



**I  
N  
A  
O  
E**

**Instituto Nacional de Astrofísica**

**Óptica y Electrónica**

**REPORTE TÉCNICO**

**“Conceptos y bibliografía sobre la  
fotoluminiscencia y procesos similares”**

**Realizado por:**

**Faridy Panohaya García  
Dr. Arturo Olivares Pèrez  
Q.I. Israel Fuentes Tapia**

**Diciembre 2004**

**©INAOE 2004**

**Derechos Reservados**

**El autor otorga al INAOE el permiso de reproducir y  
distribuir copias en su totalidad o parcial de este reporte  
técnico.**



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>4</b>
<b>HISTORIA DE LA LUMINISCENCIA.....</b>	<b>5</b>
<b>¿QUE ES LA LUMINISCENCIA?.....</b>	<b>6</b>
<b>CLASIFICACION DE LA LUMINISCENCIA.....</b>	<b>6</b>
<b>CLASIFICACION DE MATERIALES LUMINISCENTES.....</b>	<b>7</b>
<b>¿QUE ES Y COMO ES PRODUCIDA LA BIOLUMINISCENCIA? .....</b>	<b>8</b>
<b>TIPOS DE LUCIFERINA.....</b>	<b>9</b>
<b>QUIMICA DE LOS SISTEMAS BIOLUMINISCENTES.....</b>	<b>11</b>
<b>PROPIEDADES FÍSICAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LA UTILIDAD DE LA BIOLUMINISCENCIA.....</b>	<b>13</b>
<b>SINTESIS DE UN COMPUESTO BASE PARA LA OBTENCION DE COMPUESTOS QUIMIOLUMINISCENTES Y/O BIOLUMINISCENTES.....</b>	<b>14</b>
<b>SINTESIS DE 3,5 DISUSTITUIDA 2-AMINOPIRAZINA DE 2-AMINOPIRAZINA...15</b>	
<b>SINTESIS DE IMIDAZOPIRAZINONAS QUIMI Y/O BIOLUMINISCENTES.....</b>	<b>19</b>
<b>QUIMIOLUMINISCENCIA.....</b>	<b>23</b>
<b>MEDIDA DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA.....</b>	<b>24</b>
<b>APLICACIÓN ANALITICAS DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA.....</b>	<b>24</b>

<b>QUIMIOLUMINISCENCIA DEL LUMINOL Y BIS (2,4, TRICLORFENIL) OXALATO (TCPO).....</b>	<b>27</b>
<b>QUIMIOLUMINISCENCIA DEL PEROXIOXALATO.....</b>	<b>27</b>
<b>QUIMIOLUMINISCENCIA DEL LUMINOL.....</b>	<b>28</b>
<b>FOTOLUMINISCENCIA.....</b>	<b>30</b>
<b>TEORIA DE LA FLUORESCENCIA Y DE LA FOSFORESCENCIA.....</b>	<b>30</b>
<b>VELOCIDADES DE ABSORCION Y EMISION.....</b>	<b>31</b>
<b>VARIABLES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA Y A LA FOSFORESCENCIA.....</b>	<b>32</b>
<b>INSTRUMENTOS PARA LA MEDIDA DE LA FLUORESCENCIA Y LA FOSFORESCENCIA.....</b>	<b>36</b>
<b>APLICACIÓN DE LA FOTOLUMINISCENCIA.....</b>	<b>37</b>
<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>38</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>40</b>

# RECOPIACION BIBLIOGRAFICA SOBRE LUMINISCENCIA

## INRODUCCION

El presente trabajo consiste en una recopilación de información bibliográfica sobre luminiscencia. El cual describe en forma rápida y concisa los diferentes procesos físicos, químicos y biológicos involucrados en estos fenómenos.

La luminiscencia es en contraste con la incandescencia (luz emitida por fuentes térmicas), la emisión de radiación óptica, resultado de la excitación no térmica de los niveles de energía de átomos, moléculas, polímeros y cristales.

La clasificación básica de los fenómenos de luminiscencia se nombra por los procesos involucrados en producir la radiación luminosa, como la quimioluminiscencia, roentgenluminiscencia, bioluminiscencia,, triboluminiscencia, cátodoluminiscencia, fotoluminiscencia, electroluminiscencia, ánodoluminiscencia, radioluminiscencia y sonó luminiscencia.

De todos estos fenómenos luminiscentes nos inclinamos por tres caminos que son: la bioluminiscencia, la quimioluminiscencia y por ultimo la fotoluminiscencia.

Partiendo de la naturaleza de los seres vivos, existen varias familias de organismos que producen moléculas básicas como las luciferinas esenciales en los fenómenos bioluminiscentes. Se describen las propiedades físicas y posibles aplicaciones de estas moléculas. Además se describen ligeramente algunos mecanismos de síntesis para replicar moléculas bioluminiscentes, por técnicas de aniquilación en organolitios, técnicas de monobrominación, arilstanación, para la obtención de coelenterazina y ciperidina.

Por otro lado con la mezcla de solventes altamente polares aproticos que reaccionan rápidamente con oxígeno se puede generar quimioluminiscencia por reacciones de dioxetanona a partir de las imidazopirazinonas. Describiéndose algunos potenciales de aplicación así como la técnica más simple para medir este proceso.

Finalmente el efecto de fotoluminiscencia que se clasifica en fluorescencia y fosforescencia que generalmente se manifiesta en materiales que se pueden foto excitar, el material al absorber energía luminosa, un electrón cambia su estado energético subiendo un orbital electrónico mas alto, el cual al recuperar la energía inicia el átomo emite radiación como la luz. se mencionan las variables que la afectan como la estructura química, el pH, la temperatura, el efecto de disolventes por citar algunos ejemplos, además de que se lleva a cabo pruebas de solubilidad de diferentes colorantes con algunos solventes para ver cuales de este presentan fotoluminiscencia.

## **OBJETIVO**

Proporcionar los conocimientos básicos y conceptuales acerca de cómo se lleva a cabo los procesos luminiscentes, así como dar información acerca de las reacciones de síntesis para llevar a cabo la producción de los fenómenos de bioluminiscencia y quimioluminiscencia y por último conocer las características y propiedades que se llevan a cabo en la fotoluminiscencia.

## HISTORIA DE LA LUMINISCENCIA

Desde tiempos inmemorables se conocían sustancias y animales que resplandecían en las sombras, por lo que despertaban la curiosidad y las supersticiones, también el avistamiento de luminosidad en los mares tropicales dio lugar a extrañas leyendas y su reporte era tomado por falacias.

Las primeras referencias escritas a las luciérnagas y gusanos luminiscentes aparecen en las crónicas chinas Shin Ching (libro de las ondas) en el periodo de 1500 a 1000 a. C., Aristóteles (384-322 a.C.) en Grecia, observó la luz emitida por los peces en descomposición y lo registro en De Coloribus: "...algunas cosas no arden por su naturaleza, ni tienen fuego de ningún tipo, aun así parecen producir luz"

Cristóbal Colon también informo en sus cuadernos de bitácora de extraños avistamientos de luces en los mares tropicales.

En 1565, el español Nicolás Monarde escribió acerca del extraordinario color azul intenso de un extracto acuoso de la manera llamada "lignum nephriticum". Esa misma solución fue estudiada 90 años después más tarde por Athanasius Kircher en Alemania, Francisco Grimaldi en Italia, Robert Boyle e Isaac Newton en Inglaterra.

Ellos reportaban que cuanto la solución era iluminada con la luz blanca aparecía una luz reflejada azul intensa, mientras que la luz transmitida era amarilla. Nadie identificó entonces esa luz azul intensa como emisión luminiscente hasta 1852, en que el físico inglés George Stokes usando filtros y prismas demostró que la luz incidente de una región espectral era absorbida y transformada por la solución en una luz emitida en una región espectral diferente, de mayor longitud de onda.

Demostró, con la ayuda de este efecto que el cuarzo es atravesado por las radiaciones ultravioletas, mientras que el vidrio ordinario no lo es.

Stokes acuñó el nombre de fluorescencia derivado de fluor-spar (espatos, en inglés), al igual que la palabra opalescencia se había derivado del nombre de un mineral.

La luminiscencia de los sólidos fue reportada por primera vez en 1603 por Vincenzo Cascariolo de Bolonia, quien calentó polvos de barita natural (sulfato de bario) con carbón y encontró que la mezcla resultante brillaba en la noche él observó que la piedra aparentemente se cargaba de la luz solar por el día y brillaba durante horas en la oscuridad, así que la llamó lápiz solares (piedra del sol).

La piedra fue estudiada también por los científicos italianos Galileo Galilei y Giulio Lagulla. Por su aspecto poroso también le denominaron Spongia Solis (esponja solar) en la suposición de que absorbiera luz tal como una esponja absorbe agua.

En 1652, sin embargo, Nicolás Zucchi demostró, por medio de filtros ópticos, que el color de la luz emitida durante la noche era la misma que cuando la piedra era expuesta a la luz blanca o de otros colores, como azul o verde.

A partir de Cascariolo se designó como fosforescentes a las sustancias que presentaban la propiedad de brillar durante largo tiempo después de excitadas.

El término luminiscencia fue introducido en 1888 por el químico alemán Eilhard Wiedemann para abarcar los dos fenómenos, la fluorescencia y la fosforescencia, y definido a la luminiscencia como todo los fenómenos luminosos no causados solamente por el aumento de la temperatura.

## ¿QUE ES LA LUMINISCENCIA?

La luminiscencia es el proceso por el cual un material genera radiación no térmica dependiendo de las características del tipo de material. Así la luminiscencia es la emisión de la luz por medios diferentes a la combustión y por eso ocurre a temperaturas más bajas que las requeridas por la combustión. La luminiscencia contrasta con la incandescencia, en que es la producción de luz por materiales calentados.

Cuando ciertos materiales absorben varios tipos de energía, una parte de la energía se emite como la luz y este proceso tiene dos pasos que son:

La energía incidente hace que los electrones de los tomos del material absorbente se existen y salten de las orbitas internas de los átomos alas orbitas exteriores. Cuando los electrones caen de nuevo a su estado original, emiten un fotón de luz.

El intervalo entre los dos pasos pueden ser corto (menos de 0.0001 segundos) o largo (muchas horas). Si el intervalo es corto, el proceso se llama fluorescencia y producida es casi siempre de menos energía, es decir, de longitud de onda mas larga que la luz excitante.

### **CLASIFICACION DE LA LUMINISCENCIA:**

En dependencia de la clase de excitación que produce la luminiscencia se le asignan diferentes nombres, que se señalan por prefijos, así tenemos:

**Quimioluminiscencia:** Es causada por reacciones químicas, por ejemplo cuando el fósforo amarillo se oxida en el aire, emitiendo una luminiscencia verde.

**Bioluminiscencia:** Es la emisión de la luz por organismos vivientes, sin calor apreciable. La luz resulta de una reacción química de enzimas y otras ciertas sustancias en los organismos.

**Roengtenluminiscencia:** Es producida por rayos x de alta energía al bombardear ciertos materiales, un ejemplo es la incidencia de lo rayos x en una pantalla fluoroscópica.

**Triboluminiscencia:** La luminiscencia que resulta del rompimiento, rascado o despedazado de ciertos materiales; la palabra viene del griego tribu que quiere decir frotar, consiste en la mayoría de los casos en descargas eléctricas que tienen lugar entre las diferentes partes del sólido, cuando estas se separan por acciones mecánicas externas.

**Cátodoluminiscencia o Electroluminiscencia** y es debida ala excitación por electrones. Tiene lugar cuando ocurren descargas eléctricas en presencia de gases enrarecidos o con vapores de ciertas sustancias. De ahí los llamados rayos catódicos que se utilizan en las pantallas de diferentes tipos de dispositivos como: televisores, computadoras, osciloscopios, radares, etc.

**Ánodoluminiscencia e ionoluminiscencia:** Corresponden a la luminiscencia en ánodos debida a la acción de iones positivos sobre la sustancia.

