



Estados Unidos Mexicanos

República Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

190

Examinación



DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

Examen

que para obtener el Título de

Químico

presenta

Victor Manuel Herrera González

México, D. F.

1950



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Presidente Profra. Guadalupe Vélez Pratt
Vocal Prof. Helio Flores Ramírez
Jurado asignado Secretario Profra. Yolanda Caballero A.
originalmen 1er. Suplente Prof. Mauro Cruz Morales
te según el 2o. Suplente Profra. Eloisa Uriarte Navarro
tema.

Sitio donde se desarro
llo el Tema

Bibliotecas de Fac. de Química,
Inst. de Química, Inst. de Invest.
Biomédicas, Inst. de Biología

Sustentante: Victor Manuel Barrera González.

Asesor del Tema: Dra. Yolanda Caballero Arroyo.

A LA MEMORIA DE MIS PADRES :

NARCISO BARRERA PLATA

Y

ANGELA GONZALEZ ZAMUDIO

**QUIENES CON SU EJEMPLO DE
INTEGRIDAD Y HONRADEZ ME
MOSTRARON EL CAMINO DE
LA SUPERACION ...**

A MI NOVIA :

Dra. CARMEN BAEZ RUIZ

DE QUIEN APRENDI QUE LAS COSAS
REALIZADAS CON AMOR Y DEDICACION
PERDURAN SOBRE LAS HECHAS POR
OBLIGACION

A LA Dra. YOLANDA

CABALLERO

ARROYO

QUIEN CON SU VALIOSA ORIENTACION
Y AYUDA HIZO POSIBLE LA REALIZACION
DE ESTA TESIS.

**"EL HOMBRE HA SIDO HECHO NO
PARA VER LA LUZ , SINO PARA
VER SOLAMENTE LAS COSAS
QUE LA LUZ ILUMINA"**

(GOETHE)

I N D I C E

<u>INTRODUCCION</u>	1
---------------------	---

<u>GENERALIDADES</u>	3
----------------------	---

I.- Quimioluminiscencia: Generalidades

II.- Bioluminiscencia: Generalidades

C A P I T U L O I

<u>QUIMIOLUMINISCENCIA DE COMPUESTOS ORGANICOS</u>	21
--	----

- I. A. Clasificación
- I. B. Mecanismo de la Quimioluminiscencia
- I. C. Luminól
- I. D. Lofina
- I. E. Lucigenina
- I. F. Quimioluminiscencia de iones de Radicales
Aromáticos
- I. G. Porfirinas
- I. H. Pirogalol
- I. I. Endoperóxidos Aromáticos

C A P I T U L O II

<u>BIOLUMINISCENCIA</u>	32
-------------------------	----

- II. A. Importancia y Distribución
- II. B. Clasificación
- II. C. Recambio
- II. D. Función de la Enzima

- II. E. Grupo I: Oxidación del Substrato
 - G.I.1. Cypridina
 - G.I.2. Peces: Apagón y Parapricantus
 - G.I.3. Odontosyllis y Latia
- II. F. Grupo II: Activación del Substrato
Seguido de Oxidación
 - G.II.1. Cocuyo y Luciernaga
 - G.II.2. Celenterados Bioluminiscentes
 - G.II.2(a) Antozoarios
 - G.II.2(b) Renilla
 - G.II.2(c) Factores para la emisión de luz azul
 - G.II.2(d) Factores para la emisión de luz verde
 - G.II.2(e) Control del destello bioluminiscente
- II.G. Grupo III: Reducción Seguida de Oxidación
 - G.III.1. Bacterias
 - G.III.1(a). Período de vida de la Enzima intermediaria: Número de Recambio
 - G.III.1.(b). Requerimiento de Aldehído
 - G.III.1.(c). Inducción Fotoquímica de la Bioluminiscencia
 - G.III.1.(d). Propiedades de la Luciferasa Bacteriana: Aislamiento y Recombinación de Subunidades
 - G.III.2. Hongos
- II.H. Grupo IV: Peroxidación
- II.I. Grupo V : Sistemas Precargados
 - G.V.1. Dinoflagelados: Luminiscencia del "Destellador "

- G.V.2. Los Hidrozoarios y Los Ctenóforos
G.V.2(a). La Medusa: Una Proteína "Precargada"

C A P I T U L O III

FUNCION BIOQUIMICA DE LA BIOLUMINISCENCIA 100

C A P I T U L O IV

APLICACIONES 107

IV.A Determinación de algunos Iones metá-
licos mediante el Luminól

IV.A.1. Aparato

IV.A.2. Capacidad Analítica

IV.B. Determinación de algunos iones metá-
licos mediante la Lucigenina

IV.C. Riboflavina- H_2O_2

IV.D. Bioluminiscencia: Algunas Aplicacio-
nes

IV.D.1. Sistema bioluminiscente del Cocuyo y
Luciérnaga

IV.D.2. Sistema bioluminiscente Bacteriano

IV.D.3. Otros Sistemas Bioluminiscentes

CONCLUSIONES 122

NOMENCLATURA 127

BIBLIOGRAFIA 128

I N T R O D U C C I O N

La emisión de luz puede originarse en cualquier lugar en que un sistema sufra un cambio directo en su energía libre. La fuente de excitación original del sistema puede ser térmica, como en una lámpara incandescente; eléctrica, como en el chispazo de un relámpago;-- mecánica, como en el destello que acompaña la ruptura de un cristal de azúcar; o química, como en la fosforescencia.

A las reacciones luminiscentes cuya fuente de excitación es química, se les denomina reacciones quimioluminiscentes (1).

La quimioluminiscencia está íntimamente relacionada-- con el fenómeno fluorescente, puesto que ambos son -- procesos de emisión, sin embargo, la diferencia fundamental estriba en la formación del estado electrónicamente excitado, mientras que en el fenómeno fluorescente la excitación de las moléculas se logra mediante el suministro inicial de energía luminosa, en la quimioluminiscencia la obtención del estado electrónicamente excitado se logra mediante energía puramente química obtenida durante el transcurso de la reacción, ésta energía, al ser absorbida por un determinado número de moléculas, es emitida al final de la reacción como energía luminosa. O sea que es un proceso exoenergético en el que la energía en vez de manifestarse

en forma de calor, se manifiesta en forma de luz (2).

Cuando se descubrieron los primeros compuestos quimio luminiscentes, los investigadores creyeron encontrarse en el umbral de un nuevo tipo de procesos, pero -- con el advenimiento de la termodinámica, se dieron -- cuenta de que el fenómeno podía explicarse en base a procesos termodinámicos clásicos (3).

Existe un gran número de sustancias quimio luminiscentes, pero dentro de los compuestos orgánicos se encuentran los casos mas sobresalientes de emisión de luz brillante, además, el estudio de los compuestos orgánicos quimio luminiscentes ha servido para aclarar aspectos medulares de otro fenómeno no menos espectacular; la emisión de luz por un organismo: la bioluminiscencia.

Las reacciones bioluminiscentes son procesos quimio luminiscentes catalizados por una enzima (4).

La bioluminiscencia constituye un fenómeno muy interesante de la naturaleza, es luz sin calor; forma perfecta de alumbrado, es algo que el ingenio del hombre aún no puede lograr (5).

GENERALIDADES

La quimioluminiscencia y la bioluminiscencia se estudiaron, en un principio en forma separada, pero un rasgo fundamental de ambos fenómenos que sorprendía a los investigadores era que la emisión de luz no estaba acompañada de emisión perceptible de calor (6), por lo que ha sido costumbre, durante muchos años, describir a éstos procesos como emisión de "Luz Fría" para distinguirla de la luminiscencia térmica.

Aunque el estudio de la luminiscencia, tanto en sistemas vivos como en sustancias orgánicas, se realizó desde hace varios siglos, en realidad no fué sino hasta los últimos años del siglo XIX en que el fenómeno pudo ser asociado a una reacción química simple (3).

Las reacciones quimioluminiscentes son procesos en los que una molécula, capaz de fluorecer, es promovida a un estado electrónicamente excitados por medio de energía química. Si la reacción es acompañada por la emisión de luz visible ésta debe suministrar una energía de por lo menos 40-70 Kcal/mol. (7).

Las relaciones entre la naturaleza de un compuesto --

orgánico y su facultad para mostrar luminiscencia, -- están generalmente asociadas con su naturaleza y su facultad de mostrar el fenómeno fluorescente (8), -- por lo que se explicará someramente cómo se produce éste fenómeno.

La fluorescencia es una reacción iniciada fotoquímicamente, la fotoquímica estudia el efecto de la energía radiante en las reacciones químicas, así como -- las velocidades y mecanismos de las reacciones iniciadas por la acción de la luz (2).

Las reacciones térmicas se inician por la activación debida a las colisiones moleculares, como sabemos, -- la agitación térmica no es el único procedimiento -- mediante el cual la energía de los átomos y moléculas aumenta suficientemente para causar una reacción sino que los átomos y las moléculas pueden absorber radiación. La absorción de luz por un átomo o molécula conduce a su excitación, y si la activación es suficientemente grande puede originarse una reacción química.

La velocidad de las reacciones térmicas, sin catalizar y a una concentración fija, puede variar sólo -- por un cambio de temperatura. En las reacciones fotoquímicas la velocidad se modifica al variar la intensidad de la luz usada en la irradiación y el número de moléculas activadas depende de la intensidad de --

luz, la concentración de moléculas activadas será -- proporcional a la intensidad luminosa a que el reactivo se haya expuesto (9).

Cuando un átomo absorbe energía radiante, ésta, según su magnitud, puede ocasionar la ionización del átomo o producir la excitación electrónica. Un átomo electrónicamente excitado tiene un período de vida de unos 10^{-7} a 10^{-8} seg., si durante éste tiempo el átomo no sufre colisión con alguna otra partícula a la que pueda transferirle algo o toda su energía, se producirá una reemisión de ésta energía en forma parcial o total, a éste fenómeno se le conoce con el -- nombre de fluorescencia, cuando los electrones excitados regresan a su estado basal emitiendo una radiación de frecuencia igual a la absorbida, se obtiene una fluorescencia de resonancia (10). Generalmente -- la emisión cesa cuando se elimina la radiación incidente, sin embargo, en ocasiones la fluorescencia -- puede persistir algo más y entonces tenemos la fosforescencia, tanto la fluorescencia como la forforescencia tienen el mismo origen, pero la diferencia entre ambas radica en que en la última la emisión tiene lugar con más lentitud (II)

Las leyes de velocidad que siguen las reacciones fotoquímicas son generalmente más complejas que las seguidas por las reacciones térmicas.

Consideremos la reacción:

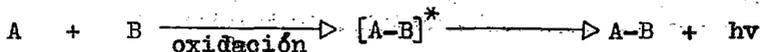


que procede por activación fotoquímica, supongamos - que la reacción prosigue por el mecanismo siguiente:

- a) $A_2 + hv \longrightarrow A_2^*$ (activación).
 b) $A_2^* \longrightarrow 2A + hv$ (disociación).
 c) $A_2^* + A_2 \longrightarrow 2A_2 + hv$ (desactivación).

La primera etapa en ésta secuencia es la absorción - de un cuanto de luz por A_2 , con la formación de una molécula activada que puede llevar a cabo una disociación, de acuerdo con la reacción (b), o puede desactivarse por colisión con otra molécula inactiva de A_2 , de acuerdo con (c), El producto final, A, se forma sólo en la reacción (b) (9).

Ahora, tomemos en cuenta la reacción:



(Reactivos)

(Producto
electrónicamente
excitado)

(Producto
en estado
basal.)

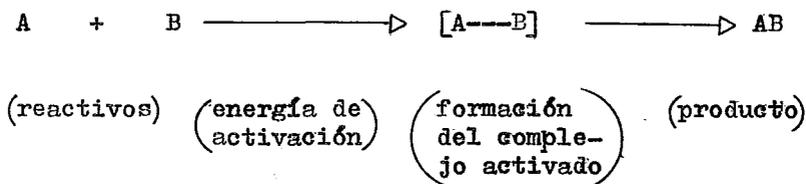
Como podemos ver, en las reacciones fotoquímicas se produce un cambio por absorción de luz. El proceso in

verso es la emisión de luz por un sistema a temperaturas ordinarias como resultado de una reacción química; como sucede en la quimioluminiscencia y en la bioluminiscencia.

I.- Quimioluminiscencia: Generalidades

Para que una reacción se efectúe, debe de suministrarse a los reactivos una energía suficiente para que sean capaces de activarse y por consiguiente transformarse en el producto o los productos de reacción (2).

Podemos representar la reacción de la molécula A con la molécula B para dar el nuevo producto AB, mediante la siguiente ecuación:



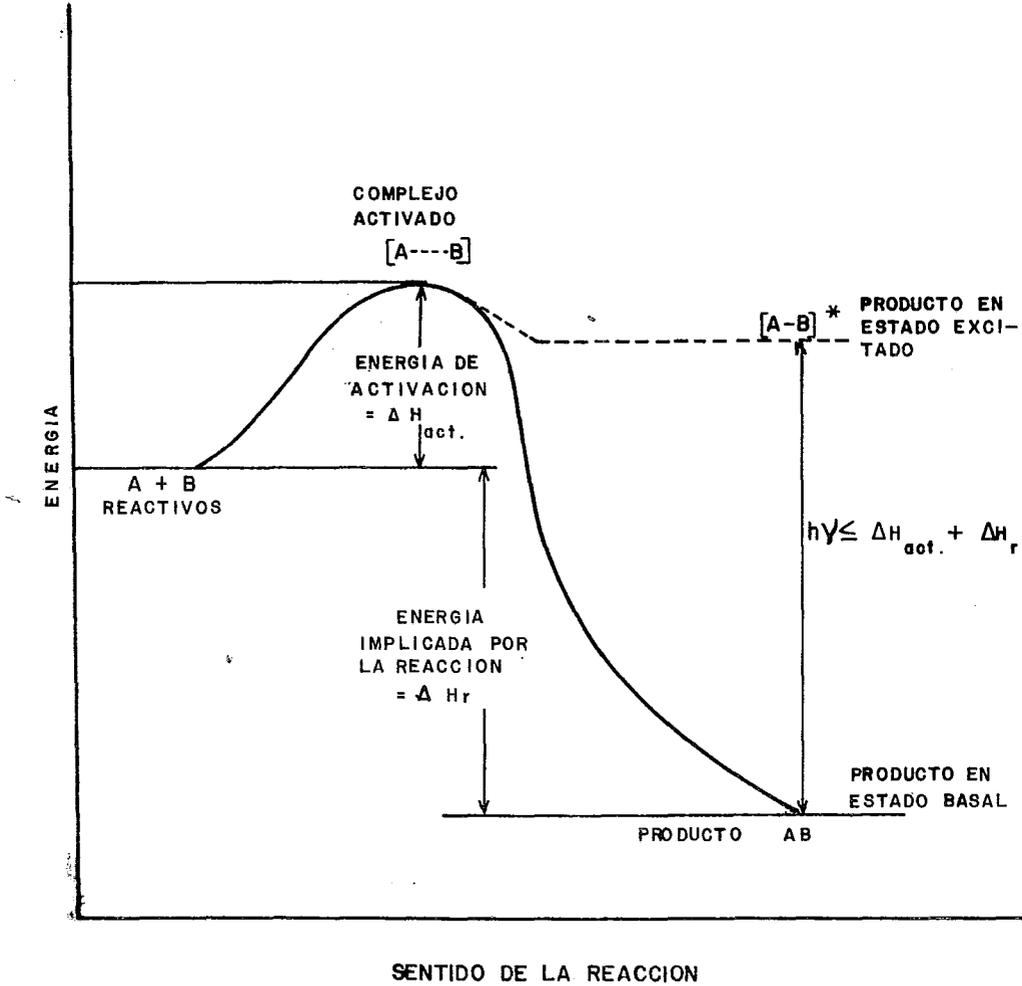
Las relaciones de energía involucradas en la reacción se representan en la figura 1 .

La energía que debe ser adquirida por los reactivos al irse formando el complejo activado se llama energía de activación (9).

En las reacciones quimioluminiscentes la emisión de

FIGURA 1

RELACIONES DE ENERGIA INVOLUCRADAS EN UNA REACCION QUIMICA



luz es causada por un producto molecular formado en un estado electrónicamente excitado. La emisión de la radiación ocurre cuando ésta molécula, que no es necesariamente un producto directo de la reacción, regresa a su estado basal(9).

Se considera que el estado excitado va surgiendo en el lado opuesto del proceso (representado por la línea punteada en la figura 1), probablemente a partir de una energía altamente vibracional obtenida al avanzar la reacción hacia el producto final. En otras palabras, parte de la energía involucrada durante la transición de complejo activado a producto final se ocupa en trasladar un determinado número de moléculas hacia el estado electrónicamente excitado (3). Se desconoce si el proceso de equilibrio entre las moléculas del estado basal vibracionalmente excitadas y el estado electrónicamente excitado puede afectar la eficiencia de la reacción luminiscente.

La importancia de la formación de los productos por un mecanismo concertado ha sido subrayada por la relación exacta entre la entalpia de la reacción (ΔH_r) y la energía de radiación ($h\nu$), lógicamente no se incluye a $h\nu$ en la energía de activación (4).

El producto excitado puede indentificarse demostrando que el espectro de emisión en la reacción quimio luminiscente es igual o comparable con el espectro de fluorescencia obtenido a partir del producto --

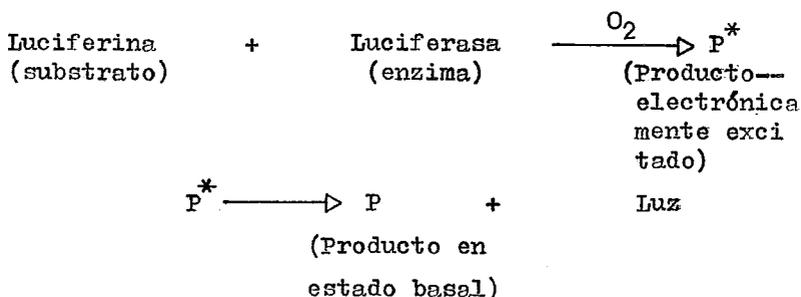
aislado puro (12).

II.- Bioluminiscencia: Generalidades

La capacidad de emitir luz por ciertos organismos, se debe a que poseen una enzima, llamada luciferasa, que actúa sobre un sustrato; la luciferina. Este sistema enzima sustrato tiene la propiedad de crear estados electrónicamente excitados, cuya desactivación produce energía luminosa.

La bioluminiscencia, por tratarse de un proceso quimioluminiscente catalizado por una enzima, tiene un rendimiento cercano al 100 % en la producción de luz (13).

La reacción bioquímica que da como resultado la emisión de luz por un organismo puede escribirse, en forma general, de la manera siguiente:



La obtención de luciferina en forma pura ha permitido determinar la eficacia del proceso emisor de luz, para ello se comparó el número de moléculas de luci-

ferina oxidadas con el número de cuantos de luz producidos, resultó que por cada molécula de luciferina consumida se emite un cuanto de luz (14).

La bioluminiscencia no sólo ofrece interés por sí misma, sino que nos proporciona un medio muy preciso para el estudio de otros procesos biológicos, ya que la intensidad de luz producida es una evidencia directa de un tipo de reacciones que es común en cierta clase de procesos vivos.

C A P I T U L O I

QUIMIOLUMINISCENCIA DE COMPUESTOS ORGANICOS

La mayoría de los compuestos orgánicos quimioluminiscentes se descubrieron de una forma fortuita, durante algún tiempo se conocieron únicamente tres compuestos eficaces en la emisión de la luz; La lofina --- (II), el Luminol (I) y la Lucigenina (III) (15)

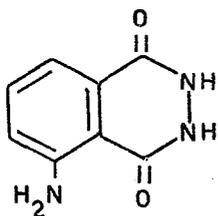
Radziszewski, en 1877, demostró que la Lofina (II)-reaccionaba con oxígeno en solución alcohólica de --- KOH emitiendo luz. Este investigador encontró que un gran número de compuestos orgánicos presentaba ésta-propiedad.

No se conocía el mecanismo de emisión de la luz, de modo que resurgió el interés por estos compuestos ca sí al mismo tiempo de establecerse la estructura de la primera luciferina. Pronto resultó factible idear modelos de compuestos tales como M, (esq.2) que se encuentran entre las sustancias quimioluminiscentes más brillantes. (16).

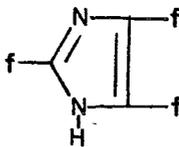
El esquema 2 muestra un bosquejo de un mecanismo en el que interviene como intermediario un peróxido.(17) Desde el descubrimiento del Luminol (I) en 1928, los estudios y trabajos en éste campo han tenido gran -- auge, en la actualidad son muchas las investigacio--

ESQUEMA. N.º I

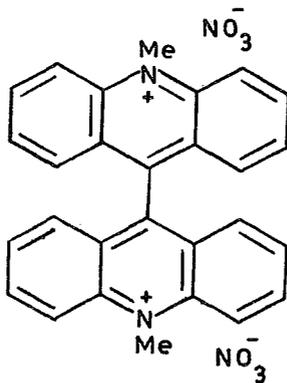
PRIMEROS COMPUESTOS LUMINISCENTES CONOCIDOS



(I)
LUMINOL



(II)
LOFINA



(III)
LUCIGENINA

nes en torno a nuevas sustancias quimioluminiscentes-
(18).

I.A. Clasificación.

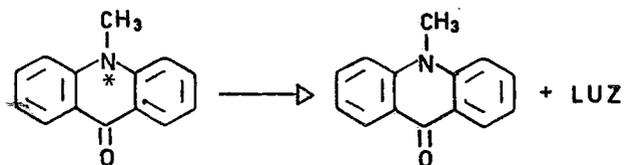
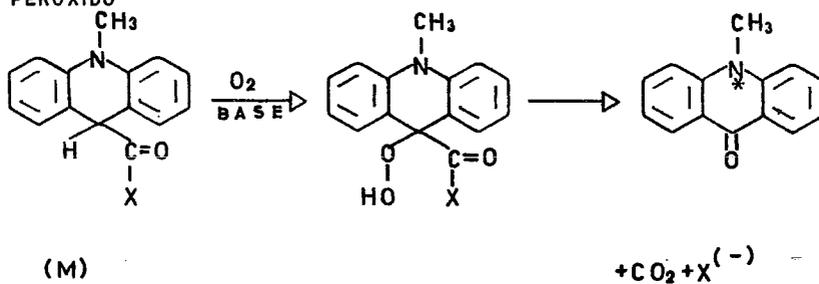
Todos los compuestos orgánicos quimioluminiscentes conocidos pueden clasificarse en tres grupos: a) Grupo - del Luminol, en el que se produce descomposición de - peróxidos, como por ejemplo la Lofina (II) y la Lucigenina (III); b) Reacciones de Transferencia de Electrones, como sucede en el difenilantracenuro de sodio y c) Formación de Oxígeno Excitado, como en el caso - del Pirogalol y algunos polifenoles. (esq.3).

I.B. Mecanismo de la Quimioluminiscencia.

La mayor parte de las reacciones exotérmicas conducen a la formación de estados electrónicamente excitados- que terminan por liberar su energía en forma de calor para que la Luminiscencia ocurra es necesario que X - sea un buen grupo saliente (esq. 2), y que XII sea un ácido más fuerte que el peróxido de hidrógeno el resultado de ésto es la formación de una dioxo etanona- (estructura N, esquema 3), proponiéndose que los dioxoetanos tienen la estructura adecuada para formar es- tados electrónicamente excitados (19). Se ha demostra- do que los dioxoetanos sencillos (P Y R, esq. 3) forman, al descomponerse, compuestos carbonilo electrónicamente excitados. (20).

ESQUEMA Nº 2

MECANISMO EN EL QUE INTERVIENE COMO INTERMEDIARIO UN —
PEROXIDO



En el sistema oxalato (S, esq.3) se produce la transferencia de la energía de un compuesto fluorescente formando éste último durante la reacción, también se han hecho estudios adicionando previamente el compuesto fluorescente, llegando a las mismas conclusiones (21).

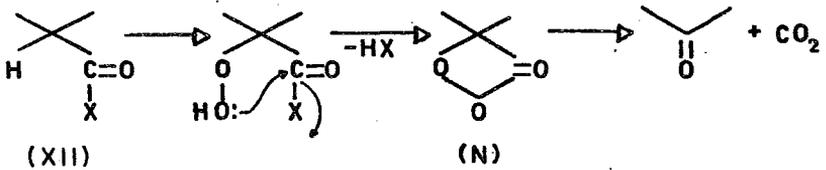
I.C. Luminól.

A pesar de que existen compuestos que muestran mayor luminiscencia que el Luminol, éste fué el primer compuesto quimioluminiscente que se estudió de una manera formal. El Luminol, ó 5-amino-2, 3-dihidroftalazina-1, 4 díona, fué reportado por primera vez en 1928 por Albrecht (3,18). Este compuesto debe estar en solución acuosa alcalina, en presencia de peróxido de hidrógeno y un catalizador como el ferricianuro de potasio; para que sea capaz de realizar una emisión máxima de luz (22). Su espectro muestra una banda λ a $424 \text{ m}\mu$ (23).

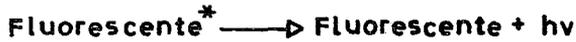
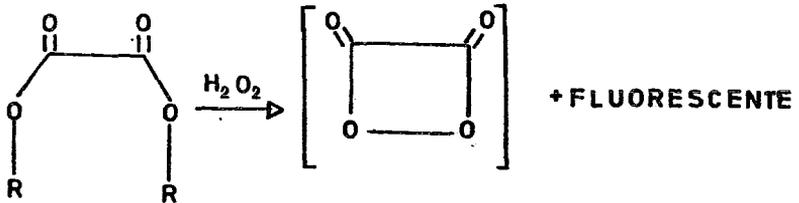
Se ha destruido a través de varios estudios en relación a derivados del Luminol, que los substituyentes electrodonadores generalmente aumentan la intensidad de la emisión de la luz, mientras que grupos aceptores substituidos en el anillo bencénico, producen el efecto contrario (24). Varios derivados como (IV) y (V) son más eficientes en la emisión de luz que el Luminol, éste aumento es de 30 % y 300 % respectivamente (25.26) (esq. 4).

ESQUEMA 3

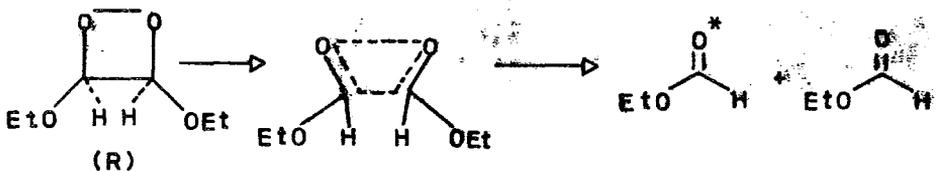
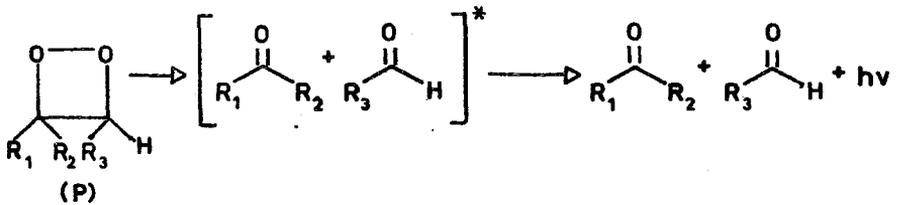
a) DESCOMPOSICION DE PEROXIDOS



b) REACCIONES DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES



c) FORMACION DE OXIGENO EXCITADO



Algunos substituyentes en el anillo heterocíclico -- (como VI y VII) (27) , o un cambio de posición de -- los heteroátomos (como VIII y IX), es suficiente -- para impedir la quimioluminiscencia (28) (esq.4).

La reacción también puede ser inhibida por quinol, -- fenoles y por el ión cianuro (29), por otro lado puede ser aumentada por agentes inorgánicos oxidantes -- como compuestos que contengan Fe (III) o Cu (II).

Si en lugar de peróxido de hidrógeno se emplea peróxido de benzoilo, también se produce un aumento en -- la quimioluminiscencia (3).

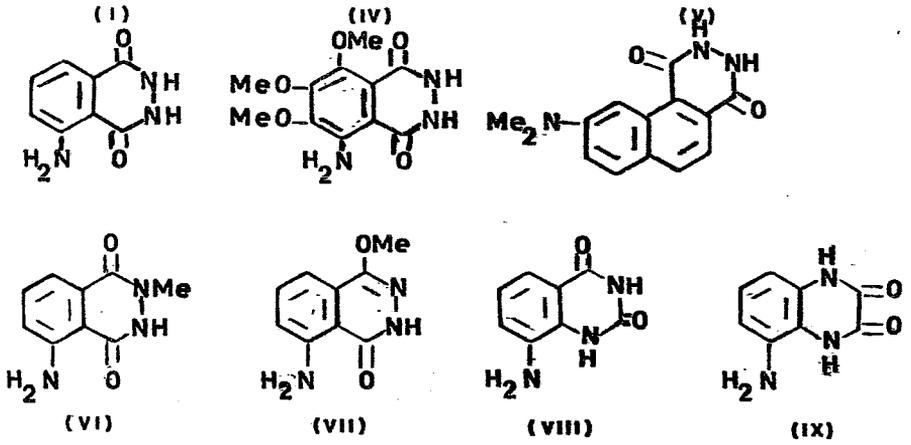
Existían muchas dudas acerca del mecanismo de emisión de luz, pero utilizando sulfóxido de dimetilo -- como disolvente y un exceso de NaOH, se logró aislar casi como único producto el ácido 3-aminoftálico.

Posteriormente se repitió el experimento en las mismas condiciones, pero al añadir una corriente de -- O_2 ¹⁸ se encontró que éste se incorporaba cuantitativamente en el ión aminoftalato (25) demostrando que éste ión es el responsable de la emisión de luz.

