

QUÍMICA E LUZ

Quimioluminiscencia: propiedades do luminol

Manuel R. Bermejo,¹ M. Isabel Fernández-García,¹ Beatriz Fernández,² M. Inés García-Seijo,³
Esther Gómez-Fórneas,¹ Ana M. González-Noya,¹ Marcelino Maneiro,¹ Rosa Pedrido,¹ María
J. Romero,¹ Laura Rodríguez-Silva¹

¹Departamento de Química Inorgánica, Universidade de Santiago de Compostela

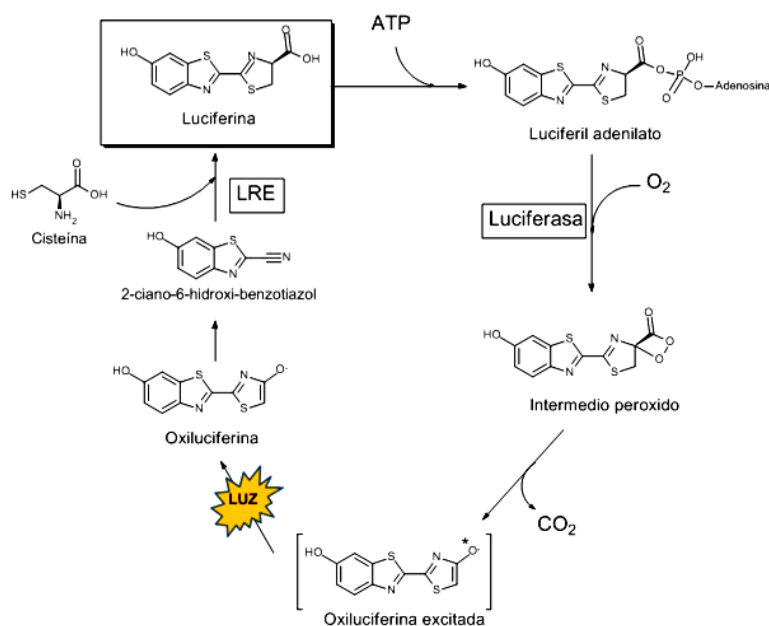
²IES Anxel Fole, Lugo

³CPI Luís Díaz Moreno, Baralla

Introducción

Os vagalumes permítenos comprender o fenómeno de bioluminiscencia (quimioluminiscencia feita por un ser vivo), é dicir, a emisión de “luz fría” por organismos vivos. É unha reacción química que usan os vagalumes masculinos para atraer ós vagalumes femininos e estas responden tamén emitindo luz.

O mecanismo bioquímico responsable da bioluminiscencia, ou emisión de luz por parte deste insecto e outros organismos baséase na descomposición dun peróxido. Os elementos clave do mecanismo de emisión de luz descubríronos os investigadores do grupo de William McElroy, en USA, durante os anos 60 e mais tarde, nos anos 70, o laboratorio de Gary Schuster en Xeorxia Tech identificou os mecanismos electrónicos da molécula responsable da emisión de luz. Os órganos luminosos do vagalume conteñen os dous materiais protagonistas: a luciferina, un derivado do benzotiazol, que purificou e cristalizou a partir destes insectos, e a luciferasa, o encima que cataliza a reacción.¹



Todos os peróxidos orgánicos son moi inestables e este, espontaneamente, rompe, xerando unha molécula de oxiluciferina cuxo osíxeno atópase nun estado excitado “singlete”. A formación dunha molécula cun osíxeno en estado excitado tras a ruptura dun peróxido é común e é a base das bioluminiscencias. Neste caso, as moléculas excitadas decaen ao seu estado fundamental cunha vida media de 10^{-9} segundos, emitindo o exceso de enerxía en forma de luz de cor verde amarelada, cunha lonxitude de onda de, no caso de *Lampyris noctiluca*, exactamente 550 nm. Unha curiosidade: a emisión luminosa do noso animalíño constitúe a fonte de luz mais eficiente do mundo cunha eficiencia cuántica do 100% (isto é, o número de moléculas que reaccionan dividido entre o número de fotóns emitidos é 1). Para que vos fagades unha idea, as nosas fontes de luz mais eficientes, os LED teñen unha eficiencia cuántica entre o 50 e 60% nos mellores casos.