**Fotoluminiscencia:** Es la emisión de luz producida por ciertos materiales que son irradiados por luz ultravioleta.

**Sonoluminiscencia:** Es la luminiscencia producida por ondas sonoras de ultra altas frecuencias o ultrasonidos.

## CLASIFICACION DE MATERIALES LUMINISCENTES

**Moléculas aromáticas** que producen luminiscencia se encuentran en fases sólidas, líquidas y de vapor, así como en soluciones fluidas y rígidas. Estas constituyen un extenso grupo que son usados ampliamente en centelladores, tintes y pinturas luminiscentes, aclaradores de telas y papel, láseres, etc.

**Cristales inorgánicos**, como diamantes, rubí, sulfuro de zinc y tungstenato de calcio. Su emisión es usualmente eficiente, que resulta de las impurezas o defectos de los cristales. Los cristales inorgánicos luminiscentes son utilizados para pantallas luminiscentes, centelladores, láseres en estado sólido, joyería, etc.

**Gases nobles** He, Ne, Ar, Kr, Xe= en fase sólidas, líquidas de vapor y en soluciones. Estos son utilizados en lámparas de descarga, láseres de gas y centelladores.

**Moléculas inorgánicas simples** en fase de vapor que producen luminiscencia. Algunas ( $H_2, D_2, N_2, Y H_G$ ) son usados en lámparas de descarga, y otros ( $N_2, I_2, Y CO_2$ ) en láser de gas.

**Iones inorgánicos**, notables de tierras raras, que se utilizan como activadores en cristales, vidrios y quelatos. Sus aplicaciones incluyen centelladores inorgánicos y de vidrio.

**Moléculas biológicas**, como las aromáticas que se encuentran aminoácidos, nucleótidos, retinil polienos, clorofilas, carotenoides, vitaminas y hormonas. Su estudio esta en una importante área de la investigación biofísica.

**Moléculas alifáticas** (parafinas y ciclohexano), las cuales se creían que no producían luminiscencia pero ahora se conoce que emiten a lo lejos del UV con una baja producción de fotones.

Esta lista ilustra un amplio rango de materiales luminiscentes y sus aplicaciones.



## BIOLUMINISCENCIA

### ¿QUE ES Y COMO ES PRODUCIDA LA BIOLUMINISCENCIA?

La bioluminiscencia es una luz simple producida por una reacción química que es originada en organismos, esta luz suele ser verdosa y fría por que no va acompañada de radiaciones infrarrojas ni produce calor alguno.

La bioluminiscencia es un fenómeno que se da en organismos como bacterias, algas, hongos, insectos, peces, medusas, cangrejos, corales, moluscos e incluso en algunos tiburones. Aunque los ecosistemas marinos, donde la luz escasea y les permite brillar con todo su esplendor, son el hábitat preferido de estas especies. También se encuentran seres capaces de emitir luz en otros habitats como es el caso de las luciérnagas, los nematodos – de los cuales se conocen hasta 33 especies de lombrices bioluminiscentes-, las moscas , algunos ciempiés, un tipo de caracol de malasia e incluso ciertos hongos, ciertos hongos, como la *Armillaria mellea*.

Como se había mencionado anteriormente la bioluminiscencia es una luz producida por una reacción química en los organismos y para que esta se produzca se necesita de cuatro elementos: el oxígeno, un compuesto orgánico denominado luciferina, la enzima catalizadora luciferaza, y el ATP (trifosfato de adenosina) que es una sustancia capaz de generar la energía necesaria para que se lleve a cabo la reacción.

El mecanismo de reacción es el siguiente:

- El oxígeno oxida la luciferina
- La luciferaza acelera la reacción
- El ATP proporciona la energía para que esta se convierta en una nueva sustancia (luciferina oxidada) capaz de descomponerse para volver a su estado inicial.
- En este último proceso se libera el exceso de energía captado, esta en forma de luz.

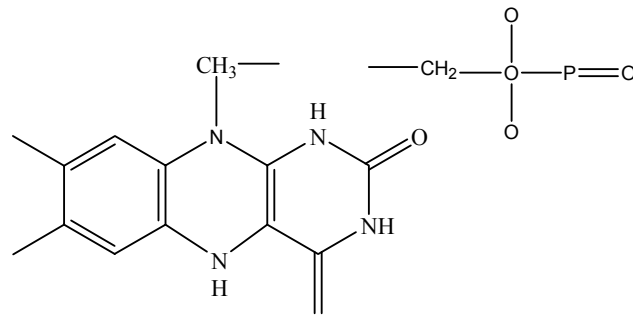
La intensidad de la luz producida es muy grande y la luminiscencia en una pequeña zona del animal es proporcionalmente mayor al de una lámpara fluorescente.

La reacción completa se produce en menos de un milisegundo y se mantiene mientras el organismo permanezca en un estado de excitabilidad. Según las distintas especies de animales la composición química de la luciferaza y de las luciferinas varia, lo que produce colores distintos: que van del rojo o al ámbar y también del verde al azul que es lo mas frecuente.

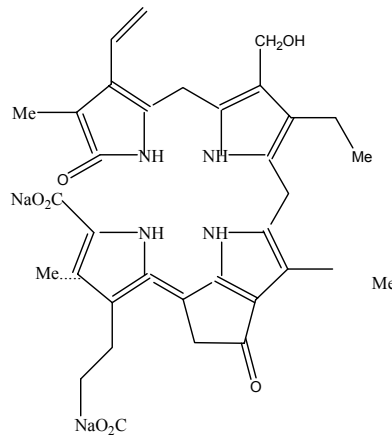
## TIPOS DE LUCIFERINA

Como ya se había mencionado la luciferina es el sustrato básico las reacciones bioluminiscentes. Algunos ejemplos de luciferinas marinas son las siguientes:

**Luciferina de bacterias:** es fosfato de riboflavina reducida la cual es oxidada en asociación con una larga cadena compuesta por aldehído, oxígeno y una luciferaza.

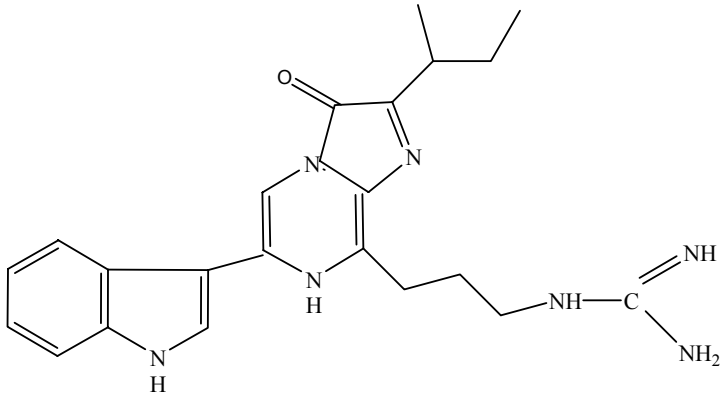


**Luciferina de los dinoflagelados:** se cree que es un derivado de la clorofila debido a que tiene una estructura similar a esta. En el genero *Gonyalux*, la molécula es protegida de una luciferaza por una luciferina enlazada a una proteína a un pH de 8, pero cuando ele baja a 6, la luciferina se libera reacciona y se produce luz.

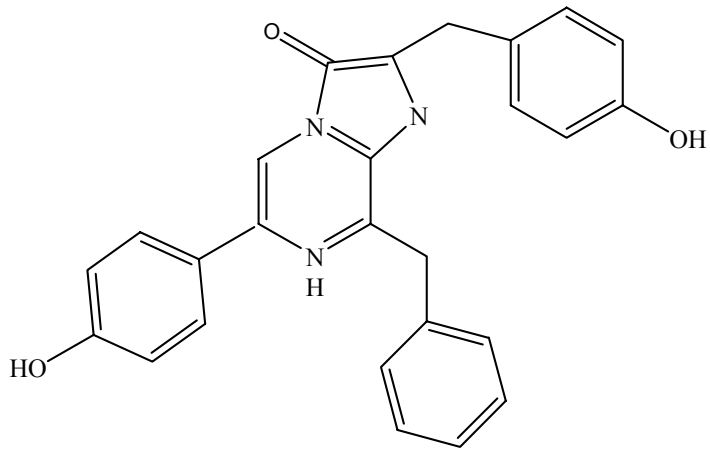


**Luciferina de vargulina:** es en la ostracod vargula y por los peces de guardiamarina porichthys, en estos, la luminiscencia tiene que ver con la dieta de estas especies

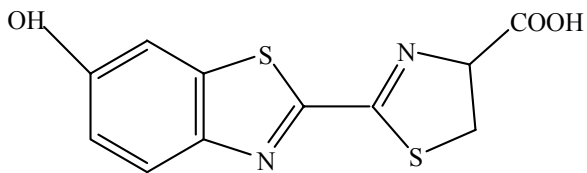
Ya que pierden la habilidad de luminiscencia cuando han consumido demasiada luciferina.



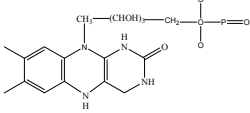
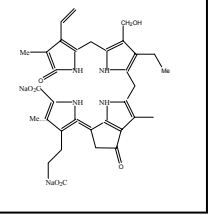
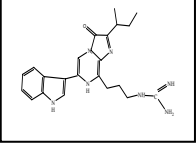
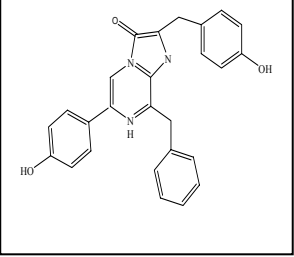
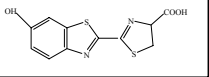
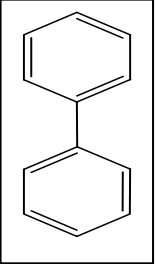
**Luciferina de coelenterazina:** es la luciferina marina mas popular encontrando una gran variedad en el reino phyla.



**Luciferina de las luciérnagas:** en estas es utilizado un sistema luciferina luciferaza que requiere ATP como un cofactor y puede ser usado como un bioindicador de la presencia de energía o vida



## QUIMICA DE LOS SISTEMAS BIOLUMINISCENTES

	<p align="center"><b>Bacterias</b></p> <hr/> <p align="center">Luciferina + Luciferaza</p>	<p>Bacterias Algunos peces Algunos calamares</p>
	<p align="center"><b>Dinoflagelados</b></p> <hr/> <p align="center">Luciferina + Luciferaza</p>	<p>Dinoflagelados Camarón Euphausiid</p>
	<p align="center"><b>Vargula</b></p> <hr/> <p align="center">Luciferina + Luciferaza</p>	<p>Otras Algunos peces</p>
	<p align="center"><b>Coelenterazina</b></p> <hr/> <p align="center">Luciferina + Luciferaza</p>	<p>Radiolariosos Ctenóforos <b>Cniradianos</b> Calamares Copepods Camarón Decapods Camarón Mysid Algunos Peces Chaetognaths</p>
	<p align="center"><b>Luciérnaga</b></p> <hr/> <p align="center">Luciferina + Luciferaza</p>	<p>Luciérnagas</p>
	<p align="center"><b>Otros Mecanismos Desconocidos</b></p> <hr/> <p align="center">?+?</p>	<p>Antifodos Gusanos Nemertean Gusanos Polychaete Bivalvos Larvaceans Tunicates Limperts de agua fresca Gusanos de tierra Hongos</p>
<p align="center"><b>Grupos Marinos con miembros Luminosos desconocidos</b></p>	<p>Esponjas Diatoms Foraminiferans Heteropodos Pterópodos</p>	

## PROPIEDADES FÍSICAS

**Espectro:** En el mar, la luz bioluminiscente es concentrada en la ventana azul debido a la gran transparencia óptica del agua. Muchos organismos emiten entre 440nm y 479nm. Algunos cnidarios tienen proteínas verdes fluorescentes que absorben una emisión inicialmente azul y la emite pasando hacia verde (505nm). Un notable pez tiene un mecanismo similar para pasar la emisión inicial en el rojo para ver a su presa, esto lo hace cerca del infrarrojo con sus ojos rojos sensibles. La medición in situ a varios metros de profundidad confirma la emisión agrupada en la región del espectro que va de azul al verde.

**Intensidad:** La luminiscencia del único dinoflagelado es rápidamente visible al oscuro adaptado por el ojo humano como una demostración. La mayoría de los dinoflagelados emiten cerca de 6 a 8 fotones en un destello que dura acerca de 0.1 segundos. Muchos organismos grandes como las medusas emiten cerca de 2 a 11 fotones por segundo y algunas veces décimas de segundos. La intensidad de la luminiscencia por dinoflagelados fotosintéticos es fuertemente influenciada por la intensidad de la luz del sol de un día previo.

