

Roberto Márcio Souza Santos, Maiza Ferreira Santos

Instituto de Química da UFBA - Vale de Ondina - Campus da Federação s/n - CEP 40210 - Salvador - BA

Maria de Fátima Dias Costa

Instituto de Ciências da Saúde da UFBA - Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela - Salvador - BA

Recebido em 8/6/92; cópia revisada em 2/12/92

The article describes the main Chemiluminescence and Bioluminescence systems, presenting their historic and conceptual aspects, emphasizing their applications in chemical and biological analyses (immunoassays, molecular biology, environmental chemistry and other areas). It also describes the properties, advantages and importance of luminescence in analyses, due to the sensitivity, quickness, safety and reliability of the method.

Keywords: chemiluminescence, bioluminescence.

1. INTRODUÇÃO

A luminescência, um dos espetáculos mais fascinantes de dissipação de energia é definida como emissão de radiação eletromagnética, por moléculas, de comprimentos de onda que vão do ultravioleta ao infravermelho no espectro eletromagnético. Essas radiações resultam da transição de um estado eletronicamente excitado para um estado de energia mais baixa. A luminescência, a depender das formas de excitação, está subdividida em: quimioluminescência (QL), bioluminescência (BL), termoluminescência, eletroluminescência e fotoluminescência (Fluorescência e fosforescência)¹.

QL e BL são, analiticamente, os tipos de luminescência mais importantes. Suas aplicações em ensaios clínicos, imunoensaios, no campo da ciência forense, análise da poluição do ar, contaminação de alimentos e muitas outras, trazem rapidez, segurança e confiabilidade aos resultados².

Muitas vantagens têm apontado as reações quimioluminescentes (QL) como sendo, na prática laboratorial de pesquisa ou diagnóstico, mais convenientes que outras, sobretudo aquelas baseadas na emissão de radioisótopos. De sensibilidade equivalente ou superior a estas, as reações QL ainda apresentam a seu favor um custo operacional mais baixo, além da não agressão ao operador e ao meio ambiente, tão problemáticas quando se faz uso de materiais radioativos³.

2. ASPECTOS HISTÓRICOS

A luminescência é conhecida pela ciência há muito tempo. Aristóteles (384-322 a.C.) descreveu em "De Anima" a BL de fungos e bactérias, em peixes mortos. Depois, Robert Boyle, na Alemanha, descobriu que o oxigênio estava envolvido no processo bioluminescente (BL). Dubois também contribuiu com seu trabalho de BL de vaga-lumes no século XIX. Radziszwski sintetizou a lofina em 1877 e Eder o pirogalol em 1887, sendo responsáveis pelos primeiros exemplos de reações QL em solução. O fenômeno da QL foi descrito, pela primeira vez, por Eilhard Wiedeman em 1888. Em 1928, Albrecht descreveu as propriedades do luminol, enquanto a lucigenina foi sintetizada por Gleu em 1935. Um fato curioso foi demonstrado por soldados japoneses durante a Segunda Guerra Mundial, que utilizavam pó de *Cypridina*, um crustáceo muito comum nos mares do Japão, juntamente com saliva, originando uma luz azulada, que os ajudava na leitura de

mapas nos acampamentos, sem que os inimigos os notassem. Em 1947, a luciferase de vaga-lume foi, pela primeira vez, isolada⁴. Em 1952, Strehler e Totter⁵ publicaram uma aplicação analítica desta enzima, na dosagem de ATP. O primeiro ensaio QL foi descrito em 1976 com uma publicação Schroder e colaboradores⁶.

O interesse e a aplicação dessa metodologia têm crescido desde então, o que é mostrado na literatura das últimas décadas.

3. QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Em reações QL, a energia excedente de uma molécula num estado eletronicamente excitado singlete ou tripleto, é dissipada na forma de radiação eletromagnética, diferentemente do que ocorre na maioria das reações exotérmicas, onde a dissipação é na forma de calor ou excitação rotacional ou vibracional. O fenômeno da QL ocorre devido a quebra de ligações ricas em energia, tais como, peróxidos, hidroperóxidos ou 1,2-dioxetanos, já existente nas moléculas ou formadas a partir de rearranjos moleculares (intermediários).

