



LUMINISCENCIA: APLICACIONES ANALÍTICAS



ALFONSO BADÍA CARRILLO

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DOBLE GRADO EN FARMACIA Y EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Revisión Bibliográfica

LUMINISCENCIA: APLICACIONES ANALÍTICAS

AUTOR: ALFONSO BADÍA CARRILLO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TUTORA: M^a DOLORES HERNANZ VILA

Presentado en la Facultad de Farmacia de Sevilla en Julio de 2021

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| 1. <u>Resumen</u> | -5- |
| 2. <u>Introducción</u> | -6- |
| 2.1 <u>Luminiscencia</u> | -6- |
| 2.2 <u>Diagrama de Jabłoński. Fluorescencia y fosforescencia</u> | -7- |
| 2.3 <u>Técnica analítica. Instrumentación</u> | -9- |
| 2.4 <u>Tipos de luminiscencia</u> | -11- |
| 3. <u>Objetivos de la revisión</u> | -13- |
| 4. <u>Metodología</u> | -14- |
| 5. <u>Resultados y discusión</u> | -15- |
| 5.1 <u>Luminol</u> | -15- |
| 5.1.1 Papel del luminol en la investigación forense | -17- |
| 5.1.2 El luminol en el análisis de aguas contaminadas | -18- |
| 5.1.3 Aplicación del luminol en la detección del asma | -19- |
| 5.1.4 Luminol en la industria alimentaria | -19- |
| 5.2 <u>Quinina</u> | -20- |
| 5.2.1 Análisis químico de la quinina presente en el agua tónica | -22- |
| 5.2.2 La quinina como estándar de referencia para la calibración de los espectrofluorímetros | -23- |
| 5.3 <u>Fluoresceína</u> | -24- |
| 5.3.1 Uso de la fluoresceína sódica en el estudio de los vasos sanguíneos retinianos | -26- |
| 5.3.2 Fluoresceína sódica en el estudio del epitelio corneal. Adaptación de lentes de contacto RGP | -26- |
| 5.3.3 Aplicaciones del isotiocianato de fluoresceína en inmunoensayos para la detección de antígenos y anticuerpos | -28- |
| 5.4 <u>Proteínas fluorescentes: Proteína verde fluorescente (GFP)</u> | -29- |
| 5.4.1 Monitoreo de proteínas y enzimas celulares en organismos vivos | -31- |
| 5.4.2 Detección de interacciones entre proteínas celulares mediante microscopía de fluorescencia | -31- |

| | | |
|-----------|--|-------------|
| 5.4.3 | Estudio del sistema nervioso mediante el uso de proteínas fluorescentes | -31- |
| 5.4.4 | Proteínas fluorescentes en la detección de la diseminación de células cancerosas | -32- |
| 6. | <u>Conclusiones</u> | -33- |
| 7. | <u>Bibliografía</u> | -34- |

1. RESUMEN

La luminiscencia es un proceso que afecta tanto a átomos como a moléculas, donde se produce emisión de energía no térmica en forma de luz requiriendo una preexcitación previa del compuesto. Para explicar este fenómeno se utiliza el diagrama de Jabłoński, donde se definen las dos formas de emisión de luminiscencia y sus características: la fluorescencia y la fosforescencia, que se diferencian principalmente en que la pérdida de exceso de energía ocurre sin cambio de multiplicidad de spin en la fluorescencia mientras que en la fosforescencia si se produce cambio, provocando que el tiempo de emisión de luminiscencia en fosforescencia sea más prolongado.

Las principales fuentes de excitación que producen luminiscencia son la quimioluminiscencia, donde se produce luminiscencia por reacciones químicas, y la bioluminiscencia, donde se produce por reacciones catalizadas por enzimas en organismos vivos. Para la medida de esta luminiscencia en el laboratorio se utilizan tres instrumentos, el espectrofluorímetro, el fluorómetro y el fosforímetro.

El conocimiento de la utilidad de la luminiscencia en la química analítica ha llevado a la comunidad científica al desarrollo y estudio de moléculas con esta característica. En esta revisión se han tratado de recoger los puntos más importantes sobre las principales aplicaciones analíticas de cuatro moléculas, que han sido elegidas por su utilidad en el campo sanitario y medioambiental, así como en el análisis químico. Las moléculas estudiadas son el luminol, la quinina, la fluoresceína y la proteína verde fluorescente (GFP). Además, cabe destacar que la fluoresceína también tiene numerosas aplicaciones en el campo de la óptica.

Palabras clave: luminiscencia, luminol, quinina, fluoresceína, GFP.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Luminiscencia

La palabra luminiscencia proviene del latín. Está formada por el prefijo *lumin-*, que significa luz, y el sufijo *-encia*, que significa cualidad de un agente, por lo que se puede definir luminiscencia como la cualidad que tienen los objetos para emitir luz (Correcher y Garcia-Guinea, 2015).

La luminiscencia es un proceso que afecta a átomos y moléculas, y consiste en la radiación no térmica en forma de luz. Esta cualidad se diferencia de la incandescencia, donde se produce una radiación luminosa con aumento de la temperatura (García et al., 2004).

El fenómeno de la luminiscencia requiere una preexcitación de la molécula. Esto provoca que los electrones de la molécula se eleven de los orbitales internos, donde se encuentran en estado fundamental con poca energía, a los orbitales externos, donde aparecen los electrones excitados con mayor energía (Beltrán, 2015). Posteriormente, se produce el regreso de los electrones a los orbitales iniciales, produciéndose la emisión de fotones de luz de la energía previamente adquirida (García et al., 2004). Esta emisión ocurre en regiones del espectro electromagnético, principalmente la zona del visible, y es producida a una longitud de onda superior a la que se produce la radiación activante (Sancho, 2016). Por lo que se puede decir que el fenómeno de la luminiscencia se produce cuando se da una emisión de fotones de luz de la energía previamente adquirida por los electrones del compuesto implicado.

A lo largo de la historia, el hombre siempre ha tenido conciencia de la existencia del fenómeno de la luminiscencia. En la Antigüedad, los hombres visualizaban fenómenos luminiscentes como las auroras boreales o especies del mar que resplandecían en la oscuridad. Las primeras referencias sobre luminiscencia datan de 1300 a.C. donde en las crónicas chinas, escritas por Shing Ching, se describe el fenómeno de la luminiscencia desprendido por algunas especies de gusanos y luciérnagas. Aristóteles (384-322 a.C.), filósofo y científico griego, hizo también referencia a este fenómeno en su libro "De Coloribus" relatando la luz emitida por peces en descomposición (Padilla, 2018).

En 1603 se descubrió uno de los primeros materiales luminiscentes en Bolonia, Italia. Se trataba de una piedra de barita, que emitía brillo en la oscuridad tras ser expuesta a la luz durante el día. El conocimiento de la existencia de estos materiales fue el inicio para los estudios de los alquimistas coetáneos como Galileo Galilei. Posteriormente en 1888, el físico alemán Eilhard Wiedemann definió por primera vez el término de luminiscencia incluyendo en la definición los términos de fotoluminiscencia y quimioluminiscencia. Además, realizó una clasificación de los distintos tipos de luminiscencia en función de la fuente de excitación que incidía sobre los distintos materiales. En 1930, Aleksander Jabłoński explicó el proceso luminiscente mediante un diagrama en su tesis doctoral.

2.2. Diagrama de Jabłoński. Fluorescencia y fosforescencia

En el diagrama de Jabłoński (Figura 1) se explica físicamente como se producen las dos principales formas de luminiscencia: la fluorescencia y la fosforescencia. Para que se produzcan los fenómenos de luminiscencia debe darse una previa absorción de radiación a una longitud de onda (λ) adecuada. Tras ello, los electrones en estado vibracionales y electrónicos fundamentales (S_0) pasan, según la cantidad de radiación absorbida, a estados excitados ($S_1, S_2\dots$). Esta transición ocurre sin cambio del spin del electrón excitado. La vida del electrón en estado excitado es de 10^{-7} a 10^{-8} segundos y, posteriormente, la molécula pierde este exceso de energía de dos formas distintas con emisión o sin emisión de radiación (García, 2015).

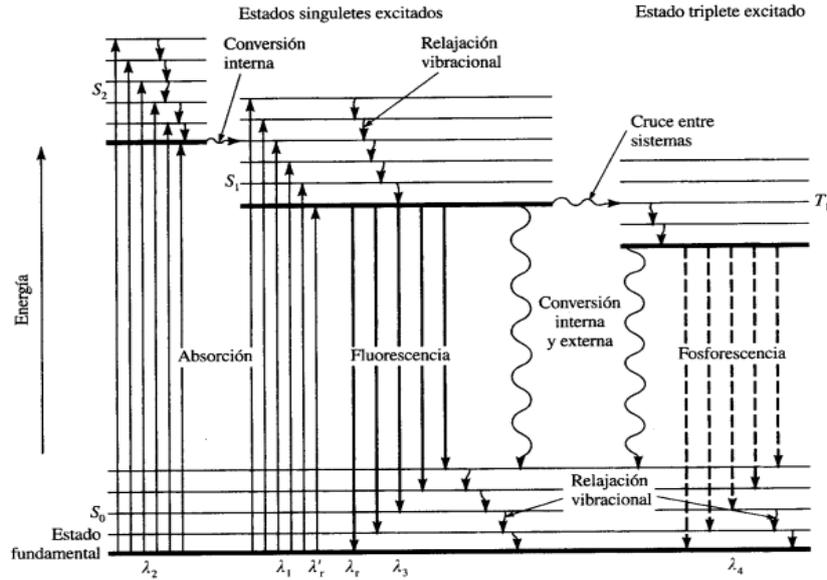


Figura 1. Diagrama de Jabłoński. Diagrama de energía parcial para un sistema fotoluminiscente (Chong, 2014).