**Cinética:** Algunos organismos emiten la luz continuamente, pero muchos emiten destellos con rangos de duración cerca de 0.1 segundos a 10 segundos. Algunos dinoflagelados pueden responder respectivamente a la excitación en un periodo corto. En muchas especies multicelulares la luminiscencia es controlada por los nervios. De esta manera en algunos peces el sistema nervioso simpático controla la luminiscencia mediante un neurotransmisor que es la noradrenalina. En las luciérnagas el transmisor es un glutamato (Del ácido glutámico que es un aminoácido ácido o con carga negativa). En algunos invertebrados marinos las transmisiones son desconocidas.

Los organismos unicelulares como los dinoflagelados o radiolarios, la luminiscencia es provocada por la deformación de la superficie celular por fuerza por minuto (1 dina por  $\text{cm}^2$ ). La deformación mecánica recorre la membrana de la vacuola, lo que nos lleva a pensar que es así como se induce a la emisión de luz ya que emite protones de la vacuola ácida que entran en contacto con los elementos celulares que contienen la química de emisión de luz.

En algunas instancias en animales marinos invertebrados utilizan los ojos u otros receptores de luz, la emisión de luz puede ser inducida por la excitación fótica aun por organismos luminiscentes llamada luminiscencia empática, lo cual este fenómeno todavía no ha sido demostrado, aunque tiene una potencia relevancia en la generación de luminiscencia por un movimiento de la fuente por fotones transferidos de organismos luminiscentes producido el movimiento mecánicamente.

En la tierra es mas común observar hongos en los árboles resplandeciendo o en pocas familias de insectos luminiscentes como ya se había mencionado anteriormente a las luciérnagas.

La bioluminiscencia ha envuelto algunas veces al mar como evidencia de distintos y varios mecanismos químicos por la cual se produce la luminiscencia y un gran número de grupos que guardan relación taxonómica que contienen miembros bioluminiscentes.

### **LA UTILIDAD DE LA BIOLUMINISCENCIA**

Los seres vivos utilizan la capacidad de producir luz para las siguientes funciones:

- De alimentación o caza, de reproducción y de defensa
- Para atraer a sus presas y obtener así su alimento
- Algunos peces y algunos insectos utilizan su capacidad bioluminiscente como señuelo, mientras otros la usan como linternas que iluminan a su víctima potencial y al deslumbrarla anulan sus defensas.
- Para escapar de los depredadores, la propia luz resulta de suma utilidad para ciertos peces, calamares y camarones al usarla como trampa para confundir al atacante en horas diurnas, camuflándose con el brillo solar y difuminado así su propia sombra.
- por último, en su función de comunicación sexual, el ejemplo más conocido es del de las luciérnagas, que intercambian y evitan la confusión entre las distintas especies, pues emiten sus luces en longitudes de onda y frecuencia diferentes según corresponda.

Los animales bioluminiscentes pueden serlo, debido a que poseen órganos especiales para ello (los fotoros), bien por que alojan en el interior de sus tejidos una bacteria bioluminiscente. Este último es el caso de algunos calamares y peces, como los de la familia anomalopidos, que poseen debajo de los ojos un órgano lleno de bacterias productoras de luz. En las luciérnagas, sin embargo, estos órganos especializados; los fotoros se encuentran situados en los tres últimos segmentos abdominales y, además llevan una especie de reflector formado por placas de cristales diminutos. La sofisticación llega al máximo en algunos organismos en los que los fotoros son auténticas lentes biológicas, mecanismos complejos que permiten enfocar la luz y encenderla o apagarla a voluntad.

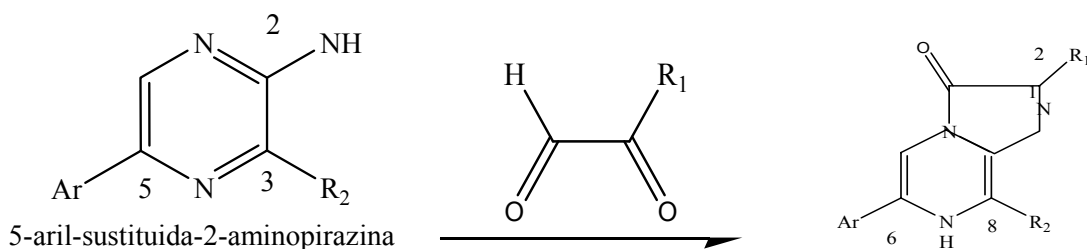
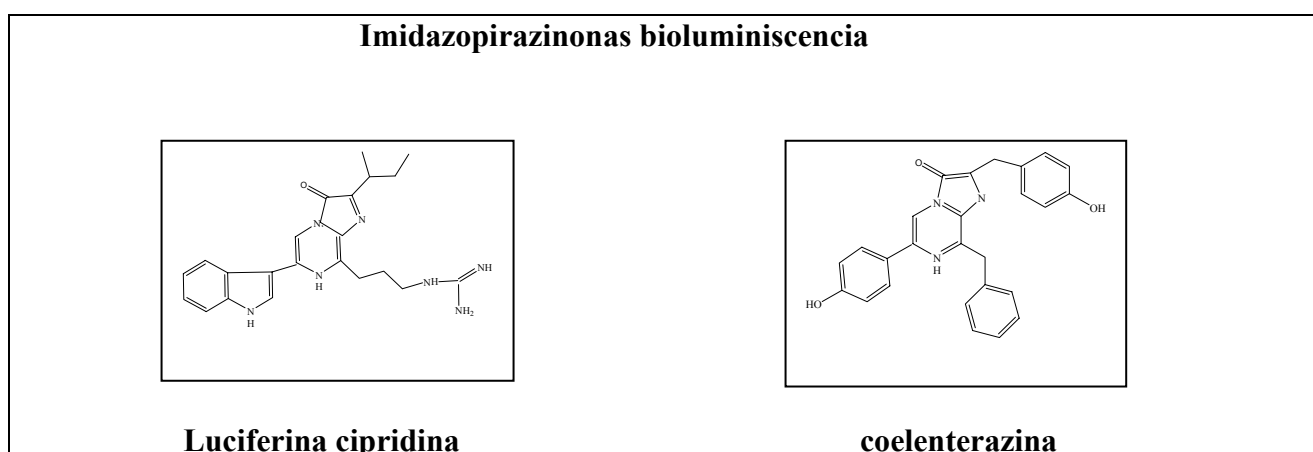
Como en muchas otras ocasiones el hombre se ha inspirado en fenómenos naturales para desarrollar tecnologías aplicadas a distintos aspectos de la vida. En el caso de la bioluminiscencia se ha utilizado para lo siguiente:

- Se han desarrollado mecanismos para medir y controlar las concentraciones de ATP en medios biológicos.
- Observando la cantidad de luz emitida por bacterias luminiscentes es posible determinar el grado de contaminación de las aguas, ya que la propia contaminación destruye a esas bacterias. A partir de ahí, se puede calcular también el peligro de los contaminantes para otros seres vivos que habiten en dichas aguas.

- En el campo de la medicina también se ha desarrollado ensayos con marcadores bioluminiscentes para detectar infecciones, drogas virus, etc. en lugar de los marcadores radioactivos que se venían utilizando hasta ahora, mucho menos inofensivos
- Igualmente se han desarrollado ya los instrumentos necesarios para detectar cualquier reacción química que genera luminiscencia, como un nuevo sistema de detección para capturar una reacción quimioluminiscente con una película.

## SINTESIS DE UN COMPUESTO BASE PARA LA OBTENCION DE COMPUESTOS QUIMIOLUMINISCENTES Y/O BIOLUMINISCENTES

### INTRODUCCION



La 3, 6, 8-imidazopirazina trisustituida-2-ondas están ampliamente distribuidas en organismos marinos y en algunos casos son usados como sustancias bioluminiscentes como el jellyfish *Aequorea* y crustáceos *cypridina* (*vargula*) *hirgendorffii*. Estos compuestos también son quimioluminiscentes y se utilizan para detectar químicos como el calcio o especies de oxígeno activo como el superóxido.

Ideéis Nakamura, Daisuke Takeuchi, Mihoko Aizawa, Chun Wu y Akio Murai de la división de química, escuela de graduados en ciencias de la universidad de Hokkaido, Sapporo 060 Japón han estado investigando la síntesis convergente en orden para preparar imidazopirazinonas con diferentes propiedades luminiscentes como los colores de la luminiscencia.

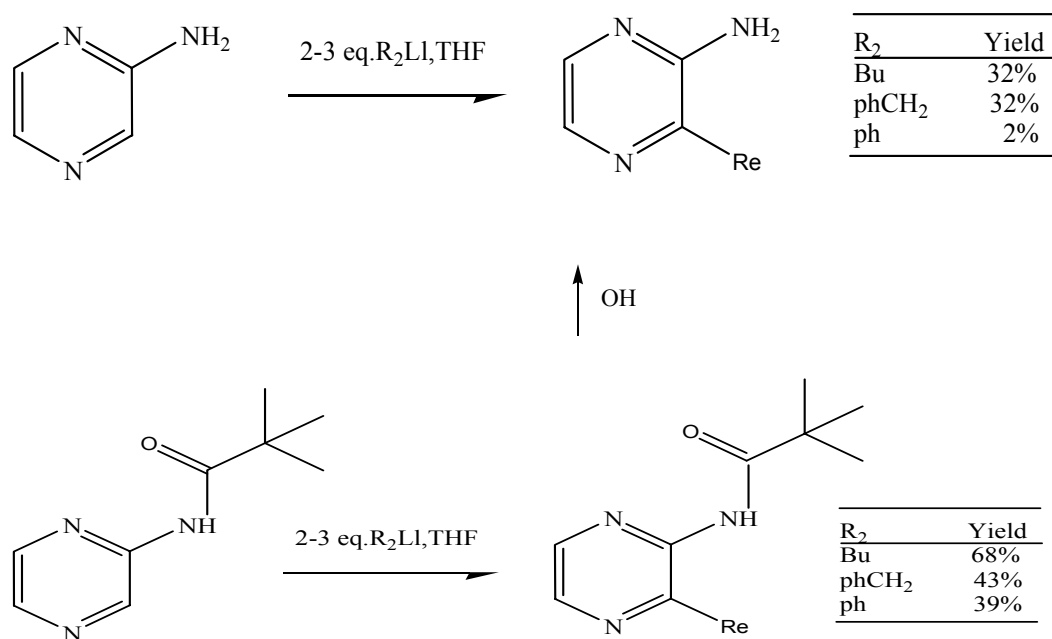
Desde el 5-aryl-3-sustituido-2-aminopirazinas ha sido utilizado para preparar imidazopirazinonas chimi y/o bioluminiscentes, por lo que se ha desarrollado un nuevo enfoque para sintetizar 3,5 disustituido-2-aminopirazina teniendo cromóforos conjugados de 2-aminopirazina comercialmente disponible por varios pasos incluyendo el paladio mediante un acoplamiento como reacción clave.

## Resultados y discusión

### 1. síntesis de 3,5 disustituida 2-aminopirazina de 2-aminopirazina

#### 1) alquilacion de 2-aminopirazina con organolitio

Alquilacion de aminopirazina con alquil litio

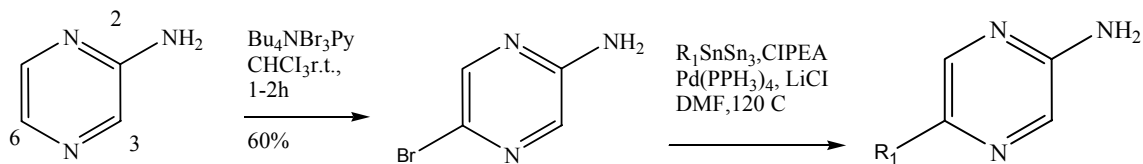


La alquilacion selectiva en la posición 3 de 2-amino o 2-acilaminopirazina fue llevada a cabo con organolitio en THF (tetrahydrofurano) a -20 C. Aditivos como TMEDA, CuI y BF<sub>3</sub>-ET<sub>2</sub>O, una sobreoxidación y el intercambio de metales como MgBr o Cu no dio mejoría.