Esse processo pode ser ativado enzimaticamente ou quimicamente.

O produto excitado ao retornar ao estado fundamental, emite fótons, caracterizando a QL direta ou poderá transferir sua energia para uma outra molécula, sendo então, QL indireta⁷.

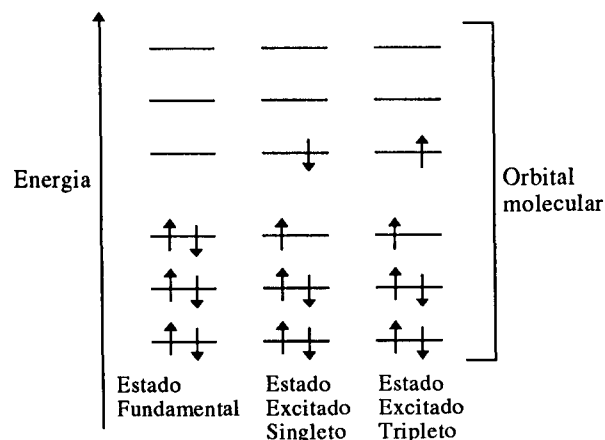
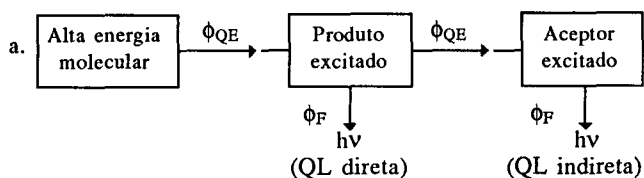


Figura 1. Representação esquemática da distribuição do elétron nos orbitais moleculares para diferentes estados de uma molécula.



b. $\phi_{QL} = \phi_{QE} + \phi_F + \phi_{TE}$

ϕ_{QL} = Rendimento quântico total

ϕ_{QE} = Quimioexcitação

ϕ_F = Fluorescência ou fosforescência

ϕ_{TE} = Transferência de energia

c. $\% \phi_{QL} = \frac{\text{fótons produzidos}}{\text{moléculas reagidas}} \times 100$

Figura 2.

a. Esquema geral do fenômeno da QL.

b. Equação geral do rendimento quântico total.

c. Rendimento quântico total, (medida de produção de luz).

Assim como nos casos de fluorescência, o sistema QL não é um estado de equilíbrio termodinâmico e pode ocorrer na fase gasosa, sólida ou líquida, sendo esta a mais aplicada. A relação entre QL e o fenômeno de absorção/emissão, tal como fluorescência é apresentada a seguir. (Figura 3)

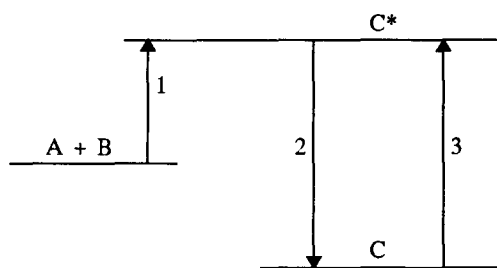


Figura 3.

