

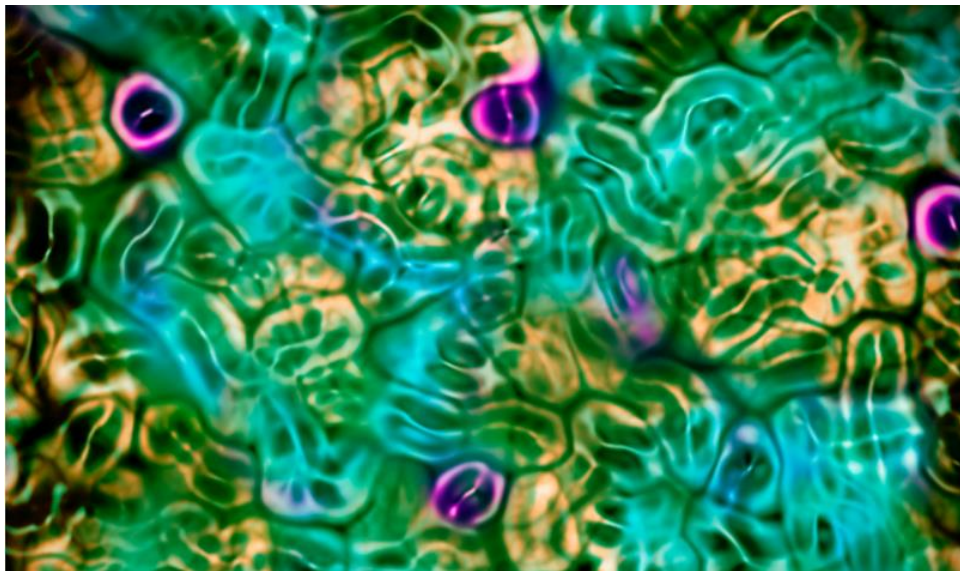


UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

APLICACIONES DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA



Blanca Esther Márquez Noriego



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

APLICACIONES DE LA

QUIMIOLUMINISCENCIA

Autora: Blanca Esther Márquez Noriego.

Lugar y fecha de presentación: Sevilla, 6 de julio de 2022.

Departamento: Química Analítica.

Tutoras: María Dolores Hernanz Vila, María José Jara Palacios.

Tipología del proyecto: Trabajo de revisión bibliográfica.

RESUMEN

El fenómeno de la luminiscencia se produce cuando un átomo o molécula, previamente excitados, regresan a su estado fundamental, emitiendo luz. Las bases que explican este proceso quedaron establecidas por Jablonski en 1930, quien elaboró un diagrama donde detalla la emisión de luz por parte de un compuesto preexcitado.

Las reacciones de luminiscencia pueden clasificarse en función del agente causal de las mismas. Así, la quimioluminiscencia estará originada por una reacción química que genera un producto excitado. Este producto liberará la energía sobrante en forma de emisión de luz al pasar a su estado fundamental, en el que es más estable.

Los avances en el área de la investigación han permitido elaborar nuevos métodos de detección basados en reacciones quimioluminiscentes, que aportan beneficios en múltiples campos. La elevada sensibilidad, unida al bajo costo del proceso y a la rapidez en la obtención de resultados, hacen de estas técnicas un recurso muy valioso.

El luminol y los ésteres de acridinio son dos compuestos utilizados en multitud de reacciones quimioluminiscentes con amplias posibilidades de uso, incluido los ensayos de inmunoanálisis por quimioluminiscencia, que aportan grandes ventajas para la salud de la población.

Así, a lo largo de esta revisión bibliográfica se expondrá el valor del luminol para la detección de manchas de sangre, con aplicación en medicina forense y técnicas de esterilización y prevención de infecciones nosocomiales; para garantizar la calidad y el buen estado de aguas de consumo y de alimentos; y como método de detección del cáncer. De igual forma, se mostrará la relevancia de los ésteres de acridinio en la detección de enfermedades como el COVID, el Alzheimer o la toxoplasmosis.

Palabras clave: Luminiscencia, quimioluminiscencia, luminol, éster de acridinio.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN.....	9
3. METODOLOGÍA.....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1 LUMINOL.	11
4.1.1 APLICACIÓN DEL LUMINOL EN MEDICINA FORENSE.....	12
4.1.2 APLICACIÓN DEL LUMINOL EN SANIDAD	14
4.1.3 APLICACIÓN DEL LUMINOL EN ONCOLOGÍA.	15
4.1.4 APLICACIÓN DEL LUMINOL EN CONTROL DE CALIDAD	18
4.1.5 APLICACIÓN DEL LUMINOL GESTIÓN MEDIOAMBIENTAL.....	21
4.2 ÉSTERES DE ACRIDINIO.....	21
4.2.1 APLICACIÓN DE LOS ÉSTERES DE ACRIDINIO EN ALZHEIMER.....	22
4.2.2 APLICACIÓN DE LOS ÉSTERES DE ACRIDINIO EN COVID-19.....	24
4.2.3 APLICACIÓN DE LOS ÉSTERES DE ACRIDINIO EN TOXOPLASMOSIS.....	26
5. CONCLUSIONES.....	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

El fenómeno de la luminiscencia lleva apreciándose desde hace milenios. Sus primeros registros datan del año 1.300 a. C. en el que Shih Ching plasmó en el Libro de las Odas cómo las luciérnagas y los gusanos emitían luz, proceso que conocemos hoy en día como bioluminiscencia (Correcher y García-Guinea, 2015).

Aunque al principio se especuló con que el calor daba origen a la reacción de luminiscencia, más tarde se comprobó que no era el agente causal del proceso. En 1930, Jablonski propuso un esquema de electrones y niveles de energía en el que se aprecia la esencia del proceso luminiscente. Éste se ha conservado hasta la época actual (Correcher y García-Guinea, 2015).

Así, la luminiscencia hace referencia a la emisión de fotones que se produce cuando los electrones de una molécula o átomo, previamente excitados, recobran al estado fundamental (Cabriales-Gómez, 2004). Esto se debe a que, al recibir energía externa, con independencia del tipo que sea, los electrones adquieren energía y pasan a un estado excitado, lo que conlleva un cambio de orbital. La molécula o el átomo busca su estado más estable, por lo que el electrón vuelve al estado fundamental emitiendo luz (Correcher y García-Guinea, 2015).

El diagrama que se muestra en la Figura 1 ilustra los distintos estados electrónicos de una molécula o átomo y permite diferenciar la fluorescencia de la fosforescencia.

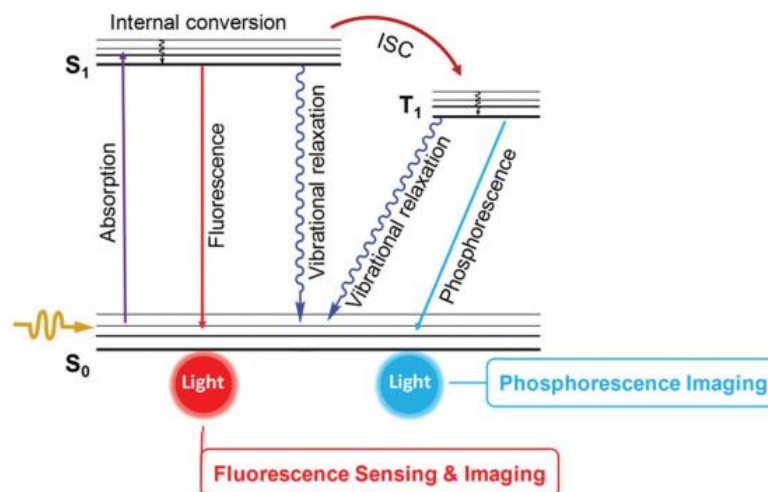


FIGURA 1: DIAGRAMA DE JABLONSKI. Representación del Diagrama de Jablonski donde se aprecian los fenómenos de la fluorescencia y la fosforescencia (Feng et al., 2020).

Cuando un agente activador aporta energía y es absorbida por la partícula, se produce una transición electrónica desde el estado fundamental (S_0) a un estado excitado singulete (S_n) (Cabriales-Gómez, 2004), y más tarde sufrirá una conversión interna rápida hacia el estado singulete más bajo (S_1) (Feng et al., 2020). Así, en función del orbital al que acceda el electrón, se dan estados excitados diferentes.