## 2) Arilación de 3-bromo y 3,5-di bromo-2-aminopirazina

Arilación en la posición 5 de 2-aminopirazina



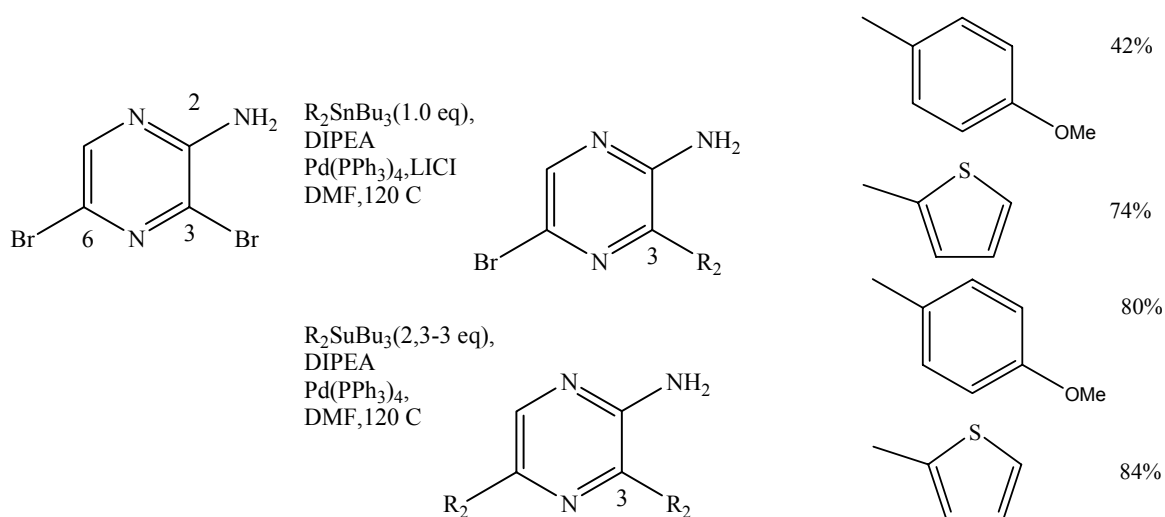
$\text{R}_1$	yield
	63%
	86%
	86%

N.Sato, J.Heterocyclic Chem. 19, 673, (1972).

H. Nakamura, D. Takeuchi, A. Murai, Synlett, 1955, 1227.

La monobrominación de 2-aminopirazina fue llevada a cabo por modificación del método reportado por Sato. El 3-bromo-2-aminopyrazina reacciona con varios alquil, alil y arilstananos para formar 3-sustituida2-aminopirazina.

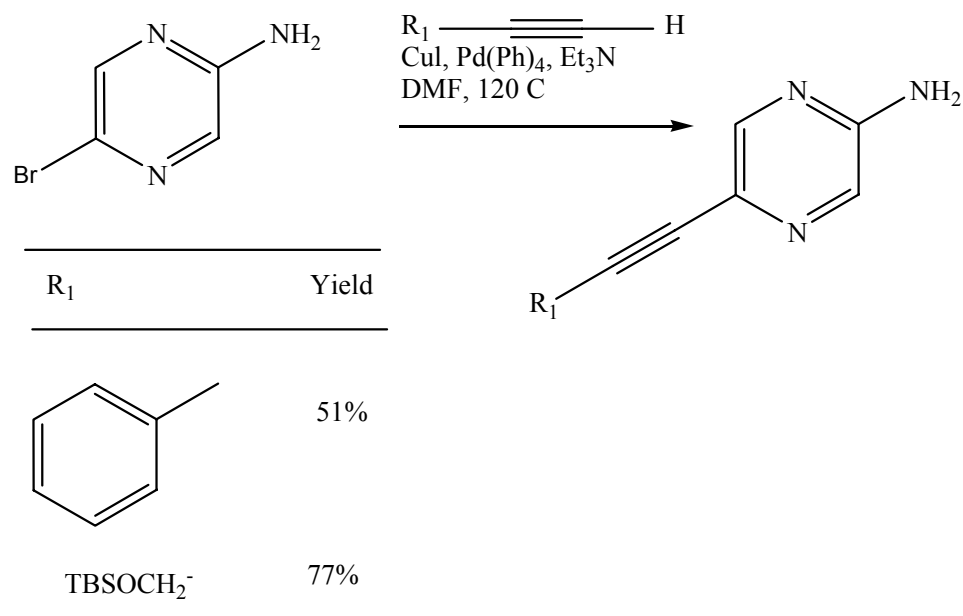
### Arilación de 3,5-di bromo-2-aminopirazina



El 3,5 dibromo-2-aminopyridina preparado por el método de Sato dio derivado de 3-aril o 3, 5 diaril dependiendo de la cantidad de arilstananos. La reactividad mas grande de la posición 3 puede ser explicado por el efecto de quelacion de un grupo amino en la posición 2

### 3) Alquilacion de 3-bromo y 3,5-dibromo-2-aminopirazina

Alquilacion en la posición 5 de 2-aminopirazina

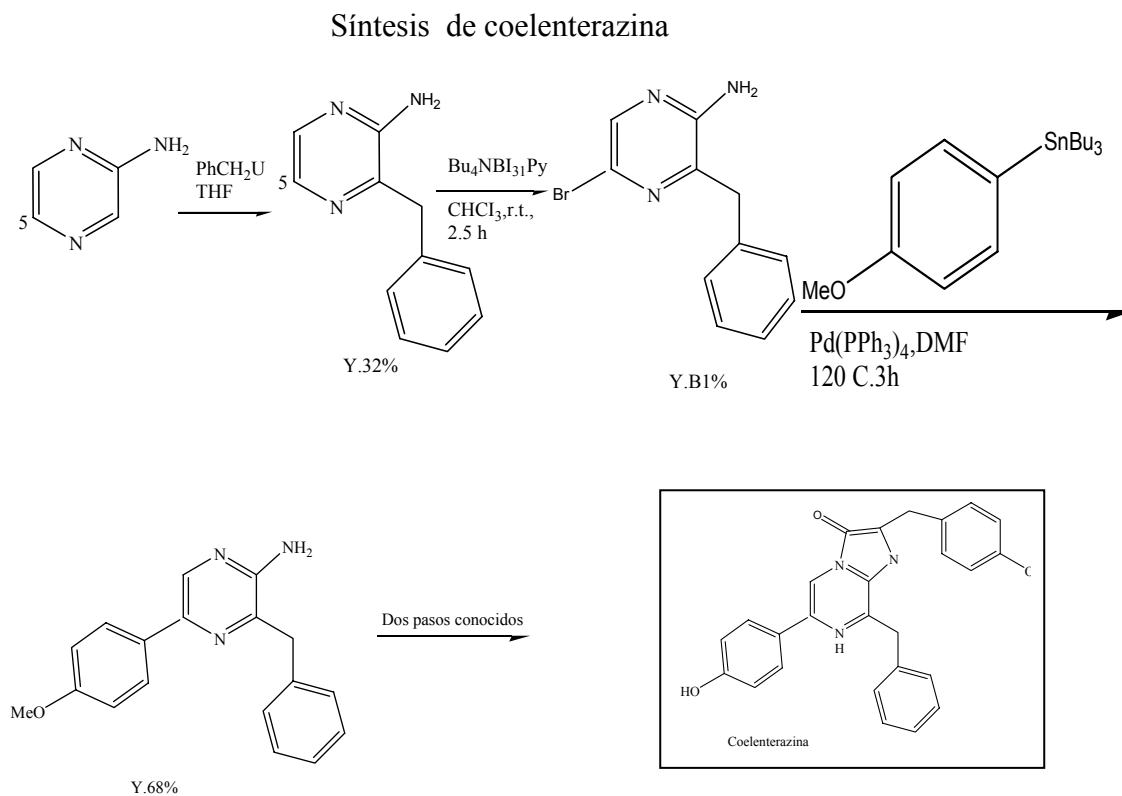


El 5-bromo-2-aminopirazina reacciona con varios tipos de alquinos en presencia de  $CuI$  para formar 5-sustituída 2-aminopirazina la cual pudiera ser convertida en un alquilo con sustituyentes funcionarizados.

3,5 -dibromo-2-aminopirazina produjo derivados de alk-3-inil o dialk-3,5-inil, bajo las condiciones usando 1 equiv. y 2-3 equivs de arilstananos, respectivamente.

## II. Síntesis de imidazopirazinonas quimi y/o bioluminiscentes

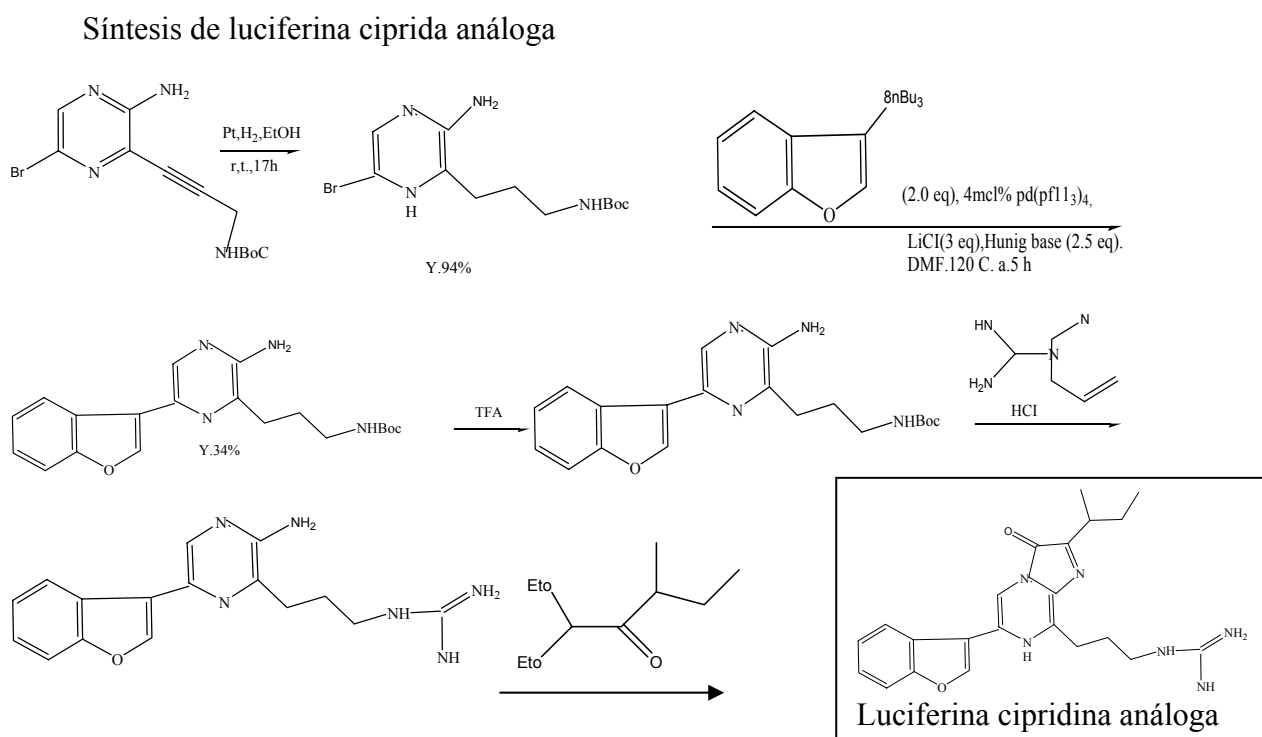
### 1) síntesis de coelenterazina



“Y.Kishi, H. Tanino, and T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 2747-2751(1972).  
S.inoue, S.sugiura, H.Kakoi, K. Hashizume, *Chem. Lett.* 141-144(1975).