En el primer caso, cuando la desactivación se produce sin emisión de radiación, se puede dar una conversión interna, donde la molécula pasa de un excitado a otro de menos energía, o una conversión externa, en la cual la molécula cede su energía a disolventes u otros solutos. También, puede producirse un cruce entre sistemas donde hay un solapamiento entre dos niveles de energía próximos y un cambio en el spin electrónico, cambiando la multiplicidad de la molécula con una transición singlete-triplete, a diferencia de lo que ocurre en el resto.

Por otro lado, cuando la desactivación se produce con emisión de radiación, aparecen los fenómenos de luminiscencia y fluorescencia. En la fluorescencia la pérdida del exceso de energía ocurre sin cambio de multiplicidad en el spin, desde el nivel vibracional más bajo del estado singlete excitado hacia cualquiera de los niveles vibracionales en estado fundamental (Figura 2). En la fosforescencia si se produce un cambio de multiplicidad en el spin, y se parte del nivel vibracional más bajo del estado triplete excitado también hacia los estados fundamentales (Del Castillo, 1996).

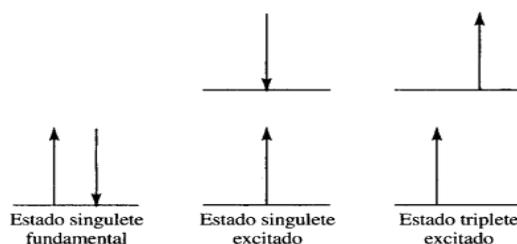


Figura 2. Diagrama del estado singlete fundamental, estado singlete excitado y estado triplete excitado (Skoog et al., 2001)

Como indican los autores Skoog et al. (2001) y Correcher y Garcia-Guinea (2015), el diferente cambio de multiplicidad del spin es una de las diferencias entre la fluorescencia y la fosforescencia. Debido a esta diferencia, el proceso de la fluorescencia es un proceso más rápido ($c < 10^{-8}$ s), ya que la emisión se produce a la vez que la radiación, mientras que en la fosforescencia ($c > 10^{-8}$ s) la luminiscencia perdura una vez quitada la fuente de excitación, ya que el estado excitado es metaestable y la emisión se retrasa.

El camino que siguen las moléculas excitadas hasta el estado fundamental no excitado es aquel en el que el tiempo de vida media del estado excitado es el menor posible. Por ello, la mayoría de las moléculas no son luminiscentes, y dentro de las que sí lo son, existe una mayor cantidad de moléculas fluorescentes frente a fosforescentes (García, 2015).

2.3. Técnica analítica. Instrumentación

La instrumentación empleada en la medida de la luminiscencia es similar a la utilizada en las medidas de absorción de ultravioleta-visible. Los instrumentos de fluorescencia son el espectrofluorímetro y el fluorómetro.

Los autores Skoog et al. (2001) detallan el funcionamiento y las características de estos instrumentos cuyo esquema se representa en la Figura 3. Ambos instrumentos utilizan dos monocromadores, el primero para la selección de la longitud de onda de excitación y el segundo para la selección de la radiación fluorescente resultante y que también compensa las fluctuaciones en la potencia de la fuente. El haz de referencia y el haz de la muestra pasan por un atenuador que reduce su potencia hasta similar a la

de la radiación fluorescente lo que permite su medición en tubos fotomultiplicadores. Estas mediciones atraviesan un amplificador diferencial que aumenta la señal de fluorescencia producida y permite la lectura final en un dispositivo.

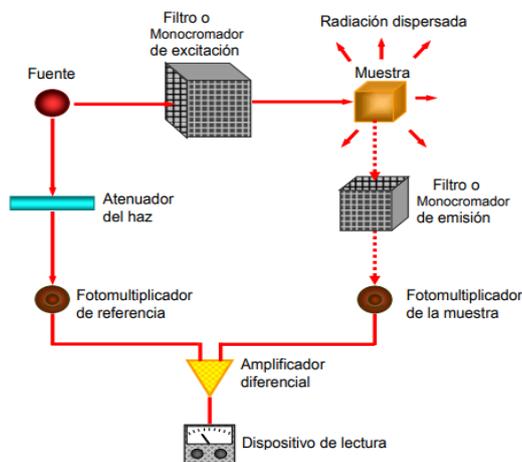


Figura 3. Esquema característico de los componentes del espectrofluorímetro y del fluorómetro (Skoog et al., 2001).

Los espectrofluorímetros son los instrumentos especializados para realizar mediciones de fluorescencia, aunque los fluorómetros también pueden dar medidas de las concentraciones exactas. Ambos presentan algunas diferencias en su composición como son que los espectrofluorímetros comerciales tienen como fuentes lámparas de arco de xenón de alta presión (75-450 W), aunque algunos pueden tener láseres, los cuales tienen distintas ventajas como poder analizar muestras de un microlitro o menor, minimizar las interferencias fluorescentes cuando se requiere una excitación altamente monocromática o poder analizar compuestos hidroxilos en la atmósfera y de clorofila en seres vivos acuáticos. A diferencia de los espectrofluorímetros, los fluorómetros presentan como fuente de excitación una lámpara de arco de mercurio.

Por otro lado, para la medición de la fosforescencia se utilizan los fosforímetros (Figura 4). Los fosforímetros tienen diseños similares a los fluorómetros y espectrofluorímetros, excepto que tienen dos componentes adicionales, un vaso Dewar con ventanas de cuarzo, en cuyo interior hay nitrógeno líquido (-196 °C) el cual evita la degradación de la señal, y un dispositivo que irradia alternativamente a la muestra, y tras un pequeño retraso mide la fosforescencia. Este retraso permite

diferenciar la radiación fosforescente de la fluorescente, ya que la fosforescencia perdura una vez eliminada la fuente de radiación.

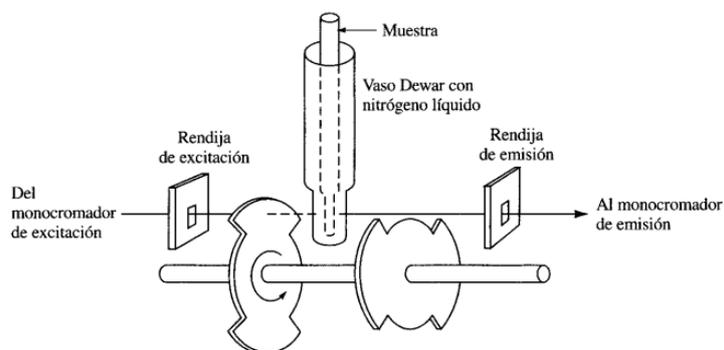


Figura 4. Esquema general de un fosforímetro, instrumento utilizado para medir fosforescencia (Skoog et al., 2001).

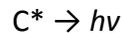
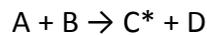
Los instrumentos empleados en la medida de fluorescencia necesitan una calibración instrumental para garantizar el correcto funcionamiento, y una calibración metodológica para establecer una relación clara e inequívoca entre la respuesta instrumental y la concentración de analito. Esta calibración puede llevarse a cabo con una disolución patrón de fluoróforo estable, como puede ser el patrón de sulfato de quinina a una concentración 10^{-5} M siendo las longitudes de onda de excitación y emisión de 350 y 450 nm, respectivamente, la cual permite realizar ambas calibraciones simultáneamente (Skoog et al., 2001).

2.4. Tipos de luminiscencia

Existe una gran variedad de tipos de luminiscencia dependiendo de la fuente de excitación que incide sobre las moléculas, donde destacan la quimioluminiscencia, en la que la energía activante proviene de una reacción química, o la bioluminiscencia, donde las reacciones químicas son de carácter biológico, destacando las luciérnagas, algas, medusas, peces abisales, algunos crustáceos, protozoos o bacterias. En ambos grupos se producen las reacciones luminiscentes dentro del espectro de ultravioleta-visible, aunque existen también otros tipos de luminiscencia que se producen fuera del espectro ultravioleta-visible (Amo, 2015; Correcher y Garcia-Guinea, 2015).

- *Quimioluminiscencia*

La reacción de quimioluminiscencia más simple se representa:



En esta reacción química, A y B son los sustratos que reaccionan entre sí para dar los compuestos C* y D, donde C* es el compuesto C en estado excitado.

La temperatura es un factor que afecta a las reacciones quimioluminiscentes. Esta reacción se acelera cuando aumenta la temperatura, así, a bajas temperaturas, la reacción continúa produciéndose, pero es tan lenta que la luminiscencia es casi imperceptible (Amo, 2015).

Para la medición de la quimioluminiscencia no es necesaria la selección de la longitud de onda ya que la fuente de radiación es la reacción química entre los dos sustratos (Skoog et al., 2001).

- *Bioluminiscencia*

La bioluminiscencia es la propiedad que poseen ciertos organismos de producir luz a partir de reacciones catalizadas por enzimas. Como por ejemplo se produce con la molécula luciferina, la cual se une al oxígeno y produce una oxidación que libera energía en forma de luz (Bagazgoitia et al., 1987). Los organismos utilizan la luminiscencia como herramienta de defensa propia (por ejemplo, el calamar vampiro), como camuflaje (ejemplo los peches hacha) o en la comunicación intraespecífica entre organismos de la misma especie como es el caso de las luciérnagas (Sancho, 2016).