En la fluorescencia, el electrón pasará desde el estado S_1 al S_0 para disipar la energía, emitiendo un fotón con una longitud de onda más larga y energía más corta (Feng et al., 2020). En este proceso, la absorción de la energía se produce a la vez que la emisión de la luz. La duración de la fluorescencia es de 10^{-8} segundos (Correcher y García-Guinea, 2015).

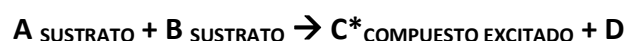
En el proceso de fosforescencia, el electrón pasará desde el estado S_1 a T_1 , que es el triplete más bajo en energía. Este proceso conlleva un cambio en la multiplicidad de espín del electrón. Al pasar posteriormente del estado T_1 al estado fundamental (S_0) se produce la emisión de fotones (Feng et al., 2020). Los estados tripletes tardan más en llegar a su estado fundamental (Cabriales-Gómez, 2004), por lo que en la fosforescencia el tiempo de emisión es mayor y persiste aun habiendo terminado la excitación del átomo o molécula (Correcher y García-Guinea, 2015).

En función del agente causal de la excitación del electrón, existen diversos tipos de reacciones luminiscentes (Tabla 1):

TABLA 1: AGENTE CAUSAL VS REACCIÓN LUMINISCENTE. Tabla donde se relaciona el tipo de agente causal que genera una reacción luminiscente, la cual se encuentra denominada por el mismo.

AGENTE CAUSAL VS REACCIÓN LUMINISCENTE	
Fotones de baja energía (luz UV o luz visible)	Fotoluminiscencia
Campo eléctrico	Electroluminiscencia
Reacción química	Quimioluminiscencia
Organismo vivo	Bioluminiscencia
Ultrasonido	Sonoluminiscencia
Térmico	Incandescencia
Campos magnéticos	Magnetoluminiscencia

Esta revisión bibliográfica versará acerca de las aplicaciones de la quimioluminiscencia, que queda definida como una reacción química en la cual, la energía que se libera se emite, además de en forma de calor o energía, en forma de luz. Así, la especie electrónicamente excitada derivada de una reacción química, libera la energía sobrante en forma de emisión de luz al pasar a su estado fundamental (Yan et al., 2019). La reacción más sencilla de quimioluminiscencia es:



La luz que se emite en este tipo de reacciones se manifiesta en una longitud de onda que abarca desde el ultravioleta hasta el infrarrojo; y tiene diversos grados de intensidad, así como distintos tiempos de vida (Barni et al., 2007).

Para que se aprecie la luz emitida durante el proceso de quimioluminiscencia es necesario que se cumplan unas determinadas condiciones:

- Debe ser una reacción exotérmica.
- Un número significativamente alto de moléculas deben alcanzar el estado excitado, por lo que la reacción debe ser energéticamente favorable.

- Debe existir una vía de desactivación favorable que permita la emisión de luz de la molécula o átomo previamente excitado.

La intensidad de la emisión depende de la velocidad de reacción y de la eficiencia del proceso, es decir, el número de fotones emitidos irá en función del número de moléculas que reaccionan (Barni et al., 2007).

Desde finales de los años setenta se ha desarrollado la quimioluminiscencia. Esta técnica analítica cuenta con innumerables ventajas (Yan et al., 2019), así, muestran especial interés las aplicaciones en los campos de la biomedicina, de la química, de la alimentación y del medio ambiente entre otros (García-Campaña y Baeyens, 2001). Esto es debido a que posee la capacidad de detectar y cuantificar macro y micromoléculas, incluyendo proteínas, carbohidratos, ADN y ARN (Khan et al., 2014).

Es una técnica que cuenta con una gran sensibilidad de detección (Yan et al., 2019) y supone además una alternativa barata y sencilla en cuanto a su utilización (García-Campaña y Baeyens, 2001).

Existen muchos sustratos utilizados en las reacciones de quimioluminiscencia. Esta revisión versará sobre el luminol y los ésteres de acridinio, así como de su aplicación en distintos campos.

Un mejor conocimiento de este proceso permitirá crear nuevas funcionalidades y aplicaciones con alta repercusión en la salud de la población con el fin de optimizar los procesos analíticos derivados.

2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

Ante la necesidad real de obtener diagnósticos médicos con alta sensibilidad y especificidad en el menor tiempo posible, es necesario conocer cómo se produce la reacción quimioluminiscente. En la actualidad, este proceso se ha vuelto vital en el diagnóstico de estados patológicos y en la pronta detección de los mismos, que permiten una rápida actuación para tratarlos.

Así, el objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica, lo más actualizada posible, acerca de las diversas aplicaciones de la quimioluminiscencia.

Para alcanzar este objetivo general, se marcaron los siguientes objetivos específicos:

- Comprender el proceso luminiscente y conocer las características que definen una reacción quimioluminiscente.
- Investigar las posibles aplicaciones de este proceso analítico y, específicamente, la utilidad del luminol y de los ésteres de acridinio como compuestos quimioluminiscentes.
- Describir el beneficio que aporta, en cada campo, este tipo de prueba analítica argumentando la repercusión que supone contar con este tipo de tecnología, lo cual permite valorar las recientes aplicaciones sanitarias.

3. METODOLOGÍA

Estrategia de búsqueda:

Para la realización de la presente revisión, se han consultado diversas bases de datos, como PubMed, ScienceDirect, Google Scholar y Dialnet, las cuales han permitido obtener información de relevancia utilizada para la elaboración de este trabajo. La búsqueda de artículos científicos en las mismas se realizó en lengua inglesa y española.

La búsqueda se fundamentó principalmente en las palabras clave: “luminescence”, “chimioluminescence”, “luminol”, “chimioluminescence applications”. Así, se partió desde los conceptos más generales hasta la búsqueda de términos más concretos que han ayudado a elaborar cada apartado del trabajo.

Criterios de selección:

- Bibliografía actualizada. Para desarrollar el trabajo se ha intentado realizar una revisión lo más actualizada posible. La selección de artículos científicos se ha centrado en publicaciones de los últimos 25 años.
- Idioma. Se han seleccionado los artículos en lengua inglesa o española. Los artículos redactados en otra lengua fueron descartados.
- Artículos completos. Se descartaron los artículos en los que sólo estaba disponible la parte correspondiente al resumen o abstract.

Todo el material documental utilizado para la realización de esta revisión, ya sea como fuente de información o de imágenes, viene especificado en el apartado de bibliografía, al final del documento.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: APLICACIONES DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA

El fenómeno quimioluminiscente puede aplicarse en multitud de campos analíticos. Así, este tipo de pruebas resultan cruciales para procesos que engloban diagnósticos médicos, control de calidad de alimentos y aguas de consumo, control de contaminación ambiental o técnicas de investigación forense.

En esta revisión bibliográfica se abarcarán dos moléculas utilizadas en procesos de detección analítico debido a sus propiedades quimioluminiscentes. Ambas de especial importancia debido a los últimos avances y a su amplio uso a lo largo de los años.

4.1. LUMINOL

La molécula de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona) es uno de los compuestos luminiscentes más utilizados en química analítica, con aplicación en el campo forense, biomédico, clínico y medioambiental debido a que implica alta sensibilidad, bajo costo, simplicidad y selectividad. Todas estas características lo convierten en un método muy valioso en la detección analítica mediante reacciones quimioluminiscentes (Khan et al., 2014).

Se presenta como un polvo sólido cristalino amarillo que se encuentra estable a temperatura ambiente y sensible a la luz. Es insoluble en agua, pero soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos polares. Las disoluciones de luminol son muy sensibles a la luz y térmicamente inestables, por lo que no deben someterse a altas temperaturas (Khan et al., 2014). Normalmente son estables entre 8 y 12 horas. Se utiliza principalmente en reacciones quimioluminiscentes directas en fase líquida (Barni et al., 2007).

En la Figura 2 se detalla el proceso de excitación del luminol y la posterior emisión de energía en forma de luz. Como puede apreciarse en la reacción, para que se produzca la oxidación a 3-aminoftalato (3-APA) necesitamos un oxidante fuerte, como permanganato (MnO_4^-), hipoclorito (ClO^-), yodo (I_2) o hidróxido (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En la reacción puede intervenir un catalizador, que puede ser algún

metal de transición como el cobre (Cu^{2+}), el hierro (Fe^{2+}) o el cobalto (Co^{2+}), o bien metacomplejos (Meseguer, 2004).