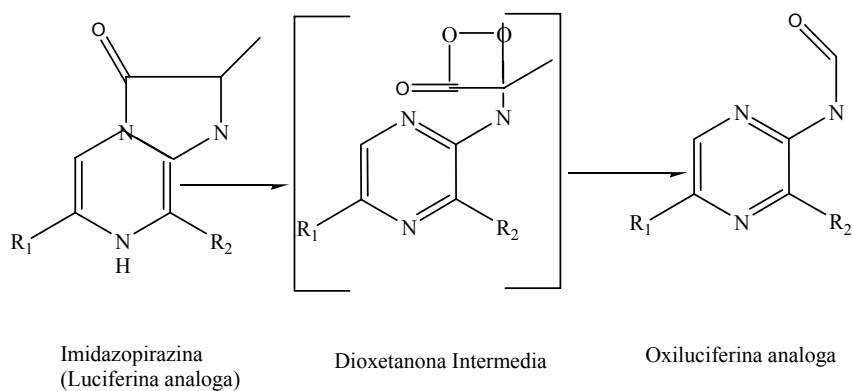
La introducción del bencil y grupos p-metoxifenil a los núcleos de la 2-aminopirazina fue llevada a cabo por alquilación directa y acoplamiento de stille, respectivamente para proporcionar el conocido precursor de la coelenterazina. La síntesis de coelenterazina puede estar completada por los siguientes dos conocidos pasos de dimetilación y formación de imidazolona. Aunque este método es acortado por solo uno o dos pasos con rendimiento moderado comparado con el procedimiento conocido, esto no permite introducir varios tipos de cromóforos aromáticos.

## 2) Síntesis de cipridina



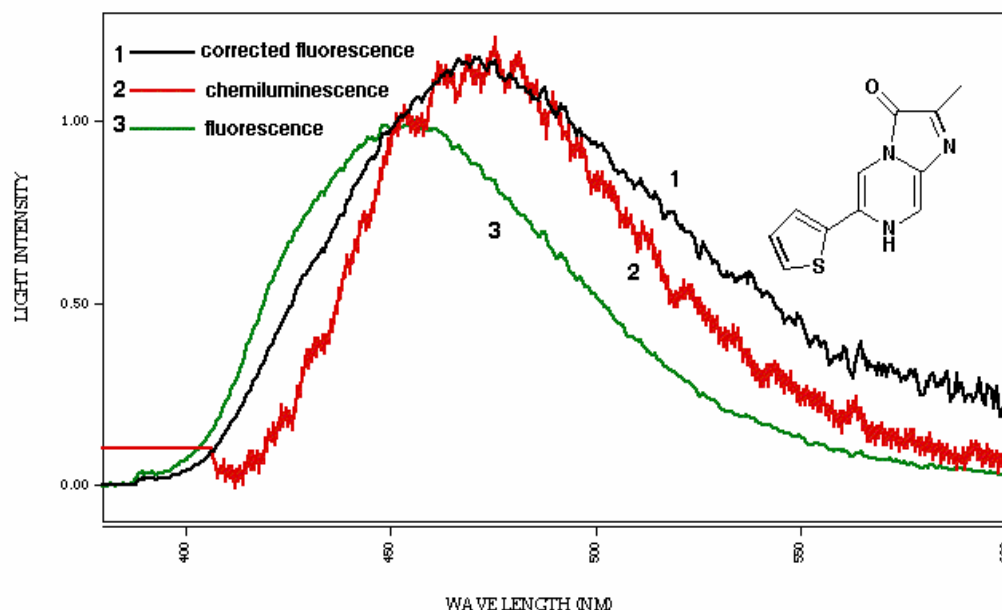
La luciferina ciprida análoga fue construida mediante ocho pasos desde la 2 aminopirazina. Las condiciones de acoplamiento de stille todavía no han sido optimizadas pero puede ser aplicado a otra índole como compuestos heteroaromaticos análogos. Los estudios sobre la relación estructura - actividad están aun en progreso.

## 3) Síntesis y quimioluminiscencia de las imidazopirazinonas

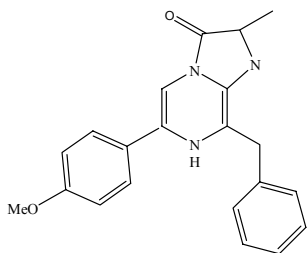


Las imidazopirazinonas son bien conocidas debido a que reaccionan con oxígeno molecular bajo ciertas condiciones tal cual solventes polares aproticos Con un catalizador de base o soluciones buffer. La producción de oxidación y amida correspondiente crea la dioxetanona intermediaria y resulta en emisión de luz de un estado excitado del anion de amida. Las imidazopirazinonas con diferentes sustituyentes en las posiciones 6y8 fueron preparados de la sintetizada de la 2-aminopirazina con metilglyoxal su examinada quimioluminiscencia

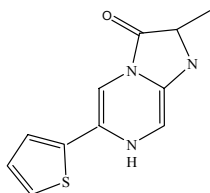
**Chemiluminescence spectrum of monothiénylimidazopyrazinone in DMSO-KOH and fluorescence spectrum of the reaction solution after chemiluminescence in DMSO-t-BuOK.**



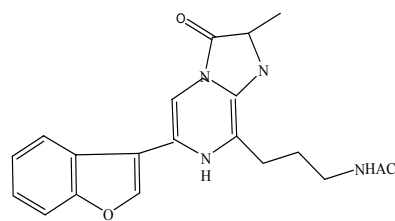
Todos los compuestos sintetizados dieron luminiscencia en Me<sub>2</sub>So y la mayoría de su espectro quimioluminiscente fue idéntico al espectro de fluorescencia de los aniones de amida. Por ejemplo, los derivados de monodienil dieron luminiscencia azul con un máximo de 475 nm en Me<sub>2</sub>SO en presencia de pH 5.6, buffer de acetato 0.1 M ó KOH 1M. El espectro quimioluminiscente fue sobrepuesto sobre el espectro de fluorescencia corregido de la solución reacción después de que la emisión fue puesta en funcionamiento por BuOK



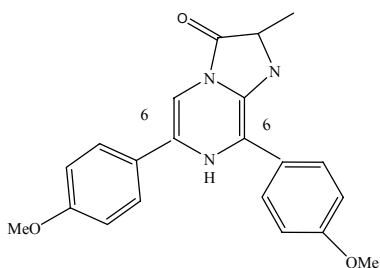
L.Y. 100  
C.L. 465nm  
**Azul**



L.Y. 26  
C.L. 475nm

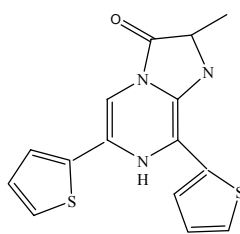


L.Y. 52  
F.L. 451nm



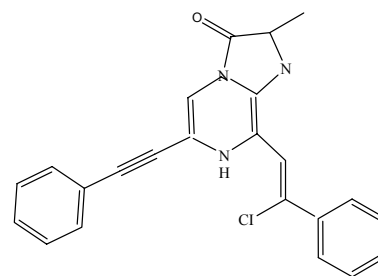
L.Y. 240  
C.L. 520nm  
**Amarillo**

**Verde**



L.Y: 67  
C.L. 545 nm

**Amarillo**



L.Y. 62  
F. L. 534nm

L.Y. 350  
C. L. 585nm

**Naranja**

L.Y.: Relative Light yield (producción relativa de luz)

C.L.: Chemiluminiscentes (quimioluminiscencia en

In DMSO-KOH DMSO-KOH)

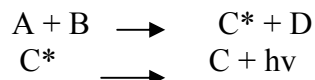
En buffer DMSO-Ac

La conjugación en la posición 6 de la imidapirazinona tuvo un pequeño efecto en el color de la luminiscencia, mientras que la conjugación en la posición 8 dio un cambio más grande en la luminiscencia. La coplanaridad del grupo dienil resulto un cambio más grande que p-MeOPh. El compuesto alquinil dio un color naranja en buffer de Me<sub>2</sub>SO-Ac (hasta aquí la longitud de onda mas larga) la cual no fue idéntica al espectro de fluorescencia bajo condiciones neutras o fuertemente básicas. La identificación en los productos de reacción y de las especies de emisión de luz está ahora en progreso.

## QUIMIOLUMINISCENCIA

La quimioluminiscencia se produce cuando una reacción química de una especie electrónicamente excitada, la cual emite radiación para volver al estado fundamental. Las reacciones de quimioluminiscencia se producen en algunos sistemas biológicos, en donde a menudo el proceso se denomina bioluminiscencia.

Se descubrió que ciertos compuestos orgánicos relativamente simples también era capaces de presentar quimioluminiscencia. La reacción mas sencilla de tales compuestos para producir quimioluminiscencia se puede formular como

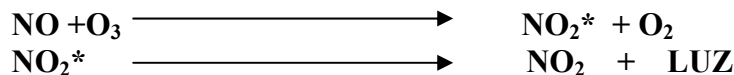


Donde  $C^*$  representa el estado de excitado de la especie  $C$ . Aquí, el espectro de luminiscencia es el del producto de reacción  $C$ .

La energía puede ser transferida dentro o fuera de la materia en diferentes formas como calor, luz o por reacciones químicas. Cuando la energía es liberada por la materia en forma de luz nos referimos a un fenómeno de luminiscencia. Hay una excepción que es usualmente hecha que es cuando la materia tiene temperatura elevada y se manifiesta por haz brillante esto es conocido como incandescencia.

Cuando la energía es liberada de la materia en forma de luz debido a una reacción química el proceso es llamado quimioluminiscencia. Un ejemplo común de reacción quimioluminiscente es una llama, donde la reacción entre un combustible y un oxidante produce un estado excitado de los productos que emiten luz: sin embargo, como ejemplo de quimioluminiscencia este es un proceso complicado por el hecho de que las partículas incandescentes están frecuentemente presentes también por que cierta cantidad de calor es liberada por la reacción por lo tanto, alguna o muchas emisiones incandescentes muy calientes. Un mejor ejemplo de reacción quimioluminiscentes es entre el monóxido de nitrógeno ( $\text{NO}$ ) y ozono ( $\text{O}_3$ ). Esta reacción es rutinariamente utilizada para determinar cualquier ozono (usando exceso de  $\text{NO}$ ) o  $\text{NO}$  (usando exceso de ozono  $\text{O}_3$ ).

La reacción se muestra en la siguiente ecuación:





El monóxido de nitrógeno reacciona con el ozono para producir dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) en un estado excitación (denotado por un asterisco).pequeña parte de l exceso de energía envuelta en este proceso es liberada como calor: por lo tanto, la mezcla de reacción y los productos no presentan incandescencia en algún grado significativo. La reacción produce un estado excitado de  $\text{NO}_2^*$  el cual regresa a un estado de energía mas bajo (en parte) liberando fotones de luz: la quimioluminiscencia. Esta radiación electromagnética tiene un rango de longitud de onda: sin embargo, la emisión es centrada alrededor de 1200 nanometros (nm).

La palabra condicional en parte esta incluida en el ultimo párrafo porque hay actualmente dos formas de estado excitado  $\text{NO}_2^*$  y de-excitado. Una vía es la emisión de foton (quimioluminiscencia); otra es perdiendo energía a través de colisiones con otras partículas. Este proceso de colisiones es muy significativo por la cantidad de partículas disponibles para el incremento de colisiones. En la fase de gas, la presión más alta significa la colisión de velocidad más alta. Esta es por que muchas reacciones de quimioluminiscencia en fase de gas se ejecutan a bajas presiones: este incremento de la cantidad de energía liberada vía emisión de foton va decreciendo la cantidad de desactivación de colisiones.

### **MEDIDA DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA**

La instrumentación para la medida de la quimioluminiscencia es muy simple y puede componerse de solo un recipiente de reacción adecuado y un tubo fotomultiplicador. Generalmente, no es necesario ningún dispositivo para seleccionar la longitud de onda, ya que la única fuente de radiación es la reacción química entre el analito y el reactivo.

La señal típica de un experimento quimioluminiscente en función del tiempo alcanza rápidamente un máximo cuando la mezcla del analito y del reactivo es completa: a continuación tiene lugar un decrecimiento más o menos exponencial de la señal. Normalmente, la señal se integra para un periodo de tiempo fijo y se compara con estándares tratados de forma idéntica.

A menudo se obtiene dependencias lineales entre la señal y la concentración en un intervalo de concentraciones de varios órdenes de magnitud.

### **APLICACIONES ANALITICAS DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA**

La aplicación de la quimioluminiscencia a la química analítica es el desarrollo reciente. Las reacciones que producen quimioluminiscencia son pocas, lo que limita el procedimiento a un número relativamente pequeño de especies. Sin embargo, algunos compuestos que reaccionan dando quimioluminiscencia son componentes importantes del medio ambiente. Así, la alta selectiva, la simplicidad y la extrema sensibilidad del método explican su reciente utilización.