Existen bacterias, como *Vibrio fischeri* o *Photobacterium*, que tienen un mecanismo de comunicación intercelular, conocido como *Quorum sensing* o autoinducción, que controla la expresión genética en función de la densidad celular. En un estudio realizado por Nealson en 1997, se determinó que estas bacterias eran capaces de producir luminiscencia sólo cuando alcanzan una determinada concentración poblacional o *quorum*, ya que tras superar este umbral el organismo produce una gran cantidad de autoinductores, que al conectar con sus receptores aumentan la síntesis de la enzima luciferasa, encargada de la producción de bioluminiscencia (Marquina y Santos, 2011).

3. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

El objetivo principal es realizar una revisión bibliográfica de las distintas formas de luminiscencia y sus aplicaciones analíticas. Para ello, se marcaron una serie de objetivos secundarios que nos permitieron alcanzar el objetivo principal:

- Conocer las principales formas y el origen del fenómeno de la luminiscencia. Así como, conocer los principales instrumentos utilizados en el laboratorio para la medida de la luminiscencia.
- Hacer una revisión bibliográfica de las características, el origen y las principales aplicaciones analíticas de moléculas luminiscentes en el ámbito medioambiental, sanitario y en el campo de la óptica.

4. METODOLOGÍA

Para la búsqueda de la información en la presente revisión bibliográfica se han partido de las ideas más generales como puede ser el término de luminiscencia y sus formas que son fluorescencia y fosforescencia, hasta conceptos más específicos como son las aplicaciones de las moléculas seleccionadas.

Al estar realizando un Trabajo Fin de Grado de doble grado del ámbito de las ciencias de la salud establecimos distintos criterios de inclusión a la hora de elegir la información, como son la elección de moléculas que tuvieran aplicaciones tanto en el campo sanitario como medioambiental. Además, como la óptica ha sido una de las dos ramas estudiadas en este doble grado, se decidió incluir al menos una molécula que tuviera importantes aplicaciones dentro de este campo. Tras realizar la búsqueda de moléculas que cumplieran con estos parámetros, se decidió revisar cuatro moléculas como son: luminol, quinina, proteína verde fluorescente (GFP) y fluoresceína, esta última con importantes aplicaciones en óptica.

La recopilación de la información se ha realizado a través de diferentes bases de datos públicas como Pubmed, ScienceDirect, Dialnet y Google Académico, a las que se accedió a través del catálogo FAMA de la biblioteca de la Universidad de Sevilla. En ellas se han buscado artículos científicos y libros mediante el uso de palabras clave como: luminiscencia, fluorescencia, luminol, quinina, fluoresceína o GFP.

Se han utilizado en la presente revisión 68 artículos tanto en inglés como en español, acotándose la fecha de publicación de estos a los últimos 25 años, aunque en ocasiones por la calidad de los escritos se ha recurrido a artículos anteriores.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Luminol

El luminol ($C_8H_7N_3O_2$) o 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona es una de las moléculas más utilizadas con aplicaciones analíticas en reacciones quimioluminiscentes directas en fase líquida. La molécula es un derivado del ácido ftálico, preparada comercialmente a partir de la condensación del ácido 3-nitroftálico con hidrazina (N_2H_4) y su posterior reducción (Aguilar y Durán, 2011). En la Tabla 1 se representa la estructura química del luminol (Figura 5), características del luminol, así como el mecanismo de quimioluminiscencia del luminol y sus principales aplicaciones analíticas.

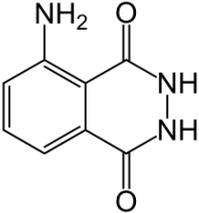
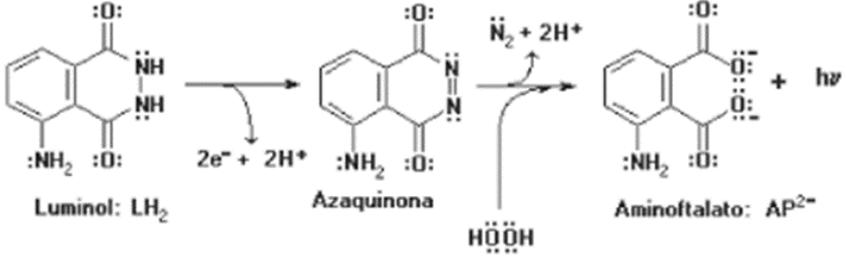
Para que se produzca el fenómeno de la luminiscencia debe producirse una reacción química donde el luminol se oxide hasta 3-aminoftalato. Esta reacción necesita un medio básico, pudiéndose emplear disolventes polares o apolares (Martín y Martín, 2001) (Figura 6). Como agentes oxidantes de la reacción se utilizan distintas moléculas como son permanganatos para la determinación de paracetamol en fármacos o presencia de urea en plantas, el yodo en la determinación de penicilinas y el hipoclorito en la determinación de amonio o catecolaminas. Cabe destacar el oxígeno como el agente oxidante más utilizado en investigaciones forenses, el cual es obtenido en una reacción previa de descomposición del peróxido de hidrógeno (Meseguer, 2004).

Para que se produzca la reacción quimioluminiscente del luminol pueden o no intervenir catalizadores en función del medio utilizado. Las reacciones con presencia de catalizadores se producen entre pH 8 y 12, dependiendo del catalizador utilizado (García, 2014). Estos catalizadores son metales de transición o metalocomplejos como la hemoglobina (Meseguer, 2004).

La reacción del luminol con el peróxido de hidrógeno puede darse en un medio orgánico o medio acuoso. En el caso de medio orgánico, como es el dimetilsulfóxido, la intensidad de emisión luminiscente tiene un pico máximo de 500 nm y no necesita un catalizador para que se produzca. Como resultado de esta reacción aparece luminiscencia de color verde-amarillento. Esta reacción también puede producirse en un medio acuoso, con el pico máximo de emisión luminiscente a 425 nm, y en este caso

si necesita un catalizador para que se produzca la reacción que como resultado tiene luminiscencia de coloración azulada (Martín y Martín, 2001).

Tabla 1. Luminol: características, reacción quimioluminiscente y aplicaciones analíticas.

| | | | |
|--|--|---|--|
| <p style="text-align: center;">LUMINOL</p>  <p style="text-align: center;">Figura 5. Estructura química del luminol (Cedrol, 2011).</p> | <p>El luminol o 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona es una molécula luminiscente de color amarillo pálido, sólido a temperatura ambiente, soluble en disolventes orgánicos y poco soluble en agua (Cedrol, 2011).</p>  <p style="text-align: center;">Figura 6. Mecanismo propuesto para la quimioluminiscencia del luminol (Salgado et al., 2006).</p> | | |
| APLICACIONES ANALÍTICAS | Papel del luminol en la investigación forense. | Detección de muestras pequeñas de sangre en escenas criminales. | (Grodsky et al., 1951), (Castelló et al., 2002), (Gil et al., 2010), (Cedrol, 2011), (Quispe y Flores, 2014) (Romero, 2018). |
| El luminol en el análisis de aguas contaminadas. | Estudio de especies reactivas de oxígeno (ROS) en aguas. | | (Pourfaraj et al., 2018), (Yu y Zhao, 2021). |
| | Determinación de acetona y otras cetonas en agua. | | (Kodamatani et al., 2021). |
| | Determinación de radicales hidroxilos en técnicas de cavitación hidrodinámica. | | (Domínguez, 2018), (Podbevšek et al., 2021). |
| Aplicación del luminol en la detección del asma. | Detección de especies reactivas de oxígeno en enfermos asmáticos. | | (Cluzel et al., 1987). |
| Otras aplicaciones del luminol. | Estudio de radicales libres procedentes de proteínas, hidratos y grasas en alimentos. Determinación de la enzima tirosinasa por <i>Quenching</i> . | | (Liu et al., 2010), (Ruiz, 2014), (Wang et al., 2020). |

- *Papel del luminol en la investigación forense*

Entre las distintas aplicaciones que tiene la reacción quimioluminiscente del luminol destaca la detección y análisis de pequeñas muestras de sangre en escenas de crimen en investigaciones forenses (Figura 7), por lo que esta reacción es fundamental para esclarecer los distintos hechos delictivos (Romero, 2018). En esta reacción, el luminol reacciona con el peróxido de hidrógeno y como catalizador actúa el hierro (Fe^{2+}) presente en la hemoglobina de la sangre (Quispe y Flores, 2014).



Figura 7. Rastro luminiscente producido por la reacción del luminol con sangre de una víctima en un suceso delictivo (Cedrol, 2011).

Esta reacción permite la detección de muestras pequeñas de sangre, incluso aquellas que no se visualizan. La escena del crimen, en condiciones de oscuridad, se rocía con una disolución de luminol descrita previamente por Grodsky et al. (1951) y que contiene agua destilada, perborato sódico, luminol y carbonato sódico. Esta reacción del luminol da como resultado luminiscencia de color azulado en las zonas donde se encuentra presente la sangre, la cual contiene el catalizador de la reacción (Quispe y Flores, 2014).

Esta reacción tiene una alta sensibilidad, pudiendo detectar presencia de sangre en muestras muy diluidas. También detecta sangre en la gran mayoría de muestras que han sido lavadas tras el crimen, en muestras con antigüedad superiores a seis años o en muestras que han podido ser deterioradas por distintos agentes como la luz o la lluvia (Gil et al., 2010; Quispe y Flores, 2014).