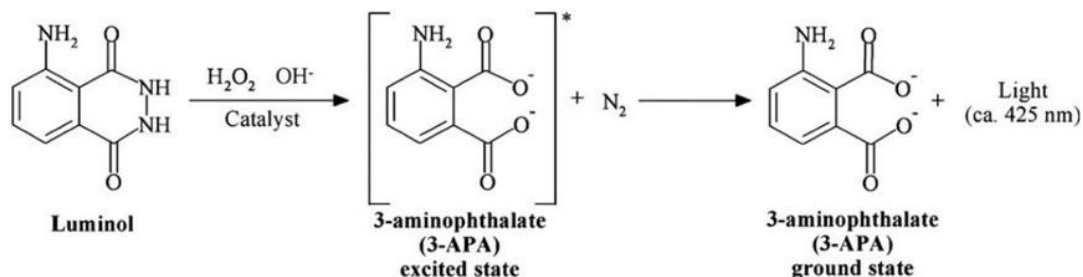


FIGURA 2: QUIMIOLUMINISCENCIA DEL LUMINOL. Proceso en el que se detalla la reacción del luminol con un oxidante en medio básico en presencia de un catalizador, que provoca la emisión de luz en la reacción quimioluminiscente. Obtenida de Stoica et al., 2016.

Existen factores que condicionan la intensidad luminiscente emitida como el pH de la reacción, la concentración de luminol y la de los agentes oxidantes.

El pH ejerce un papel fundamental en este aspecto. La intensidad aumenta con un pH más alto, midiéndose la intensidad máxima en un rango de 8-9,5. Hay que encontrar un equilibrio que favorezca la buena intensidad del luminol y la actividad de la peroxidasa, ya que a pH=9,5 hay una mejor sensibilidad por parte del luminol, pero el peróxido se difunde más en el gel; disminuye su actividad retardando el alcance de la estabilidad. A pH=8 la actividad del luminol es menor, pero alcanza una mejor estabilidad (Khan et al., 2014).

El luminol alcanza su mayor intensidad a una concentración concreta. Por encima de ésta, las señales disminuyen (Khan et al., 2014).

4.1.1. Aplicaciones del luminol en medicina forense: Detección de sangre en muestra

Durante muchos años se ha utilizado el luminol en investigación forense como una herramienta en la búsqueda de manchas de sangre (Barni et al., 2007), es un método utilizado a nivel mundial debido al su elevada sensibilidad (Khan et al., 2014), que permite tanto la detección de manchas de sangre oculta como la posibilidad de inspeccionar grandes zonas (Stoica et al., 2016).

Esta prueba tiene una gran sensibilidad, ya que puede detectar la presencia de sangre diluida hasta un nivel de $1:10^6$, lo que equivale a $1 \mu\text{L}$ de sangre en un litro de disolución (Barni et al., 2007) incluso años después de haberse producido el depósito de la sangre sobre la superficie (Khan et al., 2014).

Este proceso se fundamenta en la quimioluminiscencia que se produce cuando el luminol reacciona con el hierro férrico.

El mecanismo se basa en la capacidad de la hemoglobina (Hb) y sus derivados sanguíneos para potenciar la oxidación del luminol en presencia de una disolución alcalina (Stoica et al., 2016). La hemoglobina es la molécula que transporta el oxígeno en nuestro organismo (Khan et al., 2014). Se encuentra en el interior de los eritrocitos y está formada por cuatro subunidades que presentan un grupo hemo (protoporfirina IX- Fe^{2+}) en su interior.

Cuando la sangre sale del organismo sufre un proceso de degradación y el hierro se oxida, pasando a Fe^{3+} . Tras aplicar luminol, el hierro férrico puede catalizar su oxidación y la descomposición del peróxido, dando lugar a la consecuente reacción quimioluminiscente (Barni et al., 2007).

El procedimiento a seguir es rociar la zona con una disolución de luminol y peróxido en ambientes oscuros. Como presenta efectos irritantes y nocivos, se recomienda utilizar material EPI formado por gafas, respiradores, guantes y ropa protectora (Stoica et al., 2016).

Las zonas que emiten luz se marcan para su detección cuando haya cesado la emisión, pudiendo realizar fotos o videos de la luz obtenida. Así, queda revelada la distribución de la sangre, que permitirá reconstruir la presunta escena del crimen (Khan et al., 2014).

Existen sustancias que pueden interferir en esta prueba. Se pueden producir falsos positivos por compuestos muy oxidantes frente al luminol como el hipoclorito de sodio, el permanganato de potasio y el yodo, sustancias presentes en productos de limpieza, desinfectantes, antisépticos e insecticidas. Cuando una persona intenta eliminar las manchas de sangre lavando la zona con agua y jabón o bien con hipoclorito,

se puede ver afectada la eficacia de la quimioluminiscencia que aporta el luminol, hasta el punto de no poder percibirse las emisiones de luz. Si la mancha de sangre se deja al aire, en un par de días el hipoclorito se descompondría y no interferiría con el tratamiento de luminol (Stoica et al., 2016).

Es posible mejorar el proceso de detección de sangre utilizando previamente una disolución de urea como pretratamiento. La urea reacciona con el hipoclorito de sodio (lejía) e inactiva los productos finales impidiendo que interfieran con la luminiscencia permitiendo la visualización de las manchas de sangre. El pretratamiento permite también eliminar los falsos positivos provocados por el hipoclorito de sodio.

Además, la utilización tanto la urea (al 8 M) como de ciclodextrinas (en concentración de 15 mM) permite mejorar la intensidad de la quimioluminiscencia y ampliar el tiempo de duración de la emisión de luz, lo cual favorece la toma tanto de fotos como de videos que forman parte de las evidencias utilizadas en investigación forense en los tribunales (Stoica et al., 2016).

4.1.2. Aplicaciones del luminol en sanidad: Desinfección y prevención de infecciones

La transmisión de infecciones nosocomiales se produce dentro del hospital. Para minimizarlas, es vital la correcta desinfección de las áreas sanitarias donde se han producido operaciones, así como la correcta esterilización del material empleado en curas y cirugías (Khan et al., 2014). En un estudio de Bergervoet et al. (2008) se advierte la posibilidad de transmisión de enfermedades por contaminación sanguínea en áreas hospitalarias de alto riesgo, como salas de hemodiálisis, quirófanos o salas de parto si estas no se encuentran en condiciones asépticas.

El luminol permite detectar restos de sangre en superficies o material sanitario no esterilizado y/o desinfectado correctamente mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente. Ayuda a prevenir la contaminación en ambientes sanitarios e impide infecciones entre pacientes causadas por la incorrecta descontaminación del material con sangre infectada (Khan et al., 2014). Por ello, este método ayuda a mejorar la eficiencia de los métodos utilizados en la esterilización y la desinfección (Khan et al.,

2014) monitorizando los procesos de limpieza (Bergevoet et al., 2008) como se puede apreciar en la Figura 3.

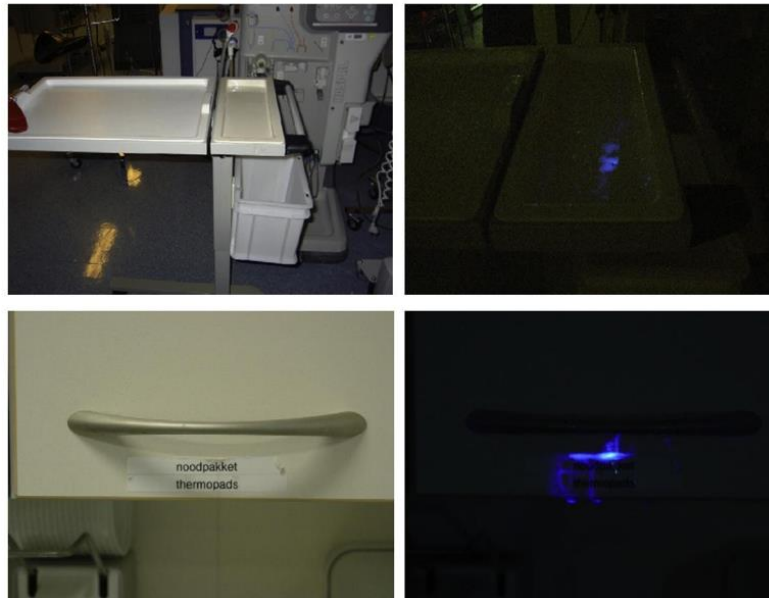


FIGURA 3: OBJETOS DE LA UNIDAD DE HEMODIÁLISIS DE UN HOSPITAL. Muestra de fotos donde se considera que los materiales a simple vista están limpios, pero tras utilizar luminol se aprecian restos de sangre. Obtenida de Bergervoet et al., 2008.

