

Trabajo de Fin de Grado
Facultad de Ciencias

Diseño Computacional de Derivados de Luciferina con Propiedades Fotofísicas Mejoradas



Universidad Autónoma
de Madrid

Mario Rodríguez Sánchez

Índice

Resumen	
1. Introducción y antecedentes	4
2. Objetivos e hipótesis	7
3. Metodología	8
4. Resultados y discusión	10
4.1 Métodos de cálculo	10
4.2 Variaciones del benceno	11
4.3 D-luciferina	17
4.3.1 Derivados de la luciferina	20
4.4 Coelenterazina	24
5. Conclusiones	26
Bibliografía	28

Resumen

En este trabajo se realizará un análisis de las moléculas D-luciferina y coelenteracina, todas ellas con implicación en fenómenos de bioluminiscencia, con objeto de modificar su estructura química y propiedades tales como la energía, de cara a su posible aplicación en técnicas de bioimagen. Para ello, se diseñaron las correspondientes moléculas con GaussView y se optimizó la geometría de equilibrio del estado electrónico fundamental y del estado electrónico excitado a partir de métodos de aproximación basados en el DFT, empleando el funcional B3LYP y la base 6-311G, utilizando para ello el programa para cálculos de química cuántica Gaussian19. Para complementar y facilitar la comprensión de los resultados a analizar, se diseñaron y optimizaron moléculas sencillas tales como el benceno, la anilina y el trifluorotolueno, con lo que se concluyó que la sustitución de un grupo amino en una molécula genera una menor energía del estado electrónico excitado y por ende un incremento de su longitud de onda, resultando de un mayor interés en técnicas de bioimagen al presentar una mayor capacidad de penetración en las células vivas. A su vez, se procedió a modificar la molécula D-luciferina, dando lugar a sus derivados amino 5- aminoxiluciferina (5-amox), 6- aminoxiluciferina (6-amox), 7-aminoxiluciferina (7-amox) y 8- aminoxiluciferina (8-amox). Se aplicó la misma metodología para la coelenteracina.

Los resultados obtenidos muestran que el derivado 8-aminoxiluciferina presenta la energía más baja en comparación con la molécula inicial y con el resto de los derivados, por lo que se corresponde con la especie química de mayor interés. Para el caso de la coelenteracina, no se lograron obtener resultados coherentes en lo que respecta a la optimización del estado electrónico excitado, por lo que se concluye que la metodología, basada en el método de aproximación utilizando el DFT, no es la más adecuada para esta molécula, resultando en la necesidad de ampliar la investigación en lo que respecta a los métodos de relación entre la función de onda y la energía.

Palabras clave

Fluorescencia, bioluminiscencia, D-luciferina, absorción, emisión, DFT, B3LYP, coelenteracina, oxiluciferina.

1. Introducción y antecedentes

A lo largo del transcurso de la vida, la naturaleza ha logrado crear numerosos procesos fotoquímicos que en la actualidad son de vital importancia para multitud de aplicaciones tecnológicas. En este trabajo, vamos a centrarnos en la bioluminiscencia, el cual es un proceso de emisión de luz por un organismo como resultado de una reacción química, sin requerir una excitación previa de radiación electromagnética. Sus principales aplicaciones están integradas en el ámbito de la medicina, destacando su empleo en técnicas de bioimagen y detección de afecciones de alta gravedad para el cuerpo humano (Adams y Miller, 2014).

Se estima que existen aproximadamente 30 sistemas bioluminiscentes, de los cuales sólo 9 de ellos han sido estudiados en profundidad. Centrándonos en la distribución de la bioluminiscencia por taxones, se conocen unos 700 casos en procariotas y eucariotas, destacando el hecho de que la mayor parte de los organismos bioluminiscentes residen en el medio marino, donde se distribuyen entre bacterias, dinoflagelados, moluscos, crustáceos, peces óseos y tiburones. A su vez, cabe destacar la inmensa variedad de sistemas bioluminiscentes que todavía no han sido estudiados con mayor profundidad. Diversos estudios afirman que, por norma general, las luciferinas suelen conservarse con mayor frecuencia que las luciferasas, lo cual es un aspecto muy determinante a la hora de plantear investigaciones con respecto a estos sistemas. En algunos sistemas bioluminiscentes podemos encontrar unas luciferasas ciertamente curiosas, denominadas fotoproteínas, las cuales solo van a ser capaces de emitir luz en presencia de cofactores tales como Mg^{2+} o Ca^{2+} (M. Kaskova *et al.*, 2016).

La bioluminiscencia se origina debido a una interacción enzima-sustrato, luciferina-luciferasa, cuya estructura química puede observarse en la Figura 1. Esta interacción induce la oxidación de una molécula orgánica, en este caso la luciferina, generando una molécula de oxiluciferina en estado electrónico excitado, la cual producirá emisión de luz visible al relajarse a su estado fundamental, tal y cómo puede apreciarse en la Figura 2. Por lo general, la emisión de radiación luminiscente suele producirse a longitudes de onda entre 400-720 nm, es decir, entre el violeta y el infrarrojo (Kahlke y D.L. Umbers, 2016). La primera luciferina en ser descubierta fue la D-luciferina, y es sin duda la más popular dadas sus diversas funciones.

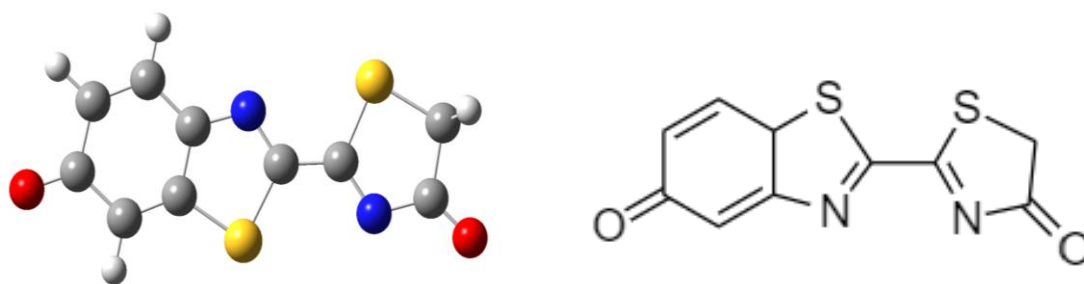


Figura 1. Estructura química de la luciferina mostrada con una representación de barras y bolas (izquierda) y esqueleto (derecha).

Este sistema bioluminiscente fue obtenido a partir de la luciérnaga *Photinus pyralis*, la cual emite radiación electromagnética de color amarillo-verdoso, alcanzando los 560 nm. En este caso, la luciferina sufre un proceso de reducción, catalizado por una enzima reductasa, hasta obtener el compuesto intermedio luciferilo adenilato, del cual el 80% es oxidado hasta formar oxiluciferina y emisión de luz. El 20% restante da lugar a peróxido de hidrógeno y deshidroluciferina. Esta reacción presenta aplicaciones importantes principalmente relacionadas con el análisis y determinación de la concentración de ATP (adenosín trifosfato). Esta concentración de ATP intracelular suele encontrarse en altos niveles, por lo que podemos determinar la presencia de muerte celular si observamos un decaimiento de la concentración de este. Por ejemplo, el ATP participa activamente en el desarrollo de tumores, e información relacionada con las concentraciones intracelulares de ADP (adenosín difosfato) y ATP, así como su ratio, son de gran importancia a la hora de estudiar el comportamiento metabólico del tumor. Además, es muy útil para el desarrollo de técnicas para determinar el metabolismo del cáncer y para analizar metabolitos involucrados en la comunicación y la señalización celular (M.Kaskova *et al.*, 2016).