En ocasiones, los criminales rocían las escenas del crimen con lejía. La lejía contiene hipoclorito sódico, el cual reacciona con el agua oxigenada y luminol

rápidamente, impidiendo que se dé la reacción de quimioluminiscencia entre el agua oxigenada, el luminol y el hierro de la sangre, por lo que no se podrían localizar muestras de sangre. Para solucionar este problema se debe esperar un tiempo, ya que la lejía se degrada al cabo de unos días (Cedrol, 2011).

Esta alta sensibilidad y la capacidad de combinación con otras técnicas confirmatorias convierten a la reacción del luminol en la técnica de primera elección y la más apropiada en medicina forense como prueba orientativa para la detección de muestras de sangre. La realización de esta reacción mantiene la viabilidad de las muestras de sangre para su análisis posterior del ADN mediante una técnica de PCR, lo que supone una ventaja para llevar a cabo la identificación del criminal (Castelló et al., 2002), aunque otros autores indican que si afectan al análisis posterior de ADN (Cedrol, 2011).

A pesar de su gran utilidad, esta técnica tiene como desventaja la posible obtención de falsos positivos. El hecho de que no sea una prueba específica del hierro en sangre hace que otros catalizadores den reacción de quimioluminiscencia proveniente de otros materiales que contengan hierro (Gil et al., 2010) o cobre (Romero, 2018).

- *El luminol en el análisis de aguas contaminadas*

El luminol se utiliza en el análisis de aguas contaminadas, permitiendo la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otras sustancias contaminantes en aguas, debido a que el luminol reacciona con estas moléculas produciendo quimioluminiscencia. Las especies reactivas de oxígeno, donde se incluyen radicales libres, iones de oxígeno y peróxidos, producen estrés oxidativo celular y daños en los distintos organismos, por ello tiene suma importancia su detección en el medio (Yu y Zhao, 2021). Para facilitar la detección de estas moléculas se utilizan catalizadores como hidroxilos de cobalto o de níquel, que aumentan la intensidad máxima de luminiscencia producida en la reacción entre ROS, luminol y H_2O_2 (Pourfaraj et al., 2018).

Otra aplicación del luminol es la determinación de acetona y otras cetonas en aguas, donde se utilizan una combinación de técnicas de separación por cromatografía de líquidos y detección quimioluminiscente empleando luminol. La reacción produce

radicales cetilos excitados, que en presencia de luminol y un agente oxidante, como es el peróxido de hidrogeno, producen una reacción quimioluminiscente, permitiendo la determinación directa de sus concentraciones (Kodamatani et al., 2021).

El luminol también es utilizado en la detección de radicales hidroxilos producidos en el proceso de cavitación hidrodinámica. Esta técnica se utiliza para la desinfección de aguas por la ruptura de las membranas celulares de los microorganismos presentes en ella. Se produce un descenso de la presión local del agua por debajo de la tensión de sus vapores, dando lugar a la ebullición del fluido y a la formación de burbujas o cavidades, las cuales colapsan posteriormente y producen la ruptura de las membranas (Domínguez, 2018). El luminol permite la detección de los radicales hidroxilos formados en el proceso, ya que reacciona con ellos produciendo una reacción quimioluminiscente, siendo los lugares donde la concentración de radicales hidroxilos es elevada donde se produce una mayor intensidad de luminiscencia. Este hecho permite optimizar los diseños del reactor de cavitación hidrodinámica, mejorando así el tratamiento de aguas residuales (Podbevšek et al., 2021).

- *Aplicación del luminol en la detección del asma*

El luminol se utiliza también en la detección y análisis de enfermedades respiratorias como el asma. Las especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrogeno, se generan en los macrófagos alveolares, existiendo una relación directa entre el aumento de producción de estas moléculas y la gravedad del enfermo asmático. La intensidad de la quimioluminiscencia producida permite evaluar el grado de desarrollo del asma en el paciente (Cluzel et al., 1987).

- *Otras aplicaciones del luminol*

En la industria alimentaria, el luminol también tiene diversas aplicaciones analíticas. La combinación de técnicas de separaciones cromatográficas, como HPLC, y reacciones de quimioluminiscencia del luminol con los distintos radicales libres presentes en grasas, azúcares y proteínas, permite conocer la composición y calidad de los alimentos (Liu et al., 2010).

Como ejemplo, el luminol permite la determinación mediante el método por extinción o *Quenching* de la cantidad de tirosinasa presente en un alimento. Esta enzima

es una de las responsables del oscurecimiento de algunos alimentos, como son las frutas, y también de la producción de melatonina en el cuerpo humano. El método de *Quenching* consiste en la disminución de la luminiscencia generada por una sustancia debido a la presencia de un analito que la atenúa (Ruiz, 2014). La tirosinasa transforma el fenol en o-quinona y esta molécula es la que produce la atenuación de la luminiscencia, y por tanto es la molécula *Quenching*.

En un estudio realizado por Wang et al. (2020) se determinó la cantidad presente de tirosinasa en muestras de suero humano. Para este estudio se utilizó luminol que al reaccionar con la fluoescamina en presencia de polivinilpirrolidona (PVP) produce una alta intensidad de luminiscencia. Al entrar este sistema en contacto con o-quinona (*molécula Quenching*), la intensidad de luminiscencia disminuye rápidamente, permitiendo correlacionar directamente la disminución de la intensidad de luminiscencia con la cantidad presente de o-quinona, y por consiguiente con la cantidad de tirosinasa presente en suero humano.

5.2. Quinina

La quinina o chincona es un alcaloide que proviene de la Corteza del árbol de la Quina o *Chincona* y tiene sus orígenes en América del Sur. La Corteza de Quina (Figura 8) está compuesta de diferentes moléculas como son aceites esenciales, compuestos fenólicos y alcaloides, como la quinina, además de la cinchonina, la cinchonidina y la quinidina (Rodríguez y Armenter, 1997). En la Tabla 2 se representan la estructura química de la quinina, características y propiedades de la quinina, y sus principales aplicaciones analíticas.



Figura 8. Fragmentos de corteza del árbol de la Quina (Nakamatsu y González, 2018).

Las propiedades terapéuticas de la corteza de quina eran conocidas por los indígenas americanos, aunque estas propiedades fueron ocultadas a los españoles colonizadores hasta el siglo XVII. Tras el descubrimiento de sus propiedades se utilizó para combatir las enfermedades de la época como la malaria, y no fue hasta el siglo XIX cuando se consiguió aislar la quinina (Jimenez-Alfaro, 2019). Tras su aislamiento, su producción estaba limitada a la cantidad de corteza de quina disponible. Por ello, se intentaron desarrollar diferentes procesos con el fin de poder sintetizarlo químicamente y no fue hasta el año 1944 cuando Woodward y Doering obtuvieron la primera síntesis de quinina utilizando rutas parciales a partir de quinotoxina, toxina de procedencia natural. El hecho de que se utilizara esta molécula como punto de partida se debe a que la síntesis total de quinina sigue una ruta demasiado larga, obteniendo rendimientos muy bajos (Nakamatsu y González, 2018).

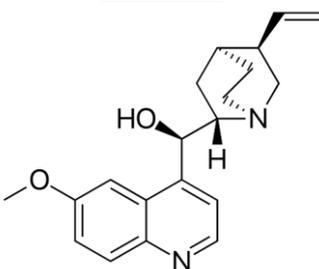
En el siglo XIX, Jacob Schweppes elaboró un agua carbonatada a la que le añadió quinina con el objetivo de tratar la malaria, dando como resultado una bebida refrescante que ha llegado hasta nuestros días como el agua tónica (Nakamatsu y González, 2018).

Uno de los principales problemas del consumo de quinina es cuando la concentración de quinina en niveles plasmáticos es superior a 10 mg/L, lo que produce un cuadro de intoxicación conocido como cinchonismo. Los síntomas del cinchonismo son sudoración y ruborización de la piel, visión borrosa, audición defectuosa, mareos, náuseas, diarreas y vómitos. En los casos más graves puede llegar a producir severas erupciones cutáneas, ceguera o sordera (Rodríguez y Armenter, 1997). Debido a estos efectos secundarios no es recomendable el consumo de quinina en mujeres embarazadas, personas con trastornos hepáticos y en niños (Féas et al., 2008).

La quinina se utiliza principalmente en medicina por sus acciones farmacológicas, pero también tiene aplicación en el campo de la química debido a su capacidad fluorescente cuando se encuentra en un medio ácido y es iluminada con luz ultravioleta o láser en la oscuridad. En estas condiciones la quinina emite luz a una longitud de onda de 400 nm lo que corresponde a una luz blanco-azulada (Heredia, 2008). Entre estas aplicaciones, destacan la determinación de quinina en el agua tónica, con el objetivo de

realizar controles de calidad en bebidas y alimentos para evitar en los consumidores sus posibles efectos adversos, o la utilización como disolución patrón de referencia para la calibración instrumental de los fluorímetros.