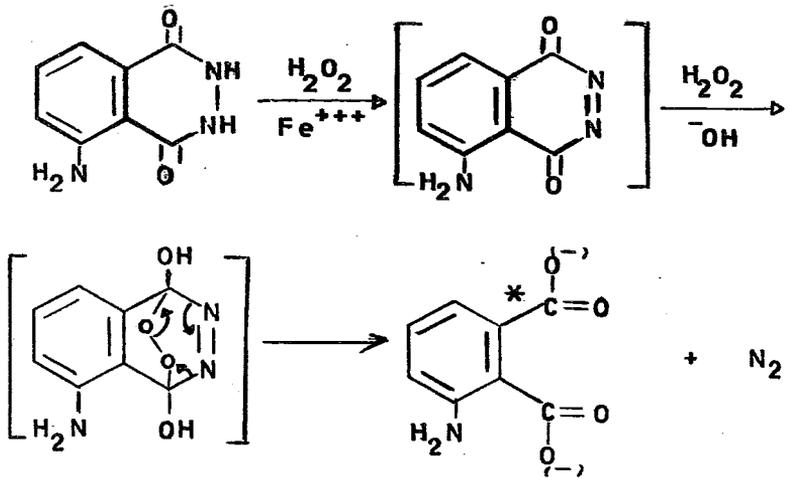
Otro hecho que demuestra esto es que la Q_{cl} del ión aminoftalato en sulfóxido de dimetilo es de 485 m μ , y su Q_f , en el mismo disolvente es de 440-500 m μ .--

ESQUEMA N.º 4

ALGUNOS DERIVADOS DEL LUMINOL



MECANISMO



Se han realizaso varios experimentos similares, pero todos coinciden en que el ión aminoftalato es la -- única molécula emisora durante el paso productor de luz (30), además, se ha comprobado que el dianión -- del ácido ftálico carece de fluorescencia visible -- (31).

I.D. Lofina.

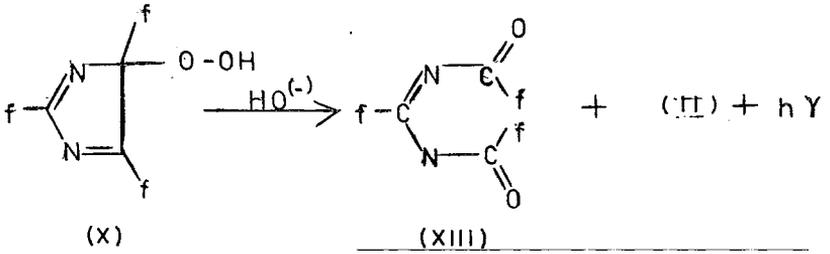
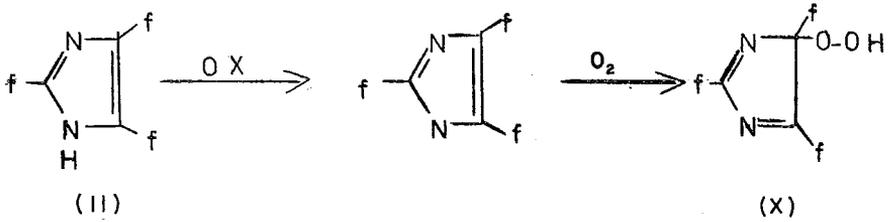
La Lofina es el 2, 2, 5-trifenilimidazol (II), fué -- el primer compuesto quimioluminiscente que se aisló -- en forma pura. La oxidación directa de éste compues- to, usando una base fuerte en presencia de oxígeno -- dá como resultado la emisión de una luz amarilla -- (500 m μ) (3).

La luminiscencia de la Lofina está asociada con la -- formación de un radical libre inestable de color púr -- pura, éste radical reacciona con oxígeno para formar un peróxido aislable (X), la adición de una base co- mo único reactivo a este peróxido, dá como resultado la emisión de luz a 530 m μ (32) (esq. 5). Este peró- xido se ha preparado independientemente y emite una- luz más intensa que la emitida por la Lofina en sí -- cuando es tratada en condiciones similares (33).

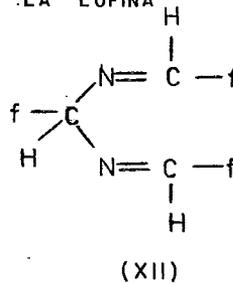
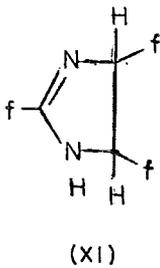
El dihidro derivado, el amarino (XI), es también qui -- mioluminiscente y se oxida con mucha facilidad pro- duciendo la lofina. La hidrobencamida (XII), aunque-

ESQUEMA N° 5

MECANISMO LUMINISCENTE DE LA LOFINA



ALGUNOS DERIVADOS DE LA LOFINA



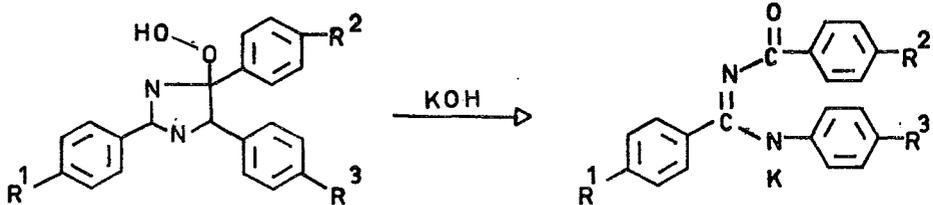
no es cíclica, tiene una estructura similar y el fenómeno puede asociarse con la formación de un radical por la extracción de un átomo de hidrógeno (3).

Los productos principales de la descomposición en condiciones adecuadas del peróxido (X), son la lofina (II) y la dibenzoilbenzamida (XIII) (esq.5). Aún no se ha esclarecido si la eliminación del oxígeno es suficientemente exotérmica como para provocar la emisión de la luz observada ($530\text{m}\mu$), de tal manera que la formación de la lofina en estado excitado queda descartada (4), por otro lado, la dibenzoilbenzamida (XIII) tiene una fluorescencia muy débil en soluciones alcalinas y se ha demostrado que fluoresce a longitudes de onda considerablemente más cortas que a $530\text{m}\mu$ (3). Por lo que la naturaleza exacta del emisor, y por ende del mecanismo, se desconoce hasta el momento (3). Sin embargo ciertos derivados de la lofina muestran una relación satisfactoria en sus longitudes de onda entre la fluorescencia de la sal de la dibenzoilbenzamida formada en la reacción y su quimioluminiscencia (34) (esq.6).

La fluorescencia de (XVa) y la quimioluminiscencia de (XIVa) tienen un máximo a $491\text{m}\mu$. ($2 \times 10^{-3}\text{M}$), y el espectro correspondiente a las estructuras (XVb) y (XIVb), tienen un máximo de $485\text{m}\mu$ a la misma concentración. Como sucede en el luminol (I), la

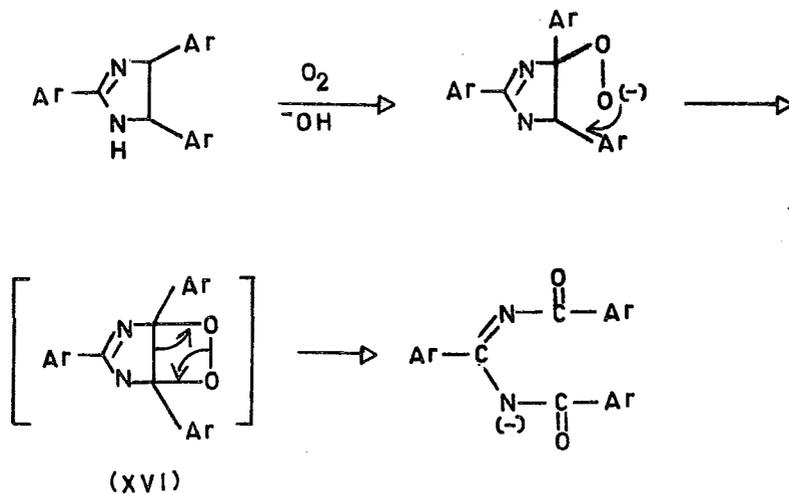
ESQUEMA 6

FORMACION DE INTERMEDIARIOS LUMINISCENTES
EN ALGUNOS DERIVADOS DE LA LOFINA



(XIV a: $R^1 = \text{NMe}_2, R^2 = R^3 = \text{H}$) (XV a: $R^1 = \text{NMe}_2, R^2 = R^3 = \text{H}$)

(XIVb: $R^1 = \text{NMe}_2, R^2 = R^3 = \text{OMe}$) (XVb: $R^1 = \text{NMe}_2, R^2 = R^3 = \text{OMe}$)



intensidad de la luz es directamente proporcional a la concentración de Lofina (II) substituída, y la oxidación (en éste caso se ha demostrado que es una peroxidación) es el paso lento de la reacción (3) . Se ha propuesto que el mecanismo ocurre vía el intermediario (XVI) (esq.6).

Las intensidades relativas emitidas por una serie similar de lofinas substituídas (35) dan una relación-lineal de $\log I/I_0$ contra σ , endonde I es la intensidad observada del derivado, I_0 es la intensidad de la oxidación de la lofina, σ es la constante de substitución de Hammett. Se cree que la relación es debida a la velocidad de oxidación (formación de Peróxido) o bien el aumento de la luminiscencia que es debido a la formación de intermediarios fluorescentes- muy inestables (3).

Se ha propuesto que la discrepancia entre los dos -- resultados de ambas investigaciones es debida al empleo de disolventes diferentes (etanol y sulfóxido - de dimetilo).

Otra serie importante de peróxidos que tambien son - quimioluminiscentes, son los indoles-3 y -1 hidroperoxídidos (36) (XVII). Se ha demostrado que éstos compuestos emiten luz cuando son calentados, o cuando - son tratados con terbutóxido de potásio en sulfóxido de dimetilo.

La reacción bajo éstas condiciones sólo da los productos mostrados en el esquema 7, el anión amida (formado en gran cantidad) es el producto electrónicamente excitado (3). Por ejemplo, la quimioluminiscencia de (XVIIa) y la fluorescencia de anión amida correspondiente, tienen ambos un máximo de 518m μ ; (XVIIb) da una luz con un máximo a 495 m μ , nuevamente idénticos al de la fluorescencia de su anión amida correspondiente (36).

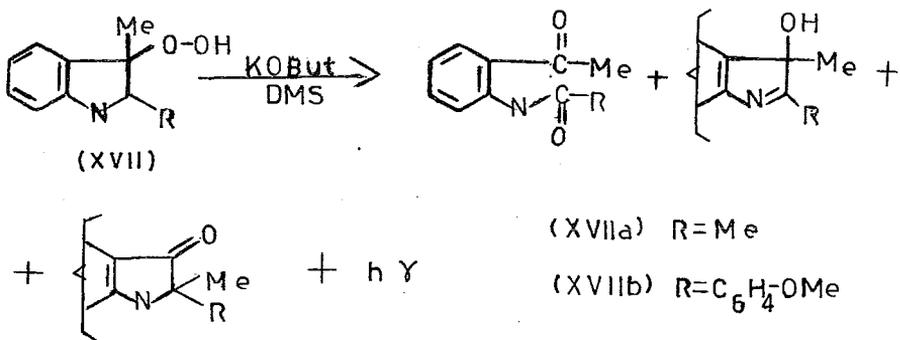
Este último grupo de peróxidos es de gran importancia, no sólo por el hecho de ser quimioluminiscentes sino porque se ha demostrado que la luciferina aislada de un organismo bioluminiscente llamado "Renilla reniformes", posee en su estructura un grupo indólico (6). Por otro lado, los indoles simples también presentan el fenómeno quimioluminiscente cuando son oxidados en solución básica, una reacción que involucra a los indolen-3 y -1 hidroperóxidos (37).

I.E. Lucigenina.

Este compuesto fué reportado por primera vez en 1935 es de una eficiencia comparable con la del luminol y por lo tanto ha recibido mucha atención, la Lucigenina es el dinitrado de NN'-dimetil-9, 9'-biacridinio (III), que emite una luz azul-verde en la oxidación con peróxido de hidrógeno en solución alcalina (3). Los primeros trabajos propusieron un mecanismo-

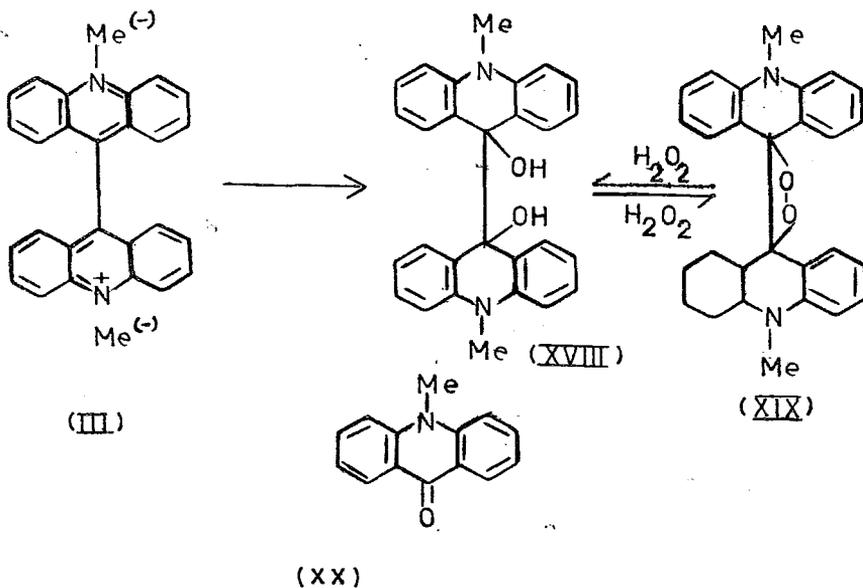
ESQUEMA N.º 7

REACCION LUMINISCENTE DE LOS -3 y -1 HIDROPEROXIDOS



ESQUEMA N.º 8

FORMACION DE LA N-METILACRIDONA (XX)



basado en la oxidación del carbinol (XVIII), sin embargo, la reacción propuesta para el paso emisor de luz no podía producir la energía de excitación observada (4) (esq.8).

Cuando se identificaron los productos de reacción, - los investigadores no tomaron en cuenta la formación de la N-metilacridona (XX), la consideraban un producto secundario. Pensaban que el paso principal en la emisión de luz era de (XIX) a (XVIII), en las investigaciones posteriores usando soluciones alcalinas - diluidas entre 40-50° C, se observó una emisión azul cuyo espectro correspondió exactamente con el espectro fluorescente de la N-metilacridona (32). También se demostró que la Lucigenina tiene una fluorescencia máxima de color verde a 18° C, usando solución - alcalina de mayor concentración. La identificación - de la N-metilacridona como la molécula principal - - emisora de luz se ha comprobado por varios métodos - (38), por lo que éstos compuestos se han estudiado - independientemente de la lucigenina en sí.

Se ha demostrado que el mecanismo opera por transferencia de energía, una forma sencilla de comprobarlo consiste en adicionar fluoresceína a una solución -- alcalina diluida que contenga únicamente N-metilacridona y observaremos que la luz emitida por éste compuesto al oxidarse es absorbida por la fluoresceína - para efectuar su fenómeno fluorescente, el color de-

la luz emitida por todo el sistema es azul-amarilla-
(3).

En la reacción de la lucigenina mostrada en el esq.-
8, ocurre una transferencia de energía es decir, uno
de los productos de reacción (la N-metilacridona) su-
fre una quimioluminiscencia, la emisión de luz es --
absorbida por otro de los productos de reacción (el
peróxido XIX) para fluorescer y pasar a la estructu-
ra (XVIII).

Una gran variedad de substancias, tales como el gli-
cerol, los glicoles, urea, ácido ascórbico, y los --
alcoholes alifáticos aumentan la intensidad de la --
luz observada. La piperidina, la piridina, el hidró-
xido de amonio y el tetróxido de Osmio; provocan un-
efecto más pronunciado (39,40).

La lucigenina en solución acuosa, en presencia de --
agentes reductores emite luz en contacto con el oxí-
geno atmosférico, su reacción quimioluminiscente es--
muy sensible al peróxido de hidrógeno, la sola pre--
sencia de huellas de éste compuesto es suficiente pa
ra excitar a la molécula (41).

Se ha descrito una serie de sales de acridinio que --
son quimioluminiscentes en presencia de soluciones --
alcalinas de peróxido de hidrógeno, dando reacciones
que esten libres de cualquier color o cualquier otra

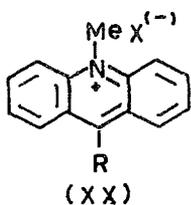
fluorescencia que no sea la de la N-metilacridona -- lo que permite una identificación inequívoca de la N-metilacridona como el único producto excitado (36). El mecanismo tanto para la lucigenina como para algunos de sus derivados se muestra en el esquema 9.

Los compuestos (XXa) y (XXb) emiten una luz de una brillantez comparable con la de la lucigenina, el orden de intensidad de la luz emitida por los compuestos está listado en forma descendente en el esquema 9, en donde los compuestos (XXf) y (XXg) ya no son quimioluminiscentes. La substitución del grupo fenilo en el compuesto (XXb), tanto por grupos aceptores de electrones como por grupos electro-donadores, da como resultado velocidades de reacción diferentes, confirmando así que el ataque del ión peróxido sobre el grupo carbonilo está asociado con la emisión de luz (42).

Los intermediarios en ambas clases de sales de acridinio involucran un peróxido de cuatro miembros, se ha demostrado que la brillantez de éstos compuestos es causada por la ruptura del enlace peróxido (42a).

A principios de la década pasada se descubrió la reacción quimioluminiscente entre el cloruro oxálico y el peróxido de hidrógeno, a raíz de esto se demostró que un gran número de peróxidos de acilo emiten luz al descomponerse, los miembros alifáticos de ésta --

ESQUEMA 9



a) $R = \text{COCl}$

e) $R = \text{CO}_2\text{Me}$

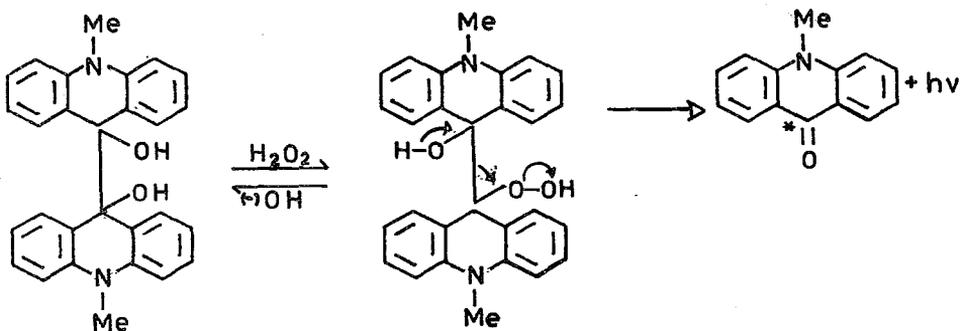
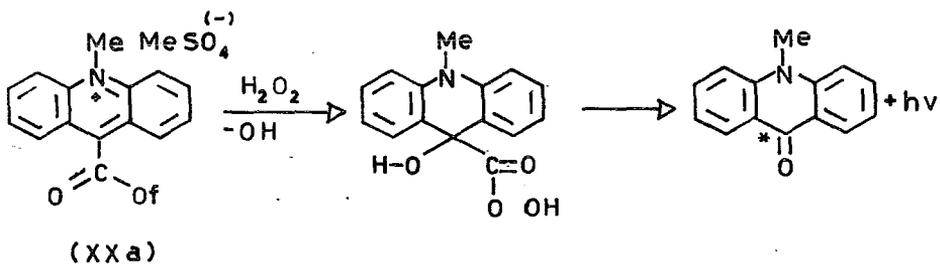
b) $R = \text{CO}_2\text{f}$

f) $R = \text{CONH}_2$

c) $R = \text{CN}$

g) $R = \text{CO}_2\text{H}$

d) $R = \text{COf}$



ALGUNOS DERIVADOS Y MECANISMO LUMINISCENTE DE LA LUCIGENINA

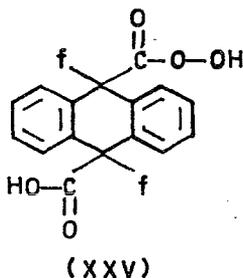
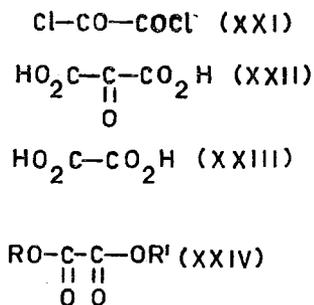
clase de compuestos no son quimioluminiscentes (43).

Por ejemplo, el 9,10-difenilantraceno, un cloruro de ácido, como (XXI), en presencia de peróxido de hidrógeno; ó bien, 9,10-difenilantraceno, ácidos como (XXII) ó (XXIII), con dicitclohexilcarbo-di-imida y peróxido de hidrógeno, emiten una luz característica de la fluorescencia del difenilantraceno (esq.10) -- (3).

El empleo de hidroperóxido de ter-butilo en vez de (XXI), (XXII) ó (XXIII) provoca un aumento en la quimioluminiscencia del sistema. Se ha comprobado que un peróxido de acilo como (XXIV, R=H, R'=H ó ter-butilo) es formado "in situ", la vía mecanística para una descomposición quimioluminiscente se muestra en el esquema 11, subrayando que estas reacciones proceden de una manera concertada. Por lo que resulta difícil hacer una distinción entre la transferencia de energía directamente de una molécula excitada de CO₂, y la descomposición de un complejo del peróxido de acilo y la molécula aceptora de energía. Sin embargo, existen evidencias para demostrar una emisión quimioluminiscente a partir de CO₂ excitado en forma gaseosa (12).

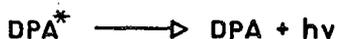
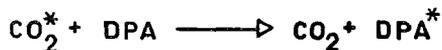
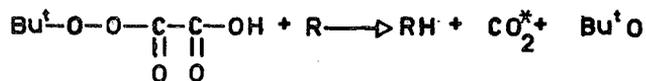
Cuando se emplean compuestos del tipo (XXIV, R=Me, Et, tBu; R'= H ó ter-butilo), la luminiscencia observada es despreciable. La descomposición del peróxi-

ESQUEMA 10
PEROXIDOS DE ACILO QUE AL DESCOMPONERSE
EMITEN LUZ



ESQUEMA 11

DESCOMPOSICION QUIMIOLUMINISCENTE DE
UN PEROXIDO DE ACILO



do de acilo (XXV), preparado a partir del correspondiente anhídrido, es también quimioluminiscente (3).

El cloruro de ácido, cloruro de 9-clorocarbonil-10-metilacridinio (XXa), fué descubierto independientemente y han sido objeto de estudios muy detallados. Se ha comprobado que su reacción quimioluminiscente es de una producción de cuantos de 1.1%, por lo tanto, tiene una brillantez mayor que la del Luminol (42). El mecanismo propuesto es igual al que se muestra en el esquema 9.

I.F. Quimioluminiscencia de iones de Radicales Aromáticos.

Otro tipo importante de procesos quimioluminiscentes en solución lo constituyen las reacciones que involucran el movimiento de electrones de un radical aniónico, o la adición de un electrón a un radical catiónico, durante la formación del estado excitado del hidrocarburo principal (44). Por ejemplo, el 9, 10-difenilantraceno de sodio puede ser oxidado a antraceno mediante un gran número de aceptores de electrones. Cuando se adiciona cloro o bromo a una solución del radical aniónico, de color oscuro en tetrahidrofurano, da una solución clara de 9, 10-difenilantraceno (DFA) y la luz correspondiente de su fluorescencia, el iodo no provoca este efecto (45). El cloruro de oxalil, el peróxido de -

benzoilo, el dióxido de nitrógeno, el ion cérico y -- ciertos tetracetatos también son efectivos, pero no -- así el oxígeno. Cuando se usa iodo y oxígeno la ener -- gía es insuficiente porque probablemente ésta se -- ocupa sólo en la oxidación (3,46).

un gran número de hidrocarburos aromáticos policíclic -- os cuando son tratados con naftalenuro de sodio, -- dan el radical anionico correspondiente, el cual emi -- te luz al oxidarse. El 9,10-dicloro-9,10-difenil an -- traceno (XXVI) puede ser considerado un agente oxi -- dante en éstos términos, y una mezcla de soluciones -- éste compuesto y de DFA emite luz (47).

A éste fenómeno se le conoce particularmente como -- luminiscencia de recombinación foto-inducida y ha si -- do estudiado principalmente en procesos que involu -- cran la reacción de un radical aniónico con su corres -- pondiente radical catiónico (45). En el fenómeno de -- recombinación, la radiación traslada un electrón de -- una molécula orgánica a bajas temperaturas, al efec -- tuarse la emisión fluorescente, el sistema es calen -- tado, pero la transferencia de un electrón del orbi -- tal de alto enlace del radical aniónico a un agente -- oxidante crea una molécula en estado excitado. El re -- greso del electrón previamente adicionado (necesaria -- mente en un orbital de antienlace) al orbital vacío -- del estado basal provoca un aumento en la quimiolumi -- niscencia observada. El mecanismo propuesto para el --

caso del peróxido de benzoilo (PBO) y el difenilantracenuro de sodio se muestra en el esquema 12 (48).

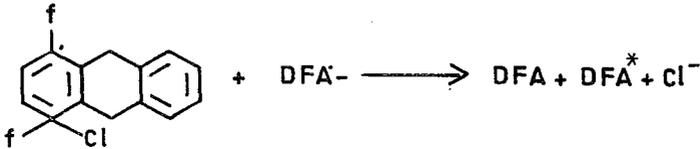
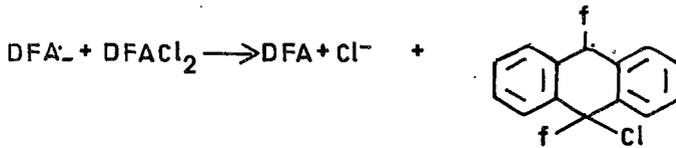
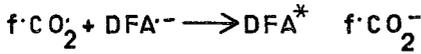
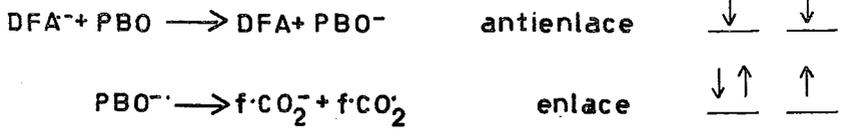
La reacción análoga realizada entre el cetil derivado de la N-metil-acridona (NMA) (XXVII) y el peróxido de benzoilo, usando cloruro de p-toluen sulfonilo como aceptor de electrones, se muestra en el esqu. 13 (45).

Para la formación de un producto en estado excitado se espera la generación de un catión del radical $Ar^{\bullet+}$ en la presencia de un anión del radical $Ar^{\bullet-}$, ambos por el movimiento de un electrón del orbital de alto enlace de $Ar^{\bullet-}$ o bien por la adición de un electrón a un orbital de antienlace de $Ar^{\bullet+}$ (3).

La electrólisis de soluciones de antraceno, rubreno, perileno y de hidrocarburos policíclicos relacionados con los compuestos anteriores, en acetonitrilo ó dimetilformanida y en presencia de un electrolito soporte, dan un aumento en la luminiscencia del cátodo (49). El color de la luz es igual al de la fluorescencia del hidrocarburo estudiado, la relación se efectúa en el cuerpo de la solución y no en la superficie del electrodo (46). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



ESQUEMA No.12
 MECANISMO LUMINISCENTE PARA EL PEROXIDO DE BENZOILO



Se ha establecido un período de vida, relativamente corto, de 10 segundos para $\text{Ar}^{(+)}$; mientras que el anión $\text{Ar}^{(-)}$ es muy estable (44.45).

Los investigadores se preguntaban si la luminiscencia era un resultado específico de la reacción $\text{Ar}^{(+)} + \text{Ar}^{(-)}$, o si la reducción y la oxidación se realizaron en forma independiente. Estudios posteriores realizados con sistemas electrolíticos que permiten la rápida inversión de la polaridad de los electrodos, lograron medir el potencial de generación y el potencial de oxidación de un proceso luminiscente de éste tipo. Por ejemplo, para el rubrenol el potencial de generación de $\text{R}^{(-)}$ es $E_{1/2} - 1.37 \text{ V.}$, y para $\text{R}^{(+)}$ es $E_{1/2} + 0.91 \text{ V.}$

Durante la inversión de la polaridad el $\text{R}^{(-)}$ preformado es oxidado aproximadamente a $+0.5\text{V.}$ que es el potencial de generación de $\text{R}^{(+)}$, demostrando que la reacción $\text{R}^{(-)} - e \longrightarrow \text{R}^*$ es luminiscente.

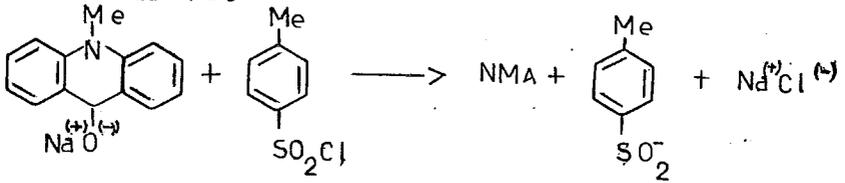
Similarmente la electroreducción de $\text{R}^{(+)}$ a -0.9 V. produce luz, resultando ésta última despreciable frente a la emitida durante la oxidación (50).