1- Reação química entre A e B no estado fundamental

1 + 2- Quimioluminescência

2- Fluorescência

3- Absorção

3.1 Comparação entre sistemas Quimioluminescentes

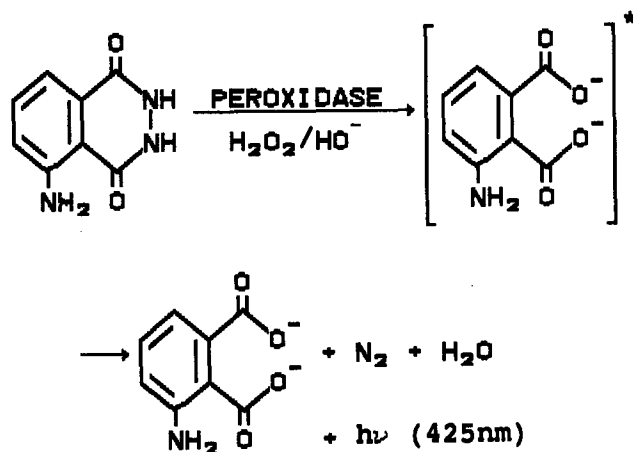
3.1.1 Luminol

O luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona)⁸, é o substrato de uma das mais clássicas reações QL. Essa molécula pode ser oxidada por H₂O₂ na presença de um catalisador, em geral peroxidase (HRP-Hoseradish Peroxidase)⁹, formando um peróxido altamente reativo, decompondo-se via um diânion, íon ftalato, eletronicamente excitado. (Eq. 1)

Outros oxidantes usados incluem hipoclorito, iodo, permanganato e oxigênio na presença de catalisadores adequados, tais como [Fe(CN)]³⁺ e Cu²⁺.

O rendimento quântico (ϕ_{QL}) de um sistema QL normalmente é muito maior que o BL. Para o luminol este é de 1%. Para melhorá-lo, são utilizados compostos químicos como intensificadores, cujo mecanismo de ação não é totalmente conhecido, embora já existam propostas¹⁰. A exemplo têm-se o p-iodofenol, manitol, histidina, 6-hidroxi-benzotiazol, diidroluciferina, dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona¹⁰⁻¹⁵. Além desta característica os intensificadores prolongam a emissão luminosa¹⁰.

O resultado da emissão luminosa pode ser detectado por



Equação 1

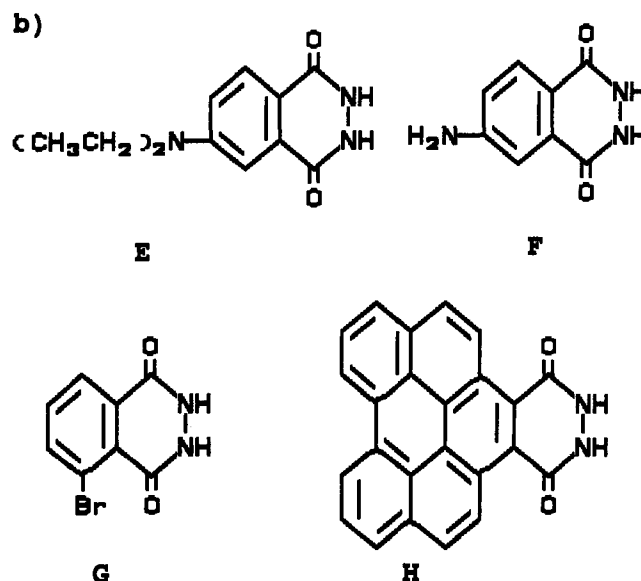
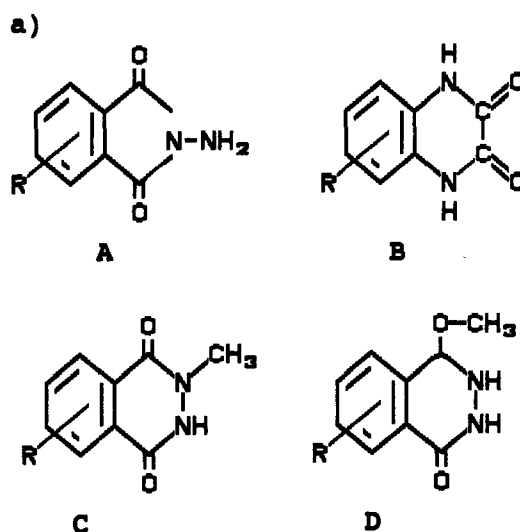


Figura 4. a) Derivados que não apresentam QL: A e B, modificações no anel heterocíclico; C e D, metilação em N e O. b) Derivados que apresentam QL, modificações em qualquer parte do anel não heterocíclico (E, F, G e H).