4.1.3. Aplicaciones del luminol en oncología: Detección marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son moléculas de naturaleza proteica utilizadas en el diagnóstico del cáncer. Por tanto, la identificación y la cuantificación de los mismos exige rapidez y alta sensibilidad (Cheng et al., 2012). Se estudiarán dos métodos distintos para la detección del antígeno carcinoembrionario (CEA) y de la alfafetoproteína (AFP).

Recientemente se han construido inmunosensores electroquimioluminiscentes (ECL) que permiten la detección del antígeno carcinoembrionario (Khan et al., 2014).

El CEA es un marcador tumoral que habitualmente se utiliza como prueba diagnóstica que no confirma la presencia de cáncer, pero sí puede determinar el riesgo de padecerlo. Puede encontrarse en niveles elevados en diversos tipos de cáncer, como en el caso de cáncer de colon, de pulmón, de estómago, de páncreas o de vejiga; o bien

en enfermedades no oncológicas como cirrosis hepática, enfermedad inflamatoria intestinal o tabaquismo (González-González et al., 2021).

El primero de los inmunosensores, construido por Cao et al. (2013) se basa en una ECL catódica amplificada del luminol. Se utiliza un inmunosensor de electroquimioluminiscencia para detectar el antígeno carcinoembrionario como se observa en la Figura 4.

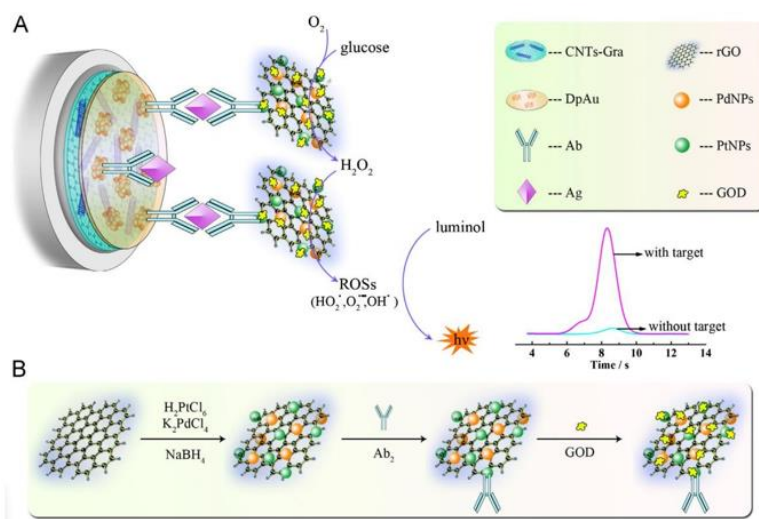


FIGURA 4: (A) FABRICACIÓN DEL INMUNOSENSOR Y MECANISMO DE DETECCIÓN. (B) PREPARACIÓN DEL ANTICUERPO SECUNDARIO MARCADO CON GLUCOSA OXIDASA. Obtenida de Cao et al., 2013.

Para que se produzca la detección del antígeno, primero deben depositarse nanopartículas de oro (AuNPs) en una plataforma de grafeno. Ésta ofrece buena biocompatibilidad para fijar el anticuerpo primario Ab₁ y mantener su actividad; así, también favorece la reacción catódica del luminol al aumentar la conductividad y la transferencia electrónica.

Para fijar el anticuerpo secundario Ab₂, se utilizaron nanopartículas de Pd y Pt, marcadas con la enzima glucosa oxidasa (GOD). Estos componentes mejoran la respuesta ECL del luminol al catalizar el paso de glucosa a gluconolactona. A su vez, se genera *in situ* H₂O₂ en la reacción, que es transformado en especies reactivas de oxígeno (ROSs), las cuales aceleran la reacción quimioluminiscente del luminol provocando un aumento de la intensidad de la emisión luminiscente cuando el antígeno carcinoembrionario es captado por los anticuerpos.

El inmunosensor mostró una respuesta sensible a la detección de CEA, y las pruebas de estabilidad, especificidad, vida útil y reproducibilidad demostraron la viabilidad del inmunoensayo desarrollado, que se puede extender a la detección de biomarcadores de otras enfermedades (Cao et al., 2013).

El segundo de los inmunosensores detecta a otro marcador tumoral distinto, la alfafetoproteína (Cheng et al., 2012). Este compuesto es una glicoproteína empleada en el diagnóstico y pronóstico de malformaciones fetales y enfermedades tumorales, como el carcinoma hepatocelular (Maldonado-Mercado et al., 2015). La reacción quimioluminiscente (Figura 5) se produce a través de luminol y peróxido de hidrógeno, catalizado por la peroxidasa de rábano picante (HRP) (Cheng et al., 2012). La técnica aplicada se denomina transferencia de energía por resonancia de quimioluminiscencia (CRET) utilizando para ello nanopartículas de oro, que serán los aceptores de energía en esta reacción química.

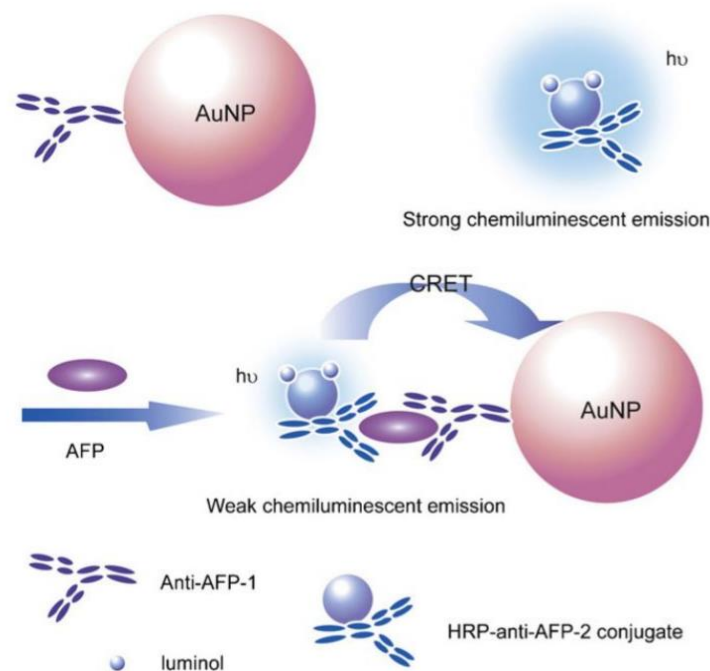


FIGURA 5: ILUSTRACIÓN DEL PROCESO CRET. Explicación esquemática del proceso quimioluminiscente entre luminol catalizado por anti-AFP-1-HRP (donante) y anti-1AuNP (aceptor). Obtenido de Huang y Ren, 2011.

Se desarrolla un inmunoensayo en el que dos anticuerpos (anti-AFP-1 y anti-AFP-2) se encuentran conjugados con nanopartículas de oro y peroxidasa de rábano picante (respectivamente). Se produce una inmunoreacción tipo sándwich entre el antígeno (AFP) y los dos anticuerpos, que unen a las especies donantes de electrones (luminol) y a los aceptores (nanopartículas de oro); lo que produce CRET y la consecuente reacción luminiscente.

Las propiedades, tanto físicas como químicas que poseen las nanopartículas de oro, las hacen idóneas para este tipo de reacciones. Presentan una elevada compatibilidad, facilidad de síntesis y simplicidad (Huang y Ren, 2011). Los resultados de Cheng et al. (2012) mostraron elevada sensibilidad en la detección de los niveles de AFP en sueros de pacientes que padecían cáncer.