I.G. Porfirinas

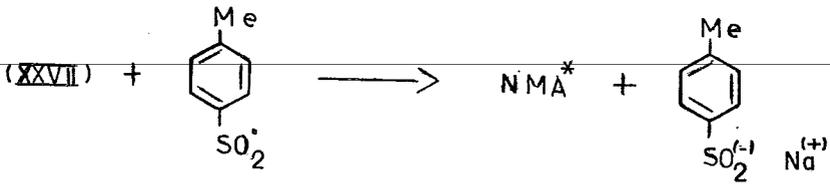
La descomposición de peróxidos orgánicos tales como el hidroperóxido de tetralina, en la presencia de --

ESQUEMA N.º 13

REACCION ENTRE EL CETIL DERIVADO DE LA NMA —
Y EL PBO



(XXVI)



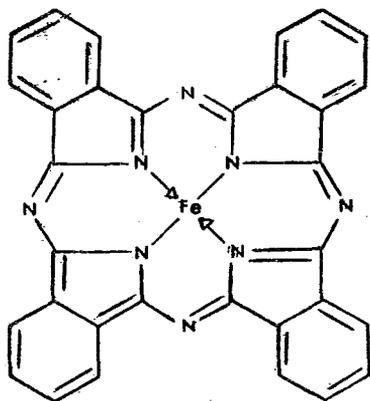
porfirinas y ftalocianinas metálicas, dan como resultado la emisión de luz del mismo color que el de la fluorescencia de la Porfirina (51). La ftalocianina de Fe (XXVIII) cataliza la descomposición exotérmica del hidroperóxido de tetralina a temperatura ambiente con la emisión de la luz, pero generalmente, se requieren altas temperaturas cuando la reacción se efectúa en un solvente inerte, como por ejemplo tolueno destilado. Los productos principales de estas reacciones son la tetralona y la ftalimida. Se ha demostrado que la ftalocianina de berilio es la más brillante (52). Los estudios de la tetrafenilporfina de zinc (ZnTPP) establecen que la luz emitida corresponde a la fluorescencia de la metalofosfirina y confirman que se requiere un metal para la emisión de luz. El mecanismo propuesto se muestra en el esquema 15 (3).

El producto de transferencia de carga es reducido -- por un radical libre formado durante la reacción, o por el peróxido en sí, siendo considerado un proceso en cadena. El aceptor de electrones en el último paso del proceso entra a un estado excitado antes que a un estado basal, siendo un resultado similar discutido anteriormente para los hidrocarburos policíclicos.

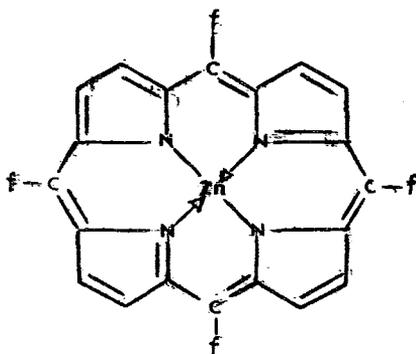
Los procesos quimioluminiscentes de éste grupo involucran reacciones de transferencia de electrones, --

ESQUEMA 14

ALGUNAS FTALOCIANINAS METALICAS QUE AL DESCOMPONERSE
EMITEN LUZ



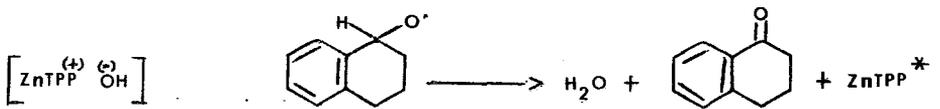
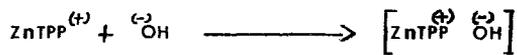
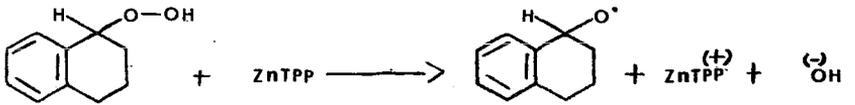
(XXV|III)



(XXIX)

ESQUEMA 15

MECANISMO LUMINISCENTE DE LA Zn TPP



puesto que la conservación de energía aunada con la velocidad de dicha transferencia es un resultado más probable en un estado electrónicamente excitado que en un estado basal vibracionalmente excitado (45).

I.H. Pirogalol

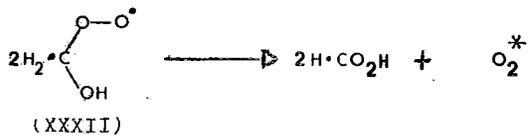
La oxidación del pirogalol en solución alcalina, con la emisión de luz, fué observada desde hace 60 años (18); pero en los últimos años se han propuesto argumentos convincentes en relación a la causa de la luz observada. En el sistema estudiado se ha identificado una banda cerca de 630 m μ como parte del oxígeno excitado (3).

Cuando se mezclan pirogalol, carbonato de potasio y formaldehído, la intensidad de la luz producida es aumentada considerablemente, a esta reacción se le conoce con el nombre de "reacción de Trautz-Schorigin". En el mecanismo de reacción se propone la descomposición de un peróxido intermediario, con la formación de oxígeno en estado excitado por la colisión de dos radicales (Esquema 16)(4).

El papel del pirogalol no ha sido totalmente aclarado, aunque es obvio que está involucrado en la formación del radical (3). Otros polifenoles también son quimioluminiscentes cuando reaccionan en condiciones similares, usando ozono como oxidante (53).

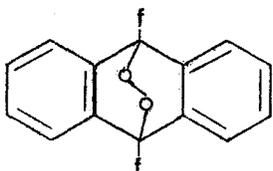
ESQUEMA 16

FORMACION DE O₂ EXCITADO A PARTIR DE UN PEROXIDO

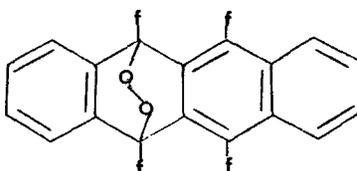


ESQUEMA 17

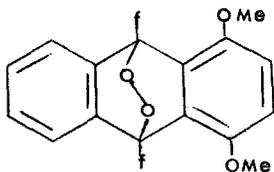
ALGUNOS ENDOPEROXIDOS LUMINISCENTES



(XXXIII)



(XXXIV)



(XXXV)

I.I. Endoperóxidos Aromáticos

Varios hidrocarburos aromáticos policíclicos lineales se oxidan rápidamente bajo irradiación para formar -- endoperóxidos tales como (XXXIII). la reacción generalmente es reversible, algunos de estos peróxidos -- emiten luz cuando desprenden oxígeno gaseoso, en un -- rango de temperaturas de 25° - 200° C (54). En general la intensidad de luz emitida por éste tipo de compuestos esbaja, sin embargo, los peróxidos de los acenos-- tales como los del rubreno (XXXIV) y 1,4-dimetoxi-9,-10-difenil antraceno (XXXV), que liberan oxígeno casi cuantitativamente, son los más eficaces en la emisión de luz (Esquema 17) todas las investigaciones relacionadas con la explicación de la luz observada indican que el hidrocarburo original es formado en un estado excitado, y no algún otro producto como la antraquinona, el espectro de la luz observada es por lo general muy similar al de la fluorescencia del hidrocarburo involucrado.

Es importante señalar la reversibilidad de la formación del peróxido como un paso productor de luz, pero desafortunadamente el calor de formación, por lo menos para el peróxido de antraceno, es muy por abajo del -- estimado para la energía de la radiación observada -- (55).

El 9, 10-endoperóxido del antraceno no produce mucho-

oxígeno al sobrecalentarse, y la antraquinona es uno de los productos principales.

C A P I T U L O I I

B I O L U M I N I S C E N C I A

II.A. Importancia y Distribución

Una de las características más importante de la bioluminiscencia es la gran diversidad de organismos -- que tienen desarrollada la capacidad de emitir luz.-- Estos incluyen ciertas bacterias, hongos, radiolarios, esponjas, corales, flagelados, hidroides, nemertinos, crustáceos, almejas, caracoles, calamares, cen típedos, milpies e insectos. Entre los últimos se -- encuentran los insectos familiarmente conocidos como cocuyos y luciérnagas. Muchos peces son también lumi nosos; pero no existen formas luminosas entre los -- anfibios, reptiles, aves ni mamíferos. Ninguna planta superior es luminosa; con excepción de unas pocas variedades de bacterias luminosas, ningún organismo de agua dulce emite luz (1).

La emisión de luz por un organismo es usada para dis tintos propósitos, como puede ser el apareamiento, -- la comunicación, encontrar y atraer a su presa, dife renciación de sexo, distraer a sus atacantes o como camuflage (6).

Un molusco luminoso llamada "Pholas dactylus", que--

desde la antigüedad ha sido considerado por el hombre como un delicioso manjar, fué utilizado en 1887 por el investigador frances Rafael Dubois en sus estudios sobre las substancias involucradas en la bioluminiscencia. Dubois demostró que un extracto de " Pholas" en agua fría continuaba emitiendo luz durante varios minutos, encontró que después de haber cesado el destello, la emisión de luz podía restaurarse mediante la adición de un segundo extracto obtenido lavanda almeja fresca con agua caliente y enfriando después el zumo. (56)

Dubois concluyó que existía cierta substancia en el extracto hecho con agua caliente que era esencial para la emisión de luz y que no era afectada por el calor; denominó Luciferina a éste material, nombre derivado de Lucifer, que significa portador de luz. A la substancia del extracto hecho con agua fría la denominó Luciferasa, indicando que el sufijo "asa" que tenía las propiedades de una enzima, la Luciferasa, al igual que la mayor parte de las enzimas, es sensible al calor. Dubois observó que tanto la Luciferina como la Luciferasa se extraían mediante agua caliente o fría; pero que el agua caliente inactivaba a la Luciferasa, dejando activa solamente a la Luciferina (56).

Otro pionero en el campo de la bioluminiscencia fué E. Newton Harvey, quien continuando con las investigaciones de Dubois logró demostrar que la emisión de

luz en los organismos es un proceso enzimático, también describió las reacciones luciferina-luciferasa en una gran variedad de seres vivos. Harvey y sus colaboradores encontraron en Japon un crustáceo (Cypridina hildendorfu) que, una vez desecado, constituía una buena fuente de luciferina y luciferasa. La Cypridina vive tanto en agua dulce como en agua salada, pero solo las formas salinas son luminosas (57). Durante la Segunda Guerra Mundial, los soldados Japoneses utilizaban Cypridina desecada como fuente luminosa de poca intensidad cuando no querían correr el riesgo de utilizar linternas. Una pequeña cantidad de polvo de Cypridina colocado en la palma de la mano y humedecido posteriormente proporcionaba suficiente cantidad de luz para leer un mapa o un mensaje (1).- El organismo no es luminoso por sí mismo; segrega luciferina y luciferasa en el agua que lo rodea y la interacción sobre éstas sustancias produce una luz azul (15).

Existen una gran cantidad de formas luminosas entre los gusanos anélidos, la luminiscencia es particularmente sorprendente durante el período de celo de éstos animales (58).

Se sabe desde hace mucho tiempo que bacterias luminosas crecen sobre carnes o pescados muertos, Roberto-Boyle realizó experiencias con éstas bacterias y en 1668 demostró que necesitaban aire para poder emitir

luz.

Durante varios siglos el llamado " Fuego del Mar" representó un misterio para los pescadores y otros observadores, el "Fuego" hace referencia a la incandescencia vista algunas veces en la estela de los barcos que circulaban en aguas tropicales. Esta incandescencia es debida a la presencia de un gran número de dinoflagelados que producen luminiscencia cuando son perturbados. Tardó en descubrirse que ésta luminiscencia es originada siempre por seres vivos debido a que la mayor parte de los dinoflagelados son unicelulares (1).

La luz en las profundidades de los océanos tiene una intensidad máxima en la región azul-verde (475 nm) y los ojos de la mayoría de los habitantes de éstas zonas han desarrollado probablemente una eficiencia óptima alrededor de ésta longitud de onda. No es de sorprendernos que la mayoría de la bioluminiscencia marina esté también en la región azul-verde. Dos terceras partes de los organismos de una columna de agua oceánica de 2000 metros son bioluminiscentes y el índice máximo de luminiscencia ocurre a los 800 metros (6).

Otro grupo bioluminiscente importante lo constituyen los hongos, probablemente el mejor conocido es el "Panus Stiptiens", que existe en dos variedades: una en América, que es luminosa y otra en Europa, que no lo es. Los micelios filiformes de las dos variedades-

pueden fundirse y mediante ésta técnica mostrarse que la luminiscencia está sujeta a control genético. Evidentemente, la variedad europea carece de uno o más genes necesarios para sintetizar las enzimas que se requieren para la luminiscencia, al menos una de éstas enzimas es la luciferasa (56).

Entre los insectos se encuentran casos sorprendentes de luminiscencia, en los colémbolos, fulgósidos, elatéricos, en las larvas de ciertas moscas, y desde luego, en los cocuyos y sus larvas llamadas luciérnagas-- los cocuyos verdaderos, o insectos luminosos se encuentran en diversas partes de la tierra y ofrecen el ejemplo más familiar de luminiscencia. La hipótesis antigua de que la luz de los cocuyos es un medio de atraer al sexo opuesto para aparearse, está hoy universalmente aceptada (56).

El proceso químico de producción de luz por los cocuyos se ha estudiado desde que Harvey estableció, por primera vez en 1916, que la luminiscencia de los cocuyos es el resultado de la misma reacción luciferina-- luciferasa que Dubois encontró en la almeja luminosa-- se sabe que la luminiscencia de los cocuyos requiere, además de oxígeno, del suministrador universal de energía, el trifosfato de adenocin (ATP). Si se hace un extracto con agua fría de las partes luminosas de los cocuyos y se abandona hasta que desaparezca la luz, con solo añadir ATP se puede regenerar de nuevo--

la emisión de luz con intensidad mayor a la original. Durante los últimos años se ha aislado la luciferina de cocuyos, y se ha llegado a establecer y confirmar su estructura química, igualmente se ha aislado y obtenido en forma pura su luciferina, su molécula que tiene aproximadamente 1000 aminoácidos y es, por lo tanto, de elevado peso molecular (59).

Un fenómeno tan difundido en la naturaleza debió tener razgos marcadamente selectivos. La emisión de luz en los organismos pluricelulares más avanzados ha ido adaptándose para cumplir funciones muy específicas, -- aún no se conoce si la emisión de luz tiene alguna -- función en los organismos inferiores, como las bacterias, los hongos y los dinoflagelados. La amplia distribución de ésta gran variedad de distintos organismos luminosos con procesos químicos diferentes implicados en la emisión de luz, indicaría que, en algún momento, éstos mecanismos tuvieron una función selectiva (1).

Parece razonable pensar que el origen de los procesos emisores de luz estuvo íntimamente relacionado con la evolución primitiva de la vida sobre la tierra, se cree que varias formas de adaptaciones "útiles" de la luminiscencia en los organismos más avanzados se produjeron en las últimas etapas de la evolución (60).

II.B. Clasificación.

Puede considerarse que todas las reacciones bioluminiscentes requieren oxígeno, aunque (a) veces los componentes aislados contienen un peróxido preformado; en los ejemplos investigados hasta ahora, la descomposición exotérmica de un peróxido intermediario da como resultado la formación de un producto en estado electrónicamente excitado. La mayoría de las veces éste producto es altamente fluorescente, o de no serlo, transfiere su energía a una molécula fluorescente (15).

Las reacciones bioluminiscentes no pueden ser clasificadas de acuerdo a mecanismos de reacción específicos. Cormier y Totter sugieren una clasificación que comprende cuatro tipos de reacciones, a la que se le ha aumentado un quinto grupo: los sistemas "Precargados" (61), (Esquema 18).

ESQUEMA 18

Grupo I	Oxidación del Substrato.
Grupo II	Activación del Substrato seguida de oxidación.
Grupo III	Reducción seguida de oxidación.
Grupo IV	Peróxidación.
Grupo V	Sistemas Precargados.

Aunque estos grupos, especialmente el V, no proporcionan un conocimiento en el mecanismo de reacción, son -

útiles como forma de presentación. El grupo V no hace referencia al mecanismo, sino al hecho de que éstos sistemas al ser aislados no son completos, esto es, necesitan "recambio" (35).

II.C. Recambio

El termino recambio se usa en relación con la síntesis y degradación de proteínas, la expresión "recambio de proteínas" se emplea usualmente para denotar un fenómeno general en el cual las proteínas tisulares se están sintetizando y degradando continuamente (62).

"Velocidad de Recambio" es el término que se utiliza para designar el proceso de renovación total (63), - aunque es difícil de medir, existe una formulación - que permite determinarla (62):

$$dE/dt = K_s - K_d E \dots \dots \dots (1)$$

en donde E= contenido de proteínas en unidades por masa, K_s=constante de velocidad de síntesis de orden cero, en unidades por tiempo por masa y K_d=constante de velocidad, de primer orden, para degradación, en tiempo⁻¹ por masa (62).

La materia de Recambio es de interés especial en los sistemas bioluminiscentes, usualmente los mecanismos

de reacción indican que la enzima funciona como un -
componente catalítico convencional.

Una de las características especiales del sistema --
del cocuyo es la inhibición del producto por la enzi-
ma; un fenómeno similar ocurre en la latia (64). En-
el sistema bacteriano el recambio, como por ejemplo-
la participación repetitiva de una molécula simple -
de enzima, no ha sido demostrado (35).

Esto no quiere decir que los componentes de la enzi-
ma en éstas reacciones requieran necesariamente de -
una función catalítica. Se ha propuesto que éstos --
pueden ser sistemas de recambio de la enzima que no-
son extraíbles ni purificables con los componentes -
emisores de luz. Se ha demostrado que tal recambio --
ocurre en el sistema del cocuyo por la reacción enzi-
ma inhibida, tanto con pirofosfato con coenzima A --
(65); el sistema operativo in vivo no ha sido total-
mente identificado (35).

En otras palabras, los sistemas clasificados dentro-
de los cuatro primeros grupos no poseen, después de-
su aislamiento y purificación los factores mecanísti-
cos para su recambio.

Un ejemplo de un sistema precargado es la proteína -
aequorina, denominada una "Fotoproteína" (66). Esta-
molécula emite luz simplemente con la adición de cal

cio, y no requiere de oxígeno. La reacción bacteriana es un buen ejemplo de un sistema más completo en el que puede verse como está involucrado un intermedio de la enzima análogo a la proteína aequorina, en éste caso se ha demostrado que algunas de las etapas exergónicas de la producción de energía son prefijadas y no se acompañan con la formación de un estado electrónicamente excitado (35).

II.D. Función de la Enzima

Una propiedad no usual y sumamente interesante de las enzimas luminiscentes es su habilidad de "manipular" energía y formar estados electrónicamente excitados. Los intermediarios enzimáticos pueden representar estado únicos implicados en el almacenaje y conversión de energía, por lo tanto, la función de la enzima en éstas reacciones puede ser visto como un ente químicamente diferente de aquellos normalmente asociados con una función catalítica (35).

Las luciferasas son clasificadas como oxigenasas por las reacciones que catalizan, éstas reacciones se asemejan, cuando menos en esbozo, a las de otras oxigenasas tales como las del catecol y el triptofano. Las mayores similitudes son el desdoblamiento del enlace C - C y la incorporación de los átomos de oxígeno en los productos.

Una diferencia notable es que otras oxigenasas tienen casi invariablemente un cofactor oxidativo basado en Fe (III). Esto es sin duda un grupo prostético no oxidoreducido, a tal grado que las luciferasas de Cypridina y de cocuyo hacen pensar en una reacción de auto-oxidación.

En realidad es difícil observar otro papel de la enzima en el paso de la oxidación que el del transporte del protón activado en las luciferinas por oxidación con el oxígeno atmosférico (6) (Esq.19).

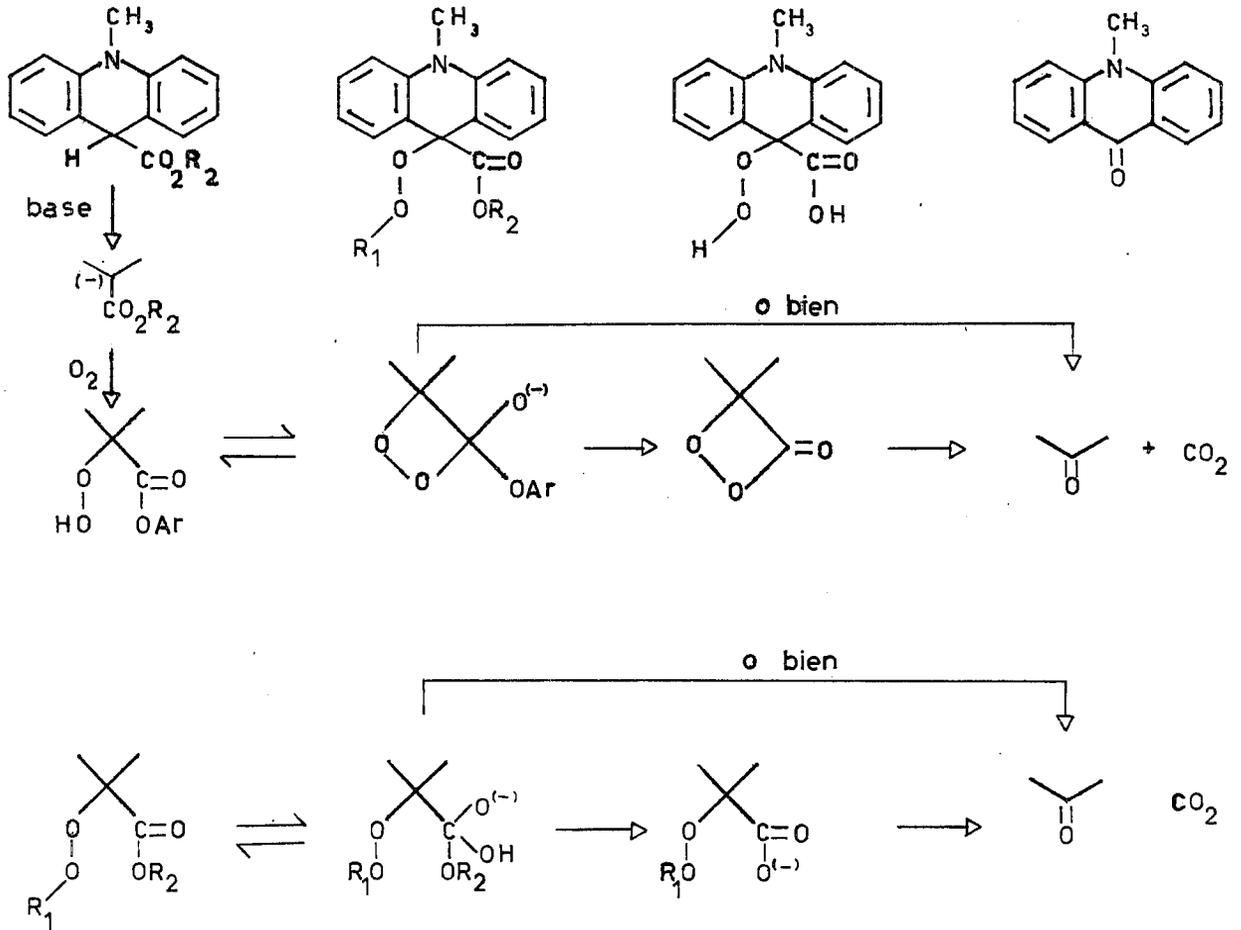
Otras funciones que conciernen a la enzima es la catálisis del ataque del peróxido sobre un ester activo. Los detalles en el aspecto de la catálisis enzimática están probablemente relacionados con el principio de acción de las enzimas hidrolíticas (6).

Los mecanismos enzimáticos son los responsables de la alta producción de cuantos comúnmente proporcionados en la bioluminiscencia, por lo que los intermediarios de la reacción deben estar protegidos, de alguna manera, de la desactivación colisional y de otras formas de transferencia de energía que abaten la producción de cuantos (13).

II.E. Grupo I: Oxidación del Substrato

En éste tipo de reacción ocurre una oxidación enzimática de un substrato, que proporciona la energía ade-

ESQUEMA 19



FUNCION DE LA ENZIMA EN LA ETAPA DE OXIDACION

cuada para formar un producto en estado electrónica-- mente excitado. Aunque varios sistemas pueden ser des_gcritos por este mecanismo, el de la Cypridina es el - que mejor se presta para ello (35).

G.I.1. Cypridina

La Cypridina hilgendorffii es un pequeño crustáceo (de 2 á 3 mm. de longitud) que se encuentra a lo largo de las costas japonesas, éste organismo expelle la enzima y el substrato a partir de glándulas separadas, direc_ttamente en el agua del mar, en ñonde la reacción ocu_rrre (67).

Su luciferasa fué aislada hace algunos años, su peso molecular es de cerca de 50,000; no tiene absorción - en el rango visible. Esto indica la ausencia de gru_ppos orgánicos prostéticos que puedan ser involucrados como especies emisoras, contiene no metales en cantidades apropiadas para un papel funcional, el valor de su constante de difusión es de $D_{20} = 7.5 \times 10^{-7}$ cm/seg., su constante de sedimentación a dilución infinita es de $S_0 20 = 4.58$ su punto isoeléctrico es $pI = 4.34$.

La composición y secuencia de aminoácidos aún no se - conocen con certesa, el pH óptimo para su bioluminis_ccencia es de 7.5 (40).

La luciferina de la Cypridina fué cristalizada e iden

tificada en 1966. La estructura del compuesto activo reducido (Esquema 20) contiene restos de triptamina, arginina y L-isoleucina (68). La molécula tiene absorción en el U.V. de cerca de 220, 270, y 312 nm, y una absorción en el visible de cerca de 425 nm. Su fluorescencia (514nm) corresponde a la transición de la última banda de absorción (69).

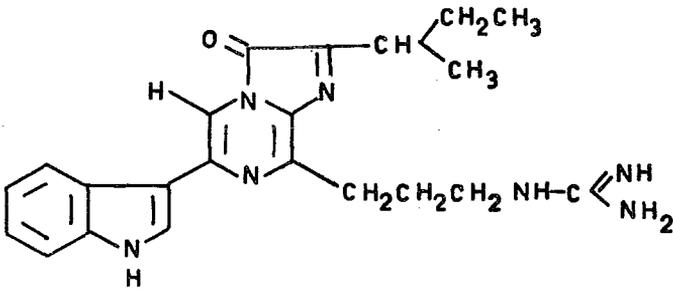
La bioluminiscencia de ésta liciferina es azul, λ_{max} . =458 nm, un color que corresponde a la fluorescencia del producto final; la oxiluciferina: $C_{22}H_{27}O_2N_7$ (35) (Esquema 20).

La Qb de la reacción es alta, aproximadamente 0.3, - por análisis de cromatografía en capa fina, el producto de la reacción luminiscente se encontró en alto rendimiento (35). Este producto es inestable bajo condiciones ácidas, sufre descomposición con la pérdida de la mitad de la isoleucina, produciendo etioluciferina; $C_{16}H_{19}N_7$.

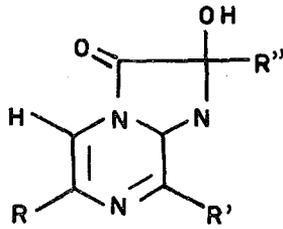
La oxiluciferina tiene una absorción a 350 nm. y una fluorescencia máxima (λ_f) de 480 nm., ésta molécula posiblemente enlazada a la enzima, es la especie-emisora de luz durante la bioluminiscencia (70)

Mediante la eliminación del grupo guanidino polar, -- tanto la luciferina como la etioluciferina, pueden ser convertidas a sus respectivas aminas. Se ha des-

ESQUEMA 20



LUCIFERINA DE CYPRIDINA



OXILUCIFERINA

cubierto que la desguanil-luciferina (Luciferamina) también es activa, emite luz cuando reacciona con la luciferasa, de una Qb. igual a la de la luciferina original (71).

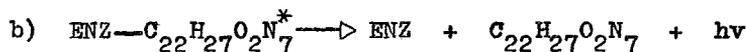
La luciferina de la Cypridina también muestra una quimioluminiscencia en sulfóxido de dimetilo, en presencia de oxígeno, aunque el espectro de emisión, λ max. 420 nm, es diferente al de la bioluminiscencia. el resultado se interpreta como una evidencia de un derivado de ésta luciferina es en realidad la especie emisora de luz en la reacción (35).

Se conoce poco acerca de los intermediarios en el mecanismo de la reacción (35). La extinción de la intensidad de la luz es exactamente exponencial y la constante de proporcionalidad de primer orden está relacionada directamente a la concentración de luciferasa (68).

A pesar de que la enzima contiene no metales, se demostró que la luminiscencia requiere la presencia de sales (72). Cuando la emisión de luz cesa, la actividad puede restablecerse por la adición de pequeñas cantidades de un gran número de sales diferentes; al grado de que se han publicado relaciones específicas entre el pH y la eficiencia en la restauración de la emisión de luz al adicionar diferentes sales (35).

La afinidad entre la luciferina y la luciferaasa es alta, siendo la K_m cerca de 5×10^{-7} M (67). Se ha demostrado que el enlazamiento ocurre en ausencia de oxígeno (73). El consumo de oxígeno en la reacción es de un átomo de oxígeno por molécula de luciferina utilizada, esto aunado con la determinación de su estructura (esquema 20) ha permitido escribir las siguientes ecuaciones (35); (esquema 21).

ESQUEMA 21



G.I.2. Peces: Apagón y Parapricantus

A pesar de que se ha demostrado que sistemas bioluminiscentes de especies estrechamente relacionadas resultan similares, existen algunos sistemas de especies no relacionadas que guardan similitudes en cuanto a su comportamiento químico. Así tenemos que una luciferina químicamente idéntica a la de la Cypridina fué localizada en órganos internos especialmente luminosos de dos especies de peces teleosteos; apagón *Ellioti* y *Parapricantus berciformes*. Sin embargo el origen del compuesto no se conoce con certeza; puesto que en el intestino de los peces se encontraron Cypridinas (35).

Las únicas diferencias que se han demostrado entre--
la luciferasa de éstos peces y la de la Cypridina --
son el comportamiento inmunológico y los aspectos ci
néticos de la reacción luminiscente (74).

G.I.3. Odontosyllis y Latia

Estos dos sistemas han sido purificados hasta un pun
to tal en el que se puede afirmar que la reacción in
volucra un mecanismo similar al que se efectúa en la
Cypridina. El Odontosyllis es el famoso gusano de --
fuego de las Bermudas, éste anélido marino libera un
material bioluminiscente en el agua que lo rodea du-
rante su apareamiento.

La emisión de luz durante la reacción es muy especta
cular siendo un fenómeno periódico que se realiza --
exactamente 55 minutos después del ocaso, durante el
segundo, tercero y cuarto día después de la luna - -
llena (35).

Su luciferina purificada (λ_{abs} . 235, 285 y 330 nm)
sirve como sustrato en la oxidación enzimática; el-
producto (λ_{abs} 250 y 445 nm) actúa como la molécula
emisora el color de su fluorescencia (λ_f 507 nm) es
muy cercano al de su bioluminiscencia (75).