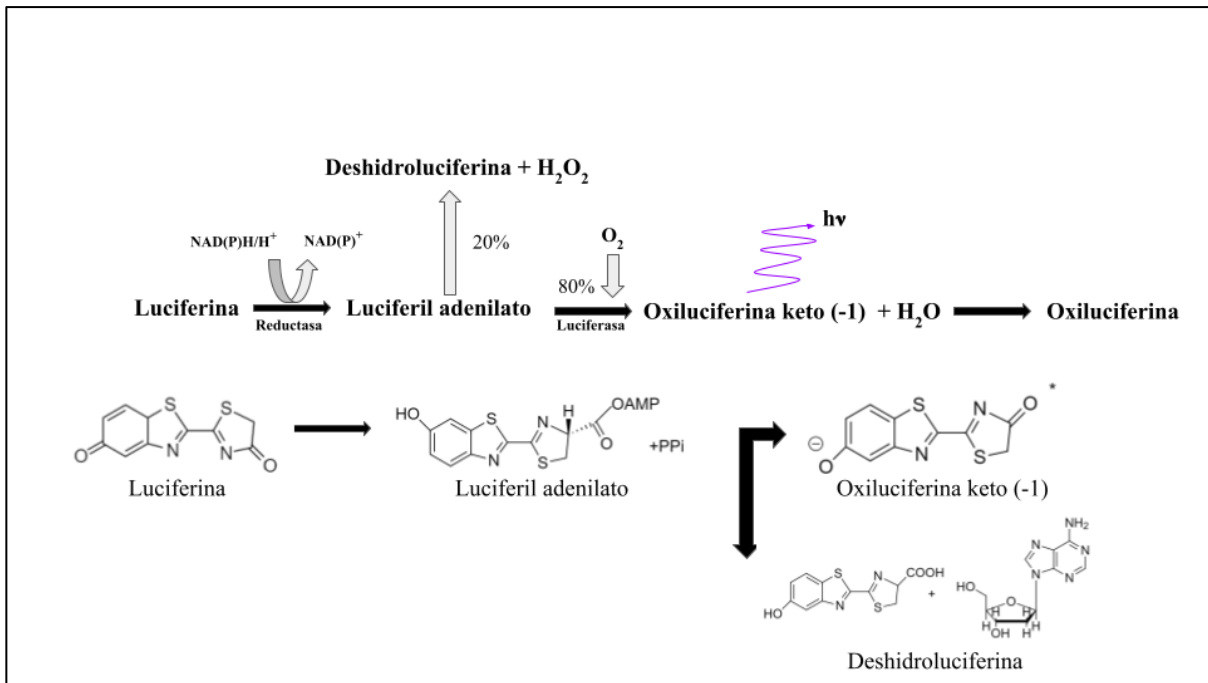


Figura 2. Proceso de emisión de luz a partir de la acción del complejo luciferina/luciferasa

La coelenteracina, por su parte, es un tripéptido modificado producido a partir de un residuo de fenilalanina y dos de tirosina, sin embargo, actualmente se desconocen los genes implicados en su biosíntesis. Todos los sistemas dependientes de la coelenteracina en la naturaleza emiten luz azul, con máximo de emisión en el rango de 450-500 nm, y sin requerir normalmente de otros cofactores, exceptuando el oxígeno (J.Syed y C.Anderson, 2021).

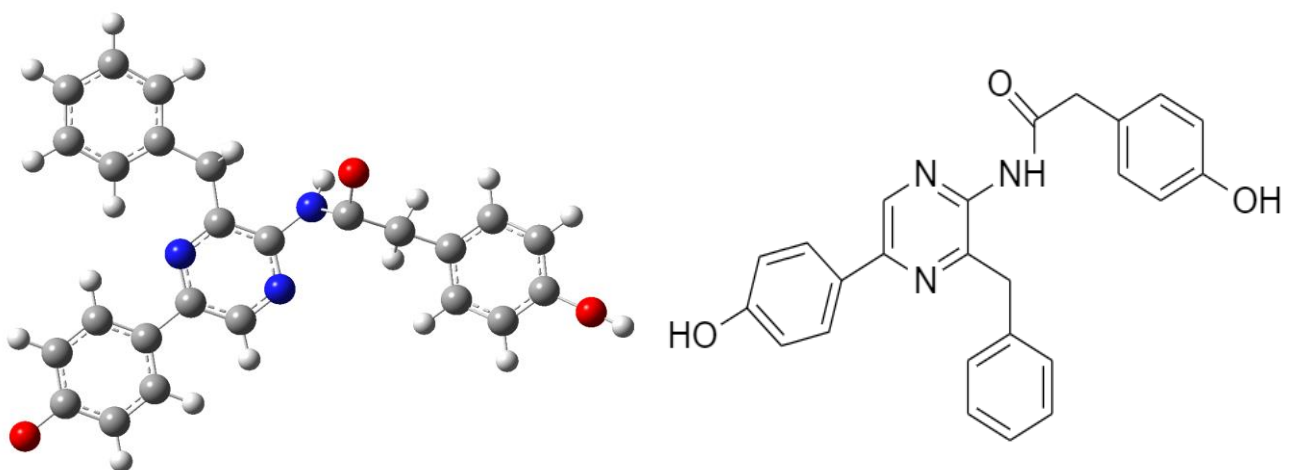


Figura 3. Estructura química de la coelenteracina mostrada con una representación de barras y bolas (izquierda) y esqueleto (derecha).

Destacar la importancia de la luciferasa de Renilla, la cual es una proteína citosólica de mediano tamaño, con origen en los corales, la cual es capaz de emitir una señal de luminiscencia permanente. Su temprano descubrimiento, así como la presencia de diversas variantes, cuyo espectro se ha desplazado hacia el infrarrojo, que han permitido su aplicación para biomedicina, más concretamente para bioimagen (Fleiss y S.Sarkisyan, 2019).

A pesar de que cada vez hay más estudios que tratan de utilizar los mecanismos implicados en la bioluminiscencia, el potencial de las herramientas basadas en ella sólo se ha conseguido explorar de forma muy superficial. Este tipo de tecnología podría resultar clave para la detección y la monitorización de enfermedades que causan una elevada mortalidad en humanos tales como el cáncer, siendo especialmente relevantes como biosensores ópticos. Al mismo tiempo, gracias a los nuevos conocimientos en fotofísica, genética y ecología de la bioluminiscencia, el diseño de nuevos dispositivos emisores de luz y comunicación lumínica están más alcanzables que nunca (Fleiss y S.Sarkisyan, 2019).

En este estudio, se pretenden modificar una serie de moléculas (D-luciferina y coelenteracina) con objeto de aumentar la longitud de onda de emisión de estas, generando de este modo una mayor penetración de la radiación emitida en los tejidos, resultando de gran utilidad para estudios y labores de bioimagen.

2. Objetivos e hipótesis

- **A.** Construir moléculas, concretamente D-luciferina y coelenteracina, así como variantes de D-luciferina utilizando el programa Gauss View.
- **A1.** Optimizar la geometría de equilibrio del estado electrónico fundamental. Calcular las energías de excitación de D-luciferina y coelenteracina mediante el programa para cálculos de química cuántica Gaussian 19.
- **A2.** Optimizar la geometría de equilibrio de estados electrónicos excitados. Calcular las energías de emisión de D-luciferina y coelenteracina mediante el programa para cálculos de química cuántica Gaussian 19.

- **B.** Contrastar los resultados y seleccionar la especie con mayor longitud de onda para emplearse en tecnologías de bioimagen.

- B1. Racionalizar los resultados en base a los orbitales moleculares.

3. Metodología

La mecánica cuántica surge como una forma de estudiar la naturaleza a niveles atómicos y subatómicos, centrándose en las interacciones y comportamientos que tiene la materia a esa escala. A finales del Siglo XIX, las diversas evidencias experimentales llevadas a cabo mostraron que la mecánica clásica fallaba cuando se intentaba aplicar a transferencias energéticas muy pequeñas o partículas de muy pequeño tamaño tal como los electrones o los átomos (Morin, 2008). Por ello, empezó a desarrollarse lo que hoy en día conocemos como mecánica cuántica, la cual reconoce la dualidad onda-partícula (la radiación se comporta como onda, pero también como partícula) y asume que las partículas tienen ciertas propiedades características de las ondas, así como una ecuación de la onda específica, denominada ecuación de Schrodinger. A su vez, la mecánica cuántica reconoce la existencia de la cuantización, que supone que una partícula no se desplaza por el espacio siguiendo un camino definido, sino que se distribuye por él como una onda (Atkins y De Paula, 2006).

En 1926, el físico Erwin Schrodinger propuso una ecuación para hallar la función de onda, la cual contiene toda la información relacionada con las propiedades dinámicas de una partícula, y la energía de cualquier sistema independiente del tiempo. La fórmula general de esta ecuación es:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (1)$$

dónde \hat{H} se corresponde con el operador Hamiltoniano, ψ es la función de onda y E es la energía del sistema.

Este operador Hamiltoniano puede determinarse a través del sumatorio de las distintas interacciones que tienen lugar en el átomo a estudiar:

$$\hat{H} = T_N + T_e + V_{ee} + V_{NN} + V_{eN} \quad (2)$$

dónde T_N es la energía de los núcleos, T_e es la energía de los electrones, V_{ee} es la interacción electrón-electrón, V_{NN} es la interacción núcleo-núcleo y V_{eN} es la interacción electrón-núcleo.

Para lograr hallar la energía de nuestro sistema, se han utilizado diversos métodos que nos permiten resolver esta ecuación de Schrodinger de una forma aproximada. Estos métodos se basan en dos principios: por un lado, tenemos aquellos basados en la obtención de la función de onda y por otro lado los que se basan en la densidad electrónica, como puede observarse en la Figura 4.