4.1.4. Aplicaciones del luminol en control de calidad: Evaluación de agua de consumo y alimentos

Detección de nitratos y nitritos en agua de consumo y alimentos:

Las concentraciones de ciertos compuestos en el agua de consumo resultan perjudiciales para la salud. Por ello, se establecen unos límites máximos de concentración en ellas, definidos en la legislación vigente. En la mayoría de los países, los niveles máximos admisibles de nitratos y nitritos en agua son 50 mg/L y 0,1 mg/L, respectivamente. Los análisis que se hacen continuamente a las aguas verifican su calidad haciéndolas aptas o no para el consumo (Bolaños-Alfaro et al., 2017). Los nitratos y nitritos son compuestos formados por nitrógeno y oxígeno, que presentan solubilidad en agua.

La utilización principal del nitrato es como fertilizante, ya que es indispensable para el crecimiento de los vegetales, por ello, la actividad humana relacionada con el cultivo hace que los niveles naturales de estos compuestos aumenten. Además la emisión de gases de vehículos, las aguas residuales industriales o los residuos ganaderos son otras fuentes de contaminación que hacen alcanzar altas concentraciones de estos iones (Bolaños-Alfaro et al., 2017).

La ingesta excesiva de nitratos (ya sea por consumir agua u hortalizas) provoca en la población metahemoglobinemia, una enfermedad grave en la que la hemoglobina presente en los eritrocitos del organismo contiene hierro férrico (Fe^{3+}) en vez de hierro ferroso (Fe^{2+}). La metahemoglobina posee una capacidad mermada para transportar el oxígeno en sangre, por lo que el aporte de oxígeno a los distintos órganos y tejidos corporales se ve disminuido (Basulto et al., 2013). Esta enfermedad se manifiesta principalmente en bebés de hasta seis meses (Bolaños-Alfaro et al., 2017). Cuando la metahemoglobina aumenta su concentración, se produce cianosis provocando el “síndrome del bebé azul” (Basulto et al., 2013) pudiendo provocar en última instancia la muerte del individuo (Bolaños-Alfaro et al., 2017).

Con respecto al nitrito, su reacción con una amina secundaria genera un compuesto denominado nitrosamina. Este compuesto es cancerígeno y supone también un riesgo para la salud de la población (He et al., 2007).

Recientemente se han desarrollado métodos analíticos muy sensibles que permiten detectar las concentraciones de estos iones en aguas de consumo utilizando la reacción quimioluminiscente del luminol. Para la detección del nitrato se desarrolló un método de inyección de flujo (FI). El método utiliza una columna de reducción de cadmio y cobre (Cu-Cd) para reducir el nitrato a nitrito. Posteriormente, el nitrito reacciona con peróxido de hidrógeno para formar peroxinitrito que en medio alcalino y en presencia de luminol desarrolla luminiscencia (Yaqoob et al., 2012). Los resultados de este estudio aplicando este nuevo método de análisis fueron comparables con los obtenidos por la técnica de referencia. Así, los beneficios de este nuevo método de detección incluyen bajos límites de detección, buena precisión y rapidez. Además, la columna de reducción tiene una larga vida útil de análisis (Yaqoob et al., 2012).

Para la detección de nitrito, se ha propuesto un sistema de análisis de inyección de microflujo (IFIA). Para ello se utilizan dos láminas de polimetilmetacrilato (PMMA). El nitrito de las muestras oxida al ferrocianuro en medio ácido, dando lugar a ferricianuro. La detección del nitrito se produce de forma indirecta por la reacción de quimioluminiscencia del luminol con el ferricianuro formado. Este método presenta alta sensibilidad y es sencillo de realizar (He et al., 2007).

Detección del antibiótico tetraciclina en leche

La tetraciclina (TC) es un antibiótico de amplio espectro indicado en neumonía, infecciones de transmisión sexual, malaria y como tratamiento coadyuvante del acné, entre otras patologías según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). La utilización de este medicamento en animales destinados a producir alimentos para los humanos puede representar una amenaza para la salud de la población (Wang et al., 2019).

La tetraciclina está contraindicada en embarazo y lactancia (debido a que este medicamento se excreta por leche materna), ya que afecta al desarrollo esquelético del bebé según la ficha técnica de la AEMPS. Además, puede ocasionar otras reacciones adversas como reacciones alérgicas, pigmentación dental y problemas gastrointestinales. Por ello, es necesario el control de los residuos que deja la utilización del medicamento en el ganado.

En un estudio de Wang et al. (2019) se consiguió unificar la técnica ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y la quimioluminiscencia del luminol para detectar la presencia de tetraciclinas en la leche de consumo, obteniendo una mayor sensibilidad que si sólo se utilizase ELISA (empleado normalmente para monitorizar los residuos de medicamentos veterinarios).

La proteína represora Tet de las bacterias, denominada TetR, es resistente a la tetraciclina. Ésta actúa uniéndose específicamente al anillo de la tetraciclina. En este inmunoensayo se expresó la proteína TetR *in vitro* y se combinó con un hapteno de tetraciclina (sintetizado previamente acoplado ácido 4-aminobenzoico con TC) marcado con HRP (la enzima que permite que se desarrolle el inmunoensayo). En la reacción de quimioluminiscencia, reacciona el luminol-peróxido de hidrógeno, catalizado por la HRP. Por tanto, en el ensayo CL-ELISA, se utiliza la proteína TetR como proteína de reconocimiento de las tetraciclinas como se aprecia en la Figura 6. La luminiscencia emitida por las muestras se relaciona con el contenido en antibiótico en la leche de consumo. Se consigue así obtener un proceso rápido, simple y muy sensible.

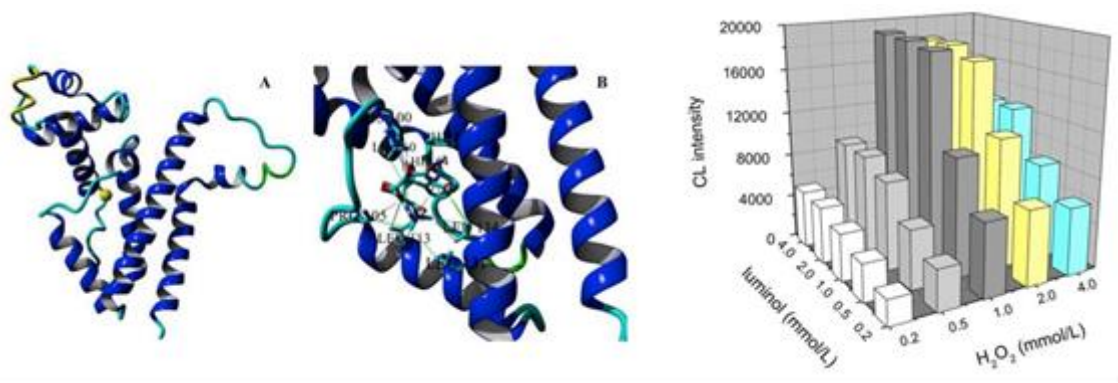


FIGURA 6: (A) ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TETR. (B) ACOPLAMIENTO DE LA PROTEÍNA CON EL ANILLO DE LA TETRACICLINA. (C) CONCENTRACIONES DE LUMINOL Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂). Representación de la proteína represora de las bacterias a la cual se acopla el antibiótico. También se muestra las concentraciones ideales de luminol y peróxido de hidrógeno para que la señal luminiscente sea lo más intensa posible. Obtenida de Wang et al., 2019.

4.1.5. Aplicaciones del luminol en gestión medioambiental: Detección de productos contaminantes

Detección de fosfatos en agua:

La contaminación de agua por niveles altos del ion fosfato (PO₄³⁻) que proviene de los detergentes vertidos en aguas residuales provoca la muerte de peces y especies marinas. Este compuesto fomenta el crecimiento de algas, que lo utilizan como nutriente. Al incrementarse la población de algas disminuye la cantidad de oxígeno en el agua (Bolaños-Alfaro et al., 2017).

La concentración de estos iones se puede analizar mediante el método de inyección de flujo-quimioluminiscencia. Para ello se hace reaccionar el fosfato con molibdato de amonio en medio ácido. Mediante la posterior oxidación del luminol con este compuesto se genera una señal luminosa cuantificable (Yaqoob et al., 2004).