Una propiedad poco común en los sistemas bioluminis-
centes, se encontró en el del Odontosyllis; su esti-

mulación invitro e invivo por pequeñas concentraciones de cianuro; entre 10^{-3} y 10^{-6} M (76).

Cuando se descubrió que el cianuro era producido en el ciempiés, incluyendo la especie luminiscente, el gusano ferrocarrilero, se ha estudiado el papel del cianuro como posible activador, pero su mecanismo de acción aún no se ha dilucidado (15).

La latia es un molusco gastrópodo, una lapa que expone una mucosidad de una luminiscencia muy brillante (λ b 520 nm). Es única entre las especies luminosas puesto que pasa su ciclo entero de vida en agua dulce. Su luciferina se ha aislado y purificado, reportándose como un aceite incoloro soluble en hexano, con una absorción a 212 nm. en etanol, tiene un peso molecular de 236. Su reacción requiere oxígeno y, aparentemente, ningún otro cofactor o activador.

Su mecanismo de reacción es igual al de la Cypridina excepto por el hecho de que la enzima es inhibida -- por el producto de reacción (77).

II.F. Grupo II: Activación del Substrato Seguido de Oxidación

En éstas reacciones el compuesto activo es un precursor del substrato que finalmente es oxidado con la emisión de luz. Se conocen dos ejemplos; los cocuyos

(y sus larvas: luciérnagas) y el Pensamiento de Mar; la Renilla. Ambos organismos emiten luz en forma de un corto destello brillante (0.2 seg.) seguido de una estimulación nerviosa.

En el cocuyo, y en la luciérnaga, la luciferina (esquema 22) reaccionan con ATP liberando pirofosfato y formando el luciferil adenilato enlazado en la enzima (E-LH₂-AMP), el cual es oxidado para emitir luz (35).

En el pensamiento de Mar la luciferina reacciona con 3'-5'- difosfo-adenosín (DPA). Esta reacción de activación involucra el movimiento de grupos sulfato para formar 3'- fosfato-5'- fosfosulfato (PAPS) y luciferina activada, la que posteriormente es oxidada con la emisión de luz (61).

G.II.1. Cocuyo y Luciernaga

La luciérnaga es una de las 250 especies de escarabajo, se le llama luciérnaga durante toda su etapa larvaria hasta que llega a la adulta en la que se le de nomina cocuyo. La metamorfosis de su organismo, si bien transforma parte de su sistema de locomoción, no afecta su sistema emisor de luz (5); por lo que se hablará indistintamente de luciérnaga o cocuyo.

La longitud de onda máxima emitida por el cocuyo --

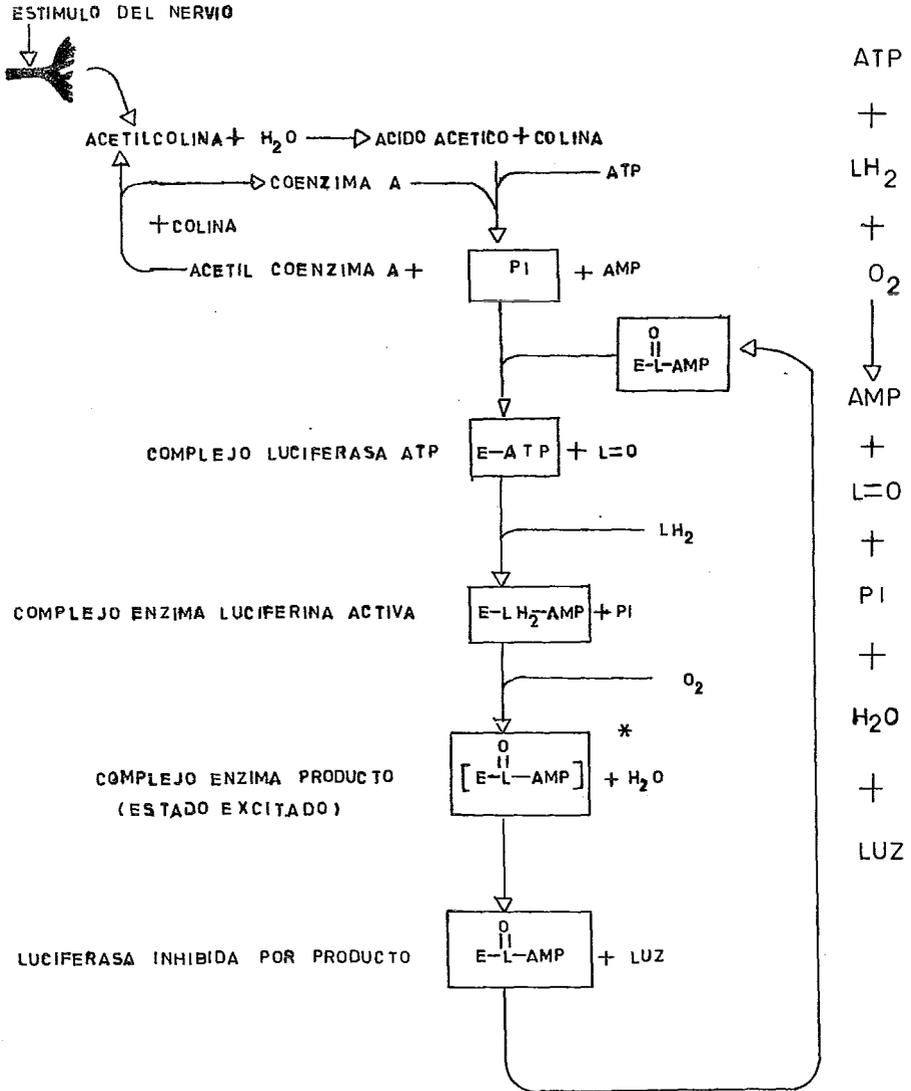
"Photinus Pyralis" corresponde a 562 milimicras en la zona amarillo-verdosa del espectro, se ha encontrado que extractos procedentes de los órganos luminiscentes de los cocuyos emiten luz a ésta misma longitud de onda en soluciones neutras. Si se acidifica la solución o se añaden altas concentraciones de fosfatos inorgánicos la luz cambia a rojo con un máximo de emisión a 614 milimicras, cambios de éste tipo pueden explicar las diferencias en el color de la luz emitida por distintos tipos de cocuyos (78).

La emisión de luz por los cocuyos depende de un suministro abundante de oxígeno, el suministro de sangre a los órganos luminosos se realiza mediante un extenso sistema capilar, y el de oxígeno mediante un sistema de tubos traqueales.

Existe una hipótesis según la cual el impulso nervioso libera simplemente el oxígeno en la glándula luminosa provocando así la luminiscencia, una segunda hipótesis, que es la más aceptada, establece una serie de etapas disparadas por acetilcolina que se libera en un nervio que termina en el órgano luminoso (1). (Figura 2).

El sistema del cocuyo es único entre los sistemas bioluminiscentes en cuanto a su requerimiento de ATP. La reacción de ATP con la luciferina del cocuyo es análoga, en su etapa inicial, en la utilización de

FIGURA 2



MECANISMO BIOLUMINISCENTE EN EL COCUYO Y LA LUCIERNAGA

otros compuestos incluyendo ácidos grasos y aminoácidos.

Todos éstos involucran la formación de un acil adenilato con la liberación del pirofosfato y la transferencia subsecuente del acil adenilato a un aceptor -- apropiado con la liberación de ácido adenílico (79).

La luciferina del cocuyo fué cristalizada en 1957 --- (14); su estructura y síntesis se reportaron durante los años subsiguientes (80).

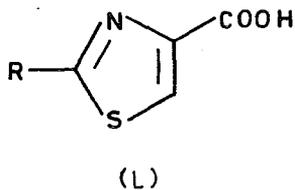
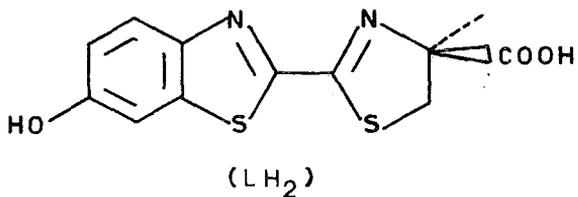
El último paso de su síntesis química involucra la -- reacción de 2-ciano-6-hidroxibenzotiasol con cisteína la D (-) y L (+)- luciferina se obtiene al reaccionar luciferina con D (-) y L (+) - cisteína respectivamente, siendo la D (-)- luciferina la forma activa (81)- (Esq.22).

Aunque la dehidroluciferina, L, no es el producto de oxidación emisor de luz es útil como un inhibidor competitivo (81) y puede usarse como un enmascarante reversible de los grupos sulfhidrilo involucrados en el sitio activo (82). La dehidroluciferina, en cualquier forma de adenilato; L-AMP, reacciona con la luciferasa, o con ATP y Mg^{++} para formar el enlace enzima-adenilato (83).

La luciferasa del cocuyo fué cristalizada en forma --

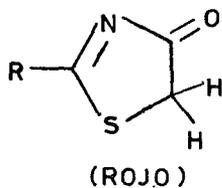
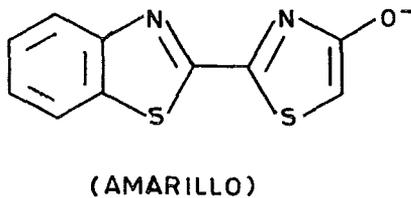
ESQUEMA 22

D (-) LUCIFERINA (LH₂) Y DEHIDROLUCIFERINA (L)
DE COCUYO



ESQUEMA 23

ESPECIES EMISORAS PROPUESTAS



pura en 1956 (35) los estudios posteriores revelaron que la molécula está compuesta por dos subunidades idénticas, con un peso molecular de cerca de 100,000 es disociable en guanidina-HCl (79).

Su estructura dimérica puede comprobarse por varios métodos, entre los más comunes están, por digestión de la luciferasa oxidada o empleando luciferasa marcada con tritiodinitrofenil. Por titulación con p-mercuribenzoato se determinó que existen seis sulfhidrilos libres (82).

La actividad de la enzima puede ser inhibida reversiblemente al reaccionar con p-mercuribenzoato, como la luciferasa reacciona con el inhibidor dehidroluciferil adenilato enmascarando dos de sus seis grupos sulfhidrilo, de modo que los cuatro grupos sulfhidrilo restantes de la enzima inhibida pueden ser titulados con cuatro moles de p-mercuribenzoato. Si posteriormente el inhibidor es removido por adición de coenzima A, el 90% de la actividad es restablecida (84).

Esta técnica permite la preparación de una enzima con sus grupos sulfhidrilo "no esenciales" bloqueados, si a esta enzima bloqueada la hacemos reaccionar con N-etil-maleimida radiactiva, se pueden marcar específicamente los sulfhidrilos involucrados en el enlace de la luciferina. La digestión de ésta - -

enzima seguida por el aislamiento del péptido radiactivo produjo un decapeptido simple (Ser-cysSht-glu--glu-aspNH₂-ala-gli-ser-gluNH₂-lis) (64).

El análisis de metales sólo reveló la presencia de - Mg y Al, 0.3 y 0.2 moles por molécula de proteína -- respectivamente. Sr, Ca y Ba fueron detectados en -- cantidades menores a 0.01 moles por mol de proteína. Se ha comprobado que ninguno de estos metales participa en la reacción luminiscente (81).

El color de la luz emitida por los cocuyos ha llamado mucho la atención de los investigadores durante -- los últimos años, está plenamente comprobado que tanto la estructura como la conformación de la enzima -- tienen un afecto esencial sobre el espectro de emisión bioluminiscente. Una gran parte de las evidencias provienen de estudios realizados con diferentes especies de cocuyos, a partir de los cuales se obtuvo una variedad considerable en el color de la luminiscencia, con rangos de emisión entre 550 y 585 nm-- (78). Aunque la molécula de luciferina está implicada como la especie involucrada en el estado electrónicamente excitado, las diferencias en el color de -- la luz emitida por distintas especies de cocuyos no puede atribuirse a diferencias en la luciferina. Los datos cromatográficos, de absorbancia y fluorescencia, indican que todas las luciferinas tienen la misma estructura (35).

Se ha demostrado que una luciferasa purificada a -- partir de una especie específica de cocuyo, cuando reacciona con ATP y luciferina sintética, emite una luz que tiene el espectro característico de esa especie. Lo mismo ocurre con las demás luciferinas -- aisladas a partir de las otras especies. Se sabe -- también que varios factores físicos y químicos afectan el color de la luz emitida in vitro, todos estos factores son interpretados en términos de una -- alteración en la conformación de la luciferasa, estos factores incluyen la estructura de la enzima, -- cantidad de ATP utilizado, temperatura, pH, metales y sales (35).

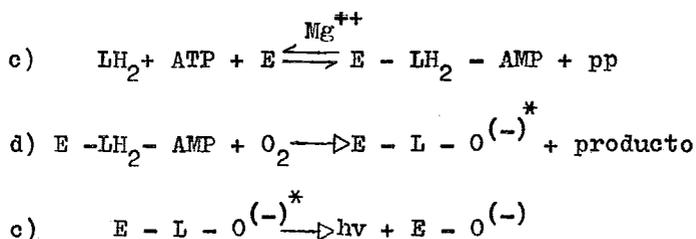
Un caso digno de mención por la variación del color en la luminiscencia es el del "gusano automóvil"; -- *P. plagiophthalmus*. Este insecto posee dos órganos uno dorsal y otro ventral, mediante los que emite -- luz de diferentes colores, con unas λ de cerca -- de 555 y 585 nm respectivamente. Esto no sólo permite distinguir los órganos, sino que, los individuos diferentes de una misma especie muestran distintos -- colores en la luz emitida por lo que es posible -- identificarlos y agruparlos en familias (58).

La emisión de luz a partir de los órganos ventrales se ha registrado como baja a 547 nm y como alta a -- 585 nm, en los órganos dorsales el rango de emisión es de 548 a 565 nm respectivamente. La luciferina --

nuevamente es la misma, tanto para los órganos ventrales como para los dorsales, por lo que se ha propuesto que existe una gran variedad de enzimas estructuralmente diferentes (35,58).

Los pasos principales de la reacción in vitro del cual pueden describirse brevemente como sigue: el enlazamiento de la enzima con el luciferil-adenilato se forma en el primer paso de la reacción (reacción c), éste reacciona con la luciferasa y el oxígeno en la reacción d, formando un estado electrónicamente excitado, seguido por la emisión de luz (64). (Esquema -- 22a).

ESQUEMA 22a



En base al consumo de oxígeno (una mol de oxígeno por mol de luciferina consumida), se ha propuesto que la especie electrónicamente excitada es E - L (O) - AMP, es decir, el dehidro compuesto con un átomo de oxígeno incorporado en algún paso desconocido. Los estudios posteriores indicaron que las reacciones involucran una descarboxilación, en base a estudios reali--

zados sobre la quimioluminiscencia de compuestos análogos, se ha propuesto que el estado basal de la especie emisora de luz amarillo-verdosa es el dianión de la luciferina descarboxilada (85) (esquema 23). - Siendo designada la enzima enlazada a la especie electrónicamente excitada como $E - L - O^{(-)}$ en la reacción d. Estos mismo estudios indican que en muy conocida emisión de luz roja está involucrado el estado electrónicamente excitado del monoanión de la luciferina descarboxilada (86) (esquema 23).

El producto de oxidación luminiscente, cualquiera -- que sea, puede tener restos de AMP enlazados fuertemente a la luciferasa y evitar así que la enzima -- reaccione, sin embargo, ésta inhibición puede ser reversible si se adiciona pirofosfato inorgánico, el -- cual reacciona con el producto, designado como $E - L - O^{(-)}$ liberando enzima libre. Esto proporciona un mecanismo para su recambio (65).

La inhibición del producto también puede ser reversible por la adición de coenzima A, puesto que ocurre la formación de un tio-éster con la enzima enlazada a la luciferina oxidada, liberando así enzima -- libre (86).

La posibilidad de que el mecanismo enzimático pueda involucrar la reacción de un grupo sulfhidrilo de -- una proteína con la luciferina para formar un com--

puesto intermediario $\text{LH}_2\text{-C-S-E}$, está descartada, puesto que se ha demostrado que no ocurre (87).

La luciferasa inhibida (E-L-O^-) también puede catalizar el desdoblamiento del ATP sin la emisión de luz.-- Una observación interesante es que la luciferasa actúa como una hidrolasa en presencia de reactivos sulfhidrilo (64).

Estos experimentos han servido para identificar los sitios de enlace de la luciferasa. Se han propuestos dos sitios de enlace en la luciferasa, uno para el ATP y otro para la luciferina. Las suposiciones de que el enlazamiento del sustrato ocasiona cambios en la conformación de la luciferasa se ha comprobado por medidas de las velocidades del intercambio hidrógeno-tritio, velocidades de la inactivación térmica y por cambios en la dispersión rotatoria óptica. En presencia de ATP y dehidroluciferina (L), la velocidad del intercambio hidrógeno-tritio disminuye y la enzima muestra mayor dificultad para la desnaturalización térmica (88). Bajo cualquiera de estas condiciones, la disociación de la luciferasa en sus dos subunidades no ocurre (80).

Las bases moleculares del control del destello de los cocuyos, que característicamente tienen una duración de aproximadamente 0.5 seg. y que poseen un control nervioso, no se conocen. Una de las condiciones neces-

sarias para la fase oscura es que los reactivos son separados, bloqueados o de alguna forma impedidos en la reacción. El producto-enzima inhibida satisface esta condición, especialmente en vista de la actividad tan potente de la pirofosfatasa del cocuyo, que puede eliminar pirofosfato y por lo tanto evitar completamente el lento recambio.

Se ha propuesto que éste complejo inactivo constituye un mecanismo químico celular por lo cual la reacción luminiscente es inhibida.

También se ha propuesto más ampliamente que el destello es iniciado por una rápida liberación de pirofosfatasa acompañada por la actividad nerviosa o de la membrana, o de ambas; se ha propuesto que la rápida-hidrólisis de la pirofosfatasa es la responsable de la extinción de la intensidad de los destellos. La pirofosfatasa puede derivarse del ciclo acetilcolina CoA-ATP (35).

Podría esperarse que el inhibidor de colinesterasa, eserina, impidiera el destello, pero esto no sucede la eserina no provoca cambios significativos, Los destellos pueden bloquearse por anfetamina y reserpina (35).

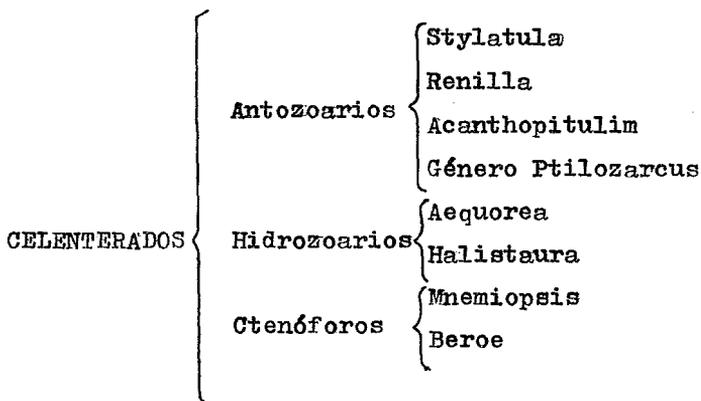
La célula responsable de la emisión de luz, el fotosito, ha sido perfectamente bien identificado, sin embargo, constituye un gran campo de investigación en el terreno de la biología, ya que se ha descubier

to que la fibra nerviosa no se inerva directamente - en el fotosito (35).

G.II.2. Celenterados Bioluminiscentes

Los celenterados son un grupo de animales marinos no tables por su belleza y brillante muestra de biolumi niscencia fueron investigadas en algunas de éstas -- criaturas durante la década pasada, poniendo énfasis en las similitudes químicas de los sistemas biolumi niscentes entre los celenterados (89), nos ocupare-- mos unicamente de tres de ellos: Los Antozoarios, -- Los Hidrozoarios y los Ctenóforos (Esquema 23a).

ESQUEMA 23a



Aunque los Antozoarios están agrupados biológicamen- te dentro de los Celenterados, por su mecanismo en - el sistema emisor de luz; los clasificaremos dentro- del grupo II: "Activación del Substrato seguida de -

Oxidación", y a los Hidrozoarios y Ctenóforos dentro del grupo V: " Sistemas Precargados" (5, 35,89).

G.II.2(a). Antozoarios

La bioluminiscencia de varios antozoarios ha sido -- examinada a nivel bioquímico. Estos incluyen a las -- plumas marinas (Stylatula, Renilla y Acanthopitulum), el género marino; Ptilozarcus (Paezoanthus y Cavernularia). La gran bioluminiscencia de la Renilla se ha estudiado con gran detalle y consecuentemente la discusión se limitará a éste organismo, además recientemente se ha demostrado que los factores químicos para la emisión de luz y su control son similares en todos los antozoarios estudiados (15,90,91).

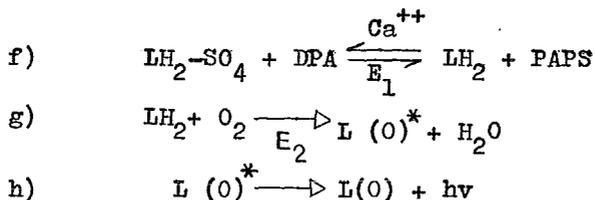
G.II.2(b). Renilla

El mecanismo de reacción de la Renilla es similar al del sistema del cocuyo en que se realizan dos pasos sucesivos, pero difiere en que esos pasos son catalizados aparentemente por enzimas diferentes (90).

Se ha demostrado que la actividad enzimática con la luciferina (reacción f, Esquema 24,) muestra un comportamiento cromatográfico diferente al de la actividad con la luciferina electrónicamente excitada -- (reacción g, Esquema 4) (35). Las enzimas no han sido bien identificadas (6), pero son designadas como-

E_1 y E_2 por comodidad (Esq. 24).

ESQUEMA 24



La luciferina de la Renilla se ha aislado e identificado, es un derivado de la triptamina que contiene un grupo sulfato, el cual es removido en el paso de activación. Esta luciferina se comporta como un anión - - fuerte y es estable a la oxidación, a valores de pH - alcalinos o neutro.

También tiene una absorción a 280 nm con cortes a - - 272 y 288 nm, su λ_f es de 362 nm. La hidrólisis alcalina de su dehidroluciferina produce triptamina (92).

El paso de activación que involucra el movimiento del grupo sulfato, requiere DPA y calcio (reacción g Esquema 24,) con la formación de luciferina activada y PAPS. La luciferina activada puede ser acumulada anaeróbicamente en presencia de la enzima E_1 . Se ha demostrado que el DPA tiene una función catalítica, su recambio debe ocurrir por alguna reacción que involucre el movimiento del grupo sulfato a partir del PAPS (35).

Si durante el paso de oxidación (reacción g, Esquema-24) se emplea luciferina activada como substrato, no se requiere calcio o DPA (35)

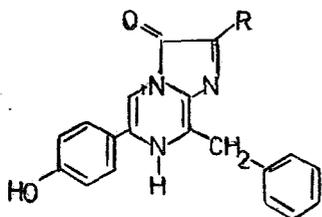
G.II.2. (c) Factores para la emisión de luz azul.

Recientemente se ha logrado la determinación estructural de un análogo parcialmente activo de la luciferina de Renilla (93), subsecuentemente se sintetizó una luciferina con una actividad bioluminiscente similar a la de la luciferina nativa (89). (Esquema 25, - - - XXXVII).

El sistema imidazol-pirazina, que está presente en la luciferina de la Renilla, existe como parte estructural de diversas luciferinas de origen marino, que incluye al crustáceo Cypridina, algunos pescados, numerosos celenterados y posiblemente el calamar. Las únicas diferencias en la estructura de la luciferina de la Renilla y la de la Cypridina se encuentran en las cadenas laterales que aparentemente están determinadas por los aminoácidos utilizados en su síntesis. Esto puede ser comprobado químicamente, ya que un buen número de luciferinas análogas se ha preparado por condensación de cualquiera de los tres aminoácidos seleccionados para producir el análogo deseado.(94).

La luciferina sintética de Renilla, así como su luciferina nativa (Esquema 25, XXXVI), reaccionan con la-

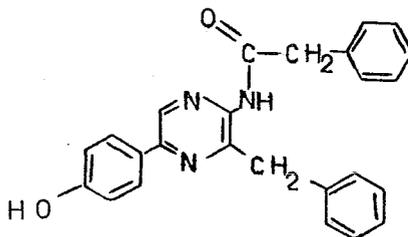
ESQUEMA 25
ESTRUCTURAS DE LUCIFERINA, OXILUCIFERINA DE RENILLA Y
ALGUNOS DE SUS DERIVADOS



(xxxvi)

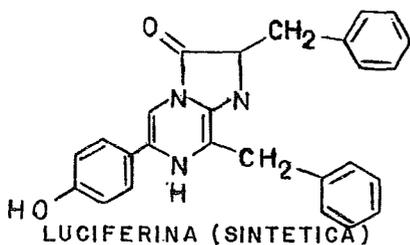
LUCIFERINA DE RENILLA

OXILUCIFERINA DE RENILLA
(SINTETICA) (xxxix)



(xl)

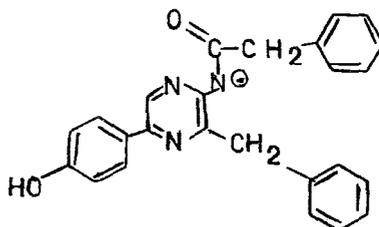
(xxxvii)



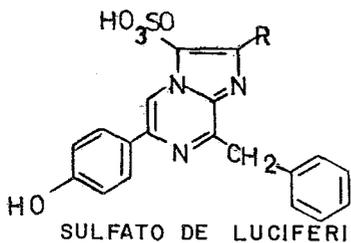
LUCIFERINA (SINTETICA)

(xxxviii)

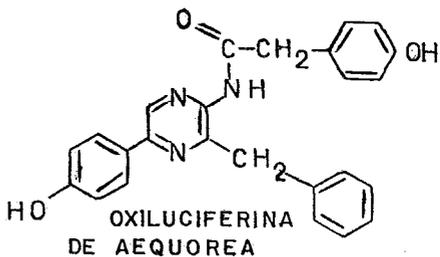
MONOANION DE LA
OXILUCIFERINA



(xli)



SULFATO DE LUCIFERILO



OXILUCIFERINA
DE AEQUOREA

luciferasa y el oxígeno molecular para producir luz-azul ($\lambda_b=490$ nm). La Q_b en cada caso es de aproximadamente 5% (93).

Los productos de la oxidación bioluminiscente de la luciferina de Renilla son la oxiluciferina (Esquema 25, XXXIX) y el CO_2 . Aproximadamente una mol de cada uno de ellos se produce por mol de luciferina oxidada. La absorción visible característica de ésta luciferina a 435nm se pierde después de que cesa la bioluminiscencia, y se encuentra una nueva absorción — a 335 nm, característica del producto (oxiluciferina) (89).

La luciferina se oxida en disolventes apróticos, como la dimetilformamida (DMF), por vía quimioluminiscente para producir oxiluciferina, CO_2 y la luminiscencia azul ($\lambda_q=480$ nm). Se requiere de oxígeno para la producción de luz y aproximadamente una mol de oxiluciferina se produce por mol de luciferina utilizada. El estudio de ésta reacción quimioluminiscente revela que la emisión azul se debe al estado electrónicamente excitado del monoanión de la oxiluciferina (Esquema 25, XL), más que a especies neutras (Esquema 25, XXXIX) o al dianión, el que produce luz amarillo-verdosa (95).

Se ha propuesto que el monoanión se forma directamente y que la velocidad de extinción de su fluorescencia

cia es más rápida que la velocidad de protonación en DMF. (96).

El estado electrónicamente excitado del monoanión de la oxiluciferina (Esquema 25, XL) parece también ser responsable de la emisión de luz azul observada en la bioluminiscencia. Resulta interesante observar -- que ninguna oxiluciferina ni su monoanión son fluorescentes en medio acuoso, sin embargo, en DMF, tanto la oxiluciferina como varios de sus análogos son altamente fluorescentes (93).

Por ejemplo, la oxiluciferina ($\lambda_f = 402$ nm) tiene una Q_f de 23% en DMF, mientras que su monoanión ($\lambda_f = 480$ nm) tiene una Q_f de 6%, como derivados sintéticos (93). Puesto que la Q_b es de 5% y su λ_b es de 490 nm, se ha propuesto que la bioluminiscencia se deriva del estado electrónicamente excitado de un monoanión complejo luciferarasa-oxiluciferina.

Aparentemente la DMF y la luciferasa proporcionan el medio ambiente adecuado para que la fluorescencia se efectúe con una producción, de cuantos de 5-6% para las especies emisoras en cada caso.

Una razón más para sugerir una Q_f aproximadamente 5% para el complejo luciferasa-oxiluciferina es la que se debe al aumento de quintuplo en la producción qumioluminiscentes de cuantos en presencia de una pro-

teína de fluorescencia verde, cuya Qf es de 30%.

La Qb de la luciferina en DMF, sin embargo, es de solo 0.1%.

De ésta forma la luciferasa de la Renilla, durante la reacción bioluminiscente, parece generar estados-electrónicamente excitados con rendimientos que llegaran casi al 100%, contrario a la vía quimioluminiscente en donde la producción es de sólo 23% (97).