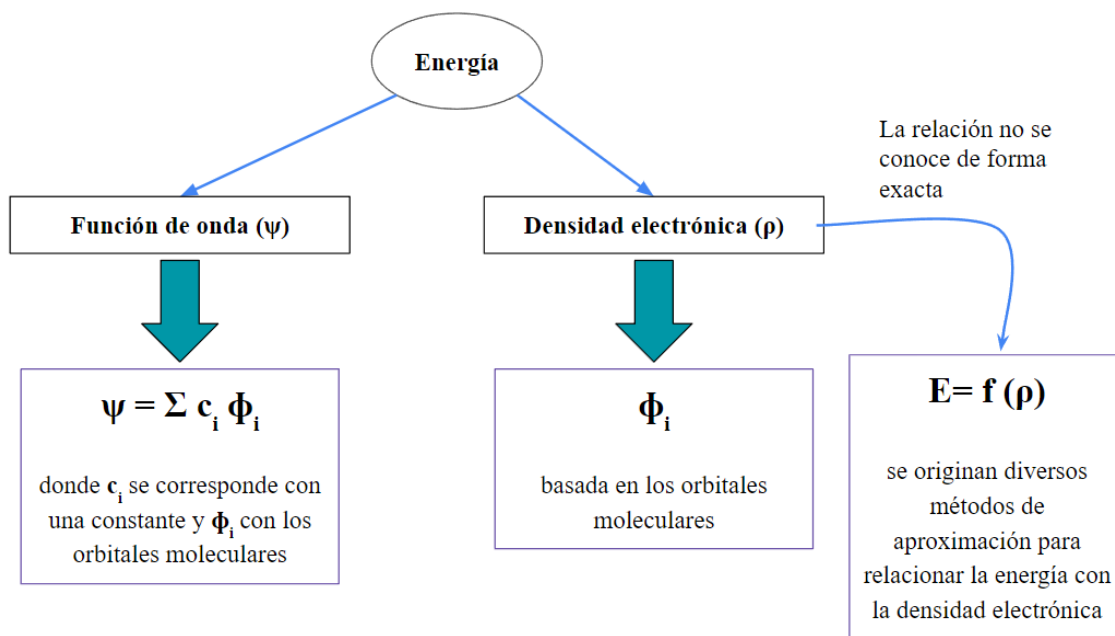


Figura 4. Metodologías de cálculo de la energía a partir de la función de onda y la densidad electrónica

Sin embargo, si decidimos centrarnos en los métodos que tratan de hallar la energía utilizando la densidad electrónica, la cual depende de nuevo de los orbitales moleculares, tenemos cierta

dificultad a la hora de realizar el cálculo de la energía, ya que no se conoce de forma exacta la relación existente entre la energía y la densidad electrónica, por lo que se han desarrollado una serie de relaciones que tratan de aproximar y emular la misma. Para ello, se utilizan los denominados funcionales, entre los cuales destaca especialmente la teoría del funcional de la densidad (DFT), capaz de sustituir una interacción electrónica que consta de 4 variables (3 coordenadas espaciales y 1 coordenada de espín por cada electrón) por otra que requiere de 3 y que además son independientes del número de electrones del sistema. De este modo, podremos calcular diversas propiedades de la molécula simplemente conociendo la densidad electrónica de la misma (Atkins y de Paula, 2010).

4. Resultados y discusión

A continuación, se procede a explicar los resultados obtenidos a raíz de los distintos cálculos realizados. En primer lugar, se explicará la metodología empleada para realizar los cálculos correspondientes en los diferentes apartados. Para lograr facilitar la comprensión de estos y lograr alcanzar un mayor grado de aprendizaje, se realizó el diseño de moléculas simples tales como el benceno, la anilina y el trifluorotolueno, y se optimizó la geometría correspondiente al proceso de absorción de radiación electromagnética, como se expondrá posteriormente. Por último, se aplicó esta misma metodología para las moléculas D-luciferina y coelenteracina.

4.1 Métodos de cálculo

En este trabajo se ha empleado el método de cálculo DFT, exclusivamente en vacío, con el objeto de optimizar la geometría en el estado electrónico fundamental de las diferentes moléculas estudiadas, en este caso D-luciferina y sus derivados aminos, así como coelenteracina, complementado con un cálculo TD-DFT, para de este modo adquirir el espectro vertical de absorción de estas.

A continuación, se realizó la optimización de la geometría del primer estado electrónico excitado (S_1), como resultado de la primera transición luminiscente producida en la molécula, donde la fuerza del oscilador (f), que se corresponde con la probabilidad de que tenga lugar esa transición electrónica, será proporcional al coeficiente de absorción molar y suficiente como para que se produzca la transición precisa. Además, se realizó la optimización de la geometría correspondiente al cuarto estado electrónico excitado (S_4) en aquellos casos en los que la fuerza

del oscilador era superior a la calculada para el primer estado excitado. Por último, se calculó el espectro de emisión a partir de la optimización de las geometrías previamente mencionadas.

Estos cálculos se llevaron a cabo empleando el funcional B3LYP y la base 6-311G(2d, p) a través del programa para cálculos de química cuántica Gaussian 19. El funcional es un elemento del DFT que permite el cálculo del potencial de intercambio y correlación utilizando la densidad electrónica como base. El funcional B3LYP forma parte de un grupo de funcionales en los cuales una porción del término de intercambio es calculada de forma exacta.

En lo que respecta al diseño de las moléculas y análisis de sus orbitales, se utilizó el programa GaussView.

4.2 Variaciones del benceno

Para alcanzar un mayor grado de comprensión de lo que ocurre al adicionar un grupo funcional (en este caso, grupos amino y grupos aromáticos), se ha procedido a modificar una molécula sencilla, tal y como es el benceno, para comprobar cómo varía la energía que presenta la molécula. Se diseñaron con GaussView las moléculas correspondientes a benceno, anilina y trifluorotolueno, tal y como se observa en las Figuras 5,6 y 7, y se optimizaron las geometrías para calcular la energía de absorción, tal y como puede evidenciarse en las Tablas 1,2 y 3.

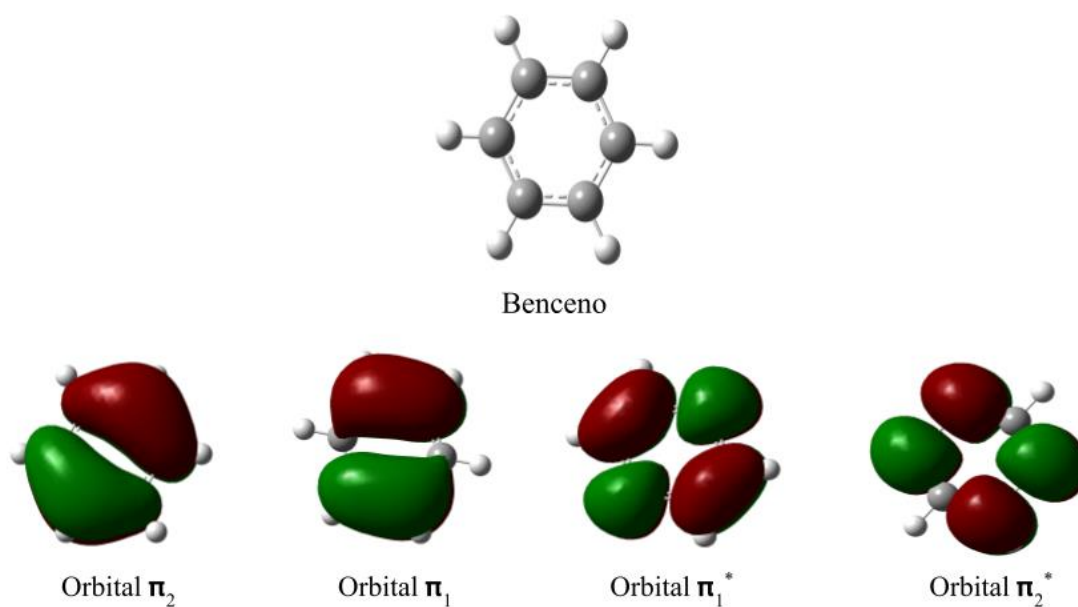
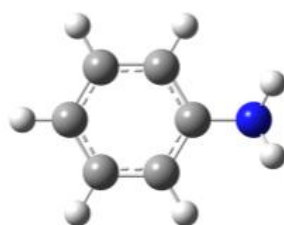


Figura 5. Estructura química del benceno y los orbitales moleculares de las principales transiciones recogidas en la Tabla 1

	E (eV)	f	Transiciones
S_1	5,54	0,00	$\pi_2 \rightarrow \pi_2^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$
S_2	6,31	0,00	$\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_2^*$
S_3	7,38	0,56	$\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_2^*$

Tabla 1. Energías de absorción (en eV), fuerza del oscilador y carácter de los tres primeros estados electrónicos del benceno