Tabla 2. Quinina: características y aplicaciones analíticas.

| | | | |
|---|---|---|---|
| <p>QUININA</p>  <p><i>Figura 9. Estructura química de la quinina (Amurrio, 2001).</i></p> | | <p>La quinina (C₂₀H₂₄N₂O₂) (Figura 9) es un alcaloide amargo, blanco, cristalino y fluorescente, utilizado en medicina por sus propiedades antipiréticas, analgésicas y, principalmente, antimaláricas, siendo el primer compuesto efectivo contra el paludismo, que permitió la cura de gran parte de la población en Europa donde estaba presente dicha enfermedad (Muñoz et al., 2015; Jimenez-Alfaro, 2019). Posteriormente, ha sido utilizado para elaborar el refresco de agua tónica o como material de referencia en la calibración instrumental.</p> | |
| APLICACIONES ANALÍTICAS | Análisis químico de la quinina presente en el agua tónica. | Calibración del espectrofluorímetro para medir fluorescencia de diferentes aguas tónicas que contienen quinina. | (Féas et al., 2008), (Esteban y Marchena, 2014), (González et al., 2015). |
| | La quinina como estándar de referencia para la calibración de los espectrofluorímetros. | Calibración instrumental y metodológica en un ensayo de determinación de causas de desplazamiento de fluorescencia en presencia de aldehídos. | (Aubourg, 1998), (Samanidou et al., 2005). |
| | | Determinación de rendimientos cuánticos y tiempos de vida media de fluorescencia de colorantes POPOP, cumarinas y ligantes biscromofóricos. | (Samanidou et al., 2005), (de Brieva, 2011), (Medrano, 2012). |

- *Análisis químico de la quinina presente en el agua tónica*

Este análisis se realiza debido a la legislación vigente de la concentración de quinina presentes en bebidas y alimentos en distintos países. Si bien, en China está prohibido la adición de quinina a los alimentos, en Estados Unidos y en la Unión Europea la concentración máxima permitida es de 83 y 100 mg/ml, respectivamente, identificándose claramente en la etiqueta (Esteban y Marchena, 2014; González et al., 2015).

En el estudio realizado por Esteban y Marchena (2014) sobre la calidad de agua tónica, se utiliza una metodología combinada de cromatografía líquida acoplada a fluorescencia inducida por láser, que produce excitación continua a 325 nm. Previamente a la realización del análisis se procede a una calibración metodológica del instrumento, con la que se obtiene una recta de calibración, utilizando disoluciones patrones de distintas concentraciones conocidas de quinina (Figura 10). Tras ello se realiza la medición de la muestra de agua tónica.

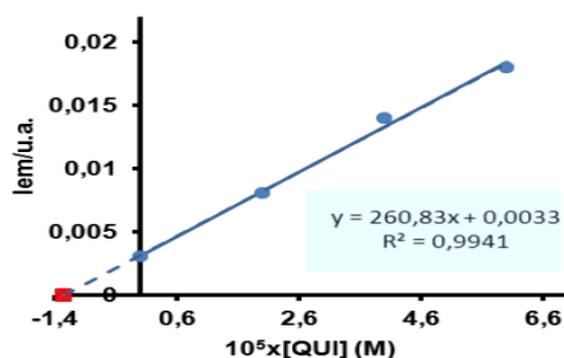


Figura 10. Representación de la intensidad de emisión luminiscente frente a la concentración de quinina de las diferentes disoluciones patrón preparadas. Ecuación de la recta de calibración y coeficiente de correlación (Esteban y Marchena, 2014).

En el estudio realizado por Féas et al. (2008) se determinó la concentración de quininas en aguas tónicas comercializadas en España. Los valores de quinina oscilaban desde los 54.02 ± 0.50 mg/L y 98.74 ± 1.32 mg/L. Además, dos muestras de agua tónica comercializadas en España no cumplirían con la legislación americana.

- *La quinina como estándar de referencia para la calibración de los espectrofluorímetros*

La quinina también es utilizada en numerosos estudios como material de referencia para la calibración instrumental del fluorímetro encargado de las medidas de fluorescencia de moléculas con bandas de absorción y emisión cercanas a las de la quinina, 325 y 400 nm respectivamente (Samanidou et al., 2005).

En el estudio realizado por Aubourg (1998), el autor utilizó una disolución de sulfato de quinina para realizar la calibración del instrumento de medida. El presente estudio determinó la relación existente entre el procesamiento del pescado y el desplazamiento hacia longitudes de onda superiores de la fluorescencia producida por

diferentes aldehídos al interactuar con los péptidos presentes en el pescado. Como respuesta a la cuestión planteada, el autor indicó que este desplazamiento era debido a que los aldehídos formaban compuestos de mayor peso molecular y mayor número de insaturaciones al interactuar con las proteínas del pescado.

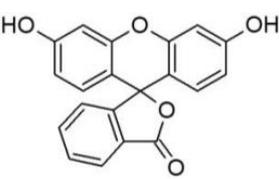
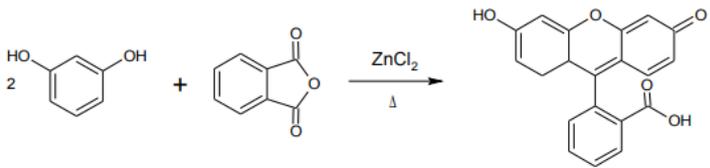
Otros estudios utilizan sulfato de quinina disuelto en ácido sulfúrico 0,1 N como material de referencia para la calibración de los instrumentos encargados de calcular el rendimiento cuántico y el tiempo de vida medio de fluorescencia de diferentes moléculas. El rendimiento cuántico relaciona la cantidad de fotones emitidos respecto a la cantidad de fotones absorbidos por un compuesto, siendo el del sulfato de quinina de 0,54 (Medrano, 2012). Esta calibración permitió el estudio de ambos parámetros en moléculas como las cumarinas, moléculas orgánicas utilizadas como medio activo en estudios con láser, siendo el lugar donde se sitúan la mayor cantidad de átomos en estado excitado (Brieva, 2011) o los ligantes bicromofóricos, utilizados como sensores ante cambios en los factores externos como el potencial redox, el pH, la luz o la temperatura, a la hora de medir fluorescencia (Medrano, 2012).

5.3. Fluoresceína

La fluoresceína ($C_{20}H_{12}O_5$) es una molécula derivada del xanteno que tiene propiedades fluorescentes cuando es disuelta en agua emitiendo luz a una longitud de onda de 514 nm en la zona de los verdes del espectro visible. Esta molécula absorbe la energía a la longitud de onda de 489 nm, en la zona de los azules del espectro (Orduz, 2015).

En la Tabla 3 se representan las principales aplicaciones de la fluoresceína, su estructura química y su reacción de síntesis.

Tabla 3. Fluoresceína y sus derivados: síntesis y aplicaciones analíticas.

| | | | |
|---|--|---|--|
| <p><u>FLUORESCÉINA</u></p>  <p><i>Figura 11. Estructura química de la fluoresceína (Orduz, 2015).</i></p> | | <p>La fluoresceína (Figura 11) es un polvo de color rojo utilizado como colorante sintético en numerosos inmunoensayos. En su síntesis se produce una reacción de condensación donde se utilizan dos moléculas de resorcinol y una molécula de anhídrido ftálico, en presencia de un agente de condensación como es el cloruro de zinc (Figura 12) (Soto y López, 2009).</p>  <p><i>Figura 12. Reacción de síntesis de fluoresceína (Soto y López, 2009).</i></p> | |
| <p>APLICACIONES ANALÍTICAS</p> | <p>Uso de la fluoresceína sódica en el estudio de los vasos sanguíneos retinianos.</p> | <p>Angiografía fluoresceínica en la detección de enfermedades retinianas.</p> | <p>(Gutierrez y Gil, 2008), (Escudero, 2015) (Norma et al., 2015).</p> |
| | | <p>Fluoresceína sódica en neurocirugías vasculares.</p> | <p>(Acha et al., 2021).</p> |
| | <p>Fluoresceína sódica en el estudio del epitelio corneal. Adaptación de lentes de contacto RGP.</p> | <p>Fluoresceína sódica en el estudio del epitelio corneal.</p> | <p>(Gálvez et al., 1998), (Baraboglia, 2009), (Formigós, 2012), (Parra, 2016), (Álvaro, 2020).</p> |
| | | <p>Evaluación de la calidad de la película lagrimal.</p> | <p>(Durán et al., 2006; Formigós, 2012).</p> |
| | | <p>Evaluación de la velocidad de aclaramiento lagrimal.</p> | <p>(Álvaro, 2020).</p> |
| | | <p>Adaptación óptima de LC RGP.</p> | <p>(de Miguel, 2011), (Parra, 2016).</p> |
| | <p>Aplicaciones del isotiocianato de fluoresceína en inmunoensayos para la detección de antígenos y anticuerpos.</p> | <p>Comprobación de la fijación del anticuerpo al soporte del ensayo.</p> | <p>(Peraile et al., 2018).</p> |
| | | <p>Marcado de antígenos para su detección en inmunoensayos.</p> | <p>(Echevarría, 1999).</p> |
| | | <p>Determinación directa de anticuerpos e inmunoglobulinas.</p> | <p>(Quezada, 1989), (Soto y López, 2009), (Alegre, 2020).</p> |

- *Uso de la fluoresceína sódica en el estudio de los vasos sanguíneos retinianos*

La técnica de angiografía con fluorescencia sódica se utiliza en el estudio de los vasos sanguíneos de la retina. En esta técnica se inyecta la fluoresceína al torrente sanguíneo que conecta con la retina. La fluorescencia llega a los distintos vasos presentes en la retina, los cuales son fotografiados en secuencias constantes y se produce luminiscencia facilitando el diagnóstico de distintas enfermedades como son los microaneurismas en retina (Figura 13) que pueden estar presentes en la retinopatía diabética (Norma et al., 2015), la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o los edemas retinianos o la retinopatía hipertensiva (Gutierrez y Gil, 2008). Además, la fluoresceína sódica ha sido utilizada para controlar en tiempo real el flujo sanguíneo en neurocirugías vasculares (Acha et al., 2021).