4.2. ÉSTERES DE ACRIDINIO

Los ésteres de acridinio son también utilizados ampliamente en el campo de la quimioluminiscencia. Son compuestos derivados del ácido acridina-9-carboxílico que reaccionan en medio alcalino con peróxido de hidrógeno (Czechowska et al., 2017). Así,

se genera un compuesto denominado N-Metilacridona (NMA) en estado excitado, que emite luz a una longitud de onda de 440 nm cuando vuelve a su estado fundamental (Figura 7).

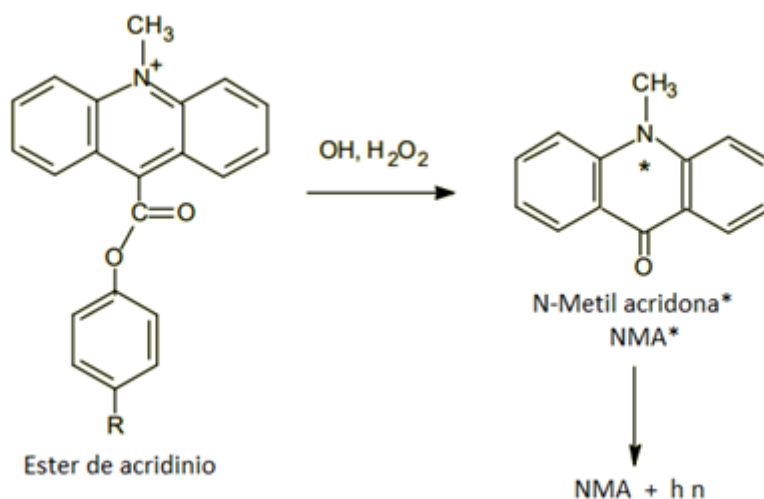


FIGURA 7: REACCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE DEL ESTER DE ACRIDINIO. Presentación de la reacción emisora de luminiscencia partiendo de éster de acridinio. Obtenida de Meseguer, 2004.

Los ensayos quimioluminiscentes que utilizan éster de acridinio como método de detección, poseen una elevada sensibilidad y son utilizados mayormente en estudios de ADN e inmunoensayos (Meseguer, 2004), donde se emplean como indicadores, aplicándose en análisis clínicos, de alimentos, medioambientales, químicos y bioquímicos (Czechowska et al., 2017).

4.2.1. Aplicaciones del éster de acridinio en sanidad: Detección de Alzheimer

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a unos 40 millones de personas en el mundo (Wang et al., 2021). Está considerada como la principal causa de demencia (Janeiro et al., 2021) siendo la pérdida de memoria y el deterioro cognitivo sus principales manifestaciones (Wang et al., 2021). La edad es el principal factor de riesgo, por lo que, debido a las previsiones de envejecimiento poblacional, su incidencia aumentará en los próximos años (Janeiro et al., 2021). Se ha

demostrado que el cúmulo del péptido β -amiloide y proteína Tau en el cerebro tienen relación con los síntomas manifestados de esta enfermedad (Barragán-Martínez et al., 2019) como puede apreciarse en la Figura 8.

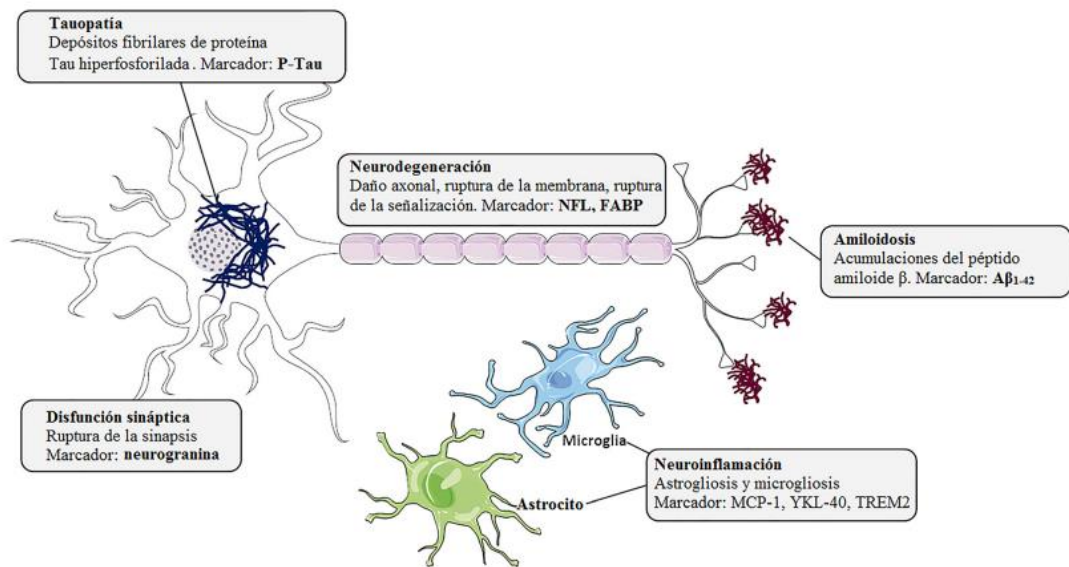


FIGURA 8: MARCADORES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. Marcadores de las alteraciones histopatológicas que se producen en la enfermedad de Alzheimer. Se observan placas seniles por acumulaciones del péptido β -amiloide, ovillos neurofibrilares por depósitos de proteína Tau, neuroinflamación, disfunción sináptica y neurodegeneración. Obtenida de Janeiro et al., 2021.

Aunque los criterios diagnósticos suelen fundamentarse en datos clínicos (Janeiro et al., 2021), pueden apoyarse en pruebas complementarias.

Wang et al. (2021) desarrollaron un método para diagnosticar el Alzheimer mediante la detección de β -amiloide en plasma (Figura 9). Para ello se utiliza un inmunoensayo de quimioluminiscencia de amplificación de círculo rodante (RCA-CLIA). La reacción permite evaluar tanto la evolución de la enfermedad como su diagnóstico mediante un método menos invasivo que su predecesor. El proceso se fundamenta en la unión de anticuerpos de captura conjugados con perlas magnéticas y anticuerpos de detección con ADN monocatenario que se unen a los antígenos A- β 42 y A- β 40 para formar una estructura tipo sándwich de doble anticuerpo. La función de la Amplificación (o replicación) en Círculo Rodante es mejorar la sensibilidad del inmunosensor generando productos con múltiples sitios de unión de sondas de detección, que se encuentran marcadas con éster de acridinio. La detección de anticuerpos en el plasma

de los pacientes desencadena la reacción quimioluminiscente, que permite diagnosticarlos. Este método presenta ventajas analíticas como son una alta sensibilidad (90,48%) y especificidad (63,64%), además de ser poco invasivo, lo que lo hace muy válido para detectar la enfermedad de Alzheimer.

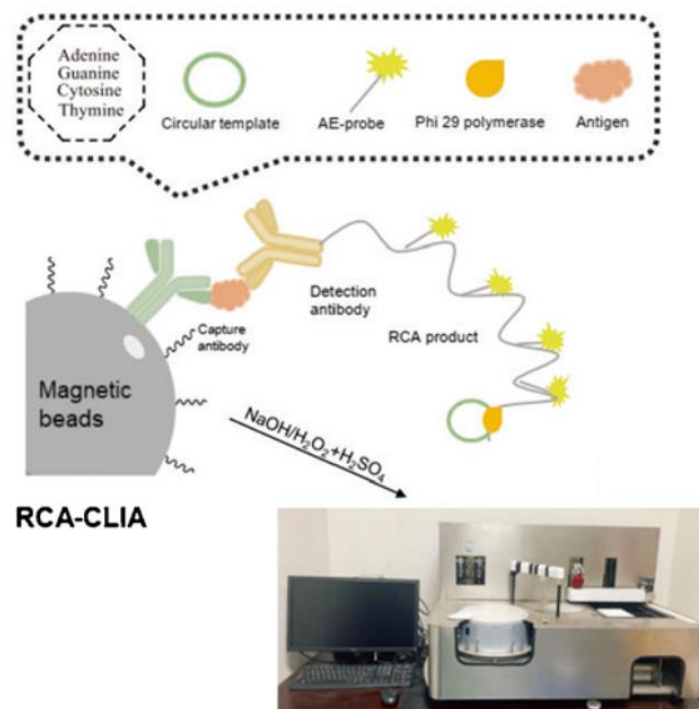


FIGURA 9: ESQUEMA DE LA REACCIÓN RCA-CLIA. Esquema donde se aprecia la creación de la sonda mediante la “plantilla” de ADN unida al anticuerpo, que forma un complejo tipo sándwich, reteniendo al antígeno en medio de ambos. Obtenida de Wang et al., 2021.