Anilina

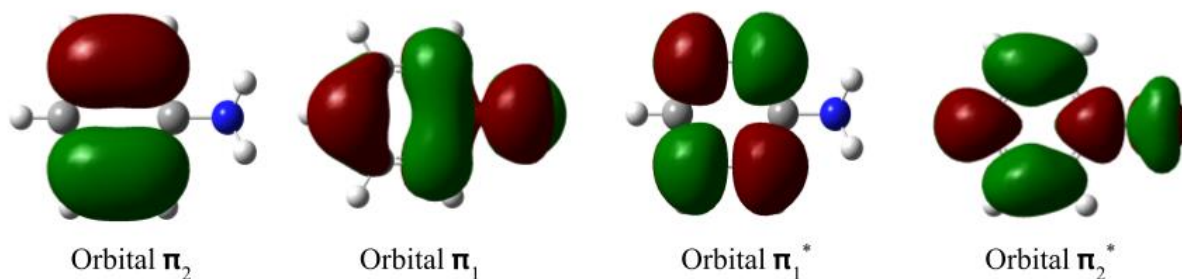


Figura 6. Estructura química de la anilina y los orbitales moleculares de las principales transiciones recogidas en la Tabla 2

	E (eV)	f	Transiciones
S₁	4,92	0,03	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$
S₂	5,78	0,14	$\pi_1 \rightarrow \pi_2^*$
S₃	6,76	0,15	$\pi_2 \rightarrow \pi_2^*$

Tabla 2. Energías de absorción (en eV), fuerza del oscilador y carácter de los tres primeros estados electrónicos de la anilina

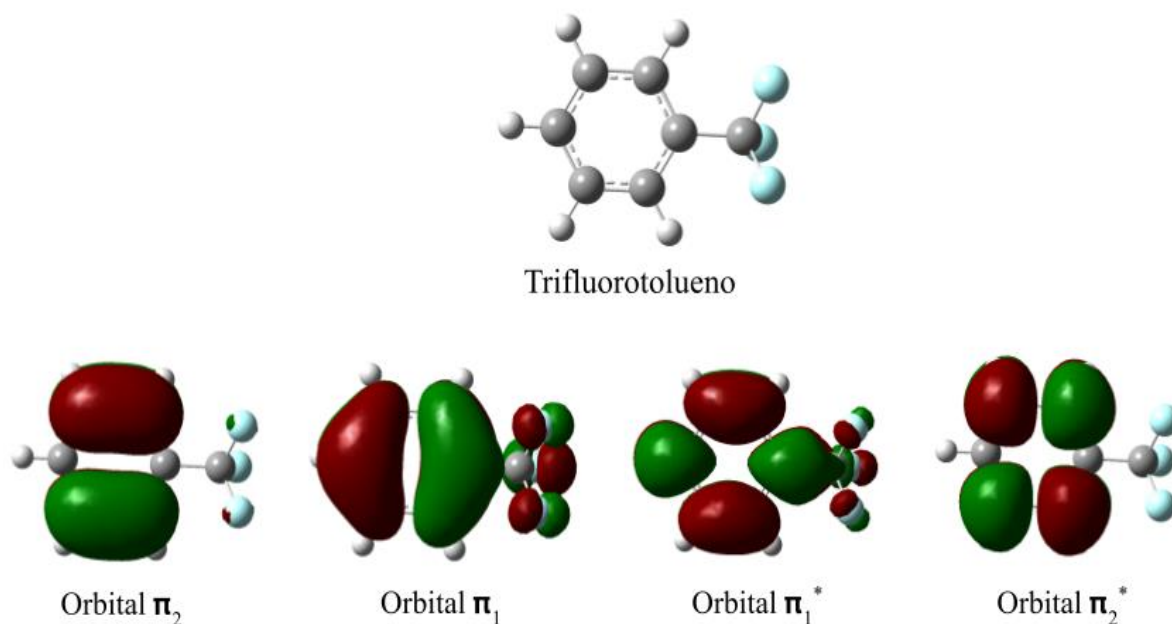


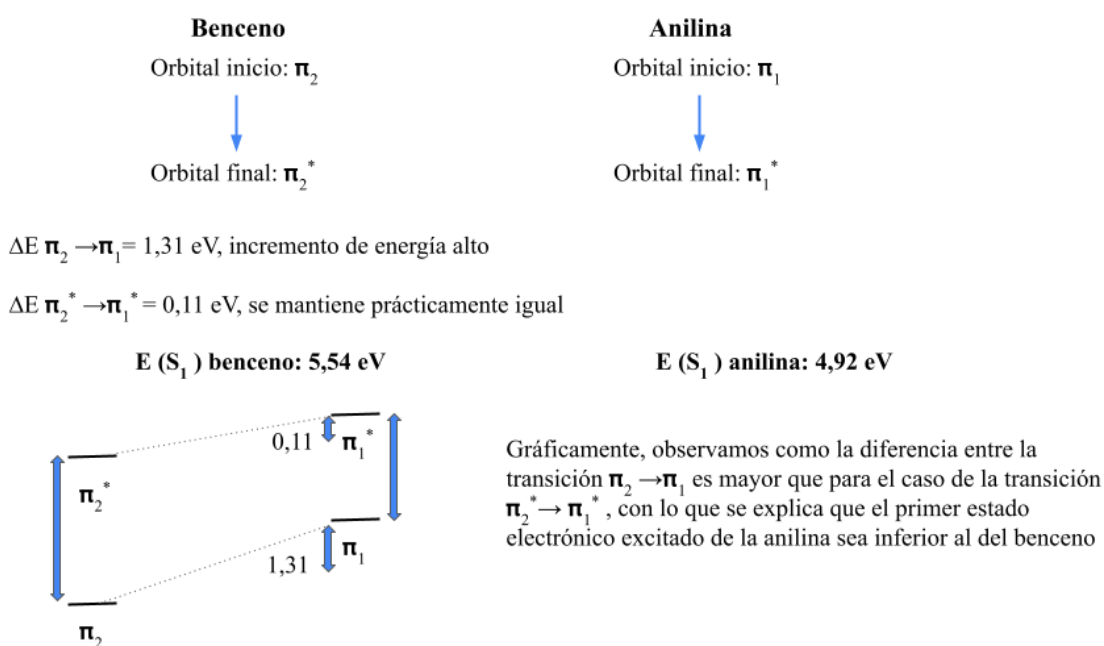
Figura 7. Estructura química del trifluorotolueno y los orbitales moleculares de las principales transiciones recogidas en la Tabla 3

	E (eV)	f	Transiciones
S₁	5,45	0,00	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$
S₂	6,19	0,02	$\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_2^*$
S₃	7,22	0,46	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$

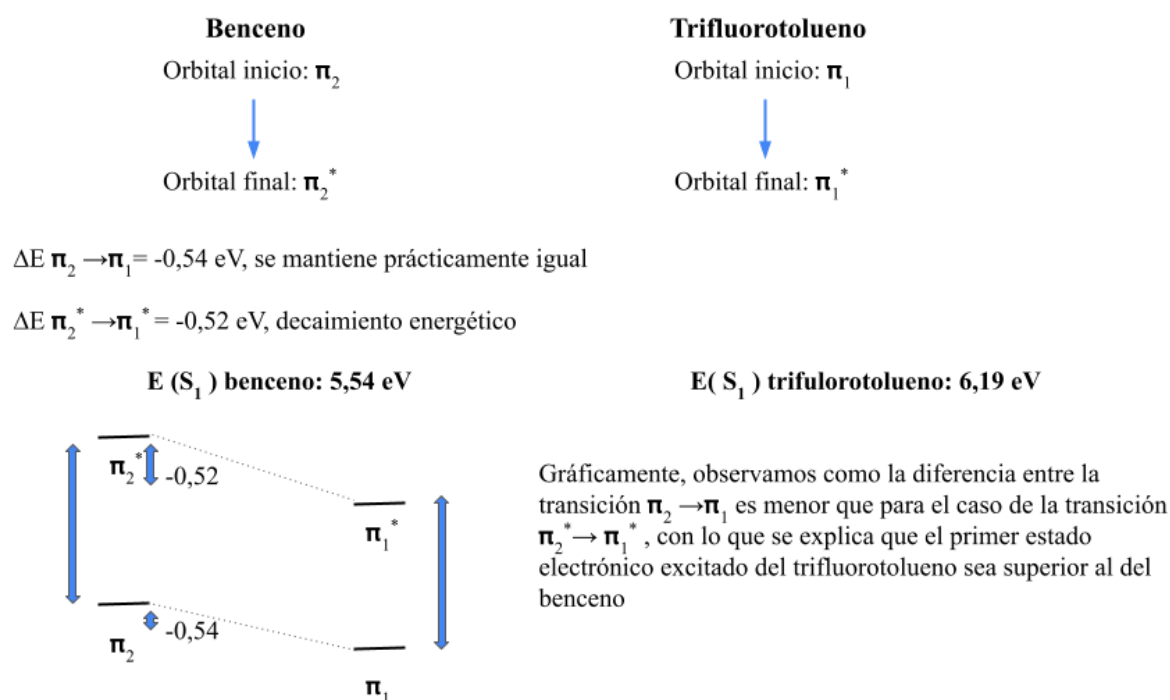
Tabla 3. Energías de absorción (en eV), fuerza del oscilador y carácter de los tres primeros estados electrónicos del trifluorotolueno