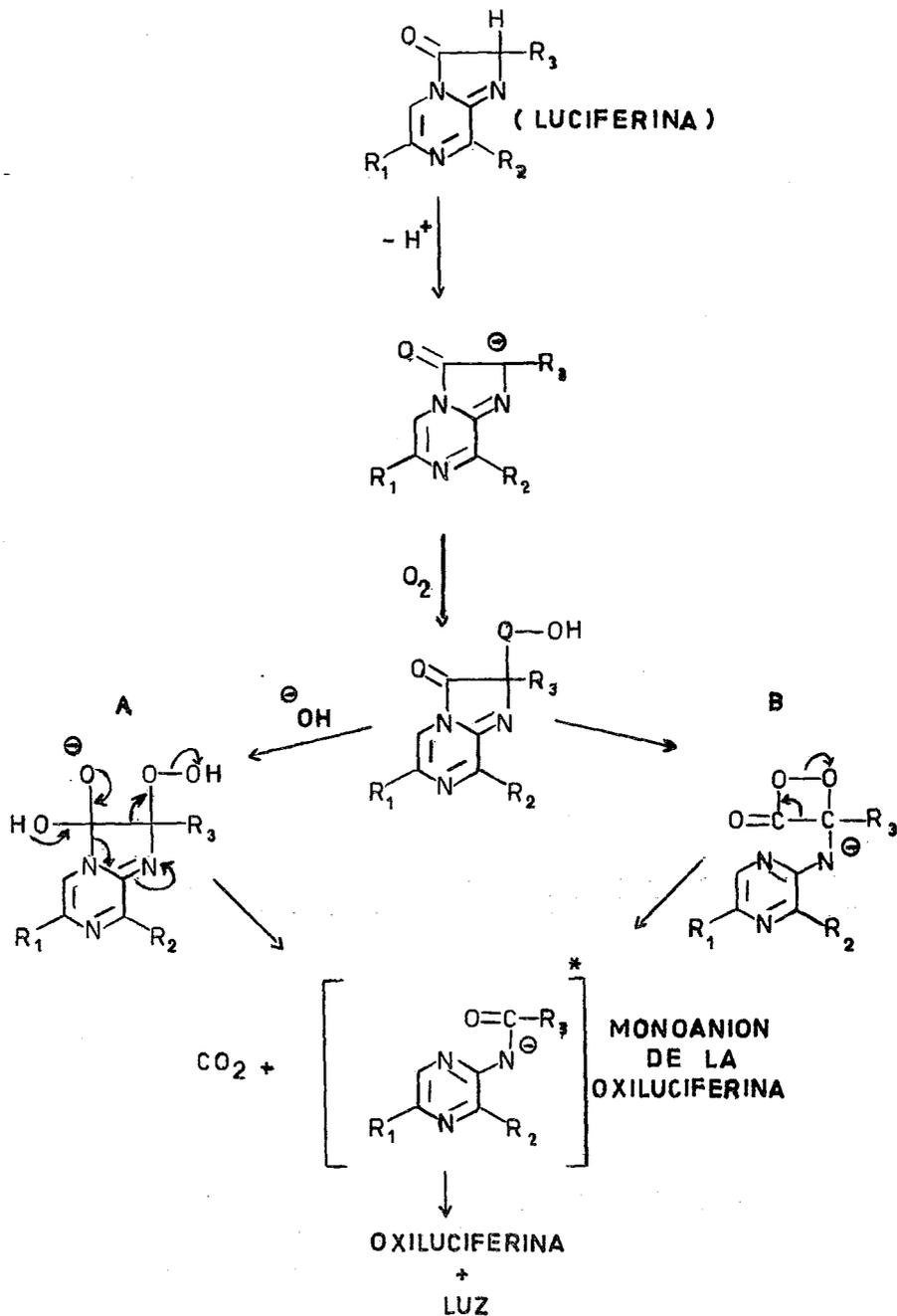
Los estudios mecanísticos utilizando agua marcada -- con O_{18} y oxígeno proponen los pasos que se muestran en el esquema 26 (camino A) para la oxidación bioluminiscente de la luciferina. La obtención de CO_2 marcado demostró que el oxígeno en el bióxido de carbono producido se deriva del agua y no del oxígeno -- (97).

Los resultados de estudios similares realizados sobre la oxidación bioluminiscente de la luciferina de cocuyo están de acuerdo con el camino A del esquema 26 (89,98). El camino B (esquema 26), en el que se propone una dioxoetanova intermediaria, es teóricamente probable; pero inconsistente con los estudios de oxígeno marcado, lo que demuestra que no ocurre ni en la Renilla ni en el Cocuyo (87,99).

Un resultado sorprendente sobre el estudio mecanís--

ESQUEMA 26

MECANISMO ALTERNATIVO PARA LA OXIDACION BIOLUMINISCENTE DE LA LUCIFERINA DE RENILLA



tico de la oxidación bioluminiscente de la luciferina de la Cypridina, empleando también oxígeno marcado, - propone el camino B del esquema 26 (89).

G.II.2.(d). Factores para la emisión de luz verde

Las medidas espectrales de la bioluminiscencia in vivo e in vitro en la Renilla y algunos celenterados -- estudiados han demostrado que las emisiones in vitro ($\lambda_b=470-490$ nm) son azules, mientras que las emisiones in vivo ($\lambda_b=590$ nm) son verdes (100). Las comparaciones espectrales precisas han demostrado que en la Renilla y en algunos otros celenterados, la emisión verde in vivo es debida a una proteína de gran fluorescencia que se ha aislado de estos animales, y a la que se hará referencia como "Proteína de Fluorescencia Verde" (89,100).

Esta proteína (peso molecular = 40,000) - contiene un cromóforo enlazado, de estructura desconocida cuya Q_f es de 30% (101). La emisión fluorescente de esta proteína es igual a la emisión verde in vivo (101).

Para explicar las diferencias en el color entre las emisiones de luz in vivo e in vitro en la Renilla, -- los investigadores han propuesto una transferencia de energía (89). Por ejemplo, la proteína de fluorescencia verde no cataliza la oxidación bioluminiscente de

la luciferina en ausencia de luciferasa, pero su adición a una reacción bioluminiscente in vitro puede - cambiar el color de la luz de azul al verde característico en la emisión in vivo (100). Puesto que las concentraciones de luciferasa y de la proteína de fluorescencia verde fueron bajas (10^{-6} a 10^{-5} M aprox.) bajo condiciones en las que se observó transferencia eficiente de energía, la interacción proteína proteína se ha propuesto como un medio para calcular una distancia de transferencia crítica de 28 Å.

El fenómeno es dependiente de altas concentraciones de proteína, y la producción de cuantos es relativa a los incrementos de luciferina, 5% para la reacción luciferasa - catalizada, a aproximadamente 25% en presencia de la proteína de fluorescencia verde - (102) (La producción de luz azul y verde se ilustra en el esquema 27).

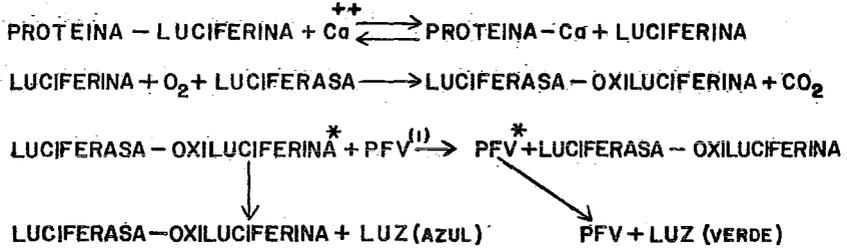
Se considera que el fenómeno involucra transferencia de energía no radiante del estado electrónicamente excitado de un mono-anión complejo luciferasa-oxiluciferina al cromóforo de la proteína de fluorescencia verde (89).

G.II.2.(c). Control del destello bioluminiscente.

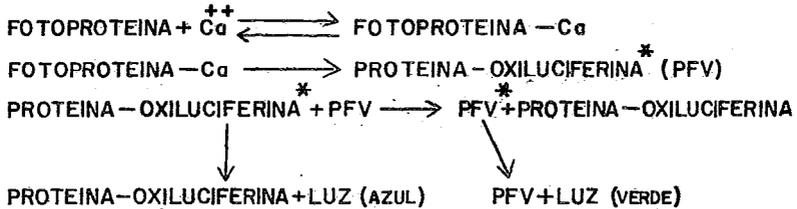
Una proteína importante en el control de la bioluminiscencia en la Renilla y en algunos otros Antozoa-

ESQUEMA 27

MECANISMO BIOLUMINISCENTE EN LOS ANTOZOARIOS



MECANISMO BIOLUMINISCENTE EN LOS HIDROZOARIOS



(1) PFV = Proteína de Fluorescencia Verde

rios se aislado recientemente (103). Es una proteína enlazada a la luciferina (peso molecular=24,000 ---- aprox.) que libera reversiblemente su enlace con la luciferina en presencia de iones calcio y muestra un color amarillo intenso cuando está aislada en forma pura (103). Es probable que la luciferil-sulfocinasa que convierte el sulfato de luciferilo (Esquema 25,- XXXVIII) a luciferina en presencia de 3,5-difosfo- - adenosin, el que desempeña un papel importante en la liberación de la proteína enlazada a la luciferina - (104).

La adición de iones de calcio a una mezcla en solución de luciferasa, oxígeno y la proteína enlazada a la luciferina excitada dá como resultado una luminiscencia azul típica de la reacción in vitro (89).- La reacción luminiscente inducida por iones calcio - puede visualizarse en la parte superior del Esquema- 27. La velocidad de decaimiento de la intensidad de luz en ésta reacción es mucho más lenta que el rápido destello de la luminiscencia in vivo. Por lo que parece que, el acceso de calcio a la proteína enlazada a la luciferina in vivo, debe realizarse mediante un control muy fino.

Un avance en la comprensión de los mecanismos involucrados en tal control fué realizado con el descubrimiento y aislamiento de los lumisomas de la Renilla- por Anderson y Cormier (105).

Los lumisomas son vesículas unidas por membranas (de un diámetro promedio igual a $0.2\text{-}\mu\text{m}$) que producen un destello de luz verde dependiente de oxígeno ($\lambda = 509\text{ nm}$) cuando se ponen en contacto con una solución hipotónica de calcio (105). Estas vesículas contienen todas las proteínas necesarias para la bioluminiscencia y su control, es decir, la luciferasa, la proteína enlazada a la luciferina y proteína de fluorescencia verde (89). Todas estas proteínas están unidas por membranas, proporcionando un medio ambiente excelente para la distribución ordenada de las proteínas necesarias para el control y procesos de transferencia de energía (105).

Un estudio de microscopía electrónica ha revelado la localización y estructura de los fotocitos de la Renilla, los que han sido descritos como células altamente especializadas que contienen un gran número de vesículas enlazadas por membranas (de diámetro promedio $=4\text{-}6\text{ m}\mu$) que se han denominado luminelos.

En los luminelos se alojan centenares de pequeñas vesículas que se consideran lumisomas, puesto que son del mismo tamaño y forma de los lumisomas aislados por Anderson. En preparaciones parcialmente purificadas, los luminelos parecen estructuras fluorescentes que producen destellos de color verde cuando se ponen en contacto con una solución hipotónica de iones calcio (89). Las membranas de los luminelos y de los lu-

misomas desempeñan un papel importante en la regulación del paso de calcio y en los sitios de enlace para calcio en la proteína enlazada a la luciferina -- (84,105).

II.G. Grupo III: Reducción Seguida de Oxidación

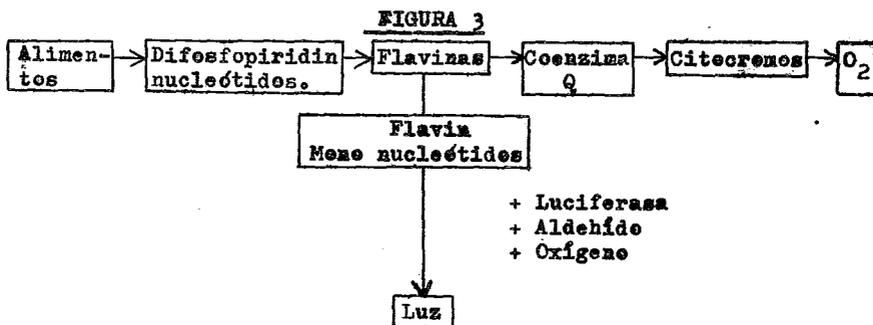
Un tercer tipo de reacción proporciona un contraste interesante con los dos primeros en que el paso reductor inmediatamente precede o acompaña a la oxidación emisora de luz. Estas reacciones se han estudiado en las bacterias, formas marinas luminosas y en los hongos. La forma de emisión de luz, siendo contínua, también proporciona un contraste interesante -- (56).

G.III. 1. Bacterias

Las bacterias luminiscentes que se encuentran en el agua salada constituyen el material favorito para el estudio de la bioluminiscencia, la mayoría de éstas formas crecen fácilmente en nutriente común de agar que contenga glucosa, glicerol y 3% de cloruro de sodio (la salinidad del agua de mar).

La fisiología y bioquímica de la luminiscencia bacteriana ha sido estudiada con gran detalle, aunque no se conoce el mecanismo exacto para crear el estado luminiscente, se conoce con razonable certeza algu--

nos de los compuestos implicados. Se sabe que la --
 reacción productora de luz está íntimamente relacio-
 nada con el proceso oxidativo o de transporte de --
 electrónes de la célula bacteriana, la hipótesis --
 actual suponen que las reacciones productoras de --
 luz son un caso particular del proceso general de --
 transporte de electrones por el que las células ex--
 traen la energía a partir de los alimentos. Los fac-
 tores que interviene en la producción de la luminis-
 cencia son una forma reducida de la riboflavina, un-
 aldehído, oxígeno y una enzima (15).

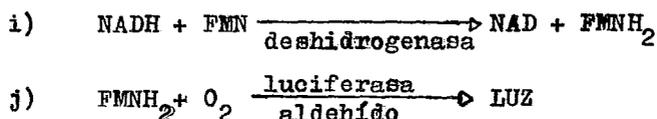


Las bacterias luminosas han sido organismos de elec-
 ción para el estudio de la acción de drogas y otros-
 inhibidores de la respiración celular. Pueden tam-
 bién obtenerse mutantes de bacterias luminiscentes --
 que no son ya luminosas o sólo debilmente luminosas-
 con ellas se pueden examinar la capacidad de varios-
 productos químicos para restaurar la luminiscencia --
 (58).

La reacción in vitro en el sistema bacteriano fué --

demostrada por Strehler (106) quien observó un efecto estimulativo del NAD sobre la emisión de luz difusa de extractos de células frescas. Se demostró posteriormente que el compuesto efectivo es la forma reducida del NAD, que reacciona con el flavin mono-nucleótido (107). Otro factor estimulativo potente lo constituye los aldehídos alifáticos saturados de cadena larga, por lo que se han establecido los siguientes pasos: (Esquema 27a) (108).

ESQUEMA 27a



Utilizando como sustrato FMN reducido químicamente se ha comprobado que el nucleótido de piridina puede omitirse. Por analogía con las reacciones bioluminiscentes conocidas, parece lógico especificar al FMN -- como una luciferina bacteriana, suponiendo que su -- oxidación resultó en la formación de FMN excitado -- (35).

Aunque no se ha implicado un grupo enlazado a la proteína, es posible que un residuo de algún aminoácido de la proteína pueda involucrarse. El espectro de -- emisión de la bioluminiscencia bacteriana (λ_{max} , 490 nm) esta muy separado del de la fluorescencia del --

FMN (λ max, 530 nm). Se ha propuesto la posibilidad de que el enlazamiento de la proteína pueda ocurrir por un cambio de ésta magnitud, pero no ha sido demostrado (89). Se puede proponer que el FMN sea químicamente alterado durante la reacción para producir un derivado que tenga el espectro de emisión apropiado.

Esta posibilidad se ha excluido porque se demostró que la emisión es por lo menos de 20 cuantos por molécula de FMN presente, que se obtendría si el FMN fuera alterado químicamente durante la reacción. La Q_0 es aproximadamente de 0.3, también se ha reportado tanto en base a los cuantos emitidos por molécula de FMNH₂ utilizada y por el ciclo catalítico (109).

Se han presentado evidencias de que las funciones de FMNH₂ son reducir la enzima en algunos pasos (110). La hipótesis en la que se propone que un grupo disulfuro es reducido a un ditiol, se ha rechazado ya que la enzima no contiene uniones disulfuro (111).

Una alternativa para la reducción de la enzima podría ser la formación de un complejo flavin-enzima-reducido, cuya cantidad y período de vida corresponde al del intermediario activo. Se han encontrado, en sistemas altamente purificados, flavinas enlaza-

das a la enzima, pero no se ha encontrado que su, pe
ríodo de vida corresponda al del intermediario biolu
miniscente (35).

El esquema 28 representa los pasos e intermediarios-
que se han propuesto para la reacción bacteriana - -
(110). Nos concentramos especialmente en los siguien
tes puntos, que serán considerados en gran detalle -
(35,110,111).

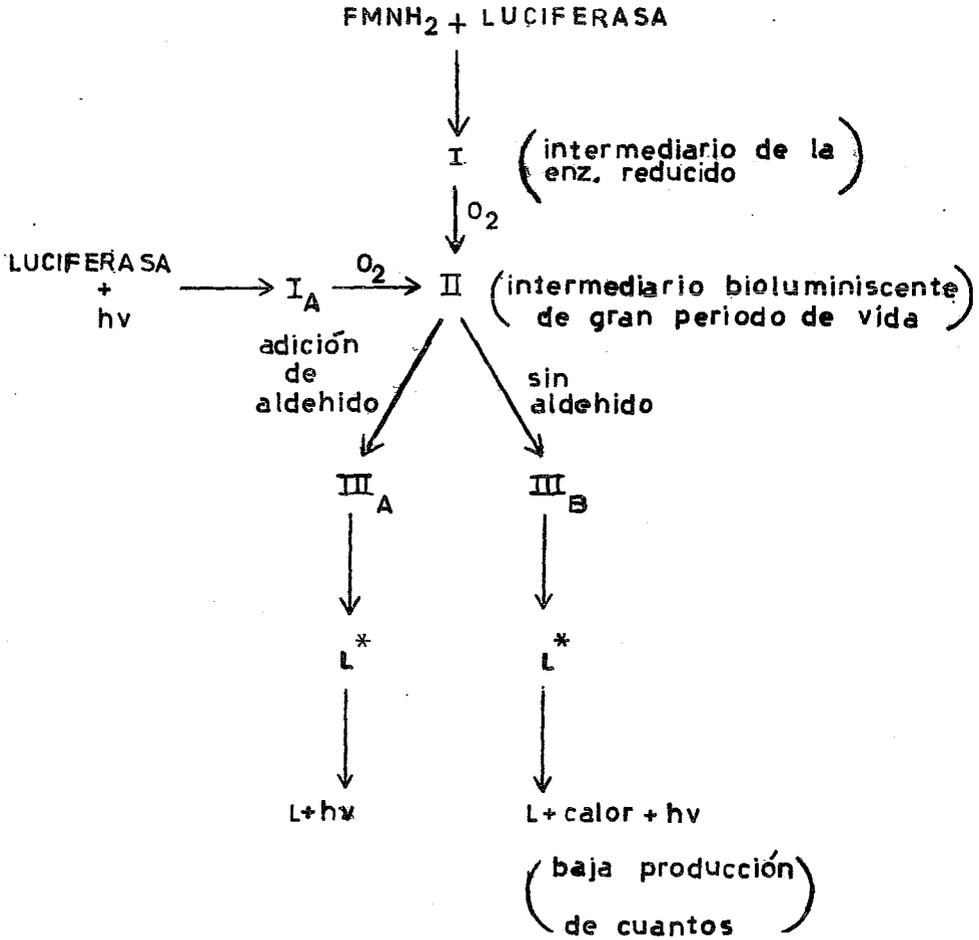
a).- El ciclo catalítico, por ejemplo, el tiempo de-
recambio requerido para una molécula de enzima dada,
es excepcionalmente más largo, en terminos de los --
intermediarios-enzima-substrato convencionales compa-
rados con los estados electrónicamente excitados.

b).- La Q_b de la reacción es dependiente en la pre--
sencia de aldehídos de cadena larga, pero el aldehí-
do virtualmente no tiene efecto sobre los pasos quí-
micos en la reacción, por ejemplo, la oxidación enzi-
mática de la flavina.

c).- El gran período de vida de la enzima intermedia-
ria puede ser formada no solo por medios químicos; -
también puede ser producida fotoquímicamente por irr-
radiación de la enzima con luz a 280 nm.

G.III.1 (a). Periodo de vida de la Enzima intermedia
ria: Número de Recambio

ESQUEMA 28



RUTAS HIPOTETICAS EN LA BIOLUMINISCENCIA BACTERIANA

El número de recambio de una enzima se define como:

$$\text{Número de Recambio} = \frac{\text{moles de sustrato convertido}}{\text{moles de Enzima} \cdot \text{/min.}} \quad (2)$$

Una mol usualmente es definida como 100 000 g. de enzima, debido a la incertidumbre entre los pesos moleculares de muchas enzimas. El cálculo del número de recambio a partir de la actividad específica de una enzima puede realizarse mediante la ecuación:

$$\text{Unidades/mg. enzima} = \frac{\mu\text{moles de sustrato convertidas/min.}}{\text{mg. enzima}} \quad (3)$$

A partir de las ecuaciones (2) y (3): la actividad específica es definida como moles de sustrato convertidas por minuto por mol de enzima (5a). Puesto que μ moles/mg. = 10^3 moles/g. y moles=g/peso molecular, -- la actividad específica puede multiplicarse por (10^{-3} X peso molecular de la enzima), para dar la ecuación:

$$\text{Número de Recambio} = \text{actividad específica} \times 10^3 \times \text{P.M. de la Enzima} \dots\dots\dots(4).$$

La ecuación (4) es una forma más sencilla de representar el número de recambio (5a).

La reacción bioluminiscente bacteriana "in vitro" --

siendo iniciada por la mezcla rápida del FMNH₂ con la luciferasa en presencia de oxígeno (con o sin aldehído), dá como resultado un emisión que aumenta hacia un máximo (en menos de un segundo) y decae exponencialmente con una vida media de 5 a 10 segundos ($K_R = 0.2/\text{seg. a } 25^\circ \text{ C}$) (35). Esta es una situación poco frecuente, porque el substrato libre tiene un período de vida mucho más corto que el de la emisión observada; el FMNH₂ es rápidamente oxidado por un medio no enzimático, en poco menos de un segundo (112).

Un análisis simple de ésta etapa, nos permite predecir que la enzima virtualmente no sufre recambio ya que por el corto período de tiempo una molécula de enzima no puede completar la reacción con trazas de substrato. Este es el caso en el que la enzima es expuesta a su substrato durante un corto período de tiempo comparado con el período de vida del intermediario -- generado, permitiendo una medida directa de ese período de vida (110).

En tales condiciones puede pronosticarse que la concentración de enzima no tiene ningún efecto sobre la constante de velocidad de 1er orden para el decremento en la intensidad de luz, esto se ha comprobado experimentalmente (110).

G.III.1 (b). Requirimiento de Aldehído.

Los aldehídos de cadena larga tienen un notable efecto estimulativo sobre la emisión de luz, se ha demostrado que su participación ocurre en una de las etapas posteriores, como se indica en el esquema 28 - (110).

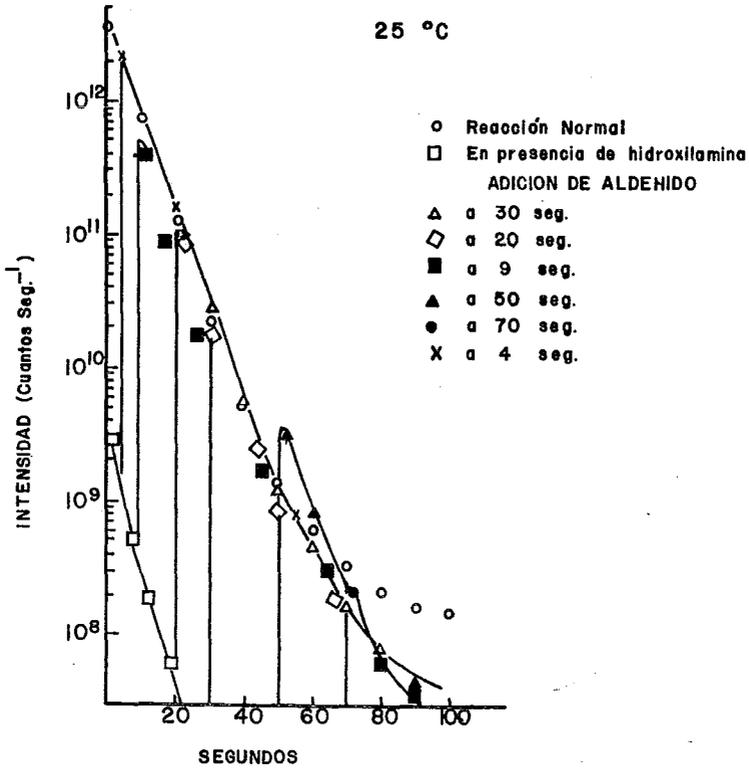
La causa de que los primeros pasos de la reacción ocurran en ausencia de aldehído puede deducirse de la observación de que la luminiscencia normal ocurre si el aldehído es adicionado posteriormente (esquema 29) El hecho de que III_B se forma en ausencia de aldehído (aproximadamente a la misma velocidad que III_A cuando el aldehído está presente) se observó porque el bajo nivel de la luminiscencia de crece con un período de vida cercano al de la reacción dependiente de aldehído (35).

Además la respuesta del sistema a la adición de aldehído a un tiempo posterior declina paralelamente con la baja Q_b (35,110,103).

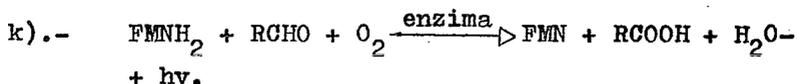
Aunque se han realizado muchos estudios concernientes a la función del aldehído, su papel en la reacción no se ha comprobado totalmente. Algunos autores afirman que el aldehído no se consume en la reacción y que su papel es catalítico, (35,106), mientras que otros sostienen que es convertido a su correspondiente ácido-graso, posiblemente por una peroxidación, para proporcionar una etapa productora de la energía adecuada -

ESQUEMA 29

TIEMPO DE INICIO DE LA REACCION LUMINISCENTE DEL FMNH_2 CON Y SIN ALDEHIDO EN PRESENCIA DE HIDROXILAMINA.



para que surja el producto en estado electrónicamente excitado (114). Los experimentos relacionados con la producción de cuantos, sustentan la segunda proposición basandose en que la reacción total puede representarse de la manera siguiente (115).



Desafortunadamente, ni la utilización de aldehído, ni la producción de ácido, ni tampoco el supuesto aldehído celular, se han demostrado directamente. En realidad, su descubrimiento original no fué como un factor de las células luminiscentes, sino como un material activo encontrado en extractos frescos (35,89).

Es importante subrayar el comportamiento poco común de la participación del aldehído: mientras que tiene un gran efecto estimulativo sobre la producción de fotones, la velocidad de oxidación por ésta vía se ve afectada. Por lo que puede postularse una división en la ruta mecanística del esquema 28 (35,111).

Un análisis e interpretación del papel del aldehído fué realizado por un grupo de investigadores, el que incluye tanto descubrimientos experimentales como una revisión de estudios anteriores, ellos proponen que el efecto del aldehído puede atribuirse a un cambio conformacional en la enzima intermediaria de gran ---

período de vida, favoreciendo así la etapa final principalmente hacia el estado electrónicamente excitado (35,89).

Estos investigadores realizaron experimentos a bajas temperaturas, puesto que la enzima intermediaria tiene un período de vida relativamente largo, fué posible atraparla por enfriamiento rápido del sistema hasta la temperatura del nitrógeno líquido (77°K), el intermediario es estable en éstas condiciones, pero al ir aumentando gradualmente la temperatura observaron que, los cuantos eran liberados en forma de una incandescencia (35).

Si una mezcla de reacción no ha sido expuesta al aldehído es llevada hasta el mismo punto de enfriamiento y posteriormente calentada en forma gradual, la producción de fotones es mucho mayor que la que se hubiera obtenido si la reacción se efectura completamente en estado líquido (116). Esto indica que el enfriamiento y el calentamiento pueden en algunos pasos prescindir del requerimiento de aldehído, por lo que se ha propuesto que algunos efectos físicos análogos pueden ocurrir en la célula viva (por ejemplo, el enlazamiento de la luciferasa a una estructura particular), significando también que el aldehído normalmente no es involucrado " in vivo " (117).

G.III.1 (c). Inducción Fotoquímica de la Bioluminiscencia.

La emisión termoluminiscente sugiere que la reacción puede involucrar intermediarios de alta energía en forma de electrones libres y electrones atrapados, -- análogos a los del fósforo inorgánico cristalino. -- Tales estados también se han propuesto junto con -- otros sistemas biológicos, especialmente la fotosíntesis, el transporte de electrones y la fotorecepción (35).

Tales consideraciones han llevado a experimentos satisfactorios para iniciar la bioluminiscencia usando energía luminosa. La emisión no es, desde luego, simplemente la fluorescencia o la fosforescencia de las especies emisoras, puesto que la emisión foto-inducida tiene un período de vida de aproximadamente 5 segundos en solución acuosa a 25°C, correspondiendo -- exactamente al de la bioluminiscencia químicamente -- inducida (111). La emisión foto-inducida por FMNH₂ -- en todos los pasos estudiados, incluyendo la distribución espectral, dependencia de aldehído y el efecto de los aldehídos de cadena larga (110,118).

La reacción inducida por energía luminosa no requiere la adición de flavina. El espectro corresponde al de la absorción de la proteína, con un máximo de 280 nm (35).

La reacción bioluminiscente inducida por energía luminosa, sin embargo, requiere de oxígeno. Aunque es-



una irradiación seguida de la emisión de luz apreciable en la ausencia de O_2 , es distinta de la bioluminiscencia, siendo de un período de vida relativamente corto, concentrada a longitudes de onda cortas -- (430 nm), no es afectada por el aldehído (111).

G.III. 1.(d). Propiedades de la Luciferasa Bacteriana: Aislamiento y Recombinación de Subunidades

Esta Luciferasa se encuentra en grandes cantidades -- en la célula bacteriana, conteniendo de 2 a 5 por -- ciento de la proteína soluble (109).

Durante la etapa luminosa son emitidos aproximadamente 104 cuantos por segundos por célula simple. La actividad de la enzima "in vivo" aparentemente es la -- misma de la emisión "in vitro" estimulada por aldehído (35).

Algunos investigadores han logrado aislarla con un -- 90% de pureza (109), y reportaron que su preparación contenía una NADH-deshidrogenasa que permanecía asociada a la luciferasa después de varias recristalizaciones (119). Esta es, desde luego, la enzima que -- acopla la luciferasa con el NADH vía flavina (35).