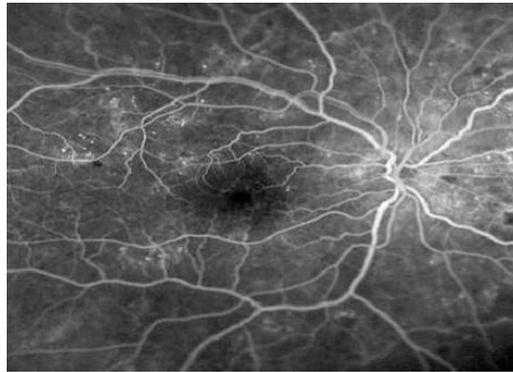


Figura 13. Diagnóstico mediante angiografía fluoresceínica de microaneurismas retinianos (Gutierrez y Gil, 2008).

En algunas ocasiones, el uso de fluoresceína puede producir en los pacientes distintas reacciones adversas como pueden ser náuseas, vómitos, dolor de cabeza, dolores o alergias (Escudero, 2015).

- *Fluoresceína sódica en el estudio del epitelio corneal. Adaptación de lentes de contacto rígidas gas permeable (RGP)*

En el gabinete optométrico, para el estudio de la integridad epitelio corneal se utiliza la lámpara de hendidura con un filtro azul cobalto y la fluoresceína. La fluoresceína se añade mediante unas tiras de papel secante que se ponen en contacto con el ojo y el paciente al parpadear lo distribuye por todo el epitelio. El epitelio corneal está formado principalmente de lípidos, y la fluoresceína al ser hidrosoluble, solo podrá

penetrar en las zonas donde el epitelio pierde su integridad, por lo que al proyectar luz azul sobre el ojo se produce la estimulación e iluminación de la fluoresceína situada en estas zonas lesionadas (Gálvez et al., 1998; Formigós, 2012; Parra, 2016; Álvaro, 2020). En veterinaria el uso de fluoresceína también está permitida para el diagnóstico de enfermedades oculares (Baraboglia, 2009).

Otra de las aplicaciones de fluoresceína es la evaluación de la calidad de la película lagrimal mediante el test BUT (*break-up time*). Para realizar el test BUT se tiñe la película lagrimal con fluoresceína la cual producirá fluorescencia al ser iluminada con luz azul de cobalto. El paciente debe parpadear para distribuir la fluoresceína homogéneamente por todo el epitelio hasta una indicación del óptico, y posteriormente debe mantener el ojo abierto sin parpadeo para que el óptico pueda evaluar mediante la lámpara de hendidura cuando se produce la rotura de la integridad de la lágrima (Durán et al., 2006; Formigós, 2012). Los valores normales son de 10 segundos o más, por lo que en situación donde el tiempo de ruptura es menor se produce el síndrome de ojo seco, que suele venir acompañado de una queratitis punctata (Gálvez et al., 1998). La fluoresceína también se utiliza para la valoración del aclaramiento lagrimal. Para ello se mide la velocidad a la que la fluorescencia abandona la película lagrimal, lo que permite determinar la calidad del recambio y flujo lagrimal (Álvaro, 2020).

La fluoresceína es utilizada para la adaptación óptima de lentes de contacto rígidas gas permeable (RGP). Una vez adaptada la lente de contacto, se añade fluoresceína permitiendo establecer una relación directa entre la lente de contacto y la córnea del paciente. La lente de contacto puede quedar adaptada de forma abierta, donde apoya principalmente en el centro provocando una inestabilidad y movimiento excesivo de la lente, cerrada, donde el apoyo principal se encuentra en los bordes lo que provoca un deficiente intercambio lagrimal, u óptima, donde se distribuye homogéneamente el apoyo de la lentilla en el ojo. La representación gráfica de las adaptaciones se conoce como fluorograma. Por lo tanto, los fluorogramas permiten al óptico analizar la adaptación de la lente al ojo, el cual realizará cambios en los parámetros de la lente de contacto para obtener finalmente una adaptación óptima (Figura 14) (Parra, 2016).

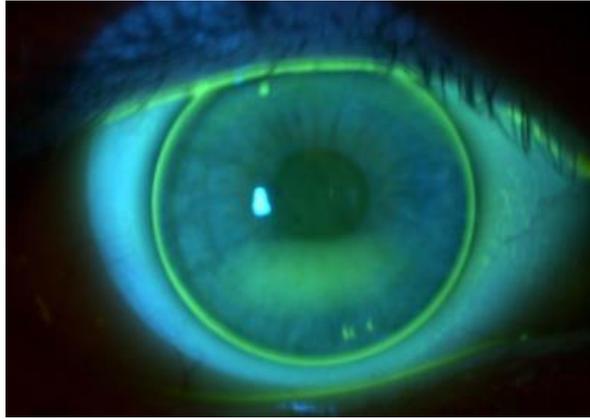


Figura 14. Fluorograma de adaptación óptima de LC RGP (de Miguel, 2011).

- *Aplicaciones del isotiocianato de fluoresceína en inmunoensayos para la detección de antígenos y anticuerpos.*

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es utilizado en el paso previo a la realización del análisis de detección de antígenos. Para realizar este ensayo es necesario fijar previamente el anticuerpo encargado de determinar la presencia de antígeno a un soporte donde se realizará el estudio. Se crea una estructura química anticuerpo-FITC que es fijada al soporte y posteriormente es excitada a 490 nm y se mide la fluorescencia a 521 nm. En los casos donde se produce fluorescencia en el soporte indica que la estructura anticuerpo-FITC ha quedado correctamente inmovilizada (Peraile et al., 2018).

Otra aplicación del FITC, es su uso como herramienta para la determinación de la presencia de antígenos. Para ello se marcan con fluoresceína los posibles antígenos presentes en la muestra a analizar. Se pone en contacto la muestra con un soporte que contiene los anticuerpos específicos del antígeno buscado. Si existe presencia de antígeno en la muestra estos se unirán a los anticuerpos fijados, y posteriormente se lava el soporte para eliminar los restos de moléculas diferentes del antígeno buscado. Tras ello, se excita el soporte y si se produce fluorescencia, indica la presencia del antígeno unido al anticuerpo fijado al soporte, por el contrario, si no se produce fluorescencia, indica que no existía antígeno en la muestra y tras el lavado se ha eliminado los restos de FITC junto a las otras moléculas de la muestra (Echevarría, 1999).

Por último, el FITC se emplea para la determinación directa de anticuerpos e inmunoglobulinas. Se utiliza de la misma forma que en la aplicación anterior, pero en este caso anticuerpos y antígenos tienen cambiados sus papeles. Para ello, se añade FITC al suero a estudiar para que se produzca la unión entre anticuerpo y la molécula, y posteriormente se pone en contacto con un soporte que contiene un antígeno determinado. En este caso, si en el suero se encuentra el anticuerpo, este se unirá al antígeno y tras una excitación producirá fluorescencia (Figura 15) (Quezada, 1989; Soto y López, 2009).

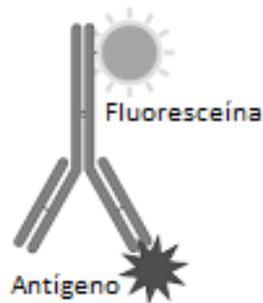


Figura 15. Esquema proceso de inmunofluorescencia directa donde la fluoresceína unida al anticuerpo se une al antígeno (Alegre, 2020).

5.4. Proteínas fluorescentes: Proteína verde fluorescente (GFP)

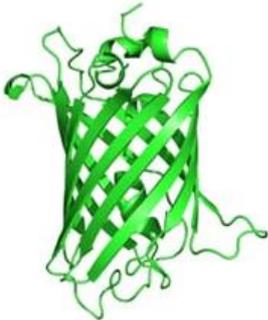
La proteína verde fluorescente (GFP) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria* (Figura 16) que emite luminiscencia en la zona verde (510 nm) del espectro visible tras ser irradiada con luz azul (470 nm) o ultravioleta, sin necesitar la presencia de otras enzimas o moléculas, es por ello que tiene numerosas aplicaciones analíticas (Welter, 2008).



Figura 16. Medusa *Aequorea victoria* (Welter, 2008).

En la Tabla 4, se representa la estructura tridimensional de la GFP (Figura 17), sus características físicas y las aplicaciones analíticas de las proteínas fluorescentes.