sensores apropriados como os luminômetros ou utilizando filmes fotográficos¹⁶ ou de raio X¹⁷. O limite de detecção do luminol, como marcador, na presença de intensificadores, no sistema H₂O₂/peroxidase é de 5x10⁻¹⁷ mol^{1,13,17-19}. Alguns derivados do luminol são apresentados a seguir. (Figura 4)

3.1.2 Derivados da Acridina

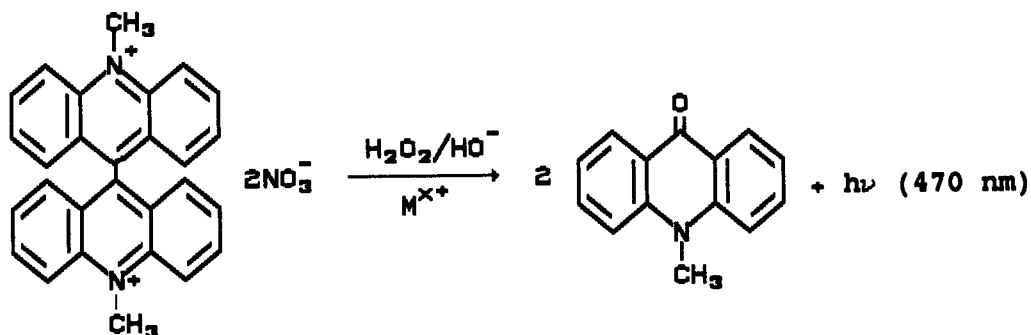
A lucigenina (nitrato bis-N-metil acridina)^{1-9,20,21} é similar ao luminol no que se refere à sua oxidação por H₂O₂ em solução alcalina, mostrado na reação abaixo. Porém essa reação dispensa um catalisador enzimático e ocorre na presença de um íon metálico tal como Pb²⁺. (Eq. 2)

Deste modo proporciona a base de sua aplicação não possível com o luminol, sendo φ_{QL} de 1 a 2%. Na reação abaixo tem-se um éster de acridina que também possui características luminescentes. (Eq. 3)

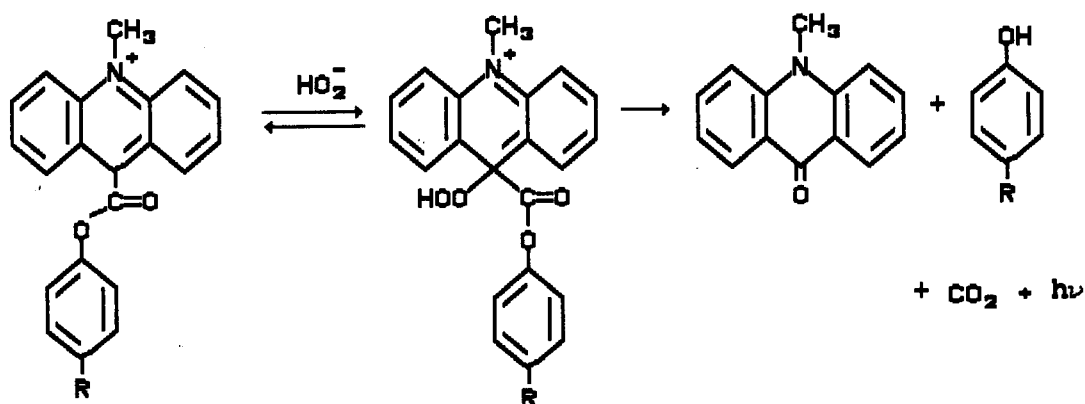
3.1.3 Diaril oxalatos

Compostos como bis-(triclorofenil)oxalato (TCPO)², sofrem uma reação de oxidação QL com H₂O₂, via um oxalato intermediário, equivalendo portanto a QL indireta, como mostra a reação abaixo. (Eq. 4)