4.2.2. Aplicaciones del éster de acridinio en sanidad: Detección de COVID-19

El COVID-19 es una enfermedad respiratoria que apareció en Wuhan (China) a finales de 2019 y se extendió por todo el mundo (Pham et al., 2020) causando millones de muertes. Esta pandemia ha provocado una crisis global sanitaria y social que ha superado todas las expectativas iniciales (Lara-Sanjuan et al., 2021). Durante el periodo transcurrido, el nivel de contagios ha rebasado las capacidades de los hospitales. Las personas asintomáticas y los contactos estrechos de portadores positivos han supuesto nuevos focos de infección. Por ello, el desarrollo y la disponibilidad de pruebas que detectasen personas que sufrían esta patología era, es y será una demanda sanitaria real

y una prioridad en esta crisis sanitaria (Pham et al., 2020). Los síntomas experimentados por los enfermos incluyen problemas respiratorios con mayor o menor gravedad, estados febriles, tos, debilidad muscular y dificultad para respirar, entre otros (Pham et al., 2020).

Las principales pruebas para analizar la presencia de COVID en la población se basan en la detección de inmunoglobulinas de tipo IgM e IgG contra las proteínas S (spike) y N (nucleocápside) (Lara-Sanjuan et al., 2021).

El inmunoanálisis por quimioluminiscencia de micropartículas descrito por Fernández-Rodríguez et al. (2020) detecta anticuerpos frente a la proteína N de la nucleocápside (Figura 10) en suero y plasma. La reacción que permite detectar analíticamente esta proteína incluye dos fases. En la primera, las micropartículas paramagnéticas recubiertas de antígeno del SARS-COVID se une a los anticuerpos (IgG) existentes en la muestra. Se añade un conjugado de éster de acridinio y anticuerpos y se incuba. Por último, se añade la disolución activadora (H_2O_2 / OH) y se mide la emisión de la reacción quimioluminiscente.

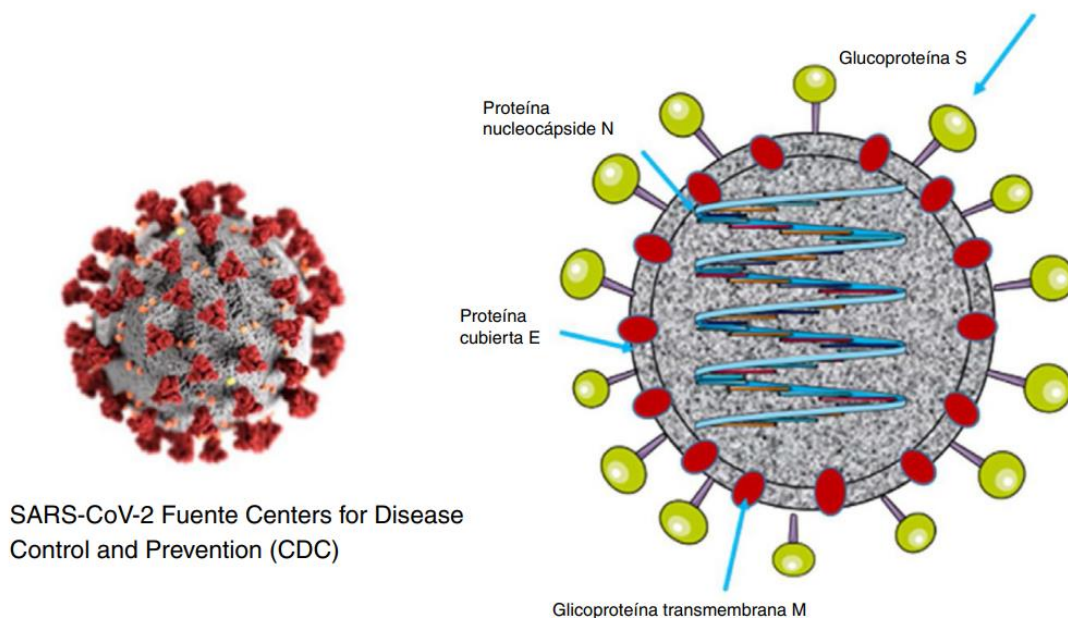


FIGURA 10: ESTRUCTURA DEL SARS-CoV-2. Estructura de virus donde se aprecia la proteína nucleocápside (N) y la glucoproteína (S); ambas utilizadas para el diagnóstico mediante quimioluminiscencia. Obtenida de Fernández-Rodríguez et al., 2020.

En otro estudio realizado por Lara-Sanjuan et al. (2021), la proteína utilizada fue la proteína S (spike). En esta reacción, también producida en dos fases, se combina en primer lugar las micropartículas recubiertas con antígeno (S) y el diluyente del ensayo. Posteriormente, los anticuerpos IgG se unen a las micropartículas y con el conjugado de IgG marcado con acridina. Por último, se añade la disolución activadora H_2O_2/OH y se produce la emisión luminiscente como se puede percibir en la Figura 11.

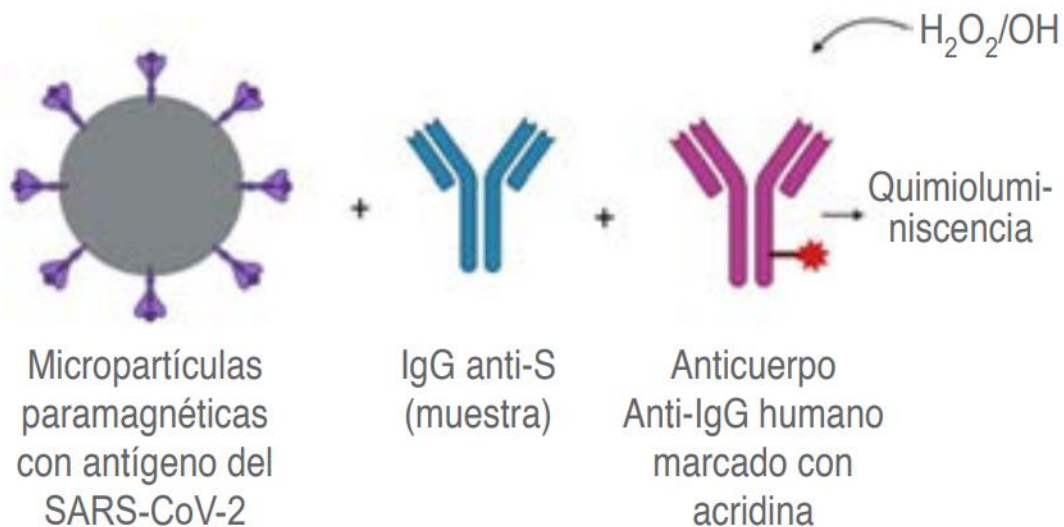


FIGURA 11: DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-SARS-COV-2 POR CMIA. Representación de la reacción de quimioluminiscencia al reaccionar el antígeno con el anticuerpo. Obtenida de Lara-Sanjuan et al., 2021.

4.2.3. Aplicaciones del éster de acridinio en sanidad: Detección de *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por *Toxoplasma gondii*, un parásito protozoo que afecta a animales y personas (Holec-Gąsior et al., 2017). De hecho, más de un 30 % de la población mundial tiene anticuerpos frente a él. Los esporozoitos provenientes de las heces de gato; los bradizoitos, presentes en carnes poco cocinadas; o los taquizoitos, las formas libres que infectan por vía sanguínea o trasplacentaria son las fuentes de infección (Sánchez-Artigas et al., 2016). En personas sanas, esta enfermedad es, por lo general, asintomática. Los casos más graves se dan en personas inmunodeprimidas y en mujeres en periodo de gestación. En este último caso, la toxoplasmosis puede generar daños graves en el feto e incluso provocar un aborto.

