Information.
- [4] Science in School. 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.