Tras esto, se procedió a comparar estas diferencias energéticas, mediante la comparación entre las diferentes energías de los orbitales involucrados en las transiciones análogas en uno u otro, para así comprobar cuál de ellas generaba una longitud de onda mayor y por lo tanto una energía menor. Como podemos observar en el Esquema 1, donde se compara la molécula de benceno con la anilina, la energía necesaria para realizar la transición $\pi_2 \rightarrow \pi_2^*$ es de un orden superior

que para la transición $\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$, por lo que podemos concluir que la sustitución de un grupo amino provoca una disminución en la energía correspondiente al primer estado electrónico excitado, es decir, se aumenta la longitud de onda de esta y por tanto la radiación penetra más fácilmente por los tejidos. Por contra, en el caso del trifluorotolueno y como se evidencia en el Esquema 2, la energía necesaria para realizar la transición $\pi_2 \rightarrow \pi_2^*$ es de un orden inferior que para la transición $\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$, por lo que podemos concluir que la adición de un grupo halógeno como el F provoca un incremento en la energía correspondiente al primer estado electrónico excitado, es decir, se disminuye la longitud de onda de esta. En este caso, como nuestro objetivo es lograr que la longitud de onda sea lo más alta posible, no nos resulta de interés adicionar grupos halógenos, mientras que sí será interesante realizar sustituciones por grupos amino.



Esquema 1. Comparación entre el benceno y la anilina y las diferencias energéticas que presentan dadas sus transiciones. El objetivo es observar el efecto al adicionar un grupo amino.



Esquema 2. Comparación entre el benceno y el trifluorotolueno y las diferencias energéticas que presentan dadas sus transiciones. El objetivo es observar el efecto al adicionar un grupo halógeno.

En base a los resultados obtenidos, podríamos preguntarnos a qué es debida esta diferencia energética entre compuestos. Cómo hemos podido observar, al añadir un grupo amino (el cuál tiende a ceder electrones, en este caso al benceno) se ha producido una disminución de la energía, es decir, se está produciendo un incremento en la longitud de onda; mientras que al añadir un grupo halógeno tal como el CF₃ (el cual, dada su elevada electronegatividad, va a tender a atraer los electrones del grupo), observamos como la energía se incrementa, y cómo por tanto se produce una disminución de la longitud de onda.

Para explicar estas diferencias energéticas encontradas, nos centraremos en dos aspectos fundamentales:

- Interacciones antienlazantes. Se produce cuando existe un plano nodal en el compuesto, es decir, una región en la cual no encontramos electrones. Esta zona presenta una gran energía, por lo que los electrones preferirán ubicarse en situaciones más estables y por tanto no ocuparán estas zonas previamente mencionadas. Por tanto, si comparamos el benceno con la anilina,

evidenciable en las Figuras 5 y 6, observamos como el benceno presenta un único plano nodal, mientras que la anilina presenta dos. Cuantos más enlaces tipo antienlazante tengan nuestras moléculas, mayor será la energía de los orbitales. Es uno de los motivos por los que la anilina presenta esta variación de energía tan alta entre los orbitales. Por tanto, podemos deducir que esto se transmite en una reducción energética de la anilina comparada con el benceno.

- Carga efectiva del núcleo (Z_{eff}). La energía de los orbitales es proporcional a esta energía de carga efectiva del núcleo. Siguiendo el modelo atómico de Bohr, sabemos que la carga positiva del átomo reside en el núcleo mientras que la carga negativa se encuentra en los electrones que rodean al mismo. Estos electrones apantallan la carga positiva, reduciendo su valor. Por tanto, un incremento en esta Z_{eff} provocará una reducción de la energía de los orbitales, ya que estaríamos aumentando la carga negativa (debida a los electrones) y por tanto reduciendo el valor de la energía del orbital. Esto se ejemplifica para el caso de CF_3 , cuyo núcleo en este caso va a ser deficiente en electrones. Esta deficiencia electrónica se manifiesta en una carga efectiva del núcleo alta, ya que habrá menos electrones que apantallen la carga positiva del núcleo y por tanto una menor energía de orbitales. Es por ese motivo por el que la energía del trifluorotolueno es superior a la del benceno.

4.3 D-luciferina

Los resultados que se mostrarán en este apartado se corresponden a los distintos análisis y cálculos realizados para las moléculas D-luciferina y sus derivados amino (5-aminoxiluciferina (5-amox), 6-aminoxiluciferina (6-amox), 7-aminoxiluciferina (7-amox) y 8-aminoxiluciferina (8-amox)). Dada la variabilidad existente entre las moléculas estudiadas, se subdividirá este apartado para facilitar su comprensión y posibilitar así la realización de un análisis más exhaustivo de cada una de ellas.

Durante el proceso de absorción de radiación electromagnética, en este caso comprendida en longitudes de onda en torno a 2,38-2,48 eV, los cálculos realizados arrojan un valor del orden de 2,58 eV, evidenciable en la Tabla 1, por lo que observamos una buena proximidad con respecto al valor experimental. Como puede observarse en la Tabla 4, la primera transición electrónica, la cual se produce entre los orbitales $\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$, presenta una fuerza de oscilación de 0,59, lo cual nos sugiere una alta probabilidad de que se produzca esa transición previamente mencionada. Los orbitales implicados en este proceso pueden observarse en la Figura 8.

Molécula	Tipo	Transición	E(eV)	E(nm)	f	Valor experimental (eV)	Valor calculado (eV)
D-luciferina	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_1$	2,58	480	0,59	2,38-2,48	2,58

Tabla 4. Representación de los caracteres implicados, las transiciones, sus respectivas energías en electronvoltios y nanómetros, la fuerza de oscilación f (probabilidad de que tenga lugar esa transición electrónica) y los valores experimentales y calculados para la molécula D-luciferina durante el proceso de absorción

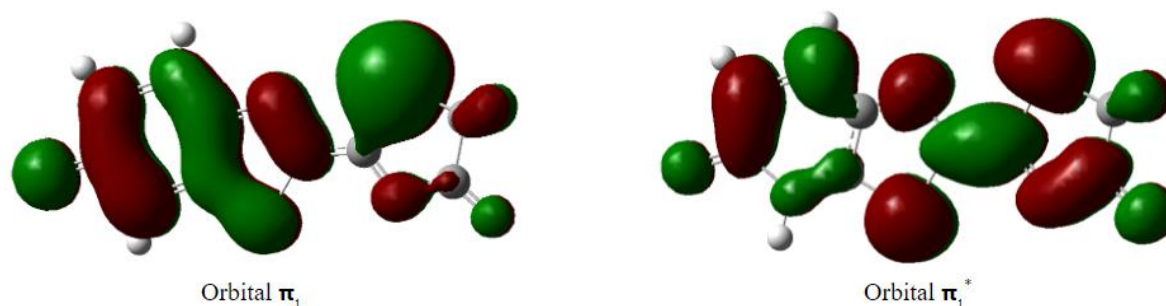
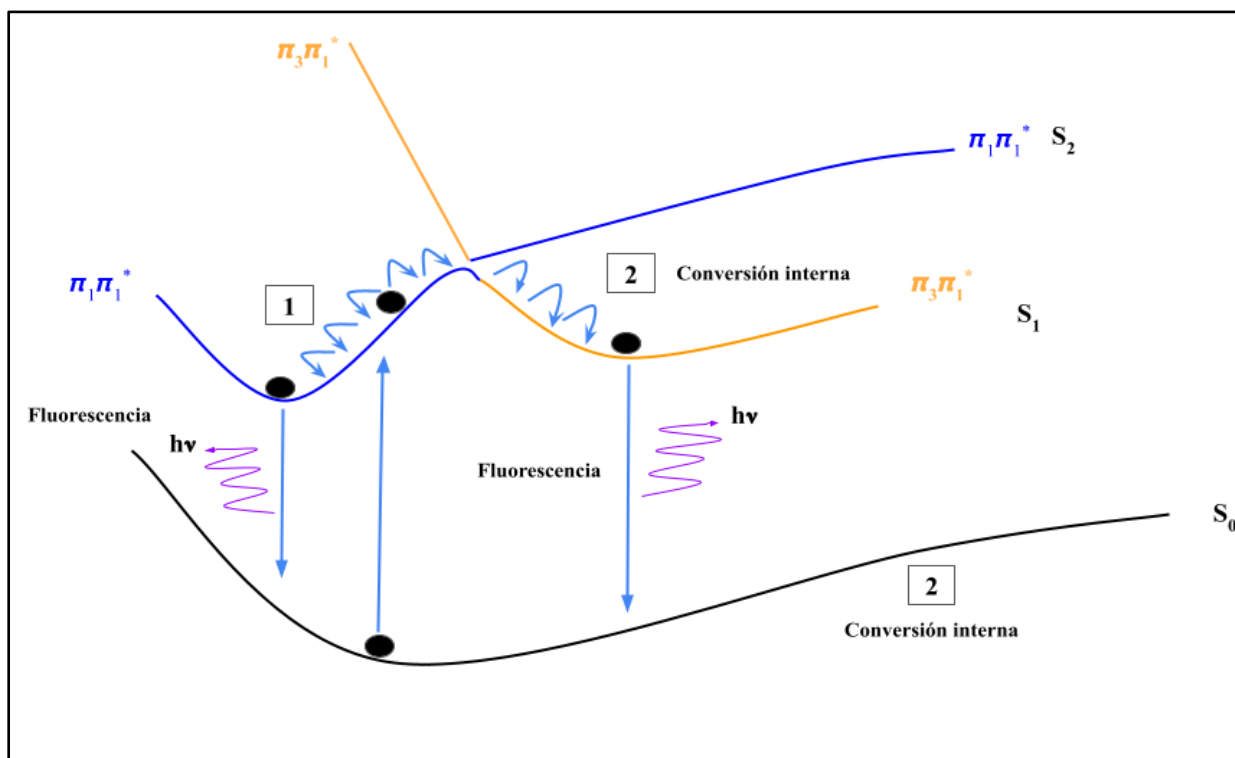