Tabla 4. Proteína verde fluorescente: características y aplicaciones analíticas de las proteínas fluorescentes.

| | | | |
|---|--|--|----------------------------------|
| <p><u>Proteína verde fluorescente</u></p>  <p><i>Figura 17. Estructura tridimensional de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) (Welter, 2008).</i></p> | | <p>Es una proteína formada por 238 aminoácidos con estructura de barril beta, que en su interior posee un cromóforo con estructura alfa hélice, que se encarga de la emisión luminiscente, el cual es formado por una ciclación espontánea, en presencia de oxígeno molecular, a partir de la secuencia de aminoácidos Ser65 - Tyr66 - Gly67 (Welter, 2008).</p> | |
| APLICACIONES ANALÍTICAS | <p>Monitoreo de proteínas y enzimas celulares en organismos vivos.</p> | <p>Control de cambios de pH, calcio, señales en cascada o interacciones proteína-proteína.</p> | <p>(Franco y Longart, 2009).</p> |
| | <p>Detección de interacciones entre proteínas celulares mediante microscopia de fluorescencia.</p> | <p>Interacción de proteínas mediante la técnica de detección de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FERT) entre dos fluoróforos.</p> | <p>(Ferrer, 2008).</p> |
| | <p>Estudio del sistema nervioso mediante el uso de proteínas fluorescentes.</p> | <p>Marcado de neuronas para la visualización de la disposición neuronal del SNC y sus interacciones.</p> | <p>(Franco y Longart, 2009).</p> |
| | | <p>Estudio neuronal mediante la técnica <i>Brainbow</i> utilizando una combinación de proteínas fluorescentes.</p> | <p>Lives et al., 2007).</p> |
| | <p>Proteínas fluorescentes en la detección de la diseminación de células cancerosas.</p> | <p>Localización de células cancerosas y su proliferación.</p> | <p>(Hoffman, 2015).</p> |
| <p>Análisis de respuesta en células cancerosas ante el uso de fármacos.</p> | | <p>(Hoffman, 2015).</p> | |

En todas sus aplicaciones, se realiza un paso previo para que la proteína GFP esté presente en el organismo a estudiar. El gen que codifica la GFP se introduce en el organismo vivo mediante la fusión a otros genes de proteínas específica. Cuando estas proteínas sean sintetizadas en el organismo, se sintetizarán unidas a la proteína GFP lo que permite mediante fluorescencia el análisis de posicionamiento, interacciones y movimientos de dicha proteína en el organismo, sin interceder en los procesos biológicos que este realice. Tras realizar numerosos estudios utilizando la ingeniería de las proteínas se desarrollaron mutaciones de la GFP que evitaban la dimerización de la proteína, y se amplió la gama de colores de la luz producida a amarillos, violetas o azules permitiendo una diferenciación de las interacciones producidas en el organismo. Además, se buscaron nuevas proteínas fluorescentes de interés como la proteína roja fluorescente (DsRed), que penetra más profundamente en los tejidos orgánicos que la GFP (Franco y Longart, 2009; Perez y Becu-Villalobos, 2009).

- *Monitoreo de proteínas y enzimas celulares en organismos vivos*

La síntesis en una célula de una proteína fluorescente unida a la proteína específica permite monitorizar procesos intracelulares como los cambios de pH, calcio, señales en cascada o interacciones proteína-proteína, así como la propia actividad de la proteína estudiada, gracias a la fluorescencia producida (Franco y Longart, 2009).

- *Detección de interacciones entre proteínas celulares mediante microscopia de fluorescencia*

Las proteínas fluorescentes permiten detectar la interacción que se produce entre dos proteínas unidas cada una de ellas a un fluoróforo. Para ello, se mide presencia de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FERT) entre dos fluoróforos situados a menos de 100 Å, donde el espectro de emisión del donador se superpone con el espectro de recepción del receptor, por lo que la emisión del donador produce la excitación del receptor, produciéndose una transferencia de energía, siendo una prueba confirmatoria de la interacción entre proteínas (Ferrer, 2008).

- *Estudio del sistema nervioso mediante el uso de proteínas fluorescentes*

Para el estudio del sistema neuronal se utilizan ratones, los cuales tienen genes similares a los humanos. Para ello, se marcan selectivamente con distintas proteínas

fluorescentes las neuronas del animal, generando un ratón transgénico y permitiendo la visualización de la disposición total del sistema nervioso central y las interacciones entre neuronas (Franco y Longart, 2009). En 2007, investigadores de la Universidad de Harvard consiguieron el marcaje de neuronas con hasta 90 colores diferentes utilizando una técnica de combinación de distintas proteínas fluorescentes, a la cual denominaron *Brainbow* (Figura 18), lo que permitió el estudio de las conexiones neuronales y establecer las diferencias entre las personas sanas y enfermas (Lives et al., 2007).

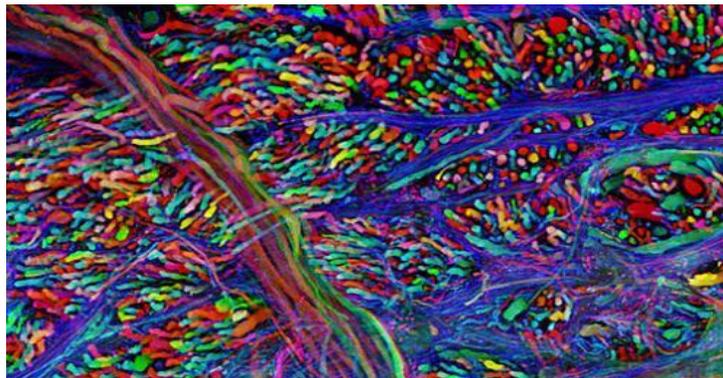


Figura 18. Fluorescencia de las neuronas del tronco encefálico mediante la técnica de *Brainbow* (Lives et al., 2007).

- *Proteínas fluorescentes en la detección de la diseminación de células cancerosas*

Las proteínas fluorescentes permiten la detección de las células cancerosas a nivel unicelular. Para su estudio se utilizan ratones que tienen en su cuerpo células cancerosas. Se introducen los genes de las proteínas fluorescentes, como GFP, en el genoma de estas células cancerosas, permitiendo detectar los tumores producidos por la proliferación de dichas células.

Además, también permite el estudio de la efectividad de los fármacos antitumorales en las células cancerosas. En un estudio realizado por Hoffman (2015), se determinó la resistencia de las células cancerosas a su tratamiento con gemcitabina en ausencia de sunitinib, ya que se observaba fluorescencia lo que indicaba el desarrollo de nuevas células cancerosas (Hoffman, 2015).

6. CONCLUSIONES

- El luminol es la molécula de elección en la detección de resto de sangre en investigaciones forenses. Además, detecta la presencia de especies reactivas de oxígeno y cetonas en aguas contaminadas y en pacientes asmáticos gracias a la reacción luminiscente que produce con ellas.
- La o-quinona, producida a partir de la enzima tirosinasa, permite la determinación de esta enzima en alimentos o suero humano mediante el método *Quenching*, que mide la atenuación de luminiscencia.
- La quinina es una molécula luminiscente utilizada en la calibración instrumental y metodológica de los instrumentos de medida de luminiscencia. Permite evaluar el cumplimiento de la legislación sobre la concentración de quinina presente en agua tónica mediante el análisis de las muestras y la comparación con disoluciones patrón de quinina.
- La capacidad luminiscente de la fluoresceína permite la detección de patologías retinianas, la evaluación de la integridad corneal, la calidad de la lágrima y su intercambio en el parpadeo y la valoración del grado de adaptación de las lentes de contacto rígidas gas permeable. en la córnea del paciente. También es utilizada como prueba confirmatoria en inmunoensayos para detectar la presencia de anticuerpos o antígenos.
- El descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP) ha impulsado el desarrollo de nuevas proteínas fluorescentes que son utilizadas en el campo de la medicina en estudios del sistema nervioso central y de las interacciones neuronales, así como para la detección y seguimiento de células cancerosas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Acha JL, Azurín M, Bellido A. Ventajas de la videoangiografía intraoperatoria con fluoresceína integrada al microscopio en patología cerebrovascular. Experiencia inicial en el Hospital Nacional Dos de Mayo. Peru J Neurosurg 2021; 3(1): 41-48.

Aguilar Muñoz ML, Durán Torres C. Química recreativa con agua oxigenada. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias. 2011; 8(Extra): 446-453.

Alegre de Miguel V. Enfermedades ampollas autoinmunes. Universidad de Valencia. Departamento de Dermatología. 2020 [en línea]. [Consultado en mayo 2020].
Disponibile en: <https://www.uv.es/derma/CLindex/CLampollosas/CLampollosas.htm> .

Álvaro Martínez S. Evaluación del aclaramiento lagrimal en pacientes con tratamiento para el glaucoma. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza. Departamento de Óptica y Optometría, 2020.

Amo Ochoa P. Luz fría: ¿una bombilla dentro de la nevera?. An. Quím. 2015; 111(3): 166-172.

Amurrio Derpic D. La quinina. Historia y síntesis. Universidad Católica Boliviana San Pablo. Acta Nova. 2001; 1(3): 241-247.

Aubourg Martínez SP. Detección de fluorescencia en sistemas modelo conteniendo aldehídos: relación con la alteración de pescado. Grasas y aceites. 1998; 49(5-6): 419-424.

Bagazgoitia Barrera FJ, García Fernández JL, Diéguez González C. Bioluminiscencia y quimioluminiscencia: aplicaciones analíticas. Química Clínica. 1987; 6(1): 31-40.

Baraboglia E. (2009). Uso de la fluoresceína en la práctica clínica veterinaria. REDVET. 2009; 10(3): 1-10.

Beltrán San Segundo H. Lámparas: tipos y características. Módulo 1.2. Universidad Jaume I. Fundación F2e. 2015.

Brieva García R. Determinación del rendimiento cuántico y tiempos de vida media de fluorescencia en sustancias colorantes con aplicaciones como fuentes laser. Trabajo Fin de Grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Escuela de Química, 2011.

Castelló Ponce A, Álvarez Seguí M, Miquel Feucht M, Verdú Pascual FA. Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. Cuadernos de Medicina Forense. 2002; 28: 33-36.

Cedrón, JC. El luminol. Revista de Química PUCP. 2011; 25(1-2): 13-14.

Chong Cheung JC. El triptófano como sonda luminiscente intrínseca: Caracterización del enlace seroalbúmina bovina-antibiótico. Trabajo Fin de Máster, Universidad de Oviedo. Departamento de Química Física y Analítica, 2014.

Cluzel M, Damon M, Chanez P, Bousquet J, Crastes de Paulet A, Michel FB, et al. Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. J Allergy Clin Immunol. 1987; 80: 195-201.