Los métodos de aislamiento han permitido la separación de las dos enzimas; la luciferasa pura contiene

cerca de 0.001% de la deshidrogenasa total (35). La separación de la deshidrogenasa y sus estudios experimentales indican que tiene una actividad específica de 80 micromoles de NADH oxidado por minuto por mg. de proteína (35). Aunque puede tratarse de un complejo molecular que involucre a la luciferasa y a la deshidrogenasa, se ha establecido que la inducción de luciferasa no es acompañada por un incremento de velocidad en la síntesis de deshidrogenasa (119).

La luciferasa tiene un peso molecular de aproximadamente 60,000; posee ocho grupos sulfhidrilo libres y no tiene enlace disulfuro (109). Su actividad máxima se obtiene cuando la enzima está en presencia de reductores suaves tales como DTT o 2-mercapto-etanol, es relativamente rica en aminoácidos, no contiene grupos prostéticos disociables. Su absorción en el ultravioleta tiene un máximo a 286 nm, característico del triptofano (35).

En las preparaciones de luciferasa se han encontrado no metales, pero se ha demostrado que ninguno interviene en la etapa luminosa (109).

El tratamiento de la luciferasa bacteriana pura con urea 8M o con guanidina-HCl 5M, conducen a la rápida pérdida de su actividad, esto es completamente reversible por dilución en buffer de fosfato con

BSA y DTT presentes. A partir de estudios realizados por sedimentación, se comprobó que en guanidina 6 M. de HCl la molécula se disocia en sus subunidades, -- las que fuéron separadas por electroforesis, encontrando dos subunidades distintas (α y β), la existencia de éstas dos subunidades distintas se ha comprobado por métodos cromatográficos. (120).

La actividad de la luciferasa puede restaurarse si -- las dos subunidades son mezcladas y diluidas en buffer para disminuir la concentración de urea. El grado de restablecimiento fué de cerca de 35%, estimado a partir de la actividad específica de la proteína -- reconstituida (35).

Estas subunidades poseen una carga negativa neta a pH neutro, la subunidad β está cargada más negativamente, por lo que tiene una diferencia en la acidez o alcalinidad de los residuos de aminoácidos. La subunidad α tiene una extinción a 280 nm, por unidades -- de microbiuret y es, por lo tanto, rica en aminoácidos aromáticos. Otra diferencia entre ambas subunidades la constituye el número de grupos amino y sulfhidrilo libres. (35,120).

Las subunidades también difieren en estabilidad, determinada por la capacidad de recombinarse una con -- la otra para formar la enzima activa. Una propiedad interesante de la subunidad β , que no la presenta --

la subunidad α , es que cuando está en presencia de buffer de fosfatos se combina con otra subunidad β para formar proteína soluble, que es del mismo tamaño que el de la luciferasa nativa, pero difiere de ésta en su carga y resulta completamente inactiva a la luminiscencia (121).

La actividad de la luciferasa desnaturalizada por otros medios (calor, detergentes) también puede ser restaurada por disolución del precipitado inactivo en guanidina o urea y posteriormente diluyendo con buffer (35).

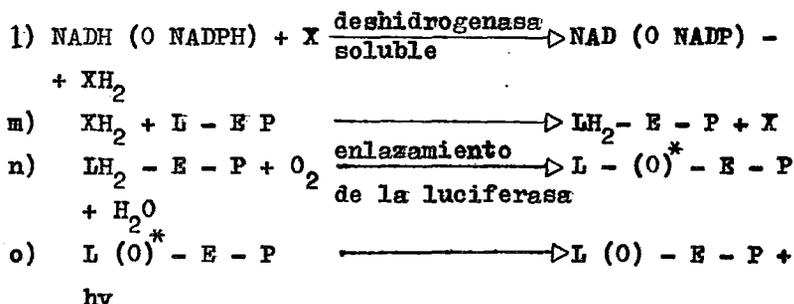
Los sistemas bacterianos también proporcionan un material excelente para el estudio de la bioluminiscencia. Los trabajos futuros para obtener una estructura molecular de la luciferasa por análisis de rayos X, los estudios actuales están también interesados en un análisis de la inducción y del control genético del sistema bacteriano, especialmente en la naturaleza de los mutantes con luciferasa que no cataliza la reacción bioluminiscente (35,122).

G.III.2. Hongos.

La reacción luminiscente en extractos obtenidos a partir de hongos difiere en ciertos aspectos de la que se realiza en la bacteria. La luz observada se encuentra en la región amarillo-verdosa concentrada-

aproximadamente a 530 nm; (35). La reacción se efectúa en una estructura particular que tiene carácter-membranoso, ésta reacción puede resumirse como se muestra en el Esquema 30 (97).

ESQUEMA 30



En donde P es un elemento estructural de la enzima (E) y la luciferina (L) también enlazada a éste (35, 123).

Como podemos observar en el esquema (30), existe una gran analogía con el sistema bacteriano, excepto que un portador de electrones intermediario, X, está presente. Otra diferencia importante es que en la reacción que se realiza en los hongos la luciferina es la parte soluble. (35). Se ha encontrado que una gran variedad de posibles mediadores de electrones (X en las reacciones del esquema 30), incluyendo las flavinas, no provocan ningún efecto estimulativo en la reacción (86).

Los pasos de la reacción pueden separarse experimentalmente, mostrando la acumulación de un intermedio reducido, porque la etapa reductora se realiza anaeróbicamente con el sistema soluble. Esto puede comprobarse por la adición de oxígeno (84,124).

El factor hidrosoluble (la luciferina) es insoluble en una gran variedad de disolventes orgánicos, y es lábil a valores de pH alcalinos (pH = 8.5).

Algunos investigadores han logrado obtener una emisión quimioluminiscente a 542 nm, al adicionar H_2O_2 ; su fluorescencia ocurre a 490 nm cuando se excita a 345 nm (35).

Esta luciferina se ha purificado parcialmente y estudiado por medio del microscopio electrónico, se ha observado que se trata de una estructura subcelular de origen membranoso (posiblemente de la membrana plasmática) (19). Sus propiedades de sedimentación indican que su tamaño varía de 0.1 a 1.0 μ ; su densidad es de 1.09 a 1.15 g/cc. (35).

Aunque un componente fosforescente obtenido a partir del género "O flavida" tiene un espectro cercano al de la bioluminiscencia, no se ha logrado su asociación con la reacción productora de luz (6, 15).

II.H.Grupo IV: Peroxidación.

Hace muchos años que Harvey descubrió que podía obtener luz de la reacción entre el pirogalol o el luminol con H_2O_2 , siendo catalizada la reacción por peroxidases vegetales (92).

Posteriormente se descubrió un requerimiento de H_2O_2 para la bioluminiscencia azul en extractos obtenidos del gusano "Balanoglossus", un hemicordio marino — (35). En estas investigaciones se descubrió que la luciferasa funciona como una peroxidasa y que no requiere de oxígeno molecular. Las peroxidases vegetales, tales como la del rábano, pueden substituir a la luciferasa en la reacción luminiscente de éste organismo; (100), además, se ha demostrado que la luciferina del Balanoglossus puede ser reemplazada por varios compuestos orgánicos quimioluminiscentes, y obtener así un sistema bioluminiscente "artificial" in vitro (35,125).

Todos los resultados de las investigaciones coinciden en que el sistema del Balanoglossus involucra una peroxidación clásica (126). Se ha comprobado que durante la reacción productora de luz se utilizan dos moléculas de luciferina (126), sin embargo la estructura de éste sustrato no se conoce aún. (6).

II.I.Grupo V: Sistemas Precargados

Estos sistemas no están agrupados con respecto a un-

mecanismo específico, sino al hecho de que los componentes aislados representan, en cierto sentido, los intermediarios. (359. Este tipo de sistemas están controlados bioquímicamente, puesto que la emisión de luz puede ser disparada fácilmente, un hecho que es de relevancia para el mecanismo del control celular (56,15).

El primero de éstos sistemas posee una estructura particular, es un organelo celular, que puede aislarse con su actividad intacta e inducirse a que emita luz (127).

Las últimas proteínas de este grupo, pueden ser consideradas como intermediarios de reacción, y por lo tanto como sustratos de las reacciones emisoras de luz, por lo que se les ha llamado "fotoproteínas" ya que las nociones convencionales de enzima y sustrato no son aplicables en los términos usuales (6,15,-35).

G.V.I. Dinoflagelados: Luminiscencia del "Destellador".

Los dinoflagelados marinos, tales como la Gonyaulax polyedra, son unas algas unicelulares, frecuentemente responsables de las mareas rojas o "fuego del mar" que contribuyen a la brillante luminiscencia del -- Oceano (35).

La luz de éstos organismos es emitida característicamente como un destello luminoso que dura sólo una fracción de segundo. (6).

Las bases bioquímicas de ésta emisión de luz son muy interesantes; involucran una estructura particular, llamada "destellador" (127), el que es posible de extraer de las células junto con los componentes solubles del sistema enzima-substrato que intervienen en la emisión de luz (35). Se concidera que los destellos normales provienen del "destellador", y que los componentes solubles extraídos están normalmente asociados a ésta partícula (128).

El "destellador" aislado puede ser inducido a que emita luz "in vitro" simplemente abatiendo el pH de aproximadamente 8 a 5.7, el intervalo de tiempo entre los destellos in vitro del "destellador" se asemeja mucho al que ocurre en la célula viva, su espectro de emisión es exactamente el mismo (129). La emisión de luz en forma de destello a partir de un organelo similar al "destellador" de la Gonyaulax se ha observado "in vivo" en la "Noctiluca" (130).

La relación exacta del llamado sistema soluble del destellador con respecto a su origen o función aún no ha sido bien establecida (6), pero es evidente que ambos están relacionados (6,35). La luciferasa soluble se ha purificado por procedimientos convencionales, pero no ha sido bien caracterizada (131).

Al ser cromatografiados los extractos crudos producen dos máximos, que corresponden a pesos moleculares de aproximadamente 150,000 y 35,000 (132). El rango de pH para la actividad de éstas dos moléculas es diferente, la actividad de la molécula más grande es óptima a pH = 6.6 e inactiva a pH = 8 — mientras que la otra molécula tiene una marcada dependencia del pH con una actividad máxima a pH = 8 (35).

La luciferina se ha logrado purificar por filtración de gel, su peso molecular es de aproximadamente 400 (92), su fluorescencia, enlazada a BSA es similar al color de su bioluminiscencia (35). En suma la luciferina, la luciferasa, y el óxígeno en este sistema, tienen un requerimiento absoluto pero no específico de sal, la concentración requerida para un efecto óptimo es $\geq 1M$ (35).

Cuando los componentes son mezclados en buffer, se requieren de algunos segundos para que la luz alcance su máxima intensidad y decae con una vida media de varios minutos. (35).

Los destelladores fueron aislados por ruptura mecánica suave de las células y por centrifugación diferencial, la partícula tiene una densidad de aproximadamente 1.23 g/cc, su constante de sedimentación es alta; 15,000 S. Estos datos son comparti-

dos con una estructura que tiene un diametro de 0.6 y una densidad de 1.21 a 1.24 g/ml (35,127).

Esta partícula unicamente requiere de oxígeno para la inducción ácida in vitro de luz, la dilución no causa ningún efecto (6); y la producción de luz es directamente proporcional al número de destelladores sobre un rango de 10^5 (35). Aunque los destelladores pierden facilmente su actividad, son insensibles a cambios osmóticos. Los tratamientos físicos bruscos (mecánicos, por ultrasonido, congelamiento) dan como resultado la pérdida de su actividad, la luz y el oxígeno, en estas condiciones, pueden acelerar la inactividad (35). La inactivación térmica ocurre aproximadamente a 30°C (35).

Estas estructuras al observarse directamente con el microscopio electrónico se han descrito como partículas opacas que tienen la apariencia de cristales. Se ha obtenido una relación entre el número de éstos cristales y la cantidad de luz emitida, se ha estimado que existe una producción de 500 fotones por destello por partícula (35). En éstos cristales se han descubierto compuestos de guanina, se ha propuesto que el destellador activo es una estructura compleja en la que un cristal de guanina se asocia con la luciferina, luciferasa y presumiblemente otros compuestos químicos (132).

El aislamiento de una estructura particular capaz de emitir luz es interesante en relación al mecanismo -- por el cual la célula puede iniciar y detener una re acción química con precisión y rapidez. Como el destello in vitro es disparado abatiendo el pH, el destello in vivo puede ser controlado por transporte de iones hidrógeno. (6).

Un cambio en el pH en un volumen pequeño no requiere el transporte de muchos protones. Conociendo un diámetro de 0.6μ , en este caso un volumen de menos -- de $0.1 M^3$, se obtiene un promedio menor de un protón por unidad de volumen a $pH = 8$, y sólo aproximadamente se requieren 100 protones para llevar el pH a 5.7 (35).

En suma, los protones fueron necesarios para titular la luciferina, la que puede así ser convertida de su forma inactiva a su forma activa. Algunos autores, -- tomando en cuenta las similitudes espectrales y factores de estabilidad, proponen que la luciferina pue de ser una pteridina (35).

G.V.2. Los Hidrozoarios y los Ctenóforos

De éstos dos grupos de organismos bioluminiscentes, -- los sistemas más estudiados son, entre los hidrozoarios, la Aequorea y la Halistaura (135); y entre los Ctenóforos la Mnemiopsis y la Beroe, (89). Todas és-

tas criaturas poseen un mecanismo luminiscente idéntico, por lo que, desde el punto de vista bioquímico, - su emisión de luz prácticamente puede tratarse conjuntamente (89).

Las luciferinas aisladas a partir de cada uno, de éstos organismos reciben nombres genéricos; de la Aequorea; aequorina, de la Halistaura; halistaurina, de la Mnemiopsis; mnemiopsina y de la Beroë; berovina (89,-134). De entre todos éstos organismos, los trabajos - e investigaciones en torno a la Aequorea son más nú-merosos, debido a su gran abundancia (35,66,89,133).- A todas éstas luciferinas se les ha llamado "fotoproteínas" (35,89).

G.V.2 (a). La Medusa: Una Proteína "Precargada"

Puede considerarse que los sistemas bioluminiscentes- aislados a partir de ciertas hidromedusas (Aequorea y Halistaura) constituyen una clase poco común (135). - La reacción involucra sólo iones calcio y una molécula de proteína simple que tiene fuertemente enlazado- un grupo que posee propiedades similares al NAD (66).

Estas proteínas han sido altamente purificadas, con - la adición de calcio, para el que la reacción es alt-amente específica, ocurre una emisión luminiscente; cu-ya vida media es de aproximadamente 1 seg. a 20° C -- (135). El producto entonces muestra una nueva banda -

de absorción (a aproximadamente 340 nm.) característica de los nucleótidos de piridina reducidos (66).

Puesto que no se involucran otros reactivos, incluyen do oxígeno, parece que ocurre una reacción productora de energía, a partir de calcio activado y una molécula que posee un enlace reducido, en la que se obtiene como uno de los productos una estructura de piridinio (66,35).

La aequorina y la halistaurina muestran una absorción a 310 nm previa a la emisión. La siguiente luminiscencia y el surgimiento de una nueva absorción a 340 nm, en donde también ocurre una fluorescencia con un espectro de emisión característico del NADH, así como el de la emisión bioluminiscente. Todas tienen una emisión máxima de aproximadamente 460 nm. (35).

Co exceso de calcio la reacción es exactamente de primer orden ($K=1 \text{ seg}^{-1}$, 25°C). El rendimiento de la reacción decrece con el incremento de la temperatura, — marcadamente alrededor de 20°C . La razón de esto es desconocida, pero no se debe simplemente a la inactivación de la proteína ya que éstos cambios sólo son — apreciables o aproximadamente 35°C . La Qq. de la reacción a 25°C es aproximadamente 0.15 cuantos por molécula de aequorina; tomando en cuenta el efecto de la temperatura se espera un rendimiento óptimo del 0.2 o más. (35).

Excepto para su calor de inactivación, que aparentemente tiene una energía de activación baja poco como la aequorina tiene propiedades que indican que es una proteína. Tiene reacciones positivas de Biuret y de Ninhidrina y es precipitable por sulfato de amonio (92).

La naturaleza bioquímica del sistema de la aequorina explica la luminiscencia de larga duración observada que, distinto a la mayoría de los organismos bioluminiscentes, la emisión puede ocurrir en ausencia completa de oxígeno libre. (35,89).

Shimonura y colaboradores proponen que las bases moleculares para el destello celular involucran ya sea un cambio transitorio en la permeabilidad al calcio ó en su transporte activo. (66). Aunque el sistema in vitro involucra material en solución, el sistema in vivo se localiza en gránulos de diámetro menor o igual a 0.5μ , que permiten la departamentalización y movimiento de calcio (35).

La naturaleza de la reacción productora de energía no es evidente. Existe sólo una molécula semejante al nucleótido de piridina por cada peso molecular de 35,000 (el tamaño probable de la proteína) y su reducción no proporciona fácilmente la energía requerida. Una posibilidad sugerida por Mc Elroy y Seliger es que el material inicial tiene ya sea un oxígeno o un

peróxido que sirve como aceptor de electrones en alguna reacción desconocida hasta el momento, Esta posibilidad no puede excluirse pero no ha sido bien investigada para proporcionar una explicación de la aparente reducción que ocurre (136).

En terminos generales, la posibilidad de que la reacción química productora de energía y el grupo emisor de luz sean partes diferentes de una misma molécula no es difícil. White y Roswell lograron sintetizar moléculas quimioluminiscentes de éstas características y demostrar, en forma indirecta, satisfactoriamente este punto (137).

En un sistema luminescente extraído a partir de una especie de camarón que, posee fotóforos en forma de ojos, se descubrieron dos componentes orgánicos involucrados en el sistema emisor de luz: una proteína incolora (con peso molecular de 10^6 aproximadamente y una substancia fluorescente estable al calor (con peso molecular menor a 1000) (77).

Los componentes proteicos de las fotoproteínas aparentemente son cadenas específicas de polipeptidos simples cuyos pesos moleculares varían de 24,000 a 31,000 (138).

Gormier y colaboradores han proporcionado evidencias de que el componente cromóforo nativo de las fotopro-

teínas es similar al de la luciferina de la Renilla (93), esta proposición es corroborada por los descubrimientos de Shimomura y Johnson, ya que la reacción bioluminiscente de la aequorina forma un producto aislable e identificable, que posee la estructura XLI --- del esquema 25; al que se le ha denominado oxiluciferina de Aequorea, por su estrecha semejanza con la estructura de la oxiluciferina de Renilla (XXXIX, Esquema 25) (139).

Durante la bioluminiscencia de la aequorina, el emisoror es un complejo proteína-oxiluciferina, nuevamente igual que en la bioluminiscencia de la Renilla (89, --- 139).

Los sulfatos de luciferilo, al igual que el sulfato -- de luciferilo de la Renilla (XXXVIII, esquema 25), -- han sido aislados a partir de numerosos celenterados -- incluyendo la Aequorea y la Mnemiopsis (140). Sin embargo, las bandas de absorción visible de la aequorina y de la Mnemiopsina no pueden explicarse en base -- a las perturbaciones espectrales de un cromóforo de -- luciferina del tipo del que posee la Renilla (89).

Una posibilidad razonable para la formación de la oxi luciferina de Aequorea (XLI, Esquema 25), es el camino que se ilustra en el Esquema 26. Aparentemente, el paso en el que se requiere oxígeno ha sido incorporado previamente en éstas fotoproteínas, dando como re-

sultado un intermediario oxigenado que es estable en ausencia de calcio (89).

Por otro lado Shimonura y colaboradores han demostrado que durante la bioluminiscencia in vitro inducida por calcio de la aequorina se produce CO_2 (141).

No obstante de que los mecanismos químicos para la emisión de luz en la Renilla, en la Aequorea y posiblemente en los Ctenóforos, parecen ser similares, existen diferencias básicas que se manifiestan a nivel proteico en el control de la luminiscencia en cada caso (87,99).

Como se muestra en el esquema 27; dos proteínas, una enlazada a una luciferina y la luciferasa, están involucradas en la bioluminiscencia inducida por calcio en los Antozoarios; mientras que, se considera que simplemente una proteína; una fotoproteína, es la responsable de la bioluminiscencia en los Hidrozoarios y en los Ctenóforos (134).

Parece ser que las fotoproteínas desempeñan una función dual; aparentemente enlaza un cromóforo de luciferina del tipo Renilla en ausencia de iones calcio, actuando igual que una luciferasa (89).

Al igual que en los Antozoarios, se ha descubierto que los Hidrozoarios bioluminiscentes contienen una

proteína de fluorescencia verde (101). La emisión fluorescente de ésta proteína aislada a partir de la Aequorea es idéntica a la que presenta la proteína obtenida a partir de la Renilla, aunque su espectro de excitación es completamente diferente (101), lo que sugiere diferencias tanto en las proteínas como en los cromóforos.

En vista de que la emisión in vivo es de color verde ($\lambda_p = 509$ nm). En contraposición al color azul de la emisión in vitro de la Aequorina ($\lambda_p = 469$ nm), se sugiere una sensibilización por el proceso de transferencia de energía, como el propuesto para el caso de la Renilla (89, 101).

Empleando preparaciones purificadas de la proteína de fluorescencia verde obtenida de Aequorea, la que contiene seis componentes proteicos de fluorescencia verde, se ha demostrado una sensibilización de la reacción in vitro por transferencia de energía (89, 101, - 141).

No obstante es difícil proponer un mecanismo para esta sensibilización, en vista de que los datos reportados con respecto a la producción de cuantos son muy bajos (89).

La transferencia de energía eficiente puede proporcionar un incremento en la producción de cuantos si el -

acceptor (la proteína de fluorescencia verde) tiene una producción de cuantos significativamente más alta que la del donador (estado excitado del complejo-oxiluciferina proteína) (101).

Puesto que la Q_b in vitro de la aequorina es de 23% y la Q_f del producto (complejo oxiluciferina-proteína) practicamente es de 23% (89,101). Cabría esperar se un gran incremento en la producción de cuantos en presencia de la proteína de fluorescencia verde ($Q_f = 72\%$). (101).

Sin embargo, la producción bioluminiscente fué sólo del 23% bajo condiciones óptimas para una transferencia de energía (101).

La regulación del paso de calcio "in vivo" en éstas-fotoproteínas probablemente ocurre de una manera análoga descrita anteriormente para los Antozoarios, ya que se han aislado lumisomas del tipo de la Renilla a partir de varias especies de Hidrozoarios bioluminiscentes (105).

Los lumisomas de hidrozoarios contienen una fotoproteína de fluorescencia verde, pero no luciferasa o alguna proteína enlazada a la luciferina (89).

CAPITULO III

FUNCION BIOQUIMICA DE LA BIOLUMINISCENCIA.

La bioluminiscencia está filogenéticamente difundida, especialmente en el medio ambiente marino, en muchos organismos puede argumentarse que la emisión de luz en sí tiene un papel en el metabolismo del organismo (35). Se conocen varias clases de funciones en éste sentido, incluyendo las señales de apareamiento en el cocuyo, o el uso de la luminiscencia como señuelo para atraer a sus presas, o bien, para distraer a sus depredadores (56).

Pero en algunos organismos, como por ejemplo la bacteria, la función de la luz aparentemente carece de importancia. Se piensa que en sistemas bioluminiscentes como éstos tiene una función bioquímica definida relacionada en algún paso con los intermediarios de alta energía, por lo que la luz emitida, en estos casos, no tiene ninguna función (35).

Esta hipótesis representa un contraste con la idea de que en tales sistemas no tiene ninguna función, ni bioquímica ni de otro tipo. Este punto de vista fué adoptado por Mc Elroy y Seliger conjuntamente con su hipótesis concerniente al origen y evolución de la bioluminiscencia (60). Estos investigadores han propuesto que la bioluminiscencia se originó co-

mo un medio bioquímico para el transporte de oxígeno, y que la luz emitida carece de función. (35).

También se ha considerado que la bioluminiscencia -- constituya un mecanismo desintoxicante, puesto que se supone que las primeras células vivas desarrolladas eran anaeróbicas y que el oxígeno primitivo era tóxico para esas células. (35).

Actualmente, en organismos tales como el cocuyo y la luciernaga, se cree que el sistema original se ha ido adaptando para propósitos específicos; en casos como el de la bacteria, en el que ahora no tiene una función aparente, es considerado por varios autores como un sistema bioquímico rudimentario. (60).

Es difícil sostener la afirmación de que un sistema -- completamente superfluo pueda persistir durante tanto tiempo en un organismo como la bacteria, que crece, -- se desarrolla y muta extremadamente rápido.

Esta es una consideración especialmente relevante en vista que entre 2 Y 5 por ciento de la proteína bacteriana soluble practicamente es luciferasa y que la -- producción de cuantos es alta (109). La posibilidad -- de que la luminiscencia sea un acompañante necesario de alguna otra función esencial e inmutable resulta difícil, por el hecho de que pueden obtenerse, relati vamente rápido, mutantes deficientes en luciferasa --

(menores a 0.01 % en contenido) aparentemente normales (35).

Además los organismos anaerobios actuales, que también están sujetos a la toxicidad en las zonas de transición ambiental, no se ha reportado que utilicen la bioluminiscencia como mecanismo desintoxicante (35).

En contrapartida existen hipótesis de que actualmente la bioluminiscencia en algunas células tiene una función bioquímica (35,89). Una posibilidad que debe considerarse es que en la reacción resulta la formación de una molécula de oxígeno activo, la que actúa en las células como un oxidante de alta energía (35).

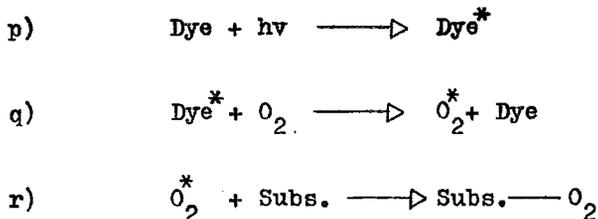
En el mecanismo se ha observado que, la emisión de luz en un sistema bioluminiscente puede ser una alternativa para la formación de un oxígeno activo. El oxígeno activo puede proporcionar un mecanismo químico que permita a las células metabolizar compuestos que no sean fácilmente atacados por las enzimas constitutivas (6).

El mecanismo puede no requerir una inducción específica para sustratos diferentes (6). Más aún, el oxígeno activo puede generarse bajo condiciones en las que la concentración de sustrato no es lo suficientemente alta como para inducirlo, y una mezcla de moléculas de diferentes sustratos puede tratarse favorablemente igual por un mecanismo general. (35).

Si tomamos en cuenta las condiciones que prevalecen en el oceano, especialmente las de las aguas que estan muy alejadas de los efectos de levigación y contaminación, es probable que los substratos utilizables sean químicamente diversos y en bajas concentraciones. (35).

Además las profundidades de los oceanos probablemente representan un medio ambiente ancestral y constante, en que los niveles bajísimos de luz exterior pueden ser un aspecto ambiental de relevancia con respecto a que posean un mecanismo especial para producir oxígeno activo. (35). Indudablemente existen varios mecanismos específicos por lo que el oxígeno puede ser activado, uno de los que debe tomarse en cuenta es aquel que involucra la formación de un oxígeno excitado de singulete que representaremos como O_2^* en el Esquema 31.

ESQUEMA 31



Kautsky y col. lograron demostrar, hace varios años que la foto-oxidación de una molécula enlazada a una

partícula ocurre fácilmente (142), aun cuando el sensibilizador absorbente de luz (Dye) esté enlazada a una partícula diferente. Los resultados de la investigación pueden resumirse en un mecanismo de reacción que supone la formación de un oxígeno excitado de gran período de vida (35), sin la reacción directa entre Dye y el substrato (Esquema 31) (143, - - 144).

Uno de los rasgos característicos de la oxidación fotosensibilizada es su especificidad química, aunque un gran número de compuestos es atacado, el tipo de reacción con una sustancia determinada, está completamente restringida, por lo que generalmente los productos se obtienen en altos rendimientos. (144).

Esto proporciona un criterio para la identificación de mecanismos; el oxígeno en estado de singulete producido por otros métodos presenta una especificidad idéntica al producido fotoquímicamente (113, 145).

Sabemos que un oxígeno excitado puede emitir un fotón como alternativa de una reacción química (146), - la luminiscencia de color rojo emitida en la reacción de H_2O_2 con hipoclorito de sodio produce varias - bandas que han sido asignadas a distintos estados de oxígeno excitado (146, 147).

La participación de O_2^* en las reacciones bioquímicas

no ha sido demostrado (6, 35), pero algunas reacciones poseen mecanismos que sugieren que el oxígeno en estado de singulete está involucrado (148).

Se ha demostrado que el oxígeno en estado excitado - de singulete oxida el nitrógeno molecular a nitrato- y el O_2 puede producirse mediante la descomposición- de H_2O_2 por catalasa (149).

La reacción bioluminiscente bacteriana es similar a ciertas enzimas que realizan hidrólisis enzimáticas- y rupturas de anillos, mientras que los detalles me- canísticos involucrados en éstas reacciones son des- conocidos, los modelos de reacción incluyen comunmen- te como intermediario a un oxígeno activo (150).

La reacción bacteriana es también poco común en cuan- to a su producción de cuantos, la que puede ser mar- cadamente influenciada por la presencia de aldehídos de cadena larga. (35).

Existen varias rutas específicas para adaptar éstas- observaciones a la hipótesis del oxígeno activo: Se- han propuesto varios mecanismos que pueden conside- rarse para la producción de O_2^* en el sistema biolumi- niscente bacteriano. (35); El primero representa la- producción de O_2^* como una alternativa directa para - la emisión de luz a 490 nm a partir del estado exci- tado, y que compite con éste en la reacción con el -

O_2 en estado basal.

Esto es análogo al mecanismo propuesto por Kautsky - (142), y pronostica una función dual para el O_2 : La bioluminiscencia es absolutamente dependiente bajo - éstas condiciones para su función en la oxidación -- del FMNH₂; pero el oxígeno extingue la luminiscencia en la formación de oxígeno excitado (Esquema 31, reac ción r) (35).

En un segundo mecanismo posible, la formación de O_2^* - sería competitiva con el aldehído, como se muestra - en el esquema (28), la reacción del intermediario II con O_2 dá como resultado la formación de III b y la obtención casi simultanea de un producto en estado - excitado (en este caso sería oxígeno excitado). (35).