Figura 8. Representación de los orbitales π_1 y π_1^* implicados en el proceso de absorción de radiación electromagnética.

Centrándonos en el proceso de emisión de radiación electromagnética, comprendida entre los 2,22-2,24 eV, los cálculos realizados arrojan un valor en torno a 2,30, por lo que de nuevo observamos que existe una gran proximidad con respecto al valor experimental. En este caso y mediante el empleo de la teoría del funcional de la densidad DFT, la optimización de la geometría de equilibrio se realizó para el segundo estado electrónico excitado y no para el primero. El motivo de esta decisión se explicará más adelante en este apartado. Como se puede observar en la Tabla 5, la segunda transición electrónica, la cual se produce entre los orbitales $\pi_3 \rightarrow \pi_1^*$ y $\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$, presenta una fuerza de oscilación del orden de 0,46, lo cual nos sugiere una alta probabilidad de que se produzca esa transición previamente mencionada y que por tanto se

genere emisión de radiación electromagnética. En este caso, este resultado es diferente a lo que ocurriría de forma natural en una molécula, donde el proceso de emisión suele tener lugar desde el primer estado electrónico excitado hasta el estado fundamental. De hecho, es altamente improbable que una molécula manifieste fluorescencia desde el segundo estado electrónico excitado ya que, por lo general, se suele producir lo que se conoce como conversión interna, el cual es un proceso mucho más rápido que implica un desplazamiento de los electrones desde el mínimo correspondiente al segundo estado electrónico excitado hasta el primer estado electrónico excitado, tal y como se explica en la Figura 9. Podemos explicar este resultado anómalo desde dos perspectivas: por un lado, es posible que el método empleado no sea el más acertado y que ello haya inducido a la formación de errores tales como este; por otro lado, y lo que parece más coherente, es que la optimización de la geometría no se haya calculado de forma correcta. Atendiendo a esto último, puede ocurrir que nos encontremos en una geometría en la cual la transición que se produce presente una fuerza de oscilación muy baja, no constituyendo por tanto una transición brillante y viéndose incapaz de manifestar fluorescencia desde el primer estado electrónico excitado. Los orbitales implicados en el proceso de emisión pueden



observarse en la Figura 10.

Figura 9. Representación de las distintas posibilidades que puede sufrir una molécula cuando es excitada. Por lo general, la ruta que suele seguirse es la fluorescencia desde el primer estado electrónico excitado. En este caso, al optimizar la geometría de la molécula, se ha

producido un fenómeno curioso mediante el cual la molécula ha decidido desplazarse hacia un mínimo correspondiente a otra transición ($\pi_3 \rightarrow \pi_1^*$) en lugar de ir al mínimo que le corresponde de forma general ($\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$). Por este motivo, en los resultados aparece como transición lumínica la correspondiente al segundo estado excitado.

Molécula	Tipo	Transición	E(eV)	E(nm)	f	Valor experimental (eV)	Valor calculado (eV)
D-luciferina	$\pi_3 \rightarrow \pi_1^*$	$S_2 \rightarrow S_0$	2,30	540	0,46	2,22-2,24	2,30
	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$						

Tabla 5. Representación de los orbitales moleculares, las transiciones, sus respectivas energías en electronvoltios y nanómetros, fuerza de oscilación f (probabilidad de que ocurra esa transición) y valores experimentales y calculados para la molécula D-luciferina durante el proceso de emisión desde el segundo estado excitado.

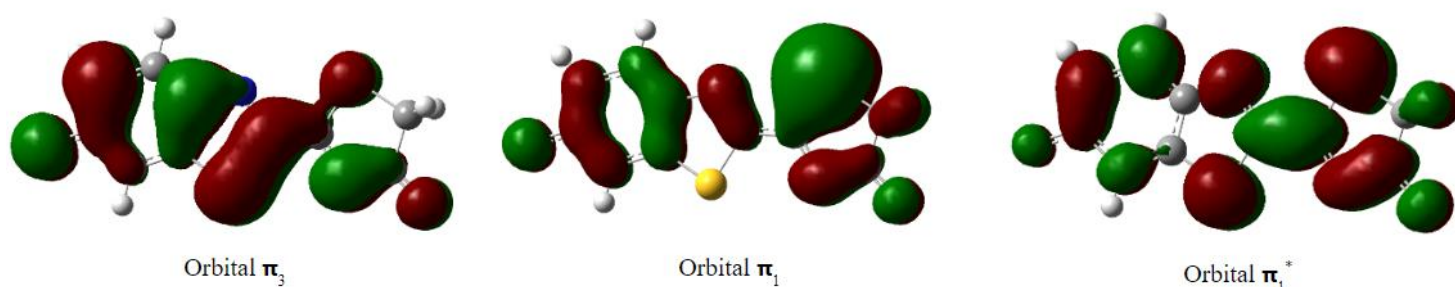


Figura 10. Representación de los orbitales π_3 , π_1 y π_1^* implicados en el proceso de emisión de radiación electromagnética.

4.3.1 Derivados de la luciferina

Una vez se ha analizado la principal molécula encargada de los fenómenos de luminiscencia, se ha procedido a modificar la misma mediante la adición de varios grupos funcionales,

ubicados en distintas posiciones de la molécula original para así comprobar cuál es el efecto que estas variaciones producen en la energía. En este caso, el grupo funcional empleado es el amino, ya que es el que se espera que produzca un aumento en la longitud de onda de emisión de la molécula y por tanto una mayor penetración en los tejidos, tal y como se ha explicado en el apartado anterior.

Se diseñaron las moléculas correspondientes a 5- aminoxiluciferina (5-amox), 6- aminoxiluciferina (6-amox), 7-aminoxiluciferina (7-amox) y 8- aminoxiluciferina (8-amox) con GaussView, como puede evidenciarse en las Figuras 11 y 12, y se procedió a optimizar las distintas geometrías para calcular las energías de absorción y de emisión de las mismas.