Se ha elaborado un método de detección de *T. gondii* a través de un inmunoensayo quimioluminiscente utilizando éster de acridinio unido a anticuerpos. Éste demostró tener mayor sensibilidad que el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, que se utilizaba anteriormente para detectar a las personas con anticuerpos frente a este parásito (Holec-Gąsior et al., 2017).

5. CONCLUSIONES

1. Las técnicas de quimioluminiscencia y de inmunoquimioluminiscencia permiten detectar patologías con alta sensibilidad y rapidez, ofreciendo un pronto diagnóstico y tratamiento, aumentando por tanto la calidad de atención al paciente y ayudando a combatirlas.
2. El luminol y los ésteres de acridinio han demostrado ser dos compuestos muy válidos para este tipo de reacciones luminiscentes, ofreciendo gran capacidad de detección de enfermos, alta rapidez y bajo coste.
3. La quimioluminiscencia del luminol permite establecer un diagnóstico precoz de enfermedades como el cáncer, lo que es fundamental para iniciar cuanto antes el tratamiento y evitar que éste se propague a otros órganos continuos provocando metástasis, una situación de peor pronóstico.
4. Los ésteres de acridinio sirven para detectar el Alzheimer, lo que ayuda a frenar la evolución de esta enfermedad neurodegenerativa hacia estadios más severos. Además, han sido utilizados en la crisis del COVID-19, una situación que ha puesto en jaque a los sistemas sanitarios a nivel mundial. La demanda de este tipo de pruebas se ha visto acentuada debido a la necesidad de localizar personas que presenten la infección, ya que suponen un nuevo foco de contagio.
5. El beneficio del desarrollo de reacciones quimioluminiscentes no queda restringido a la detección de patologías, sino que existe un amplio abanico de aplicaciones donde también son empleadas, como en control de calidad de agua y alimentos, prevención de infecciones nosocomiales e incluso en medicina forense.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) [en línea]. [Consultado en Mayo 2022]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/50404/FT_50404.pdf

Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*. 2007; 72(3): 896-913.

Barragán-Martínez D, García-Soldevilla MA, Parra-Santiago A, Tejeiro-Martínez J. Enfermedad de Alzheimer. *Medicine*. 2019; 12(74): 4338-4346.

Basulto J, Manera M, Baladia E. Ingesta dietética de nitratos en bebés y niños españoles y riesgo de metahemoglobinemia. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2013; 15: 65-69.

Bergervoet PW, van Riessen N, Sebens FW, van der Zwet WC. Application of the forensic Luminol for blood in infection control. *The Journal of Hospital Infection*. 2008; 68(4): 329-333.

Bolaños-Alfaro JD, Cordero-Castro G, Segura-Araya G. Determinación de nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos en agua potable como indicadores de contaminación ocasionada por el hombre, en dos cantones de Alajuela (Costa Rica). *Tecnología en Marcha*. 2017; 30(4): 15-27.

Cabriales-Gómez RC. Luminiscencia en polímeros semiconductores. *Ingenierías*. 2004; 7(23): 12-16.

Cao Y, Yuan R, Chai Y, Liu H, Liao Y, Zhuo Y. Amplified cathodic electrochemiluminescence of luminol based on Pd and Pt nanoparticles and glucose oxidase decorated graphene as trace label for ultrasensitive detection of protein. *Talanta*. 2013; 113: 106-112.

Cheng Y, Yuan R, Chai Y, Niu H, Cao Y, Liu H et al. Highly sensitive luminol electrochemiluminescence immunosensor based on ZnO nanoparticles and glucose oxidase decorated graphene for cancer biomarker detection. *Anal Chim Acta*. 2012; 745: 137-142.

Correcher V, García-Guinea J. Técnicas Luminiscentes. Análisis químico mediante técnicas espectroscópicas moleculares. CIEMAT. 2015.

Czechowska J, Kawecka A, Romanowska A, Marczak M, Wityk P, Krzymiński K et al. Chemiluminogenic acridinium salts: A comparison study. Detection of intermediate entities appearing upon light generation. *Journal of Luminescence*. 2017; 187: 102-112.

Feng G, Zhang GQ, Ding D. Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagrams. *Chem Soc Rev*. 2020; 49(22): 8179-8234.

Fernández-Rodríguez A, Casas I, Culebra E, Morilla E, Cohen MD, Alberola J. COVID-19 y estudios microbiológicos post mortem. *Spanish Journal of Legal Medicine*. 2020; 46(3): 127-138.

García-Campaña AM, Baeyens WRG. Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. 2000; 28(8): 686-698.

González-González D, Wagner G, Ruso-Martínez L. Rendimiento del antígeno carcinoembrionario como prueba diagnóstica del cáncer colorrectal. *Revista Médica del Uruguay*. 2021; 37(2): e201.

He D, Zhang Z, Huang Y, Hu Y. Chemiluminescence microflow injection analysis system on a chip for the determination of nitrite in food. *Food Chemistry*. 2007; 101(2): 667-672.

Holec-Gąsior L, Ferra B, Czechowska J, Serdiuk IE, Krzymiński K. A novel chemiluminescent immunoassay based on original acridinium ester labels as better solution for diagnosis of human toxoplasmosis than conventional ELISA test. 2017; *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 2018; 91(1): 13-19.

Huang X, Ren J. Gold nanoparticles based chemiluminescent resonance energy transfer for immunoassay of alpha fetoprotein cancer marker. *Analytica Chimica Acta*. 2011; 686(1-2): 115-120.

Janeiro M, Ardanaz C, Sola-Sevilla N, Dong J, Cortés-Erice M, Solas M et al. Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer. *Advances in Laboratory Medicine*. 2021; 2(1): 39-50.

Khan P, Idrees D, Moxley MA, Corbett JA, Ahmad F, von Figura G et al. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014; 173(2): 333-355.

Lara-Sanjuan F, Parra-Ortega I, Sánchez-Pérez S, Alcaraz-Ramírez D, Rodríguez-Mijangos F, López-Martínez B. Evaluación de una prueba rápida versus un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 2021; 68(2): 45-50.

Maldonado-Mercado MG, Pereyra-Morales MA, Zenteno-Galindo EA. Estructura y función de la alfa-fetoproteína. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 2015; 58(4): 5-13.

Mesguer Lloret S. Métodos quimioluminiscentes en química analítica. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia. Departamento de Química Analítica, 2004.

Pham J, Meyer S, Nguyen C, Williams A, Hunsicker M, McHardy I et al. Performance Characteristics of a High-Throughput Automated Transcription-Mediated Amplification Test for SARS-CoV-2 Detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020; 58(10): e01669-20.

Sánchez-Artigas R, Cobos- Valdés D, Sánchez-Cruz L, Miranda-Cruz A, Camejo-Roviralta L, Araujo-Baptista L. La Toxoplasmosis observada como un problema no resuelto. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2016; 35(3): 272-283.

Stoica BA, Bunescu S, Neamtu A, Bulgaru-Iliescu D, Foia L, Botnariu EG. Improving Luminol Blood Detection in Forensics. *Journal of Forensic Sciences*. 2016; 61(5): 1331-1336.

Wang D, Dai Y, Wang X, Yu P, Qu S, Liu Z et al. Determination of plasma β -amyloids by rolling circle amplification chemiluminescent immunoassay for noninvasive diagnosis of Alzheimer's disease. *Mikrochim Acta*. 2021; 188(1): 1-9.

Wang G, Zhang HC, Liu J, Wang JP. A receptor-based chemiluminescence enzyme linked immunosorbent assay for determination of tetracyclines in milk. *Anal Biochem.* 2019; 564-565: 40-46.

Yan Y, Shi P, Song W, Bi S. Chemiluminescence and Bioluminescence Imaging for Biosensing and Therapy: In Vitro and In Vivo Perspectives. *Theranostics.* 2019; 9(14): 4047-4065.

Yaqoob M, Folgado-Biot B, Nabi A, Worsfold PJ. Determination of nitrate and nitrite in freshwaters using flow-injection with luminol chemiluminescence detection. *Luminescence.* 2012; 27(5): 419-425.

Yaqoob M, Nabi A, Worsfold PJ. Determination of nanomolar concentrations of phosphate in freshwaters using flow injection with luminol chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta.* 2004; 510(2): 213-218.