CAPITULO IV

APLICACIONES

En el estudio de cualquier fenómeno generalmente se pasa de la investigación pura a la investigación aplicada, esto ha ocurrido con la luminiscencia. Después de varios años de investigación, que llevaron a comprender mejor este proceso, se tiene ahora una serie de aplicaciones en distintas áreas de la ciencia.

El desarrollo de los métodos luminiscentes abren la posibilidad de realizar análisis químicos rápidos y de alta sensibilidad empleando instrumentación poco costosa.

La quimioluminiscencia y la bioluminiscencia ofrecen varias ventajas importantes para el análisis químico:

Los métodos quimioluminiscentes y bioluminiscentes son extremadamente sensibles debido a su facilidad para medir niveles bajos de emisión de luz. Es posible calcular los límites de detección teórica para los métodos quimioluminiscentes y bioluminiscentes a partir de la ϕ_{QL} , y la capacidad de los instrumentos modernos para medir bajos niveles de luz. (151).

El único aparato que se requiere para el análisis quimioluminiscente es un detector de luz, un sistema

que mezcle los reactivos, y en algunos casos, un filtro para determinar la quimioluminiscencia a partir de otras fuentes de luz. (152).

Para muchas de las reacciones quimioluminiscentes y bioluminiscentes utilizadas, la respuesta es proporcionalmente lineal a la concentración de reactivos. (151, 153).

Los métodos quimioluminiscentes son capaces de detectar diferentes estados químicos de un metal que se encuentre presente en huellas (154), como por ejemplo: el Cr (III) cataliza la reacción mientras que el Cr (IV) no. También varios metales y complejos orgánicos no catalizan la emisión de luz, pero los iones libres producen el efecto contrario (155).

IV.A. Determinación de algunos iones metálicos mediante el Luminól.

La sensibilidad intrínseca del Luminól para emitir luz, con bajas concentraciones de metales constituye un método atractivo para el análisis de huellas de iones metálicos (154, 155).

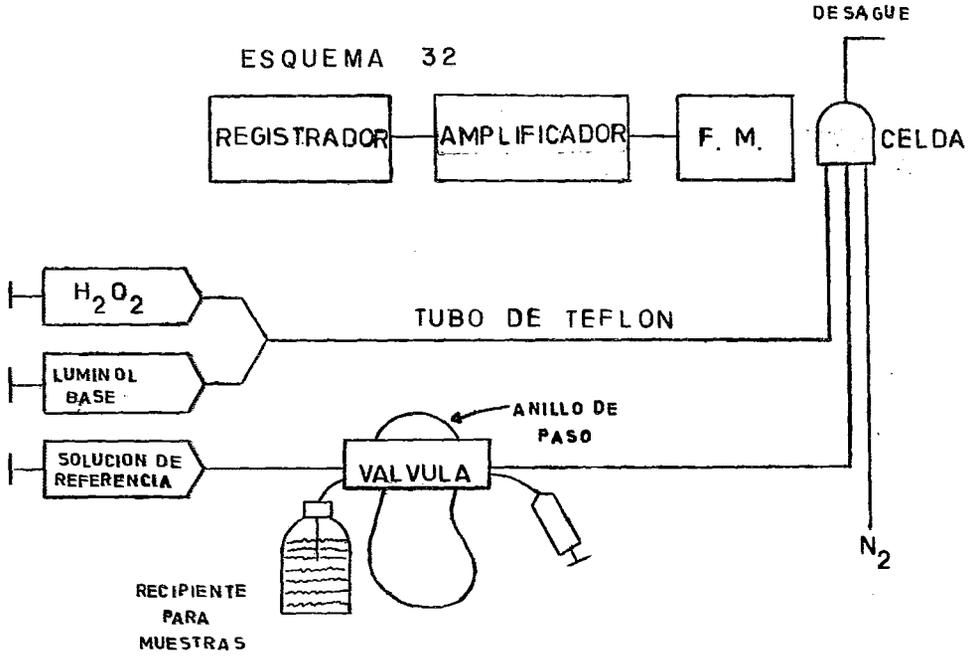
En presencia de un exceso de reactivos, la intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración del metal que cataliza la reacción (151,155).

Se han descrito varios métodos para el análisis de el cobalto, cobre, e hierro; todos basados en la catalisis de la reacción del Luminol, lo más simple es mezclar los reactivos en un recipiente que sea simultáneamente expuesto a una película fotográfica y midiendo la exposición como una función de la concentración (154, 155).

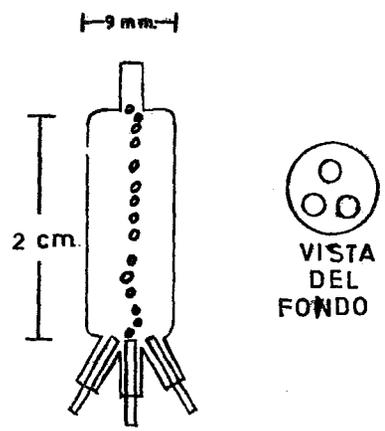
IV.A.1. Aparato

Para realizar análisis continuos por éste método, es necesario que la catálisis de la oxidación del Luminol se efectúe en un sistema de flujo como el que se muestra en el esquema 32, los reactivos son continuamente mezclados en una celda, colocada exactamente en frente de un tubo fotomultiplicador que cuantifique la emisión de luz (151,154,155). Al Luminol previamente se le adiciona una solución amortiguadora 0.1 M de $\text{KOH-H}_3\text{BO}_3$, para controlar el pH al que la reacción ocurre, ésta solución es mezclada con peróxido de hidrógeno directamente en el sistema de flujo, para evitar su descomposición (155).

La solución de referencia es similar a la solución problema, excepto en que no contiene el metal por determinar que actúa como catalizador. Cuando la solución de referencia fluye a través de la celda, se observa el nivel de la emisión de luz característico de la reacción en ausencia de trazas del metal que cata-



SISTEMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACION QUIMIOLUMINISCENTE DE METALES



DETALLE DE LA CELDA DE REACCION

Una reacción. Una muestra de la solución problema se deposita dentro de la línea de flujo de la solución de referencia mediante la válvula de inyección (151, 155).

Puede emplearse jeringas hipodérmicas de plástico de 50 ml, es preferible usar de plástico puesto que las jeringas de vidrio pueden desprender o absorber huellas de metales, lo cual afectaría la intensidad de la luz (155).

Se montan 3 jeringas al mismo nivel sobre una bomba, un tubo de teflón de pared delgada de 1/8 de pulgada de diametro se conecta a las jeringas mediante otro tubo corto de Tygón de 1/8 de pulg. de diametro interior, los flujos provenientes de las jeringas que contienen H_2O_2 y el Luminol-buffer, se unen por medio de un tubo en "Y". Puede emplearse una válvula de paso con sistema individual de inyección para depositar la muestra de la solución problema dentro de la línea de flujo de la solución de referencia; en cierta posición de la válvula de paso la solución de referencia fluye a través del anillo de paso, la muestra puede depositarse en el anillo para muestras empleando otra jeringa, en otra posición de la válvula; el anillo para muestras se conecta a la línea de flujo, para que la acarree hasta la célula de reacción (155).

En la parte inferior del esquema 32 se muestra un di-

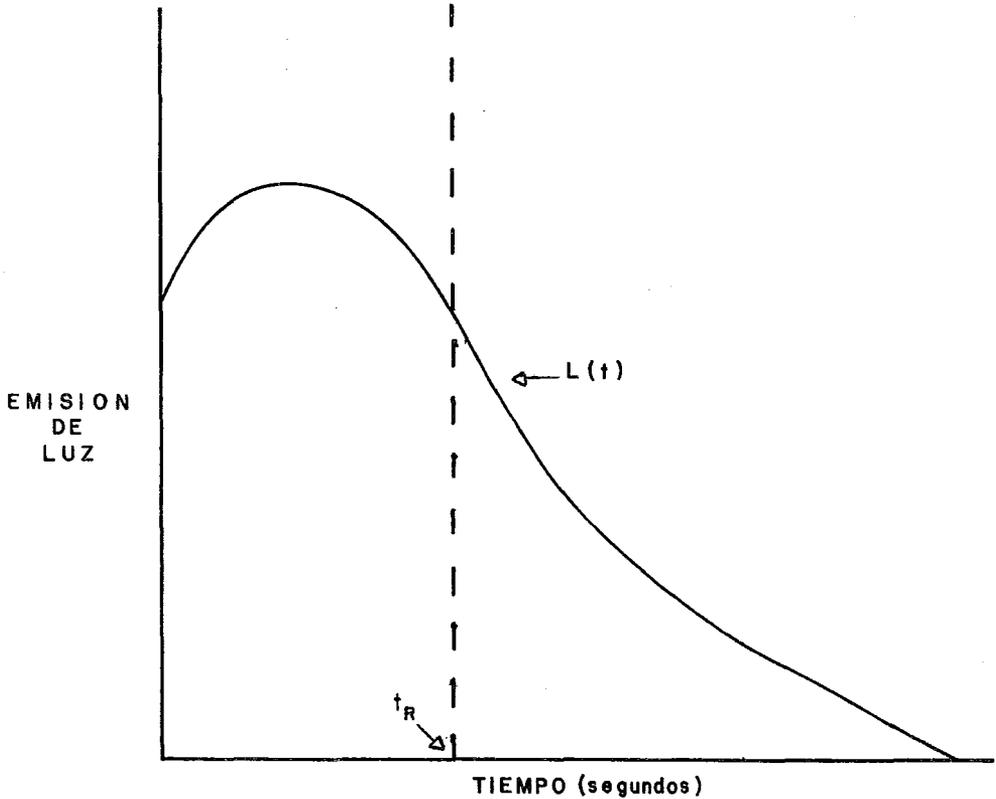
bujo detallado de la celda de reacción, el tubo de teflón del sistema de flujo se ensambla mediante nipples de vidrio de 3 mm de diametro exterior. Los tubos de teflón se introducen dentro de los nipples de vidrio prolongandolos hacia el interior de la celda, para garantizar que los reactivos inicialmente mezclados se dirijan al centro de la celda y reducir la posibilidad de que la solución regrese al tubo (155) La agitación se logra mediante el burbujeo con nitrógeno a través de otro tubo delgado de teflón insertado dentro del tubo de teflón de 1/32 de diametro interior. El flujo de gas hacia la celda es controlado mediante un medidor de flujo, la velocidad de flujo óptima para éste tipo de análisis es de 35-40 ml/min (151, 154, 155).

En el esquema 33 se muestra una curva cinética de flujo estable de la emisión de luz como una función del tiempo posterior al mezclado para la reacción del Luminol.

La emisión de luz catalizada por un incremento particular del metal en solución entrando a la celda de reacción en el sistema de flujo continuo seguirá a éste flujo cinético estable a la vez que permanece en la celda. Después de lograr un estado estable, habrá incrementos del metal en solución en todos los puntos de la curva cinética de flujo estable, y la emisión de luz observada será la suma de las emisio-

ESQUEMA 33

PRINCIPIO DE OPERACION DE LA CELDA DE REACCION



t_R = Tiempo de residencia en la celda

$L(t)$ = Intensidad de la luz a un tiempo dado, t , después del mezclado

$$\text{Luz de la celda} = \int_0^{t_R} L(t) dt$$

nes de luz catalizadas por cada incremento del metal en solución. Si asumimos que todos los iones del metal permanecen en la celda por un espacio igual de tiempo, entonces en un estado estable la emisión de luz será la integral de la curva cinética de flujo desde el tiempo de mezclamiento ($t=0$) hasta que los iones del metal permanecen en la celda, este período de tiempo ha sido designado como tiempo de residencia en la celda, t_r ; es igual al volúmen de la celda dividido entre la velocidad de flujo (155).

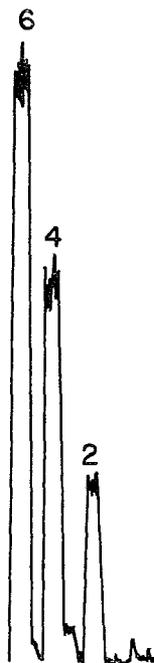
Por ejemplo los datos característicos de éste análisis para la determinación de Cr (III) en aguas se muestran en el esquema 34 (155).

IV.A.2. Capacidad Analítica

En la tabla I se enlistan algunos catalizadores para la oxidación del Luminol, en donde también se incluyen sus características analíticas. Para la mayoría de los metales analizados, la respuesta es sensible y lineal, los límites de detección están en función del sistema quimioluminiscente empleado en el análisis (151,155).

En la tabla II se enlistan algunos oxidantes que pueden determinarse utilizando la reacción del Luminol, así como sus características analíticas. En ausencia de peróxidos, el sistema quimioluminiscente es aproximadamente 100 veces menor con respecto a la intensi-

ESQUEMA 34



5 mins.

DATOS CARACTERISTICOS

Usando el sistema de flujo para
medidas de la QUIMIOLUMINICENCIA

CONDICIONES: H_2O , $10^{-2} M$,
luminol, $10^{-3} M$, buffer
de $KOH - H_3BO_3$, $10^{-1} M$,
 $pH = 10.5$

pico 2 = Cr (III) $2 \times 10^{-8} M$

pico 4 = Cr (III) $4 \times 10^{-8} M$

pico 6 = Cr (III) $6 \times 10^{-8} M$

RESPUESTA CARACTERISTICA PARA LA DETERMINACION
QUIMIOLUMINISCENTE DE Cr (III)

CARACTERISTICAS ANALITICAS DE ALGUNOS IONES METALICOS QUE CATALIZAN

LA QUIMIOLUMINISCENCIA DEL LUMINOL

CATALIZADOR	LIMITE DE DETECCION APROXIMADO M	RANGO LINEAL M	OBSERVACIONES
Co (II)	10^{-11}	10^{-11} a 10^{-7}	...
Cu (II)	10^{-9}	...	NO LINEAL
Ni (II)	10^{-8}	10^{-8} a 10^{-5}	...
Cr (III)	10^{-9}	10^{-9} a 10^{-6}	...
Fe (II)	10^{-10}	10^{-10} a 5×10^{-7}	CATALISIS CON OXI-GENO.
Mn (II)	10^{-8}	...	REQUIERE AMINAS - PARA SER UN CATALI ZADOR.

LOS DATOS PARA Fe (II) FUERON OBTENIDOS USANDO OXIGENO PARA AGITAR LA CELDA QUIMIO-LUMINISCENTE. TODOS LOS OTROS CATALIZADORES SON EFECTIVOS SOLO CON H_2O_2 .

LAS CONDICIONES FUERON: H_2O_2 10^{-2} M., LUMINOL 10^{-3} M., BUFFER DE $KOH-H_3BO_3$ 10^{-1} M.- Y EL pH DE LA CELDA ENTRE 10 Y 11.

CARACTERISTICAS ANALITICAS DE ALGUNOS OXIDANTES QUE REACCIONAN CON EL
LUMINOL PARA PRODUCIR QUIMIOLUMINISCENCIA

OXIDANTE	LIMITE DE DETECCION APROXIMADO M	RANGO LINEAL M	OBSERVACIONES
OCl^-	10^{-9}	...	REQUIERE O_2
I_2	10^{-9}	10^{-9} a 3×10^{-7}	RESPUESTAS DE SEGUNDO Y TERCER ORDEN
MnO_4^-	10^{-10}	10^{-10} a 10^{-7}	NO NECESITA O_2
H_2O_2	10^{-9}	...	EXCESO DE Ca (II) -- COMO CATALIZADOR

T A B L A No. II

dad de los sistemas catalizados (Tabla I) para un límite de detección equivalente (154, 155).

También son posibles los análisis indirectos basados en la quimioluminiscencia del Luminol, por ejemplo, - la quimioluminiscencia puede utilizarse para determinar agentes complejantes midiendo el grado a que se - solubilizan los iones metálicos de las sales metálicas insolubles (156). Puesto que varios de los oxidantes que aparecen en la Tabla II se utilizan frecuentemente como titulantes, la quimioluminiscencia del Luminol puede emplearse para observar la concentración de oxidante como una función de la cantidad que de éste se adiciona a la muestra. Esto amplía el análisis quimioluminiscentes a sustancias que no reaccionan directamente con el Luminol (155). En la tabla III se enlistan las aplicaciones analíticas de la quimioluminiscencia del Luminol, los fundamentos químicos para obtener una selectividad para una especie particular - también se incluyen en ésta tabla (151).

IV.B. Determinación de algunos iones metálicos mediante la Lucigenina

Para que la quimioluminiscencia de la lucigenina se - lleve a cabo, es necesario que su oxidación por peróxidos en solución básica ocurra en presencia de iones metálicos como catalizadores (151). Se ha reportado - que la quimioluminiscencia de la lucigenina también -

ALGUNAS APLICACIONES ANALITICAS DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA DE LUMINOL

TIPO DE ANALISIS	APLICACION	BASES PARA UNA SELECTIVIDAD
CATALISIS SIMPLE	Fe (II) EN AGUAS	POTENCIAL DE OXIDACION DIFERENTE A OTROS CATALIZADORES DE LA OXIDACION DEL LUMINOL POR OXIGENO
	Cr (III) EN AGUAS	EMPLEO DE EDTA PARA ABATIR OTRAS CATALISIS, LA FORMACION DEL COMPLEJO Cr (III) EDTA ES CINETICAMENTE MAS LENTA
CATALISIS MULTIPLE	Ga, Ni, Co, ETC.	DETECCION QUIMIOLUMINISCENTE -- COMBINADA CON SEPARACION DE INTERCAMBIO IONICO
ANALISIS ORGANICOS POR DETERMINACION DE LA SOLUBILIDAD DEL CATALIZADOR	AGENTES COMPLEJANTES EN AGUAS NATURALES	SEPARACION DE INTERCAMBIO IONICO
OXIDANTE	CLORO EN AGUAS DE DESECHO	SOLO LAS ESPECIES PRESENTES GENERAN QUIMIOLUMINISCENCIA
TITULACIONES	iodo ENLAZADO A PROTEINAS	POTENCIAL DE OXIDACION DIFERENTE DE OTROS OXIDANTES
	H ₂ O ₂ GENERADA POR OXIDASAS	SOLO LAS ESPECIES PRESENTES GENERAN QUIMIOLUMINISCENCIA
	SO ₂ EN AIRE (TITULADO CON I ₂)	MUESTREO SELECTIVO DE SO ₂
	ARSENICO TITULADO CON I ₂	DESTILACION DE AsCl ₃

es catalizada por Pb (II), Bi (III), Tl (III) y Hg -- (II); ninguno de éstos cataliza la quimioluminiscen-- cia del Luminol (154, 155). Por lo que la reacción de la lucigenina puede proporcionar los fundamentos para algunas aplicaciones analíticas que no son posibles - con el Luminol.

IV.C. Riboflavina-H₂O₂

La riboflavina reacciona con el H₂O₂ para generar qui mioluminiscencia, ésta se inicia ya sea adicionando - un agente reductor o por irradiación con luz visible- (quimioluminiscencia fotoinducida). Puesto que la in- tensidad de la quimioluminiscencia es aumentada signi- ficativamente por la presencia de cobre, pero como no es muy afectada por otros iones metálicos, este siste ma puede emplearse para análisis específicos de cobre (157).

IV.D. Bioluminiscencia: Algunas Aplicaciones

Existen distintas fuentes para diferentes tipos de lu ciferinas y luciferasas, en la tabla IV se dan algu-- nas fuentes representativas para obtener luciferina - y luciferasa (151). La selección de una fuente para - LH₂ y E, está gobernada principalmente por las condi- ciones químicas involucradas en la determinación o tí po de análisis para un elemento o compuesto (158), --

FUENTES DE LUCIFERINA Y LUCIFERASA

COCUYO Y LUCIERNAGA	FOTINUS FOTURIS LUCIOLA
CRUSTACEOS	CYPRIDINA PYROCYPRIS
BACTERIAS	ACROMOBACTER FISCHERII POTOBACTERIUM FISCHERII
PROTOZOARIOS (DINOFLAGELADOS)	GONYAULAX POLYEDRA
PENSAMIENTO DE MAR	RENILLA RENIFORMIS
MEDUSA	AEQUOREA

T A B L A No. IV

sin embargo, la eficacia, la estabilidad y el costo;-- son otros factores importantes que deben tomarse en cuenta (151,158).

IV.D.1. Sistema bioluminiscente del Cocuyo y Luciérnaga

Cuando ésta reacción se lleva a cabo (figura-2), para determinar ATP, se requiere de 0.1 a 1.0 picomoles como límite mínimo de detección, con una respuesta lineal que se amplifica cinco órdenes de magnitud (151).

Tal límite de detección y rango lineal se obtiene del llamado extracto "crudo" de ATP. Sin embargo, algunos investigadores han sido capaces de determinar ATP entre 2.0×10^{-2} picomoles en una célula bacteriana, -- controlando el pH y utilizando reactivos de alto grado de pureza (151). La diferencia entre los dos límites mínimos de detección se debe a la contaminación -- de los reactivos con el ATP o a la presencia de AMP -- en los extractos de ATP (159).

La especificidad de la LH₂ del cocuyo para determinar ATP es alta; sin embargo, se ha demostrado que tanto la citidina-5'-trifosfato (CTP) y la inosina-5'-trifosfato (ITP), estimulan la producción de luz al mismo grado que el ATP (160). Pero la contribución por éstos contaminantes a la emisión de luz total es pequeña, en una muestra que contenga ATP (151,160), pu-

esto que en los sistemas naturales la concentración de ATP es mucho mayor que la CTP e ITP (151). Se ha demostrado que otros contaminantes actúan como inhibidores de la emisión de luz en el siguiente orden de actividad: $Ca > K > Na > Rb > Li$. (159). El Hg (II) a concentraciones de 2 p.p.m. inhibe la emisión de luz debido a la influencia sobre la E (151,159).

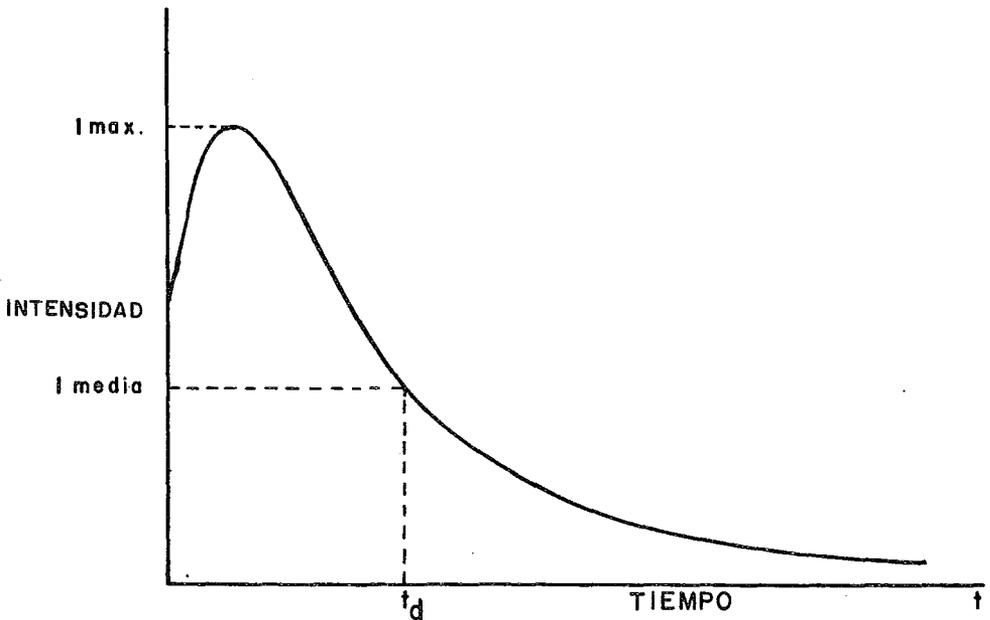
Un análisis característico de ATP emplea LH_2 de cocuyo (1.0 mg/ml, E(1.0 mg/ml) en buffer de THAM 0.05-M (pH=7.4) y solución 0.01 M de Mg (II). La mezcla puede ser liofilizada y almacenada a $-65^{\circ}C$. ésta es la forma más conveniente para almacenar los reactivos indefinidamente sin que pierdan su actividad y por simple adición de agua deionizada, reconstituirla para usarla inmediatamente.

Para un análisis, cuando menos el 0.5% del O_2 disuelto debe estar presente en la solución de reacción. - El ATP es determinado adicionando un exceso de reactivos y midiendo la intensidad de luz contra el tiempo. Una curva de respuesta característica se muestra en el esquema 35. Las curvas de calibración son trazadas a partir de las medidas de I_{max} ó I_{media} , o a partir de la intensidad total integrada como una función de la concentración de ATP (161).

El ATP está presente en todas las células vivas, a pesar de que éstas sean fotosintéticas ó heterótro-

ESQUEMA 35

ESQUEMA PARA EL ANALISIS BIOLUMINISCENTE DE ATP



Curva característica de BIOLUMINISCENCIA Vs. TIEMPO posterior al mezclamiento observado para el analisis de ATP

I max = Intensidad maxima observada

I media = Intervalo de tiempo fijo t_d , posterior a la intensidad

fas. Los enlaces fosfatos del ATP sirven como un reservorio de energía para la célula; por eso, el ATP está involucrado en bastantes reacciones metabólicas importantes y es de interés analítico (160).

Como mencionamos anteriormente es posible medir el contenido de ATP en una sola bacteria; conociendo esto, el análisis de ATP de una muestra que contenga bacterias puede proporcionar información en torno al número de organismos presentes. En la práctica sin embargo, el ATP por bacteria no se determina en base a una única bacteria, sino en base a un gran número de ellas (162). En cualquier análisis de una bacteria particular para la concentración de ATP por bacteria, los investigadores pueden comparar el análisis de ATP de cocuyo con el cultivo de la misma bacteria (151). Las ventajas de hacer un recuento de bacterias por análisis de ATP en lugar del cultivo son: la rapidez con que se realiza, la exactitud y el bajo costo. Además ciertos microorganismos filamentosos no pueden analizarse por técnicas convencionales y pueden determinarse satisfactoriamente por el método del ATP (151,162). Para ilustrar estas ventajas, consideremos el estudio en el que el cálculo de bacterias se realizó en muestras de alimentos, agua y orina. Como unas mil células bacterianas por muestra pueden ser determinadas en menos de 5 minutos. Para tal determinación el Log. (ATP) vs. Log. (número de células) muestra un coeficiente de correlación

APLICACIONES DE LA BIOLUMINISCENCIA

<u>APLICACION</u>	<u>AREA DE TRABAJO</u>
DETERMINACION DE VELOCIDAD DE REACCION	CONTROL DE PROCESOS EN ALIMENTOS, BEBIDAS EMBOTELLADAS E INDUSTRIA-FARMACEUTICA
DETECCION DE CONTAMINACION BACTERIANA	CONTROL DE CALIDAD EN ALIMENTOS, BEBIDAS EMBOTELLADAS, INDUSTRIAS-FARMACEUTICAS Y DE COSMETICOS.
MEDICION DE BROMASA EN AGUA	CONTROL DE PERDIDA DE RESIDUOS - ACTIVOS EN PROCESOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS <hr/> ESTUDIOS FUNDAMENTALES EN LIMNOLOGIA Y OCEANOGRAFIA
DETECCION DE PRESENCIA DE VIDA -	INVESTIGACIONES EXTRATERRESTRES
MEDICION DE INFECCIONES CAUSADAS POR BACTERIAS	MEDICINA

linear positivo de 0.93 (162).

En la Tabla V se enlistan algunas aplicaciones del análisis bioluminiscente para el ATP (151), en la tabla - VI se enlistan otras especies determinables por la reacción bioluminiscente del cocuyo, junto con su impor-- tancia (151, 163, 164, 165).

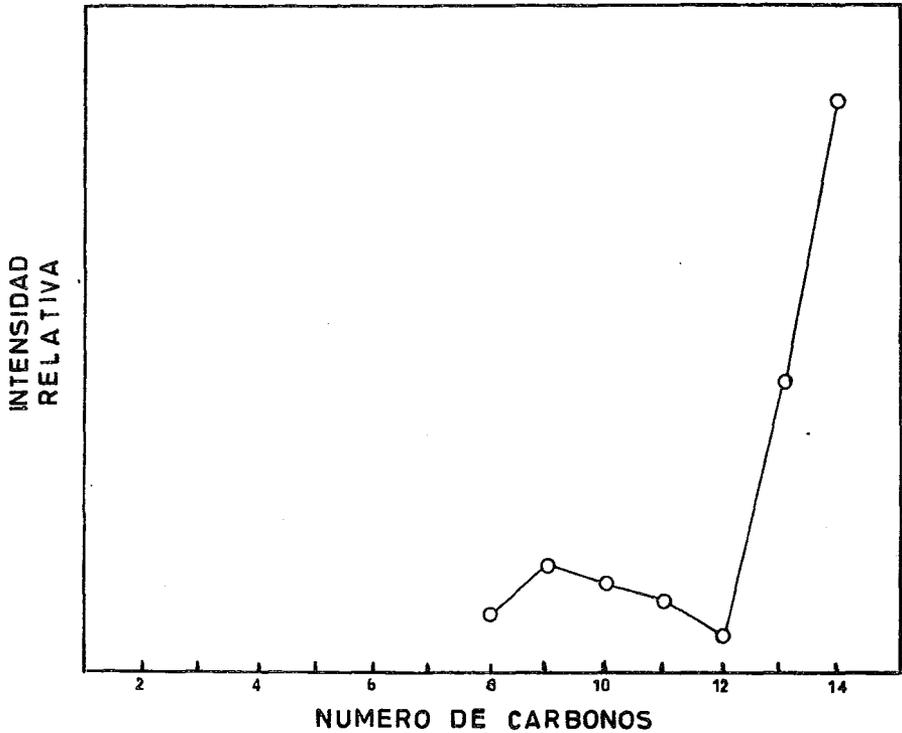
IV. D.2. Sistema bioluminiscente Bacteriano

En las reacciones del esquema (27a) y en la reacción-- de la parte III.-1(b) de éste trabajo, se resume el -- sistema emisor de luz bacteriano; la intensidad de la emisión depende de la longitud de la cadena del aldehí do, como se muestra en el esquema 36.