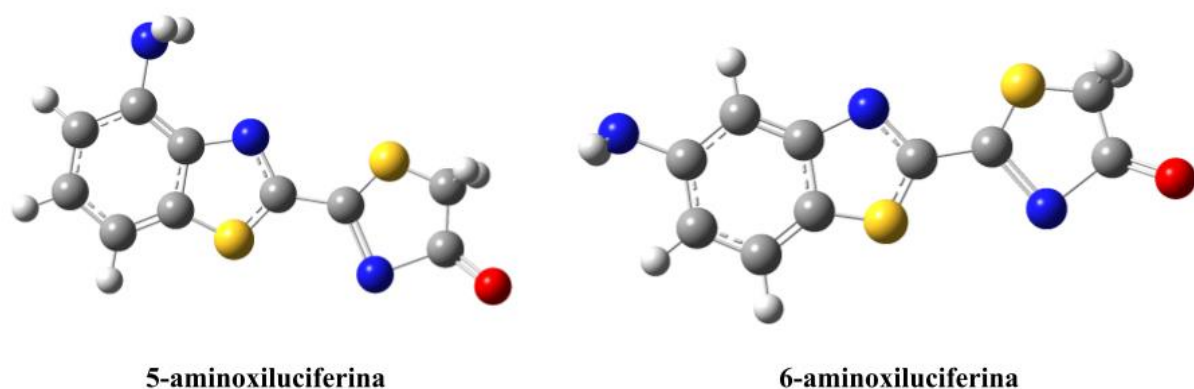


Figura 11. Estructura química de 5-aminoxiluciferina (izquierda) y 6-aminoxiluciferina (derecha) mostrada con una representación de barras y bolas

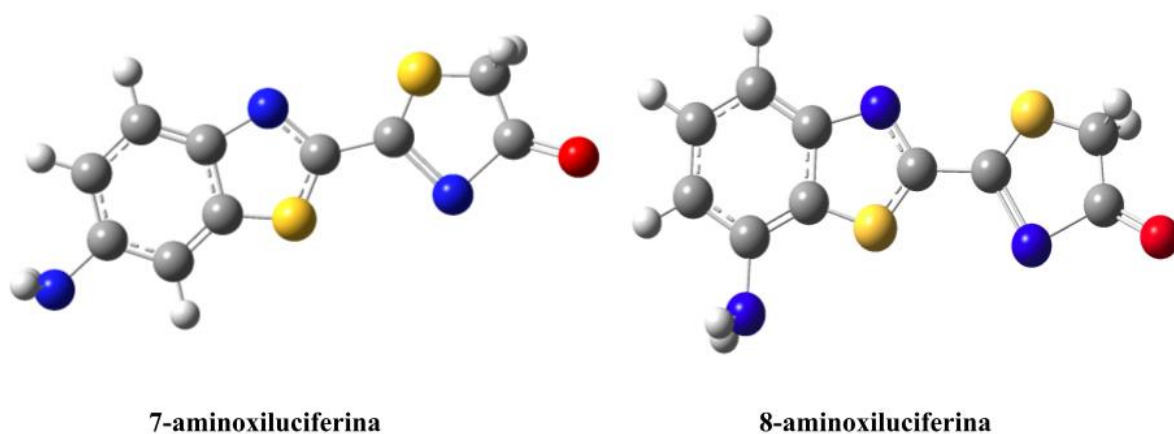


Figura 12. Estructura química de 7-aminoxiluciferina (izquierda) y 8-aminoxiluciferina (derecha) mostrada con una representación de barras y bolas

Atendiendo a los resultados obtenidos en la Tabla 6, se ha realizado el cálculo correspondiente a las transiciones entre $S_0 \rightarrow S_1$ y también entre $S_0 \rightarrow S_4$. Esto es debido a que la fuerza del oscilador para el caso de 5-amox, 6-amox y 8-amox correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_1$ es bastante baja, mientras que para la transición $S_0 \rightarrow S_4$ sí que se han arrojado valores significativos, es decir, que la transición $S_0 \rightarrow S_4$ se corresponde con la transición brillante de estas moléculas. Como podemos apreciar en las variaciones energéticas, la molécula que proporciona una variación de orden superior es 7-amox, con un valor de 0,5212 eV, lo cual nos sugiere que la sustitución de un grupo amino en la posición 7 de la D-luciferina proporciona una energía mayor que la correspondiente a la luciferina normal, y por tanto su longitud de onda será menor. Por otro lado, si atendemos a las variaciones energéticas de la molécula 5-amox, observamos que su valor es de 0,0081, es decir, una variación muy reducida de energía, lo cual nos sugiere que la sustitución de un grupo amino en la posición 5 de la D-luciferina proporciona una energía menor que la correspondiente a la luciferina normal, siendo su longitud de onda mayor.

Molécula	Tipo	Transición	E(eV)	E(nm)	f	Variación de E (eV)
5-amox	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_1$	2,59	479	0,09	$\Delta E = 2,5905 - 2,5824 = 0,01$
	$\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_4$	3,76	330	0,39	
6-amox	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_1$	2,70	459	0,07	$\Delta E = 2,7019 - 2,5824 = 0,12$
	$\pi_3 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_4$	3,80	326	0,30	
7-amox	$\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_1$	3,10	399	0,43	$\Delta E = 3,1036 - 2,5824 = 0,52$
	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_1$				
	$\pi_3 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_4$	3,72	333	0,05	$\Delta E = 3,7209 - 2,5824 = 1,14$
	$\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_4$				
8-amox	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_1$	2,66	466	0,02	$\Delta E = 2,6580 -$

	$\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$	$S_0 \rightarrow S_4$	3,75	331	0,37	$2,5824 = 0,08$
--	-----------------------------	-----------------------	------	-----	------	-----------------

Tabla 6. Representación de los orbitales moleculares, las transiciones, sus respectivas energías, frecuencias y variaciones energéticas para las variantes de D-luciferina durante el proceso de absorción.

Como puede observarse en la Tabla 7, se ha realizado el cálculo correspondiente a la transición entre $S_1 \rightarrow S_0$. En este caso no se ha considerado la transición $S_4 \rightarrow S_0$ porque las moléculas tienden a emitir radiación electromagnética desde el primer estado electrónico excitado, como se ha explicado anteriormente. Atendiendo a las fuerzas del oscilador, observamos que en general estas son muy bajas ($< 0,10$) salvo para el caso de 7-amox, con un valor de 0,38, por lo que podemos deducir que el proceso de emisión de radiación electromagnética desde el primer estado electrónico excitado será más probable en el caso de la molécula 7-aminxiluciferina. Si observamos las variaciones energéticas, podemos comprobar que la molécula 7-amox proporciona el valor más alto, siendo este de 0,56 eV, lo cual nos sugiere que la sustitución de un grupo amino en la posición 7 de la D-luciferina proporciona una energía mayor que la correspondiente a la luciferina normal, y por tanto su longitud de onda será menor. Por otro lado, si atendemos a las variaciones de energía de la molécula 8-amox, podemos apreciar que su valor es de -0,37 eV, es decir, una variación de energía negativa, lo cual nos sugiere que la sustitución de un grupo amino en la posición 8 de la D-luciferina proporciona una energía menor que la correspondiente a la luciferina normal, siendo su longitud de onda mayor y por lo tanto resultando de un interés mayor para aplicaciones de bioimagen.

Molécula	Tipo	Transición	E(eV)	E(nm)	f	Variación de E (eV)
5-amox	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_1 \rightarrow S_0$	2,10	590	0,06	$\Delta E = 2,0998 - 2,2980 = -0,20$
6-amox	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_1 \rightarrow S_0$	2,17	572	0,06	$\Delta E = 2,1685 - 2,2980 = -0,13$
7-amox	$\pi_2 \rightarrow \pi_1^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_1 \rightarrow S_0$	2,86	434	0,38	$\Delta E = 2,8598 - 2,2980 = 0,56$

8-amox	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$	$S_1 \rightarrow S_0$	1,93	643	0,01	$\Delta E = 1,9270 - 2,2980 = -0,37$

Tabla 7. Representación de los orbitales moleculares, las transiciones, sus respectivas energías, frecuencias y variaciones energéticas para las variantes de D-luciferina durante el proceso de emisión

4.4 Coelenteracina

Durante el proceso de absorción de radiación electromagnética, en este caso comprendida en longitudes de onda en torno a 2,84-2,86 eV, los cálculos realizados para el primer estado electrónico excitado arrojan un valor del orden de 2,30 eV, como puede apreciarse en la Tabla 8, mientras que para el caso del cuarto estado electrónico excitado, se obtuvo un valor de 2,86, por lo que observamos una buena proximidad con respecto al valor experimental y se comprueba que ha ocurrido algo similar a la luciferina, donde la molécula ha decidido desplazarse hacia un mínimo correspondiente a otra transición que no es la correspondiente al primer estado electrónico excitado. Como puede observarse en la Tabla 8, la primera transición electrónica, la cual se produce entre los orbitales $\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$, $\pi_1 \rightarrow \pi_3^*$ y $\pi_1 \rightarrow \pi_4^*$ presenta una fuerza de oscilación de 0,05, lo cual nos sugiere una baja probabilidad de que se produzca esa transición previamente mencionada, mientras que, para el cuarto estado electrónico, la cual ocurre entre los orbitales $\pi_1 \rightarrow \pi_3^*$, $\pi_1 \rightarrow \pi_4^*$ y $\pi_1 \rightarrow \pi_5^*$, la fuerza del oscilador es del orden de 0,06. Los orbitales implicados en este proceso pueden observarse en la Figuras 13 y 14. Por tanto, y atendiendo a los resultados obtenidos, podemos afirmar que el método de aproximación empleado para la optimización de la geometría, en este caso utilizando el DFT, no es el apropiado, por lo que se deberán buscar otros que arrojen resultados más coherentes y con fuerzas del oscilador de orden superior al calculado.