Los métodos quimioluminiscentes tienen generalmente una elevada sensibilidad, ya que en ausencia de ruido se leen niveles bajos de radiación. Además, se evita la atenuación de la radiación mediante un filtro o un monocromador. De hecho, los límites de detección vienen determinados no tanto por la sensibilidad del detector, sino por la pureza de los reactivos.

Los límites de detección típicos van de un nivel de partes por billón (o a veces menos) a partes por millón.

### **Análisis de gases**

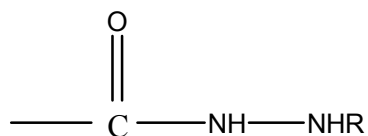
Los métodos quimioluminiscentes para la determinación de gases se originaron por la necesidad de encontrar medios muy sensibles para determinación de contaminantes atmosféricos como el ozono, los óxidos de nitrógeno y los compuestos sulfurados. Los más ampliamente utilizados son los métodos para la determinación de monóxido de nitrógeno cuya reacción donde la radiación es seguida por un tubo fotomultiplicador. Se ha encontrado una respuesta lineal para concentraciones de monóxido de nitrógeno desde 1ppd hasta 10 000 ppm. Este procedimiento es el más utilizado en el control de la concentración de este importante constituyente atmosférico desde bajos niveles de utilidad hasta alturas de 20km.

La reacción del monóxido de carbono con el ozono también se ha aplicado a la determinación de óxidos de nitrógeno superiores.

Otro importante método quimioluminiscente se utiliza para el control del ozono atmosférico. En este caso, la determinación se basa en que la luminiscencia producida cuando el analito reacciona con el colorante rodamina-B que está adsorbido en la superficie de sílica gel activada. Este procedimiento es sensible a concentraciones de ozono inferiores a 1ppb y la respuesta es lineal hasta 4000ppb de ozono. El ozono se puede también determinar en fase de gas basándose en la quimioluminiscencia producida cuando el analito reacciona con el etileno. Ambos reactivos se presentan como específicos para el ozono.

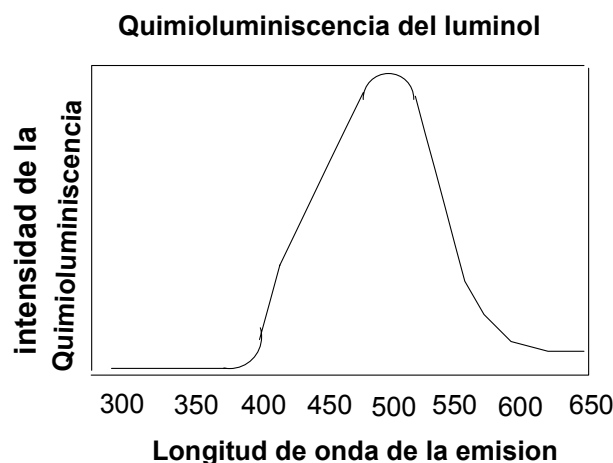
### **Análisis de especies inorgánicas en fase líquida**

Muchos de los análisis llevados a cabo en fase líquida sustancias quimioluminiscentes que contienen el grupo



Estos reactivos reaccionan con el oxígeno, con el peróxido de hidrógeno y con muchos otros agentes oxidantes dando lugar a un producto de oxidación quimioluminiscente. El luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazina) es el ejemplo más común de este tipo de compuestos. Arriba se muestra su reacción con el oxígeno. La emisión producida es igual a la del espectro fluorescente del producto, el anión 3-aminoftalato: la quimioluminiscencia es azul.

Algunos iones metálicos ejercen un profundo efecto sobre la intensidad de quimioluminiscencia cuando el luminol se mezcla con peróxido de hidrógeno y oxígeno en disoluciones alcalinas. En muchos casos, el efecto es catalítico, observándose una exaltación de la intensidad de los picos. Con unos pocos cationes, tiene lugar una inhibición de la luminiscencia. Las medidas de los aumentos y disminuciones de la luminosidad permiten la determinación de la concentración de estos iones a niveles de concentración inferiores a 1 ppm.



### **Análisis de especies orgánicas**

Un cierto número de especies orgánicas presentan un efecto catalítico o inhibitorio sobre la reacción del luminol con el peróxido de hidrógeno o el oxígeno, permitiendo su determinación. Entre estos compuestos están los aminoácidos, los gases nerviosos, ciertos tipos de insecticidas, naftoles y derivados bencénicos que contienen grupos  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_2$  y  $\text{OH}$ . Una aplicación importante de este efecto es la identificación de manchas de sangre; la hemoglobina tiene un fuerte efecto catalítico sobre la oxidación del luminol.

## QUIMIOLUMINISCENCIA DEL LUMINOL Y BIS(2,4, TRICLORFENIL)OXALATO (TCPO)

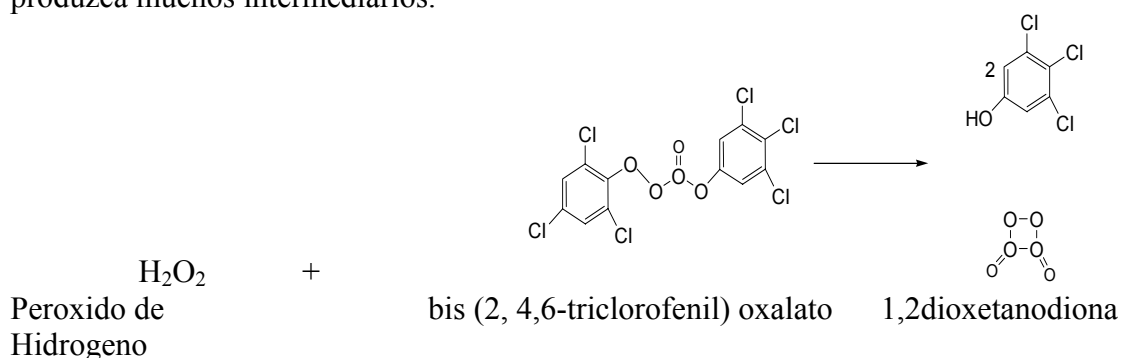
La quimioluminiscencia toma lugar entre las técnicas de espectroscopia por su inherente sensibilidad y selectividad. Esta requiere:

- Fuente de no excitación (como es el caso de la fluorescencia y la fosforescencia)
- solo un detector único de luz como un tubo fotomultiplicador
- un filtro sin monocromador y a menudo no parejo

Muchos de los métodos quimioluminiscentes solo envuelven pocos componentes químicos para generar luz. La quimioluminiscencia del luminol, el cual ha sido ampliamente investigado y la quimioluminiscencia del peroxioxalato, son usadas en métodos bioanalíticos. En cada sistema, el combustible es oxidado químicamente para producir un producto en estado excitado. En muchos métodos el luminol es el producto excitado que emite la señal de luz. En la quimioluminiscencia del peroxioxalato, el producto inicial en estado excitado no emite luz e instantáneamente reacciona con otro compuesto, frecuentemente un compuesto también es variable como colorante fluorescente, y es este fluoroforo el cual se encuentra excitado y emite luz.

### Quimioluminiscencia del peroxioxalato

Una de las secuencias de reacción sugestivas en la reacción del peroxioxalato, el cual el bis (2, 4, 6-triclorofenil) oxalato (TCPO) es el ejemplo más propiamente. Este envuelve un combustible (TCPO) más el oxidante ( $H_2O_2$ ) que reacciona para producir un intermediario, en este ejemplo se muestra como dioxietano; aunque, esta reacción produzca muchos intermediarios.



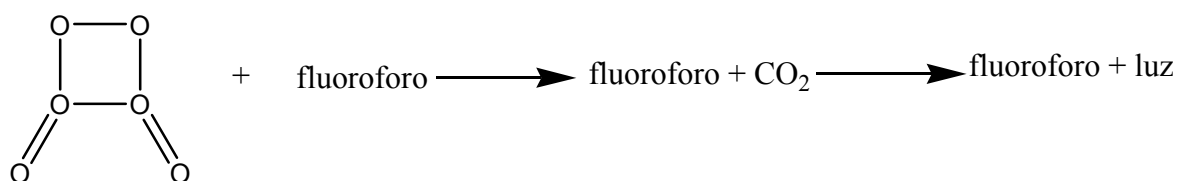
El proceso de transferencia en la reacción inicial, la reacción química del peróxido de hidrógeno con el TCPO, la emisión de luz del fluoroforo (fluoroforo\*) en estado excitado puede ser desviada a lo largo del camino por pérdidas en cada paso del proceso: la oxidación produce el intermediario, la reacción del intermediario con el fluoruro, y la reacción del fluoruro excitado para producir luz.

La oxidación inicial puede producir el intermediario de alta energía o

- TCPO en cambio puede ser hidrolizado o
- La oxidación puede ocurrir y no se presentan los productos quimioluminiscentes.

El intermediario de alta energía puede reaccionar excitando el fluoroforo o

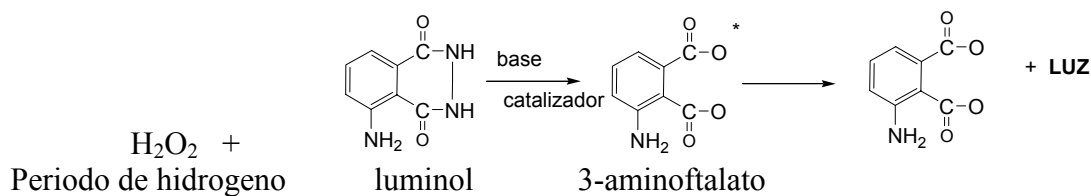
- El intermediario puede reaccionar excitado el fluoroforo o el fluoroforo.
- El intermediario y el fluoroforo pueden reaccionar sin la producción del fluoroforo excitado
- El intermediario puede descomponerse o ser rápidamente oxidado por residuos de  $H_2O_2$



Finalmente el fluoroforo excitado puede desprender energía por emisión de luz o puede ser de-excitado por la producción de calor en cambio a la de luz.

## QUIMIOLUMINISCENCIA DEL LUMINOL

El luminol también es muy usado como agente quimioluminiscente, pero nada parecido al peroxioxalato ya que los sistemas no requieren de mezclas orgánicas del solventes. La emisión quimioluminiscente es una descendencia directa de la oxidación del luminol (o un isomero como isoluminol) por un oxidante en solución básica acuosa. Probablemente el oxidante mas usado es también el peróxido de hidrogeno similar a la quimioluminiscencia del peroxioxalato; sin embargo, otros oxidantes han sido utilizados como el perborato, permanganato, yodo e hipoclorito. Si el combustible es luminol, la especie emitida es 3-aminoftalato; sin embargo, los analitos derivados del luminol permiten la determinación de compuestos y la quimioluminiscencia no seria normal en este sistema y presumiblemente tenga escasos emisores diferentes



La presencia de un catalizador es principal par este método quimioluminiscente y una herramienta analítica. Algunos cationes metálicos catalizan la reacción del luminol, el peroxido de hidrogeno  $H_2O_2$  y OH en solución acuosa incrementa la emisión de luz o por lo menos incrementa la rapidez de la oxidación para producir la emisión y por lo tanto la intensidad de producción de luz. Algunos metales, sin embargo, reprimen la quimioluminiscencia en diferentes concentraciones, este por lo tanto puede ser el fundamento de diferentes determinaciones, este por significantes. por ejemplo, este sistema puede ser usado:

Para determinar luminol ya que se presentan otras variables constantes

Para determinar derivados similares al luminol

Para determinar el peroxido de hidrogeno o el progreso de reacción que produce  $H_2O_2$ .

Para determinar las concentraciones de cationes metálicos.

o para determinar analitos que afecten la concentración de catalizadores o metálicos.

Este último es particularmente la principal característica de este sistema porque muchos componentes de cationes metálicos complejos son por si mismos conocidos. Los aminoácidos, la fructuosa y tagatosa, el glicerol, los tiotes, y la albúmina serica entre muchos otros has sido determinado usando la quimioluminiscencia del luminol.