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

de Miguel Lorenzo V. Estudio sobre adaptación de lentes de contacto RPG de gran diámetro. Trabajo Fin de Máster, Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de óptica y optometría, 2011.

Del Castillo García, B. El largo camino de los métodos luminiscentes en análisis farmacéutico. Conferencia de Ingreso en la Real Academia de Farmacia. 1996.

Domínguez Martínez, JA. La Cavitación Hidrodinámica. Anuario Ciencia en la UNAH. Ciencia Universitaria. 2018; 16(1).

Durán P, León A, Márquez M, Veloza C. Evaluación de la película lagrimal con métodos diagnósticos invasivos vs método diagnóstico no invasivo. Revista Investigaciones Andina. 2006; 8(12): 35-49.

Echevarría Mayo JE. Estrategias de diagnóstico en España. Papel del laboratorio en la erradicación del sarampión. Rev Esp Salud Pública. 1999; 73(5): 635-638.

Escudero Pastor AI. Reacciones adversas por agentes de diagnóstico en oftalmología. Hospital General Universitario Reina Sofía. Murcia. 2015.

Esteban M, Marchena M. Modificación de un espectrofotómetro de absorción para el análisis por fluorescencia de la quinina en una disolución de tónica comercial. MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide. 2014; (16): 47-51.

Feas Sánchez X, Robert Brasic J, Fente Sampayo CA, Cepeda Sáez A. Aspectos toxicológicos del consumo de bebidas refrescantes que contienen quinina. *Nutr. clín. diet. hosp.* 2008; 28(2): 20-25.

Ferrer JC. Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien, premios Nobel de Química 2008: por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP. *An. Quím.* 2008, 104(4), 276-279.

Formigós Bolea JA. *Terapéutica ocular: Estudio del uso de fármacos para realizar un examen optométrico y diagnóstico diferencial.* Universidad de Alicante. Departamento de Farmacología, 2012.

Franco AY, Longart M. Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. *RET.* 2009; 1(2): 84-96.

Gálvez Tello JF, Lou Royo MJ, Andreu Yela E. Ojo seco: diagnóstico y tratamiento. *Inf Ter Sist Nac Salud.* 1998; 22(5): 117-122.

García Segura S. *Tratamiento electroquímico de fármacos y colorantes en medio acuoso mediante procesos de oxidación avanzada.* Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona. Departamento de Química Física, 2014.

García Suárez A. *Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por métodos indirectos.* Trabajo Fin de Máster, Universidad de Oviedo. Departamento de Química Física y Analítica, 2015.

Gil Pitarch P, Verdú Pascual V, Castelló Ponce A, Negre Muñoz, MC. Técnica de criminalística en manchas de sangre: factor ambiental en las pruebas de orientación. *Revista de la Escuela de Medicina Legal.* 2010: 4-14.

González Reyes AB, Hardisson de la Torre A, Gutiérrez Fernández AJ, Rubio Armendáriz C, Frías Tejera I, Revert Gironés C. Cafeína y quinina en bebidas refrescantes: contribución a la ingesta dietética. *Nutr Hosp.* 2015; 32(6): 2880-2886.

Grodsky M, Wright K, Kirk PL. Simplified Preliminary Blood Testing. An Improved Technique and a Comparative Study of Methods. *J Crim Law Criminol Police Sci* 1951; 42: 95-104.

Gutiérrez Espinoza A, Gil Gutiérrez A. Degeneración macular: evidencia de caso. *Rev Medicina*. 2008; 14(2): 151-155.

Heredia Ávalos S. Experiencias para observar el fenómeno de fluorescencia con luz ultravioleta. *Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien*. 2008, 5(3): 377-381.

Hoffman R. Application of GFP imaging in cancer. *Laboratory investigation*. 2015; 95(4): 432-452.

Jiménez-Alfaro Ortego P. Historia de la quina: de la lucha contra la malaria a la aparición de la tónica. Trabajo Fin de Grado, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia, 2019.

Kodamatani H, Yoshimine D, Fujioka T, Kanzaki R, Tomiyasu T. A novel luminol chemiluminescence induced by photoexcited ketones: A selective determination method for acetone in wastewater. *Talanta Open*. 2021; 3:100035.

Liu M, Lin Z, Lin JM. A review on applications of chemiluminescence detection in food analysis. *Anal Chim Acta* 2010; 670: 1-10.

Livet J, Weissman T, Kang H, Draft R, Lu J, Bennis R et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*. 2007; 450: 56-62.

Marquina Díaz D, Santos de la Sen A. Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología. 2011; 3(5): 39-55.

Martín Sánchez MT, Martín Sánchez M. Luz fría: trabajos experimentales sencillos. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 2001; 4: 37-42.

Medrano Pesqueira TC. Caracterización fotofísica de nuevas sondas moleculares fluorescentes con aplicación potencial en la determinación de diversos analitos en solución. Tesis del Máster en Ciencia de Materiales, Universidad de Sonora. Departamento de investigación en polímeros y materiales, 2012.

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

Muñoz J, Rojo Marcos G, Ramírez-Olivencia G, Salas-Coronas J, Trevino B, Arellano, et al. Diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España: recomendaciones del

Grupo de Trabajo de Malaria de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33(6): e1-e13.

Nakamatsu J, González Gil P. La quinina, el símbolo de la XXII Olimpiada Iberoamericana de Química 2017. *Revista de Química PUCP*. 2018; 32(2): 17-26.

Norma RH, Janet MP, Miguel MU, Rutilio NM, Janeth RA. Detección de microaneurismas en la retina. *Memorias del Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica*. 2015; 2(1): 92-95.

Orduz Díaz, Y. Uso de la fluoresceína como pigmento fotosintético auxiliar en el cultivo de microalgas de la especie *Chlorella Vulgaris*. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Santo Tomás, Bucaramanga. Facultad de química ambiental, 2015.

Padilla Rosales I. Luminiscencia: lámparas fluorescentes y LED's. *Bol. Soc. Mex. Fís*. 2018; 32(4): 181-187.

Panohaya García F, Olivares Pérez A, Fuentes Tapia I. Conceptos y bibliografía sobre la fotoluminiscencia y procesos similares. *IANOE*. 2004; 2: 1-40.

Parra Corredor CF. Comparación del fluorograma simulado por la pentacam hr vs el fluorograma real en la adaptación de lentes de contacto RGP. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Santo Tomás, Bucaramanga. Facultad de Optometría, 2016.

Peraile Muñoz I, Gil García M, Guamán Collaguazo CE, González López L, Cabria Ramos JC, Lorenzo Lozano P. Optimización del proceso de inmovilización de anticuerpos en inmunobiosensores. *Sanidad mil*. 2018; 74 (3): 158-162.

Pérez Millán MI, Becu-Villalobos D. La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. 2009; 69(3): 370-374.

Podbevšek D, Colombet D, Ayela F, Ledoux G. Localization and quantification of radical production in cavitating flows with luminol chemiluminescent reactions. *Ultrason Sonochem* 2021;71.

Pourfaraj R, Kazemi SY, Fatemi SJ, Biparva P. Synthesis of α - and β -CoNi binary hydroxides nanostructures and luminol chemiluminescence study for H₂O₂ detection. *J Photochem Photobiol A Chem* 2018; 364: 534-41.

- Quezada M. Aplicación en patología veterinaria de las técnicas inmunohistoquímicas 1 parte. Técnica de inmunofluorescencia. *Patología Animal*. 1989; 3(2): 4-7.
- Quispe S, Flores A. Detección de manchas de sangre mediante la Prueba de Luminol en la investigación forense. *Revista Con-Ciencia*. 2014; 2(1): 83-91.
- Rodríguez Arias B, Armenter Ferrando MC. La quinina es un viejo fármaco que no cabe relegar al olvido. *Anales de medicina y cirugía*. 1977; 58(249): 172-188.
- Romero Cortez PM. ¡La luz de la verdad!. *Curiosidades de la Química*. *InfoAnalítica*. 2018; 6(2): 59-62.
- Ruiz Medina L. Estudio de la interacción entre seroalbúminas animales y cloranfenicol mediante técnicas de fotoluminiscencia molecular. Trabajo Fin de Máster, Universidad de Oviedo. Departamento de Química Física y Analítica, 2014.
- Salgado G, Navarrete J, Bustos C, Sánchez C, Ugarte R. Electroquimioluminiscencia del luminol usando electrodos de bajo costo. *Quim Nova*. 2006; 29(2): 381-384.
- Samanidou V, Evaggelopoulou E, Papadoyannis I. Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2005; 38: 21-28.
- Sancho Martínez MI. Bioluminiscencia: brillando con luz propia. All you need is biology. 2016. [Consultado en marzo 2021]. Disponible en: <https://allyouneedisbiology.wordpress.com/category/castellano/page/14/>.
- Skoog D, Holler F, Nieman T. Principios de análisis instrumental. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill; 2001.
- Soto Arenas CA, López Florez GA. Degradación fotocatalítica de la fluoresceína. Trabajo Fin de Grado, Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de Tecnología Química, 2009.
- Wang C, Chen Y, Snizhko D, Du F, Ma X, Lou B, et al. Development of luminol-fluorescamine-PVP chemiluminescence system and its application to sensitive tyrosinase determination. *Talanta*. 2020; 218: 121177.
- Welter K. La proteína verde fluorescente: una herramienta valiosa en la biomedicina. *Avances en Química*. 2008; 3(3): 99-103.

Yu W, Zhao L. Chemiluminescence detection of reactive oxygen species generation and potential environmental applications. *Trends Anal Chem.* 2021; 136: 116197.