Molécula	Tipo	Transición	E(eV)	E(nm)	f	Valor experimental	Valor calculado
----------	------	------------	-------	-------	---	--------------------	-----------------

						(eV)	(eV)
Coelenteracina	$\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_3^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_4^*$	$S_0 \rightarrow S_1$	2,29	540	0,05	2,84-2,86	2,30
	$\pi_1 \rightarrow \pi_3^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_4^*$ $\pi_1 \rightarrow \pi_5^*$	$S_0 \rightarrow S_4$	2,86	434	0,06		2,86

Tabla 8. Representación de los orbitales moleculares, las transiciones, sus respectivas energías en electronvoltios y nanómetros, fuerza del oscilador y valores experimentales y calculados para la coelenteracina durante el proceso de absorción

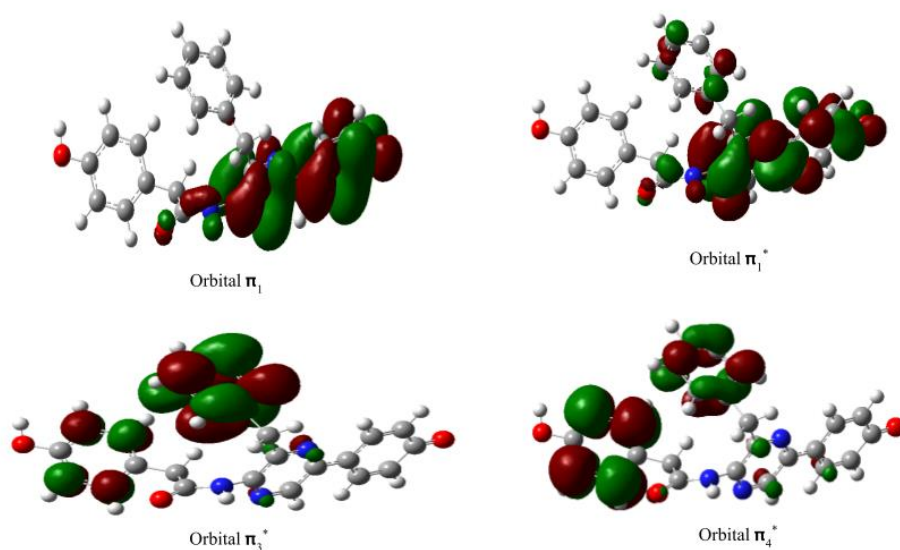


Figura 13. Representación de los orbitales π , π_1^* , π_3^* y π_4^* implicados en el proceso de emisión de radiación electromagnética

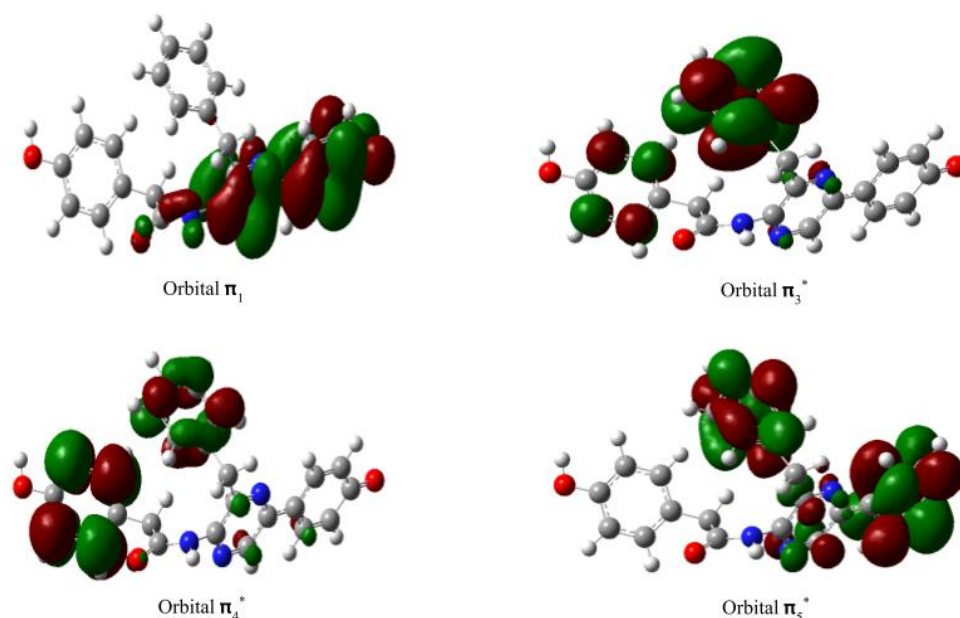


Figura 14. Representación de los orbitales π , π_3^* , π_4^* y π_5^* implicados en el proceso de emisión de radiación electromagnética

5. Conclusiones

En este trabajo se ha realizado un análisis de dos moléculas, D-luciferina, sus derivados amino y coelenteracina, implicadas en fenómenos de luminiscencia. Para ello, se han construido estas moléculas utilizando el programa GaussView y a continuación se procedió a optimizar la

geometría de equilibrio del estado electrónico fundamental y del estado electrónico excitado, implicados en los procesos de absorción y emisión de radiación electromagnética.

Para lograr hallar la energía de nuestro sistema, se han utilizado diversos métodos que nos permiten resolver la ecuación de Schrodinger de una forma aproximada. En este caso, se ha optado por emplear los métodos de cálculo basados en la densidad electrónica, cuya relación con la energía no se conoce y por tanto implican el empleo de aproximaciones, en este caso basándonos en el DFT, empleando el funcional B3LYP y la base 6-311G a través del programa para cálculos de química cuántica Gaussian 19.

A su vez, para complementar el aprendizaje de la metodología empleada, se ha procedido al diseño y optimización geométrica de una molécula sencilla, como el benceno, así como la anilina y el trifluorotolueno. De este modo, se ha podido observar qué efecto tiene la sustitución de un grupo amino y de un compuesto halógeno en la energía, concluyendo que la adición de un grupo amino provoca una disminución de la energía, y, por ende, un incremento en la longitud de onda. Este incremento en la longitud de onda produce una mayor penetración de la misma a través de las células vivas, lo cual puede resultar muy interesante para aplicarlo en técnicas de bioimagen.

Se analizaron los derivados 5- aminooxiluciferina (5-amox), 6-aminooxiluciferina (6-amox), 7- aminooxiluciferina (7-amox) y 8- aminooxiluciferina (8-amox) de la D-luciferina con motivo de encontrar aquel que genera una menor energía con respecto a la molécula original. Los resultados mostraron que la 8-aminoxiluciferina era la que presentaba una variación energética más negativa y especialmente pronunciada, en comparación con la D-luciferina original, lo que nos sugiere que la adición de un grupo amino en el sitio 8 genera una molécula con una energía menor que la original, y por tanto nos resultará mucho más útil en estudios de bioimagen.

Por último, se procedió al análisis de la coelenteracina, resultando en la optimización de la geometría exclusivamente para el proceso de absorción de radiación electromagnética, mientras que no fue posible realizarlo para el proceso de emisión. Con ello, podemos concluir que el método de aproximación empleado para la optimización de la geometría, en este caso utilizando el DFT, no es el apropiado, por lo que sería interesante buscar otros métodos de aproximación que arrojen resultados de mayor veracidad y permitan la optimización de la geometría para el estado electrónico excitado de la molécula.

Bibliografía

Adams, S.T. & Miller, S.C. (2014). Beyond D-luciferin: expanding the scope of bioluminescence imaging in vivo. *Current Opinion in Chemical Biology* (21): 112-120. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.07.003.

Atkins, P. & De Paula, J. (2006). *ATKINS' PHYSICAL CHEMISTRY*. 8 ed. Oxford University Press, Great Britain.

Fleiss, A. & S.Sarkisyan, K. (2019). A brief review of bioluminescent systems (2019). *Current Genetics*(65): 877-882. doi: 10.1007/s00294-019-00951-5.

J.Syed, A. & C.Anderson, J. (2021). Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *The Royal Society of Chemistry* 2021(50): 5668-5705. doi: 10.1039/d0cs01492c.

Kahlke, T. & D.L. Umbers, K. (2016). Quick guide Bioluminescence. *Current Biology* (26): R307-R318.

M.Kaskova, Z., S.Tsarkova, A. & V.Yampolsky, I. (2016). 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicin. *The Royal Society of Chemistry* 2016(45): 6048-6077. doi: 10.1039/c6cs00296j.

Morin, D. (2008). *Introduction to quantum mechanics*. MORIN, D. (Ed.), 1 ed. Cambridge University Press, United Kingdom.