Un aspecto interesante é o mecanismo que utiliza o organismo para reciclar a luciferina “gastada”: grazas ao encima LRE (luciferin regenerating enzyme), a oxiluciferina rompe, xerando un intermediario cianurado que reacciona con cisteína, rexenerando a luciferina. Este paso do metabolismo da luciferina non foi descuberto ata o ano 2001, no que se publicou a descrición do encima LRE. A Bioquímica é fabulosa reciclando moléculas para aforrar enerxía.²

Pero aínda non están claras moitas preguntas ao redor da bioluminiscencia dos vagalumes. Por exemplo, pénsase que o control da lonxitude de onda (cor) da emisión luminosa realízase mediante tautomería da oxiluciferina: se o bicho quere emitir luz mais avermellada, usa a forma ceto, se quere mais verdosa, usa a forma enol. Tampouco está demasiado claro o mecanismo de encendido-apagado que usan.

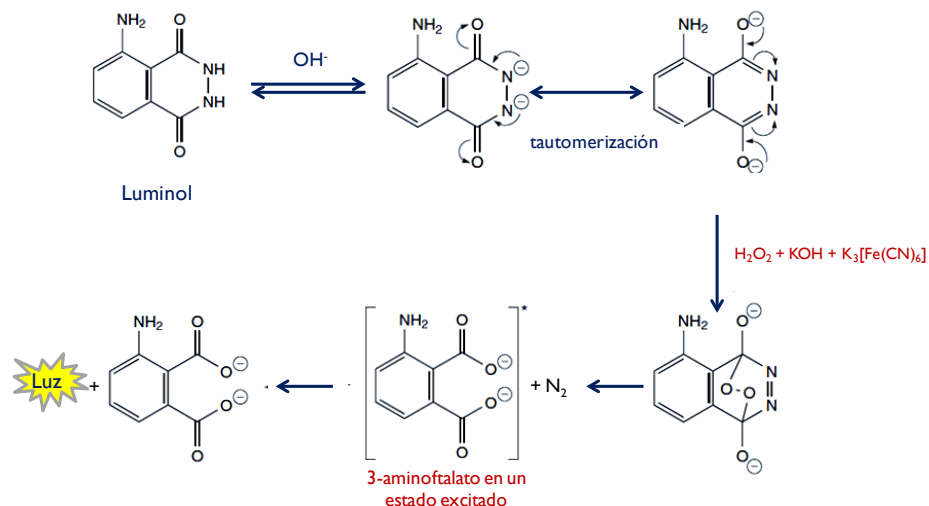
As implicacións desta reacción son moitas. Por exemplo, a luciferasa converteuse nunha ferramenta importantísima en Bioquímica e Bioloxía Molecular e as súas aplicacións van desde a Medicina ata a industria biotecnolóxica e as ciencias ambientais. Así, úsase no estudo da progresión de enfermidades infecciosas, da progresión de tumores, como biosensor no estudo de contaminantes ambientais.

Imitando aos insectos bioluminiscentes: o luminol

O Luminol é un bo exemplo de quimioluminiscencia que imita a bioluminiscencia do vagalume. E é unha reacción moi sinxela de realizar e moi instructiva. A quimioluminiscencia do luminol foi descuberta polo químico alemán Albrecht en 1928, e outro químico alemán, Walter Specht, comezou a usalo na investigación criminal en 1937. Con todo, o seu mecanismo non se coñeceu ata finais do século XX. É interesante, xa que o mecanismo ten bastante en común coa reacción da luciferina, aínda que o desenvolvemento do luminol foi independente e non inspirado na bioluminiscencia.

Tal como ocorre coa reacción da luciferina, a oxidación do substrato (luminol) polo osíxeno nacente xerado na descomposición da auga oxixenada produce un intermedio peróxido, que se descompón rapidamente formando unha molécula co osíxeno en estado excitado. Ao volver ao seu estado fundamental, a molécula emite unha bonita luz azul. Aquí os detalles do

mecanismo electrónico son lixeiramente distintos que no caso da luciferina, pero a grosso modo temos o mesmo tipo de reacción. Como vedes, no primeiro paso da reacción é necesario que a molécula se atope desprotonada, por iso a reacción ten lugar no medio básico e engádesse NaOH.



A clave da reacción está no paso de auga osixenada a osíxeno. O luminol só se “activa” en presenza de catalizadores eficaces que descompoñan a auga osixenada, por exemplo na detección forense de sangue, o catalizador é o propio ferro presente na hemoglobina, pero calquera catalizador que o descompoña (iones de cobre, complexos de ferro, encimas) fai funcionar a reacción.³

Neste congreso de ENCIGA imos propoñer a realización dunha práctica na que utilizamos o luminol (un derivado do ácido ftálico) para realizar unha reacción química que emite luz. O luminol posúe a capacidade de ensinar por medio de luz visible cando se oxida. Por iso é unha ferramenta moi utilizada na investigación forense, xa que pode revelar en disolución, cun oxidante, ata os restos máis ínfimos de sangue. As reaccións de luminol requiren un catalizador. No caso do sangue, o ferro da hemoglobina é un poderoso catalizador.