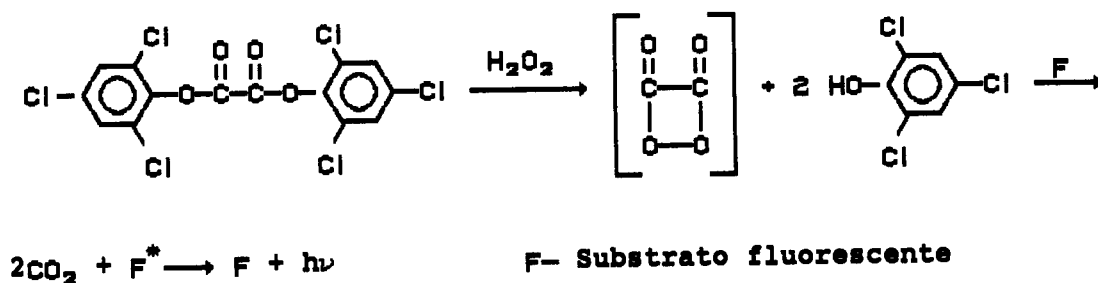
O melhor φ_{QL} ocorre em solventes estéricos e a intensidade luminosa aumenta na presença de bases orgânicas sendo inibida por ácidos orgânicos. Um problema com o diaril oxalato é a sua susceptibilidade à hidrólise afetando a característica de emissão de luz. Ele tem sido usado em acetato de etila, metanol, tampão aquoso (pH 4-10) e sistemas contendo trietilamina para análise de H₂O₂. É menos susceptível a interferências, tal como ácido úrico, porém é menos sensível que o luminol. Seu limite de detecção é de 7x10⁻⁸ mol/L².



Equação 2



Equação 3



Equação 4

3.1.4 Derivados do 1,2-Dioxetano

O que existe de mais recente no mercado em substratos QL, são alguns derivados do 1,2-dioxetano. O 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano foi o primeiro derivado a ser sintetizado, porém decompõe-se rapidamente à temperatura ambiente²², como mostra a reação abaixo. (Eq. 5)

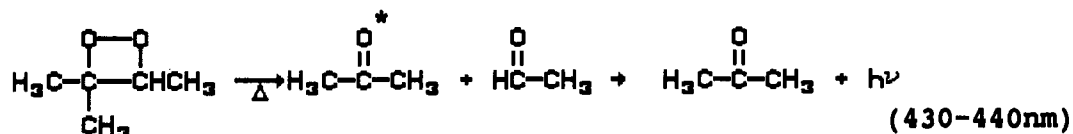
Diante desta dificuldade, outros derivados foram sintetizados conseguindo-se assim, compostos com elevada estabilidade. Um impedimento estérico no anel dioxetano, tal como o grupo adamantano é, certamente, um fator estabilizante. O 3-(2'-espiroadamantano)-4-metoxi-(3-fosforil)-fenil-1,2-dioxetano ou AMPPD, apresenta uma meia-vida de 19 anos a 25°C¹, o que proporciona uma grande vantagem em relação aos sistemas anteriormente citados. (Eq. 6)

A sensibilidade como marcador é de $1 \times 10^{-20} \text{ mol}^{-1}$. Os detalhes sobre a síntese desses compostos são omitidos pelo laboratório TROPX[®]. Porém, uma publicação recente, de um grupo de pesquisadores desse laboratório, oferece maiores informações sobre a mesma²⁹. O AMPPD é um excelente substrato para a fosfatase alcalina. A intensidade de emissão é proporcional à concentração da enzima. O pH ideal de trabalho é de 9,0 e o comprimento de onda de emissão (λ_{max}) é de 470 nm.