## **FOTOLUMINISCENCIA**

Específicamente la fotoluminiscencia es cuando la luz es dirigida sobre una muestra, donde la luz es absorbida y se imparte el exceso de energía hacia el material en un proceso llamado “foto-excitación”. Una forma en que el exceso de energía pueda ser disipada por la muestra es a través de la emisión de luz, o fotoluminiscencia. La intensidad y el contenido espectral de esta fotoluminiscencia es una medida directa de varias propiedades importantes de los materiales.

La foto-excitación provoca que los electrones dentro del material se muevan hacia estados excitados permisibles. Cuando estos electrones regresan a su estado de equilibrio, el exceso de energía se libera y puede o no incluir la emisión de luz.

La energía de luz emitida o fotoluminiscencia.

La fluorescencia y la fosforescencia se parecen en que la excitación tiene lugar por absorción de fotones. En consecuencia, los dos fenómenos a menudo se conocen por el término más general de fotoluminiscencia.

## **TEORIA DE LA FLUORESCENCIA Y DE LA FOSFORESCENCIA**

La fluorescencia tiene lugar en sistemas químicos gaseosos, líquidos y sólidos tanto simples como complejos. El tipo más simple de fluorescencia es la que presenta los vapores atómicos diluidos. Por ejemplo, los electrones 3s de los átomos de sodio vaporizados pueden ser excitados al estado 3p por absorción de radiación de longitudes de onda de 5896 y 5890 Å. Después de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$ s, los electrones vuelven al estado fundamental al estado fundamental emitiendo radiaciones de estas dos mismas longitudes de onda en todas las direcciones. Este tipo de fluorescencia, en la cual la radiación absorbida es reemitida sin cambio de frecuencia, se conoce como radiación de resonancia o resonancia fluorescente.

Las especies moleculares también presentan a veces resonancia fluorescente; sin embargo, mucho más a menudo se encuentran bandas de fluorescencia molecular (fluorescencia) centradas a longitudes de onda más larga que la línea de resonancia. Este desplazamiento hacia longitudes de onda más largas se denomina desplazamiento Stokes.

### **Estado excitados que producen fluorescencia y fosforescencia**

La comprensión de la diferencia y las características de los dos fenómenos fotoluminiscentes requieren de saber lo que es el espín del electrón y de los dos estados de excitación singlete y triplete.

### **Espín del electrón**

El principio de exclusión de Pauli postula que un átomo no puede haber dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales. Esta restricción requiere que no haya más de dos electrones en un orbital; además los dos deben de tener los estados de espín opuestos. Cuando esto ocurre, se dice que los espines están apareados.

Debido al apareamiento de espines, la mayor de las moléculas no tiene un campo magnético neto y se dice por tanto que son diamagnéticas esto es, son repelidas por campos magnéticos permanentes. Por el contrario, los radicales libres, que contienen electrones desapareados, tienen un momento magnético y, consecuentemente, son atraídas en un magnético; los radicales libres se dice que son por lo tanto paramagnéticos.

### **Estados excitados singulete y triplete**

Un estado electrónico molecular en el cual todos los espines de los electrones están apareando se llama estado singulete y no tiene lugar un desdoblamiento del nivel de energía cuando la molécula se expone a un campo magnético. El estado fundamental para el radical libre, por otro lado, es un estado doblete, el electrón desapareado puede tomar dos orientaciones en un campo magnético, lo que comunica energía ligeramente diferente al sistema.

Cuando uno de los electrones de una molécula es excitado a un nivel de energía superior, da lugar a un estado singulete o un triplete. En el estado excitado singulete, el espín del electrón promocionado está todavía apareado con el electrón del estado fundamental; sin embargo, el estado triplete los espines de los dos electrones se han desapareado y están por lo tanto paralelos. Hay que señalar que el estado triplete es menos energético que el correspondiente estado excitado singulete. Las propiedades de una molécula en estado excitado triplete difieren significativamente de las del estado excitado singulete. Por ejemplo una molécula es paramagnética en el primero y diamagnética en el último. Una transición singulete/triplete (o viceversa), que también implica un cambio en el estado eléctrico, es menos probable que la correspondiente transición singulete/singulete. Como consecuencia el tiempo de vida media de un estado excitado triplete puede oscilar desde  $10^{-4}$  a varios segundos, mientras que el tiempo de vida media para un estado excitado singulete es de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  s. Además, la excitación inducida por radiación de una molécula en estado fundamental a un estado excitado triplete tiene pocas probabilidades de que tenga lugar. Sin embargo, en ciertas moléculas un estado excitado triplete puede ser ocupado desde un estado excitado singulete; la última consecuencia de este proceso es a menudo la fosforescencia.

### **VELOCIDADES DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN**

La velocidad a la que un fotón de radiación es adsorbido es enorme, el proceso requiere del orden de  $10^{-14}$  a  $10^{-15}$  s. La emisión fluorescente, por otro lado, tiene lugar a una velocidad relativamente más lenta. Aquí, el tiempo de vida del estado excitado está inversamente relacionado con la absorptividad molar del pico de absorción correspondiente al proceso de excitación. Por tanto, para absorptividades molares del orden de  $10^3$  a  $10^5$ , los tiempos de vida del estado excitado son de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  s. Para sistemas débilmente absorbentes, donde la probabilidad del proceso de transición es pequeña, los tiempos de vida pueden ser tan largos como  $10^{-6}$  o  $10^{-5}$  s. Como se ha señalado, la velocidad promedio de una transición triplete a singulete es menor que la correspondiente transición singulete a singulete. Así, las emisiones fosforescentes requieren tiempos del orden de  $10^{-4}$  a 10 s o más.



## VARIABLES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA Y A LA FOSFORESCENCIA

La estructura molecular y el entorno químico son factores que cuentan en si una sustancia es o no fluorescente o fosforescente; estos factores también determinan la intensidad de emisión cuando tiene lugar la fotoluminiscencia.

**Rendimiento cuántico, o la eficacia cuántica**, de la fluorescencia o de la fosforescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten luminiscencia respecto al número total de moléculas excitadas.

**Tipos de transición en fluorescencia.** Una molécula excitada electrónicamente normalmente vuelve a su estado excitado más bajo por una serie de relajaciones vibraciones rápidas y conversiones internas que no producen emisión de radiación. De esta manera, la fluorescencia proviene, generalmente, de una transición desde el primer estado electrónico excitado a uno de los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental. Así, para la mayoría de los compuestos fluorescentes, la radiación se produce por una transición  $n, \pi^*$  o  $\pi, \pi^*$ , dependiendo de cual de estos niveles es menos energético.

### Eficacia cuántica y tipo de transición

Empíricamente se observa que el comportamiento fluorescente lo presentan con más frecuencia compuestos en los que la transición de más baja energía es del tipo  $\pi, \pi^*$  y no aquellos compuestos que en la transición de menor energía es del tipo  $n, \pi^*$ ; esto es, la eficacia cuántica es mayor para transiciones  $\pi^* \leftarrow \pi$

La fluorescencia está más frecuentemente asociada con transiciones  $\pi, \pi^*$  ya que tales transiciones presentan tiempos de vida promedio más cortos y por que los procesos de desactivación que compiten con la fluorescencia tienen menos probabilidad de tener lugar.

### Fluorescencia y estructura química

En principio, algunas moléculas que absorben radiación ultravioleta presentan fluorescencia.

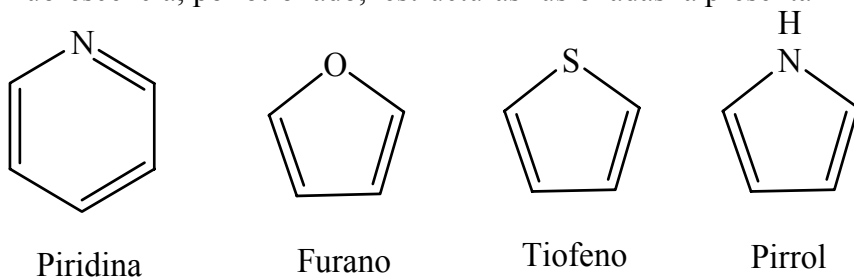
La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones  $\pi, \pi^*$  de baja energía.

Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia, pero el número de estos es pequeño comparado con el número de sistemas aromáticos. Grupos dadores de electrones como  $-\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$  y  $-\text{OCH}_3$  hacen que aumente la fluorescencia. Compuestos policíclicos como vitamina K, purinas y nucleosidos y polienos conjugados como la vitamina A presentan fluorescencia.

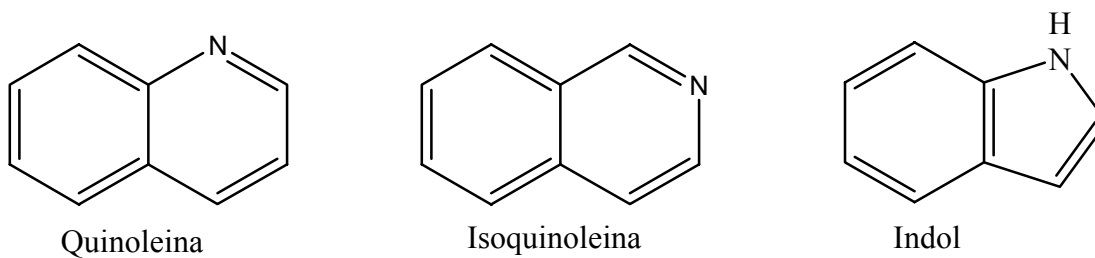
Grupos como-NO<sub>2</sub>, -COOH, -CH<sub>2</sub>COOH, Br, -I, y grupos azo tienden a inhibir la fluorescencia.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en solución, la eficacia cuantica normalmente aumenta con el número de anillos y con su grado de condensación.

Los heterociclos sencillos, como la piridina, el furano, el tiofeno y el pirrol, no presentan fluorescencia; por otro lado, estructuras fusionadas la presentan normalmente.



Con heterociclos con nitrógeno, la transición electrónica de mas baja energía se cree que implica un sistema  $n \rightarrow \pi^*$ , que rápidamente se transforma en estado triplete e impide la fluorescencia. La fusión de los anillos bencénicos dando núcleos heterocíclicos, sin embargo da lugar a un aumento en la absortividad molar del pico de absorción. El tiempo de vida de un estado excitado es mas corto en estas estructuras; así se observa fluorescencia en compuestos como la quinoleina, la isoquinoleina y el indol.



La sustitución afecta a la eficacia de la fluorescencia. La influencia de la sustitución de halógenos hace que disminuya la fluorescencia con el aumento del número atómico del halógeno que es debida en parte al efecto del átomo pesado, el cual aumenta la probabilidad para el cruzamiento entre sistemas hacia el estado triplete.

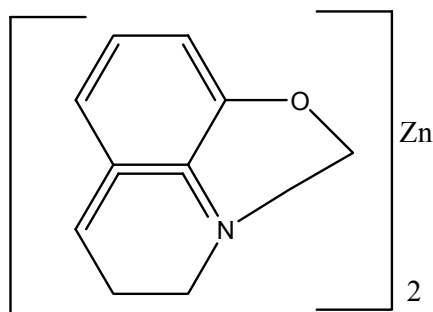
La sustitución de un ácido carboxílico o de un grupo carbonilo en un anillo aromático generalmente inhibe la fluorescencia. En estos compuestos, la energía de la transición  $n \rightarrow \pi^*$  es menor que la de la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

### Efecto de la rigidez estructural

La fluorescencia esta particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas.

Además, frecuentemente hay un aumento de la emisión cuando los colorantes que son fluorescentes se absorben sobre superficies sólidas; aquí, de nuevo, la rigidez adicional proporcionada por la superficie del sólido se debe tener en cuenta en el efecto observado.

La fluorescencia d la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un Ion metálico, por ejemplo, la intensa fluorescencia de la 8-hidroxiquinoleina es mucho menor que la de su complejo con zinc:



La parte no rígida de una molécula puede experimentar vibraciones de baja frecuencia respecto a sus otras partes y tales movimientos producen indudablemente ciertas perdidas de energía.