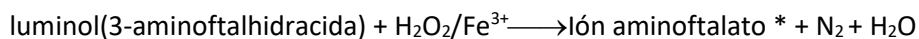
PARTE EXPERIMENTAL

Material y reactivos:

- Luminol
- Auga osixenada 110 vol.
- Hidróxido sódico
- Ferricianuro de potasio
- Cromóforos: fluoresceína, rodamina B, rodamina 6G y eosina.
- Probetas, tubos de ensaio, vasos de precipitados, matraces aforados de 1 litro, etc

Na experiencia que aquí se describe, o luminol oxídase no medio básico polo osíxeno (liberado na descomposición do peróxido de hidróxeno) a ión aminoftalato, que se forma nun estado

excitado, é dicir de maior enerxía, o cal se desactiva emitindo luz e producíndose a luminiscencia.⁴



Esta reacción necesita ser catalizada para que se produza a luminiscencia. Pódense empregar diferentes catalizadores como sales de Cu (II) ou de Co (II). Neste caso utilizaremos como catalizador o ión ferro (III) (Fe^{3+}) contido no hexacianoferrato (III) de potasio $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, coñecido tamén como ferricianuro de potasio.

Para iso, preparáense as seguintes disolucións:

- **Disolución A:** disólvense 4g de hidróxido de sodio (NaOH) e 0,4 g de luminol nun litro de auga destilada.
- **Disolución B:** disólvense 4g de ferricianuro de potasio nun litro de auga destilada.

As disolucións de cromóforos prepáranse ao 0,5% en auga excepto a de rodamina 6G que é unha disolución alcohólica.

Prepáranse tubos de ensaio cada un con:

- Tubo 1: 30-40 ml da disolución **A**. Opcionalmente pódese engadir unhas pingas de disolución de colorante cromóforo (uns 0,5ml).
- Tubo 2: 30-40 ml da disolución **B** e unhas pingas (uns 0,5 ml) da disolución de auga osixenada ao 30% (110 volumes).

Para poder observar a luminiscencia escurécese a habitación e engádesse pouco a pouco o contido do tubo **2** sobre o **1**. Aparecerá un destello luminoso azul por a quimioluminiscencia do luminol.⁵

Se ademais se engaden diferentes cromóforos, aparecerán distintas cores para a luz emitida: amarelo, se se engade fluoresceína; vermello rosáceo, se se engade rodamina B; vermello violáceo, con rodamina 6G e laranxa, se é eosina. Se se diminúe a temperatura de reacción, a luminiscencia é máis duradeira pero menos intensa.

Xogando a policía científica

Propóñovos este experimento:

1. Disolución A: Disolver 4 gramos de NaOH en 250 mL de auga destilada
2. Disolución B: Disolver 10 ml de H_2O_2 ao 30% en 490 ml de auga destilada.
3. Disolución C: disolver 0.354 gramos de luminol en 63 ml da solución A. Dilúide a medio litro con auga destilada.

Mesturar nun frasco de spray 10ml A + 10ml B + 10 ml C + 70 ml auga destilada. Pódese asperxer co spray a solución de luminol onde pensades que houbo unha mancha de sangue ou seme, por exemplo, coa luz apagada e a habitación completamente ás escuras. Veredes que as zonas onde estivo manchado ilumínanse cun visible escintileo azul, mais intenso canto mais recente ou menos limpa está a zona, pero visible aínda que se tentou limpar. Pensades que

sodes moi limpos na casa? probade a asperxer con esta solución sobre a encimera da cociña ou a pila, en especial se estiveses limpando peixe? ou o lavabo, en especial se vos cortastes afeitándoos. Aínda que non queden restos visibles de sangue, o luminol revela onde estivo.

Isto co que estamos a xogar chámase a formulación de Weber e úsase en investigación forense desde os anos 60. Xa vedes a onde nos levou o noso pequeno escaravello luminoso.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Viviani, V.R. Cell. Moll. Life Sci. 59, 1833-1850 (2002)
2. K Gomi, N Kajiyama. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276, 36508-36513.
3. www.philipallan.co.uk/chemistryreview
4. B.Z. Shakhashiri, L.G. Williams, G.E. Dirreen and A. Francis, "A cool-light chemiluminescence", J. Chem. Educ., 1981, 58, 70.
5. Experimentos con luminol, véxase o sitio web de Declan Fleming:
www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/experimental.htm