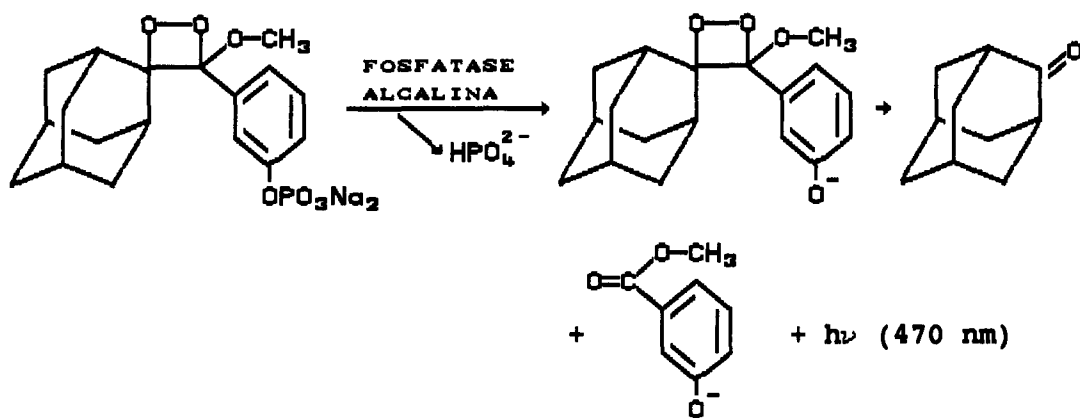
A seguir são apresentadas outras moléculas com propriedades QL²⁴. (Figura 5).

4. BIOLUMINESCÊNCIA

Determinados organismos vivos, diante da necessidade de reprodução, predação ou sobrevivência, proporcionam à natureza espetáculos característicos que envolvem percepção dos sentidos, força e habilidade com extraordinária originalidade. Dentre esses espetáculos encontra-se a BL, definida como emissão luminosa decorrente de reações catalisadas por enzimas com alto ϕ_{QL} . Apresentando rara beleza e elevada sensibilidade, este fenômeno está presente desde seres unicelulares até seres superiores, porém é desconhecido em mamíferos, anfíbios, répteis e plantas superiores. Os organismos BL já estudados pelo homem incluem bactérias (*Achromobacter fischeri*, *Photobacterium*, *Vibrio*)²⁴⁻²⁸, dinoflagelados (*Gonyaulax*, *Pyrodinium*, *Pyrocystis*)²⁸⁻²⁹, celenterados (*Aequorea*, *Obelia*)³⁰⁻³², antozoários (*Renilla*)³³⁻³⁴, fungos (*Omphalia*)²⁸, anelídeos (*Diplocardia*)³⁵⁻³⁶, moluscos (*Latia*)^{37,38}, crustáceos (*Cypridina*)³⁹⁻⁴⁵, insetos (*Photinus pyralis*)⁴⁶⁻⁴⁸ e peixes (*Apogon*, *Photoblepheron*)^{49,50}. A química da BL é complexa e ainda pouco compreendida. Em geral a reação envolve oxigênio, um substrato (luciferina) e uma enzima (luciferase). Outros reagentes algumas vezes também são essenciais. Surge então a questão quanto ao mecanismo de reação, através da qual uma descarboxilação oxidativa, levaria à produção das oxiluciferinas em estado excitado. O isolamento e estudo de dioxetanos e α -peroxilactonas (F.

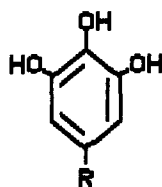


Equação 5



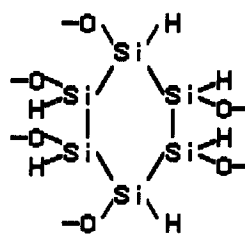
Equação 6

A.



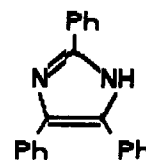
R=H; Pirogalol
R=CO₂H; Ácido Gálico

B.



Siloxano
(QL em fase sólida)

C.



Lofina

Figura 5

McCabra)^{22,40}, constituíram-se um marco importante no conhecimento da emissão de luz *in vivo*, pois ocorre a formação desses intermediários nas reações de diversos sistemas BL.

4.1 Sistemas bioluminescentes

4.1.1 Insetos lampirídeos

O vaga-lume é o sistema BL mais estudado. A produção de luz requer uma reação inicial onde, na presença da luciferase (LUC:EC 1.13.12.7., 50 KDa) (E) e tendo como cofator a luciferina, há uma conversão desta a luciferil adenilato. Esse intermediário, ainda sob catálise enzimática, combina-se com oxigênio molecular para dar um complexo oxiluciferil-adenilato-enzima como é apresentado no Esquema I.