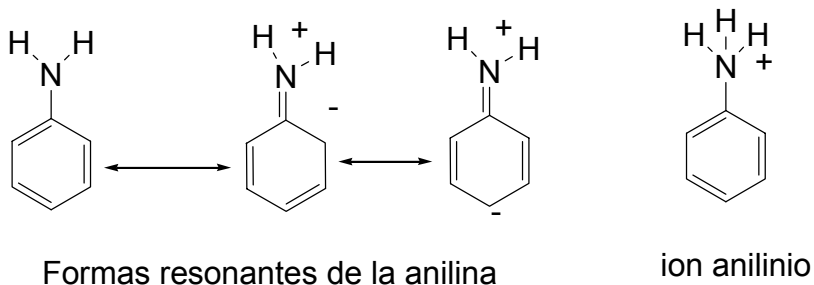
### Temperatura y efecto del disolvente

La fluorescencia de una molécula disminuye en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con tales átomos en su estructura; por ejemplo, el tetrabromuro de carbono y el yoduro de etilo. El efecto es similar al que tiene lugar cuando se introducen átomos pesados en compuestos fluorescentes; las interacciones orbital espin desembocan en un aumento en la velocidad de formación de triplete y una correspondiente disminución de la fluorescencia. Los compuestos que contienen átomos pesados se incorporan frecuentemente a los disolventes cuando se requiere exaltar la fosforescencia.

### Efecto del pH en la fluorescencia

La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo de pende del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto.

Los cambios en la emisión de los compuestos de este tipo proviene del numero de especies resonantes diferentes que están asociadas con las formas ácidas y básicas de las moléculas, por ejemplo, la anilina tiene diferentes formas resonantes mientras que el Ion anilinio solo una. Esto es,



Las formas de resonancia adicionales dan una mayor estabilidad al primer estado excitado y la consecuencia es una fluorescencia en la región del ultravioleta.

La fluorescencia de ciertos compuestos en función del pH ha sido utilizada para la detección de puntos finales en valoraciones ácido/base, queda claro que los procedimientos analíticos basados en la fluorescencia frecuentemente requieren un control estricto del pH.

Si un compuesto es no fluorescente, puede convertirse en derivado fluorescente por ejemplo, esteroides no fluorescentes puede ser convertido a un compuesto fluorescente por deshidratación con ácido sulfúrico concentrado. Estos alcoholes cíclicos son convertidos a fenoles. De manera similar, ácidos dibásicos, como el ácido málico, puede ser reactivado al hacerlo reaccionar con  $\beta$ -naftol en  $H_2SO_4$  concentrado para formar un derivado fluorescente.

### Efecto del oxígeno disuelto

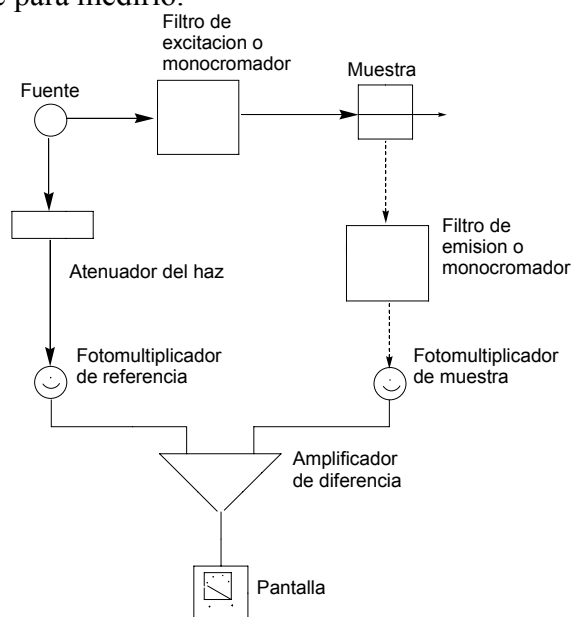
La presencia de oxígeno disuelto a menudo reduce la intensidad de fluorescente de una disolución. Este efecto puede ser el resultado de una oxidación inducida fotoquímicamente de las especies fluorescente.

### Espectros de emisión y de excitación

Los espectros de excitación se obtienen midiendo la intensidad luminiscente a una longitud de onda fija mientras se varía la longitud de onda de excitación. Los espectros fluorescentes y fosforescentes, por otro lado, implican excitación a una longitud de onda fija mientras se registra la intensidad de emisión como función de la longitud de onda. La fotoluminiscencia normalmente tiene lugar a longitudes de onda mas larga que la longitud de onda de excitación, además, las bandas fosforescentes se encuentran generalmente a longitudes de onda mas altas que las bandas d fluorescencia, ya que en la mayoría de los casos el estado excitado triplete tiene menor energía que el correspondiente estado singulete. De hecho, la diferencia de energía entre los estados excitados singulete y triplete.

## INSTRUCCIONES PARA LA MEDIDA DE LA FLUORESCENCIA Y LA FOSFORESCENCIA

Los diversos componentes de los instrumentos para la medida de la fotoluminiscencia son similares a los que se encuentran en los fotómetros o espectrofotómetros ultravioleta/visible, casi todos los instrumentos de fluorescencia utilizan ópticas de doble haz para compensar las fluctuaciones en la potencia de la fuente. El haz de la muestra primero pasa a través d un filtro o un monocromador de excitación, el cual transmite la radiación que luego provocara la fluorescencia pero excluye o limita la radiación emitida. La fluorescencia se propaga desde la muestra en todas direcciones pero la manera más conveniente de observarla es un ángulo recto respecto al haz de excitación; a otros ángulos, la dispersión por la solución y las paredes de las cubetas pueden causar grandes errores en la medida de la intensidad. La radiación emitida llega a un detector fotoeléctrico después de haber pasado por un segundo filtro o monocromador que aísla un pico fluorescente para medirlo.



El haz de referencia pasa a través de un atenuador que reduce su potencia aproximadamente la de la radiación fluorescente. Desde los tubos fotomultiplicadores de muestra y de referencia las señales son entonces conducidas a un amplificador de diferencia cuya salida se leen un contador o un registro.

Los fluorímetros son análogos a los fotómetros de absorción en los que se utilizan filtros para seleccionar las longitudes de onda de los haces de excitación y emisión.

Los espectrofluorímetros son de dos tipos. Los primeros utilizan un filtro para seleccionar la radiación de excitación y un monocromador de red de prisma para aislar un pico del espectro fluorescente. Los verdaderos espectrofluorímetros son instrumentos especializados equipados con dos monocromadores; uno de ellos permite variar la longitud de excitación y el otro permite la obtención de un espectro de emisión.

## APLICACIÓN DE LA FOTOLUMINISCENCIA

### **Determinación fluorimétrica de especies inorgánicas.**

Los métodos inorgánicos fluorimétricos son de dos tipos. Los métodos directos que implican la formación de un quelato fluorescente y la medida de su emisión y un segundo grupo que se basa en la disminución de la fluorescencia que resulta de la acción atenuadora de la sustancia que va a ser determinada. La última técnica ha sido mas ampliamente utilizada en la determinación de aniones.

### **Determinación fluorimétrica de especies orgánicas**

El numero de aplicaciones de análisis fluorimétrico a especies orgánicas y bioquímicas es muy amplio, por ejemplo, Weissler y White han recogido métodos para la determinación de mas de 200 sustancias , incluyendo una amplia variedad de compuestos orgánicos, enzimas, y coenzimas, agentes medicinales, productos naturales, esteroides y vitaminas. Las aplicaciones mas importantes de la fluorimetría están en el campo del análisis de productos alimentarios, farmacéuticos, muestras clínicas y productos naturales. La sensibilidad y la selectividad del método lo hace una herramienta particularmente valiosa en estos campos.

### **Métodos fosforimétricos**

La fosforimetría ha sido utilizada para la determinación de una gran variedad de especies orgánicas y bioquímicas que incluyen sustancias como ácidos nucleicos, aminoácidos, purina y pirimidina, enzimas, hidrocarburos del petróleo y pesticidas. Sin embargo, quizás debido a la necesidad de bajas temperaturas y a la generalmente pobre precisión de las medidas de fosforescencia, el método, se ha dedicado un esfuerzo considerable al desarrollo de métodos fosforimétricos que puedan llevarse a cabo a temperatura ambiente.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

### Prueba de soluciones de colorantes en diferentes solventes

Se enumeraron siete tubos de ensaye el cual uno tenia un colorante diferente, los colorantes utilizados fueron el azul de bromofenol, azul de bromotimol, azul de diamina, azul de evans, azul luxol, verde de bromocresol y violeta cristal, a los cuales se les añadió 1 ml de solvente, el que se utilizo primero fue el agua, después se probó la solubilidad con PVA (alcohol polivinílico), acetona, cloroformo y dimetilanilina. Además de ver si se disolvían, se observó los colores que tornaban con los diferentes solventes.

### Prueba de solubilidad

colores	SOLVENTES				
	Agua	PVA	Acetona	Cloroformo	Dimetilanilina
1-.azul de bromofenol	S	S	S	NS	PS
2-. azul de bromotimol	S	S	S	S	S
3-.azul de diamina	PS	PS	PS	PS	NS
4-.azul de evans	S	S	PS	PS	NS
5-.azul luxol	PS	PS	S	S	PS
6-.verde de bromocresol	S	S	S	PS	PS
7-.violeta cristal	S	S	S	S	PS

S = soluble PS = poco soluble Ns = no soluble

### Color que presentan al ser disueltos los colorantes en los solventes

colores	SOLVENTES				
	Agua	PVA	Acetona	Cloroformo	Dimetilanilina
1-.azul de bromofenol	Azul	Ambar	Amarillo	Azul	Azul
2-. azul de bromotimol	Verde	Naranja	Amarillo	Amarillo	Amarillo
3-.azul de diamina	Violeta	Azul	Azul	Azul	Azul
4-.azul de evans	Azul	Azul oscuro	Azul	Azul	Azul
5-.azul luxol	Azul	Azul	Azul Electrico	Azul oscuro	Azul
6-.verde de bromocresol	Azul oscuro	Azul Verde	Amarillo	Verde	Verde
7-.violeta cristal	Violeta	Violeta	Violeta	Violeta	Violeta

## CONCLUSION

De acuerdo con el trabajo realizado de la recopilación bibliográfica sobre luminiscencia, tenemos nociones de cómo se lleva a cabo los diferentes procesos luminiscentes desde su naturaleza hasta su posible síntesis como es el caso de la bioluminiscencia y la quimioluminiscencia, y de cómo se lleva a cabo la fotoluminiscencia, y las importaciones aplicaciones de estos tres fenómenos luminiscentes.

En cuanto a fotoluminiscencia ya podemos tomar en cuenta los diferentes factores que la afectan, para poder realizarla en el laboratorio de forma adecuada y correcta, como por ejemplo, ahora ya es más fácil encontrar los colorantes o fluorocromos a emplear así como el disolvente, temperatura, pH, óptimos entre otros, esto para conseguir un sistema fotoluminiscente adecuado.

Estos tres procesos luminiscentes, como ya se ha mencionado en cada uno de sus apartados tienen aplicaciones importantes para el análisis de especies orgánicas e inorgánicas entre muchas otras mas, he aquí de la importancia de la realización de este trabajo ya que con esto podríamos llevarlo a cabo en el laboratorio ya sean con productos naturales y/o biológicos como es el caso de la bioluminiscencia y la fotoluminiscencia, ya que las reacciones que se producen en la quimioluminiscencia son muy pocas, lo que limita el procedimiento sin embargo tampoco se descarta los reactivos para poder llevarlas a cabo en el laboratorio.

Por lo tanto se seguirá investigando más cerca de estos temas para que se realicen de una manera mas simple y sencilla en el laboratorio.



## **BIBLIOGRAFIA**

<http://www.cubasolar.com/biblioteca/energia/Energia14/HTML/articulo07.htm>

<http://www.cienciadigital.net/febrero2002/bioluminiscencia.html>

<http://www.lifesci.ucsb.edu/~biolum/>

<http://www.ch.ic.ac.uk/ectoc/echet96/papers/055/055.html>

[http://unx1.shsu.edu~chm\\_tgc/chemilumdir/chemiluminiscence2.html](http://unx1.shsu.edu~chm_tgc/chemilumdir/chemiluminiscence2.html)

Skoog Douglas, análisis instrumental, Editorial Mc Graw Hill, 4<sup>a</sup> edición 1994.

Gary D. Christian, Analytical Chemistry, Editorial John Wiley and sons, inc., 5<sup>a</sup> edición 1994.