Los datos de la Tabla VII muestran que éste sistema -- tiene un nivel mínimo de detección para el análisis de FMN, que es superior a otros métodos comunmente usados (151), la tabla VII también ilustra que la fluorome-- tría compite en sensibilidad para analizar FMN sin embargo, éste último carece de especificidad, restrin-- giendo su uso sólo a preparaciones puras de FMN (166,- 167). Los compuestos que comunmente se encuentran en -- las muestras de los biosistemas interfieren con el análisis fluorométrico de FMN (167,168).

La bioluminiscencia bacteriana tiene una alta especifi cidad para el FMN, algunos FMN substituidos y dinucleo

ESQUEMA 36



Intensidad relativa de biolumiscencia como una funcion de la longiitud de la cadena del aldehido adicionado

NOTA: La intensidad relativa esta dada en CUANTOS/Seg.

APLICACIONES DE LA REACCION DEL COCUYO A OTRAS ESPECIES CON ATP

ESPECIE ANALIZADA	IMPORTANCIA
CREATINA FOSFATO	RESERVA DE ENERGIA PARA LA - ACTIVIDAD MUSCULAR
AMP CICLICO	MEDIADOR DE LA ACTIVIDAD - - HORMONAL
OXIGENO DISUELTO	MEDIDA DE CALIDAD DE AGUA
PIROFOSFATO INORGANICO	MATERIA PRIMA PARA VARIOS - COMPUESTOS BIOLOGICOS

T A B L A No. VI

SENSIBILIDAD DE LOS METODOS ANALITICOS PARA FMN

METODO	CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE, MG/100 ML.
CROMATOGRAFIA EN PAPEL	10^2
REDUCTASA CITOCROMICA	10^2
OXIDASA LACTICA	1
FLUOROMETRIA	10^{-4}
BIOLUMINISCENCIA BACTERIANA	10^{-5}

T A B L A No. VII

tidos adenin flavinas (FAD) reaccionan con la (E) bacteriana para producir luz; sin embargo, el nivel de emisión es bastante bajo, por lo que es de poco interés analítico (151). La relación entre la producción total de luz y la concentración de FMNH₂ es lineal de 1.0 X 10⁻⁴ a 1.0 g/ml. (169).

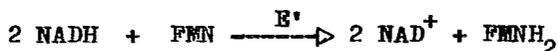
Las dos fuentes más populares de luciferasa bacteriana (E) son la fotobacteria fischerii y la Achromobacter fischerii. La luciferina, FMN, virtualmente puede obtenerse a partir de cualquier sistema vivo (151, -- 169).

La luciferasa se usa, generalmente a una concentración de 1.0 g/ml. en THAM 0.05 M (buffer de pH=7.4) (170). El dodecilaldehído complejado con bisulfito es el aldehído comunmente usado. El FMN puede extraerse a partir de la muestra tratándola con una solución al 6% de bunatol destilado en buffer de THAM 0.01 M que contenga 10⁻³ de EDTA. La extracción se lleva a cabo en menos de un minuto, y debe filtrarse en seguida, el sobrenadante contiene FMN y FMNH₂, al tratarse con NaBH₄ en presencia de PdCl₂ como catalizador, reduce el Fmn a FMNH₂, ó bien, el FMN puede ser reducido por NADH en presencia de H⁺. El FMN reducido es mezclado con la enzima (E) y el complejo aldehído de cadena larga-bisulfito ante un detector sensible a la luz, la intensidad de la emisión es comparada con una curva de calibración (166,167).

El análisis bioluminiscente por FMN se ha usado para detectar bacterias contagiosas y se ha investigado como un posible detector de vida extraterrestre (151, - 166, 167).

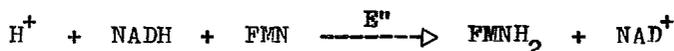
Otro tipo de aplicación implica exponer a la bacteria a vapores orgánicos y observar la disminución en su bioluminiscencia, esto puede usarse para estudiar el efecto de vapores anestésicos, o para detectar la presencia de varios compuestos tales como alcoholes, aldehidos y cetonas (168).

La dependencia de la bioluminiscencia bacteriana sobre el FMNH₂, y la participación del FMN en la siguiente reacción conduce a la posibilidad de un análisis en el que no se dependa directamente sobre el FMN, pero sí de algún substrato que sea oxidado por el NADH o reducido por el NAD⁺. (166, 167, 168).



En donde E' = NADH deshidrogenasa

Por ejemplo un método analítico para el NO₃⁻ puede basarse en las siguientes reacciones:



E" = nitrato reductasa.

La concentración del FMNH₂ resultante es proporcional a la concentración inicial de nitrato (166, 167).

IV.D.3. Otros Sistemas Bioluminiscentes

SISTEMA	APLICACION
Aequorea	Análisis de huellas de Ca (II) en muestras de origen biológico (171,172).
Renilla Reniformis	Determinación de PAPS en estudios metabólicos del cerebro. La tabla VIII -- muestra algunos activadores y su función relativa en la reacción (151,173).
Hongos	Determinación del enlace-piridina nucleotido en -- otros procesos bioquímicos (151,172).

ACTIVADORES DE NUCLEOTIDOS DE LA BIOLUMINISCENCIA
DE LA RENILLA RENIFORMIS

ACTIVADOR	% DE ACTIVIDAD RELATIVA
3', 5' - DIFOSFOADENOSINA	100
2', 5' - DIFOSFOADENOSINA	1
COENZINA A	7
3' - FOSFOADENOSINA - 5' FOSFOSULFATO (PAPS)	15-98*
ATP	0

* DEPENDE DEL GRADO DE LA HIDROLISIS ACIDA

T A B L A No. VIII

CONCLUSIONES.

1.- Para que una reacción luminiscente ocurra, se requieren de tres condiciones: a).- La reacción química debe liberar suficiente energía para producir un estado electrónicamente excitado; b).- El mecanismo de la reacción debe favorecer la formación de un producto - en estado excitado y c).- El producto en estado excitado debe ser capaz de emitir un fotón, o transferir su energía a otra molécula que pueda emitirlo.

2.- Todos los procesos luminiscentes se llevan a cabo en la zona del visible, no existen procesos quimioluminiscentes en la zona del ultravioleta ni en la zona del infrarojo debido a que la obtención del producto electrónicamente excitado se logra mediante energía - vibracional la que es capaz de excitar a una molécula fluorescente.

3.- Los procesos luminiscentes, con contadas excepciones, son las reacciones de tipo oxidativo y ocurren - con mayor frecuencia en moléculas orgánicas.

4.- Puesto que un gran número de oxidaciones de compuestos orgánicos en solución son quimioluminiscentes solo cuando el oxígeno o algún peróxido están presentes, los más recientes descubrimientos indican que en la reacción que se efectúa, el oxígeno en estado excitado es frecuentemente formado.

5.- El espectro de emisión es frecuentemente característico de un producto molecular formado por la ruptura del enlace peróxido O - O . Los espectros observados tienen una amplia banda, frecuentemente con un máximo definido, de modo que la congruencia aparente de las curvas quimioluminiscentes y fluorescentes no es un diagnóstico necesario para identificar al producto molecular excitado.

6.- Existen, de hecho, miles de especies luminiscentes extendidas en el reino animal. La luminiscencia es más frecuente entre los organismos marinos, muchos de los cuales han desarrollado notables adaptaciones para su emisión de luz.

7.- No existen vertebrados bioluminiscentes, excepto algunos peces, y entre las plantas solo se encuentran algunas bacterias y hongos.

8.- Las dificultades de recolección y las pocas cantidades de material activo extraíble, constituyen un problema, desde el punto de vista químico, que dificulta una investigación más profunda de ciertos organismos luminiscentes unicelulares.

9.- La mayor parte de los trabajos de investigación realizados sobre las luciérnagas y cocuyos, se han llevado a cabo con el género americano *Photinus pyralis* pero los componentes de la reacción luminosa (lu

ciferina, luciferasa y el luciferil adenilato enlazado a la enzima) son comunes a todas las especies hasta ahora estudiadas.

10.- En la luciérnaga y el cocuyo la emisión de luz está bajo control nervioso, y por consiguiente la hidrólisis de los diversos fosfatos implicados en la reacción luminiscente, esta asociada al impulso nervioso.

11.- Aunque algunos organismos muy afines parecen utilizar mecanismos bioquímicos análogos, no hay un mecanismo común que sea aplicable a todos los organismos luminiscentes; sin embargo, comparando tres sistemas bioluminiscentes: el de la luciérnaga, de los crustáceos y el del "pensamiento de mar", puede observarse que en cada caso el oxígeno molecular es consumido estequiométricamente y se producen dos cetonas; una luciferina cetodescarboxilada en estado electrónicamente excitado y bioxido de carbono libre.

12.- Se conocen un gran número de compuestos orgánicos quimioluminiscentes, en este trabajo solo se mencionan los más importantes, como un apoyo a futuros trabajos prácticos de investigación.

13.- Las luciferinas constituyen un grupo relativamente nuevo en el área de los Productos Naturales, enfocarse a estos compuestos dentro de este campo, sería -

objeto de otra monografía.

14.- El futuro de la humanidad es muy incierto, puede ocurrir que los niveles de contaminación ambiental -- sean tales que la concentración de oxígeno en el aire sea similar al de la atmósfera primitiva; una adaptación para utilizar bajos niveles de oxígeno la constituye la bioluminiscencia.

15.- Es importante conocer los procesos luminiscentes puesto que la producción de luz, ya sea por reacciones químicas o por organismos vivos, pueden constituir un modelo químico o bioquímico para procesos exoenergéticos de altos rendimientos; puesto que las fuentes de energía en la tierra pueden, en un futuro lejano, resultar insuficientes.

16.- En el capítulo de aplicaciones, más que describir métodos, me pareció más importante indicar el área de trabajo, tipo de análisis, tipo de industria, etc; en donde pueden emplearse procesos luminiscentes para cuantificar algún elemento ó compuesto químico, o bien, realizar el control de calidad en la fabricación de ciertos productos.

17.- Gracias a la alta sensibilidad intrínseca de los métodos luminiscentes, los aparatos para efectuar análisis de elementos no requieren de un detector de luz de gran capacidad, sin embargo, en la práctica está--

limitada por la pureza del reactivo, más que por la capacidad de medir luz.

NOMENCLATURA

E	LUCIFERASA
LH ₂	LUCIFERINA
L	DEHIDROLUCIFERINA
L=O	LUCIFERINA OXIDADA
Q _b	PRODUCCION BIOLUMINISCENTE DE CUANTOS
Q _q L	PRODUCCION QUIMIOLUMINISCENTE DE CUANTOS
ø _Q L	EFICIENCIA DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA
ø _Q L	= <u>NUMERO (O FRECUENCIA) DE FOTONES EMITIDOS</u> NUMERO (O FRECUENCIA) DE MOLECULAS REACTIVAS
I _Q L	INTENSIDAD DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA
λ _b	LONGITUD DE ONDA MAXIMA DE EMISION BIOLUMINISCENTE.
λ _f	LONGITUD DE ONDA MAXIMA DE EMISION FLUORESCENTE.
λ _q L	LONGITUD DE ONDA MAXIMA DE EMISION QUIMIOLUMINISCENTE

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Selecciones de Scientific American. "La Célula Viva".
Cap. III. Energética. Pag. 184. 2a. Edición. Editorial Blume. Madrid (1969).
- 2.- Maron, Samuel H. y Prutton, Carl F, Fundamentos de Fisicoquímica. Cap. 19 Fotoquímica Pag. 787-811. Ed. LIMUSA WILEY S.A. México. (1972).
- 3.- Mc Capra, F; Q. Rev. Chem. Soc. 20 485-510 (1966).
- 4.- Bowen, E.J.; Angew. Chem. Internat. Edit. 4 7 566--73 (1965).
- 5.- Selecciones del Reader's Digest. S.A. "Maravillas y Misterios del Mundo Animal". Cap. I, 3a. parte pag. 111-13. México, D.F. (1965).
- 6.- Mc. Capra, F.; Acc. Chem. Research. 9 6 201-8 (1976)
- 7.- Bowen, E. J; Angew. Chem. Internat. Edit. 4 81-6 --- (1965).
- 8.- Van Duuren, B. J; Chem. Reviews. 63 325 (1963).
- 9.- Sisler, Harry. H; Vander Werf, C.A. And Arthur, W.D. College Chemistry. Cap. 13 The Rates of Chemical Reactions. Pág. 290-92. Third Edition. The Mac Millan -- Company. New York. (1969).
- 10.- Price, W.C; Ann. Rev. Physic. Chem. 11 133 (1960).
- 11.- Hofert, M; Angew. Chem. 76 826 (1964).
- 12.- Gole, J. L; Ann. Rev. Phys. Chem. 27 525-51 (1976).
- 13.- Seliger, H.H. and Mc. Elroy, W. D; Arch. Biochem. -- Biophys. 88 136 (1960).
- 14.- Bitler, B. And Mc Elroy, W.D; Arch. Biochem. Biophys. 72 353 (1957).

- 15.- Mc Capra, F; Endeavour. 32 139-45 (1973).
- 16.- Mc Capra, F; Pure Appl. Chem. 24 611 (1970).
- 17.- Mc Capra, F. and Chang, Y.c; Chem. Commun. 1011 (1967)
- 18.- Albrecht, H.O; Z Phys. Chem. 136 321 (1928).
- 19.- Mc Capra, F. Chem. Commun. 155 (1968).
- 20.- Turro, N.J. and Lechtken, P; J. Amer. Chem. Soc. 94 -
2886 (1972).
- 21.- Wilsol, T. and Schaap, A. P; J. Amer. Chem. Soc. 93 -
4126 (1971).
- 22.- Vaughan, W; Chem. Rev. 43 447 (1948).
- 23.- White, E. H; J. Chem. Educ. 34 275 (1957).
- 24.- Drew, H. D. and Pearman, F. H; J. Chem. Soc. 586 - --
(1937).
- 25.- White, E. H. et al; J. Amer. Chem. Soc. 86 940(1964).
- 26.- Gundermann, K. D. Et al; Annalen. 684 127 (1964).
- 27.- Drew, H. D. and Gardwood, R. F; J. Chem. Soc. 1841 --
(1937).
- 28.- Huntress, E.H. and Gladding, J. V; J. Amer. Chem. Soc
64 2644 (1942).
- 29.- Stross, F. H. and Branch, G.E. K; J. Org. Chem. 3 - -
385 (1938).
- 30.- Armstrong, W.A. and Humphreys, W. G; Canad. J. Chem.-
43 2576 (1965).
- 31.- Metealf, W.S. and Quickenden, T.I; Nature. 206 506 -
(1965).
- 32.- Kautsky, H. and Kaiser, K. H; Naturwiss. 31 505 - --
(1943).
- 33.- White, E.H. and Harding, M.J; J. Amer. Chem. Soc. 86
5686 (1964).

- 34.- Eckert, R; Science. 151 349 (1966).
- 35.- Hastings, J.W; Ann. Rev. Biochem. 37 597-630 (1968).
- 36.- Mc Capra, F. and Chang, Y. C; Chem. Comm. 522 (1966)
- 37.- Philbrook, G.E; et al. Photochem. and Photobiol. 4 -
869 (1965).
- 38.- Totter, J. R; Photochem. and Photobiol. 3 231 (1964)
- 39.- Weber, K. and Ochsenfeld, W; Z. phys. Chem. 51 63 --
(1942).
- 40.- Tsuji, F.I. and Sowinski, R; J. Cellular Comp. Phy-
siol. 58 125 (1961).
- 41.- Glen, K. and Petch, P; Angew. Chem. 48 57 (1935).
- 42.- Rauht, M.M. et al; Org. Chem. 30 3587 (1965).
- 42a.-Mc Capra, F. and Richardson, D.G; Tetrahedron Lette-
ra. 3167 (1966).
- 43.- Chandross, E.A; Tetrahedron Letters. 761 (1963).
- 44.- Marcus, R.A; J. Chem. Phys. 43 2654 (1965).
- 45.- Chandross, E.A. and Sonntang, F.I; J. Amer. Chem. --
Soc. 88 1089 (1966).
- 46.- Hercules, D. M; Science, 145 808 (1964).
- 47.- Chandross, E.A. and Sonntang, F.I; J. Amer. Chem. --
Soc. 86 3179 (1964).
- 48.- Chandross, E.A. and Longworth, J.W; J. Amer. Chem. -
Soc. 87 3259 (1965).
- 49.- Santhanam, K.S.V. and Bard, A.J; J. Amer. Chem. Soc.
87 139 (1965).
- 50.- Feldberg, S.W; J. Amer. Chem. Soc. 88 390 (1966).
- 51.- Helberger, J.H; Naturwiss. 26 316 (1938).
- 52.- Cook, A. H; J. Chem. Soc. 1774, 1845 (1938).
- 53.- Bersis, D.S; Z. Phys. Chem. 26 359 (1960).

- 54.- Hochstrasser, R.M. and Porter, G. B; *Quart. Rev*; 26
359 (1960)
- 55.- Bender, P. and Faber, J; *J. Amer. Chem. Soc.* 74 --
1450 (1952).
- 56.- Mc Elroy, W.D. et al; *Science.* 118 385 (1953).
- 57.- Goto, T. et al; *Tetrahedron Lett.* 4035 (1968).
- 58.- Biggley, W.H. et al; *J. Gen. Physiol*; 50 1681 - -
(1967).
- 59.- Green, A.A. and Mc Elroy, W.D; *Biochim. Biophys. --*
Acta. 20 170 (1956).
- 60.- Seliger, H.H; *Photochem. and Photobiol.* 21 355 ---
(1975).
- 61.- Gormier, M.J. and Totter, J.R; *Ann Rev. Biochem.* 33
431 (1964).
- 62.- Mazur, Abraham y Harrow, Benjamin; *Bioquímica Básica.*
10a. Ed. Interamericana. México (1973).
- 63.- Leninger, A.L; *Bioquímica. Cap. 17 Ciclo de los Aci-*
dos Tricarboxilicos y Ruta del Fosfogluconato Pág.-
463. 2a. Ed. Ediciones Omega. S.A. Barcelona (1978).
- 64.- Rhodes, W.C. and Mc Elroy, W.D; *J. Biol. Chem.* 233
1528 (1958).
- 65.- Airth, R.L. et al; *Biochim. Biophys. Acta.* 27 519-
(1958).
- 66.- Shimomura, O. et al; *J. Cellular comp. Physiol.* 59-
223 519 (1962).
- 67.- Shimomura, O; Johnson, F. H. and Saiga, Y; *J. Cellu-*
lar Comp. Physiol; 58 113 (1961).
- 68.- Kishi, Y. et al; *Tetrahedron Letters.* 29 3434 ----
(1966).

- 69.- Kishi, Y. et al; Tetrahedron Letters. 29 3427 (1966).
- 70.- Johnson, F.H. et al; J. Cellular Comp. Physiol. 60 -
85 (1962).
- 71.- Kishi, Y. et al; Tetrahedron Letters. 29 3435 - ---
(1966).
- 72.- Anderson, R.S; J. Am. Chem. Soc. 59 2115 (1937).
- 73.- Chance, B. et al; J. Cellular Comp. Physiol. 15 195
(1940).
- 74.- Leonard, N. J. and Lausen, R. A; Biochemistry. 4 354
(1965).
- 75.- Shimomura, O; Johnson, F. H. and Saiga, Y; J. Cellular
Comp. Physiol. 61 275 (1963).
- 76.- Shimomura, O; Beers, J.R. and Johnson, F.H; J. Cellular
Comp. Physiol. 64 15 (1964).
- 77.- Shimomura, O. and Johnson. F. H; Biochemistry. 6 - -
2293 (1967).
- 78.- Seliger, H.H. et al; J. Gen. Physiol. 48 95 (1964).
- 79.- Mc Elroy, W.D. and DeLuca, M; Science. 157 150 - - -
(1967).
- 80.- White, E.H; Mc Capra, F. and Field, G.F; J. Amer. ---
Chem. Soc. 85 337 (1963).
- 81.- DeLuca, M. et al; Biochemistry. 3 935 (1964).
- 82.- Travis, J. and Mc Elroy, W.D; Biochemistry. 5 2170 -
(1966).
- 83.- White, E.H. and Worther, H; J. Org. Chem. 31 1484 --
(1966).
- 84.- Airth, R.L; Rhodes, W.C. and Mc Elroy, W.D; Biochin.
Biophys. Acta. 27 519 (1958).
- 85.- Hopkins, T.A. et al; J. Am. Chem. Soc. 89 7148 (1967)

- 86.- Airth, R.L. and Foerster, G. E; *J. Bacteriol.* 88 --
1372 (1965).
- 87.- DeLuca, M; and Mc Elroy, W.D; *Biochem. Biophys. Res-
Commun.* 18 836 (1965).
- 88.- DeLuca, M. and Marsh, M; *Arch. Biochem. Biophys.* 121
233 (1967).
- 89.- Cormier, M.J; Lee, J. and Wampler, J.E; *Ann. Rev.* --
Biochem. 44 255-72 (1975).
- 90.- Lee, J; *Photochem. Photobiol.* 20 535-39 (1974).
- 91.- Goto, T and Kishi, Y; *Angew. Chem.* 7 407-14 (1968).-
- 92.- Harvey, E.N; *Quart. Rev. Biol.* 31 270 (1956).
- 93.- Hori, K. et al; *Biochemistry.* 12 4463-69 (1973).
- 94.- Ma Capra, F. and Manning, M.J; *Chem. Commun.* 467-68-
(1973).
- 95.- Hori, K; Wampler, J. E. and Cormier, M.J; *Chem. Co--
mmun.* 492-94 (1973).
- 96.- Goto, T; *Tetrahedron Lett.* 29 2035-39 (1973).
- 97.- DeLuca, M; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68 1658-60 ---
(1971).
- 98.- DeLuca, M. and Dempsey, M.E; *Biochem. Biophys. Res -
Commun.* 40 117-22 (1970).
- 99.- Mc Capra, F; *Chem. Commun.* 155-56 (1968).
- 100.- Wampler, J.E; et al; *Biochemistry.* 10 2903-10 (1971)
- 101.- Morise, H. et al; *Biochemistry.* 13 2656-62 (1974).
- 102.- Wampler, J.E. et al; *Fed Proc* 31 419 (1972).
- 103.- Anderson, J.M; Charbonneau, H. and Cormier, M. J; --
Biochemistry. 13 1195-1201 (1974).
- 104.- Cormier, M.J; Hori, K. and Karkhanis, Y. D; *Bioche-
mistry.* 9 1184-90 (1970).

- 105.- Anderson, J.M. and Cormier, M.J; J. Biol. Chem. 248-
2937-43 (1973).
- 106.- Strehler, B.L; J. Am. Chem. Soc. 75 1264 (1953).
- 107.- Mc Elroy, W.D; Hastings, J.W. and Sonnenfeld, V; Sci
ence. 118 385 (1953).
- 108.- Cormier, M.J. and Strehler, B.L; J. Am. Chem. Soc.-
75 4864 (1953).
- 109.- Hastings, J.W; Riley, W.H. and Massa, J; J. Biol. --
Chem. 240 1473 (1965).
- 110.- Hastings, J.W. and Gibson, Q.H; J. Biol. Chem. 238 -
2537 (1963).
- 111.- Hastings, J.W. and Gibson, Q.H; J. Biol. Chem. 242 -
720 (1967).
- 112.- Gibson, Q.H. and Hastings, J. W; Biochem. J. 83 368-
(1962).
- 113.- Kearns, D.R. et al; J. Am. Chem. Soc. 89 5455 (1967)
- 114.- Mc Elroy, W.D. and Green, A.A.; Arch. Biochem. Bio -
phys. 56 240 (1955).
- 115.- Cormier, M.J. and Totter, J.R; Biochim. Biophys. - -
Acta. 25 229 (1957).
- 116.- Hastings, J.W. and Gibson, Q.H; Proc. Natl. Acad. ---
Sci. U.S. 52 1529 (1954).
- 117.- Hastings, J.W. and Gibson, Q.H; Photochem. Photobiol
4 1227 (1965).
- 118.- Hastings, J. W; Spudich, J.A. and Malnic, G; J. Biol
Chem. 238 3100 (1963).
- 119.- Cormier, M.J. and Kuwabara, S; Photochem. Photobiol.
4 1217 (1965).
- 120.- Friedland, J. and Hastings, J.W; Biochemistry. 6 ---

- 2893 (1967).
- 121.- Cline, T.W. and Hastings, J.W; J. Biol. Chem. 249 -
4668-69 (1974).
- 122.- Gunsalus, M. A. et al; J. Biol. Chem. 247 298-404 -
(1972).
- 123.- Mitchell, G.W. and Hastings, J.W; J. Biol. Chem. --
244 2572-76 (1969).
- 124.- Airth, R.L. and Foester, G.E; Arch. Biochem. Biophys.
97 567 (1964).
- 125.- Dure, L.S; and Cormier, M.J; J. Biol. Chem. 236 PC-
48 (1961).
- 126.- Dure, L.S. and Cormier, M.J; J. Biol. Chem. 239 - -
2351 (1964).
- 127.- DeLuca, M, and Marsh, M; Arch. Biochem. Biophys. --
121 233 (1967).
- 128.- Desa, R; and Hastings, J.W; J. Gen. Physiol. 51 105
(1968).
- 129.- Eckert, R; Science. 147 1140 (1965).
- 130.- Eckert, R; J. Gen. Physiol. 50 2211 (1967).
Eckert, R; and Reynolds, G. T; J. Gen. Physiol. 50 -
1429 (1967).
- 131.- Bode, V.C. and Hastings, J.W; Arch. Biochem. Bio- -
phys. 103 488 (1963).
- 132.- Kreiss, P. and Cormier, M.J; Biochim. Biophys. Acta
141 181 (1967).
- 133.- Steele, R.H; Biochemistry. 2 529 (1963).
- 134.- Ward, W.W. and Seliger, H.H; Biochemistry. 13 1491-
99 (1974).
- 135.- Shimomura, O; Johnson, F.H. and Saiga, Y; J.Cellular

Comp. Physiol. 62 9 (1963).

- 136.- Mc Elroy, W. D. and Seliger, H.H; Aduan. Enzymol. 25
119 (1963).
- 137.- White, E. and Roswell, D; J.Am Chem. Soc. 89 3944 --
(1967).
- 138.- Ward, W.W. and Seliger H.H; Biochemistry. 13 1500-10
(1974). Kohama, Y; Shimomura, O. and Johnson, F.H; -
Biochemistry. 10 4149-52 (1971).
- 139.- Shimomura, O. and Johnson, F.H; Tetrahedron Lett. 31
2963-66 (1973).
- 140.- Hori, K; Nakano, Y, and Cormier, M.J; Biochim. Bio--
phys. Acta. 256 638-44 (1972).
- 141.- Shimomura, O. et al; Biochemistry. 13 3278 (1974).
- 142.- Kautsky, H. and de Bruijn, H; Naturwissenschaften. -
19 1043 (1931).
- 143.- Foote, G.S. and Wexler, S; J. Am. Chem. Soc. 86 - --
3879 (1964).
- 144.- Wilson, T; J. Am. Chem. Soc. 88 2898 (1966).
- 145.- Corey, E.J. and Taylor, W.D; J.Am. Chem.Soc. 86 - --
3881 (1964).
- 146.- Khan, A.U. and Kasha, M; Nature 204 241 (1964).
- 147.- Khan, A.U, and Kasha, M; J. Am. Chem. Soc. 88 1574 -
(1966).
- 148.- Samuelsson, E; J. Am. Chem. Soc. 87 3011 (1965).
- 149.- Anbar, M; J.Am. Chem. Soc. 88 5924 (1966).
- 150.- Trudgill, P. W; Dubus, R. and Gunsalus, J.C; J.Biol.
Chem. 241 1194 (1966).
Yasuda, H; et al; Biochem. Biophys. Res. Commun. 28-
135 (1967).

- 151.- Seitz, W.R. and Neary, M.P; Anal. Chem. 46 188-202 -
(1974).
- 152.- Stevens, R.K. and Hodgeson, J.A; Anal. Chem. 45 443A
(1973).
- 153.- Nederbragt, G.W; van der Horst, A. and van Duijn, J;
Nature. 206 87 (1965).
- 154.- Seitz, W.R. and Hercules, D. M; Anal. Chem. 44 2143-
(1972).
- 155.- Seitz, W.R. and Hercules, D.M; Anal. Chem. 44 957 --
(1972).
- 156.- Stone, M.O. and Steele, R.H; Biochem. 9 4343 (1970).
- 157.- Wehry, E.L; and Varnes, A.W; Anal. Chem. 45 1800 - -
(1973).
- 158.- Dufresne, L.and Gitelman, H.J; Anal. Biochem. 37 - -
402-08 (1970).
- 159.- Suzuki, N.and Goto, T; Tetrahedron. 28 4075-82 - - -
(1972).
- 160.- John, J.B; Anal. Biochem. 37 404-16 (1970).
- 161.- Johnson, R.A. et al; Anal. Biochem. 35 91-97 (1970).
- 162.- Chapelle, E.W. and Levin, G.V; Biochem. Med. 2 41-52
(1968).
- 163.- Patterson, J.W; Brezonik, P.L. and Putnam, H.D; Envi
ron. Sci. Technol. 4 (7) 569-75 (1970).
- 164.- Holm-Hansen, O. and Booth, C.R; Limnol. Oceanogr. 11
510-19 (1966).
- 165.- Holm.- Hansen, O; Limnol. Oceanogr. 14 740-47 (1969)
- 166.- Chapelle, E.W. et al; Biochem. Med. 1 252-60 (1967).
- 167.- Stanley, P.E; Anal. Biochem. 39 441-53 (1971).
- 168.- White, D.E. and Dundas, C.R; Nature. 226 456-58 - --

(1970).

- 169.- Lee, J; Biochem. 11 3350 (1972).
- 170.- Shimomura, O; Johnson, F.H. and Saiga, Y; Science. -
140 1339 (1963).
- 171.- Ridgway, E.B. and Ashley, C.C; Biochem. Biophys. --
Res. Commun. 29 (2) 229-34 (1967).
- 172.- Izutsu, K.T. et al; Biochem. Biophys. Res. Commun.-
9 (4) 1034-39 (1972).
- 173.- Hamman, J.P. and Seliger, H.H; J. Cell. Physiol. 80
(3) 397-408 (1972).