Depois da emissão, o complexo dissocia-se para formar a enzima, AMP (Monofosfato de Adenosina), dióxido de carbono e oxiluciferina⁵¹. O CO₂ é derivado do grupo carboxila da luciferina. A reação, quando realizada em laboratório, apresenta atividade máxima em pH 7,8 a 25°C⁴⁶.

Muitas espécies de vaga-lumes assemelham-se no uso da mesma luciferina, porém a cor da luz emitida pode ser diferente devido às variações na estrutura molecular das luciferases⁵². O λ_{max} é também alterado pela mudança no pH, força iônica, temperatura e a presença de cloreto de zinco ou cádmio⁵³.

A luz emitida, chamada de luz fria, pois praticamente não dissipa calor, é mais eficiente que o sol e muitas máquinas construídas pelo homem (Eficiência: energia/massa). O φ_{QL} desse sistema é cerca de 88 a 92%^{54,55}.

Existem alguns métodos de extração e purificação da luciferase^{56,57}, uns com uma rentabilidade bem razoável e outros tornam-se quase que impraticáveis, por necessitarem de uma grande quantidade de matéria-prima (vaga-lume) para conseguir alguns miligramas de enzima. A luciferina também já foi isolada e sintetizada⁵⁸⁻⁶³.

Recentemente, pesquisadores da Universidade da Califórnia, através de técnicas de engenharia genética, inseriram o gene responsável pela síntese da luciferase de vaga-lumes em vetores (plasmídeos), os quais passaram a expressar a enzima em culturas de *E. coli*⁶⁴ ou de células de mamíferos⁶⁵.

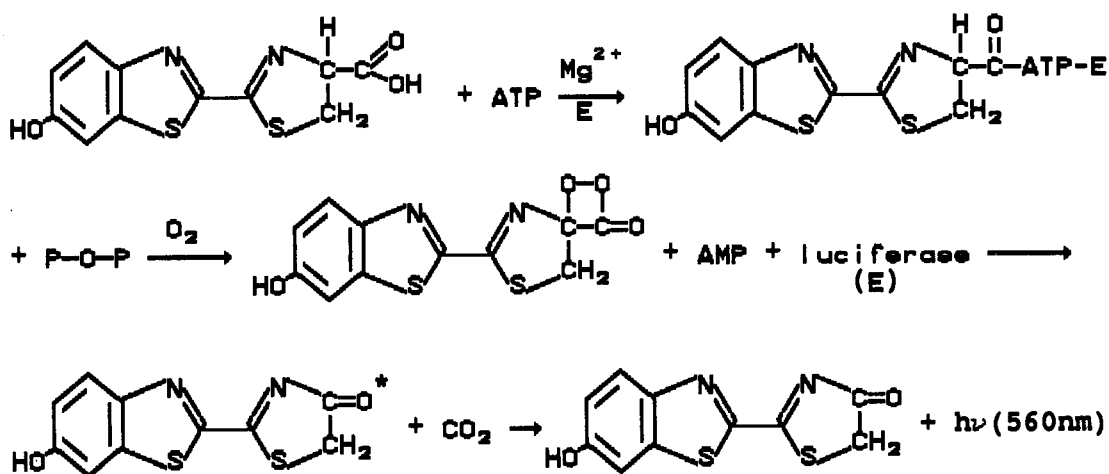
Anestésicos como procaína e lidocaína inibem a reação⁶⁶, bem como os íons Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, I⁻ e SCN⁻⁶⁷. E isto, realmente, tem formado a base de ensaios.

4.1.2 Crustáceos

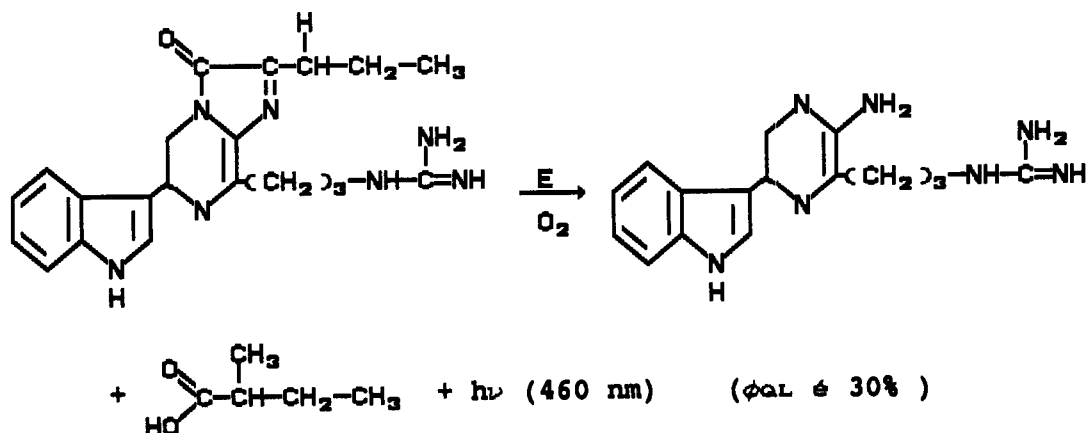
O *Cypridina* contém uma glândula na região anterior do seu corpo onde dois tipos de secreção são armazenados separadamente. Diante de um estímulo, o animal lança essas secreções equivalentes à luciferina e luciferase, as quais utilizam o oxigênio dissolvido no meio hídrico para produzir uma luminescência azulada, como mostra a reação. (Eq. 7)

4.1.3 Celenterados

O sistema BL do *Aequorea*, conhecido como medusa ou água-viva, consiste em um complexo de fotoproteína que reage com Ca²⁺ para produzir uma luminescência azulada com λ_{max}



Esquema I



Equação 7

469 nm e independe da presença de oxigênio. A seguir é apresentado a estrutura da fotoproteína da *Aequorea*, (Fig. 6).

4.1.4 Bactéria Marinha

Muitas bactérias marinhas luminescentes têm sido estudadas, particularmente a *Beneckea harveyi* (*Photobacterium fischeri*) e *Vibrio fischeri*. Os componentes requeridos para a BL são FMNH₂ (Flavino Mononucleotídeo reduzido), gerado a partir do FMN pela oxidação do NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido) ou NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido) com auxílio da enzima FMNredutase, uma cadeia de aldeído alifático (RCHO), oxigênio e uma luciferase de bactéria (LUX: EC 1.14.14.3., 39-42 KDa), como mostra o esquema II.

A luz total produzida na reação é proporcional à quantidade de cada um dos substratos (O₂, FMNH₂ e RCHO) quando eles estão presentes em quantidade limite. A função da luminescência, cujo φ_{QL} é de 20% é ainda pouco conhecida. A Figura 7 apresenta as estruturas de luciferinas de outros sistemas BL.

5. APLICAÇÕES ANALÍTICAS

Análises diretas de metais, tais como íons divalentes Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ e os íons vanadila, podem ser feitas utilizando o sistema luminol/H₂O₂ numa concentração de 1-10ppb⁶⁸. Manganês (Mn²⁺) também pode ser determinado quando uma amina é adicionada para aumentar seu potencial de redução pela estabilização do íon Mn³⁺⁶⁸. Cromo (Cr³⁺) pode ser determinado em presença de outros metais, com adição de EDTA para desativar a maioria das interferências⁶⁹. O íon Fe²⁺ pode ser analisado pela reação luminol/ar na ausência de H₂O₂⁷⁰.

Arsênio (As³⁺), numa concentração aproximadamente 2x10⁻⁷M, pode ser determinado por titulação com iodo, usando a reação oxidativa do luminol para indicar o ponto final⁶⁸. Outros exemplos incluem titulação de tálio⁷¹ e chumbo⁷² com dicromato e análise do Fe²⁺ pela titulação com Ce⁴⁺⁷³. O aparecimento da QL indica o excesso de oxidante.

A meia vida de materiais como polímeros, óleos lubrificantes, alimentos e outros depende muito das condições de

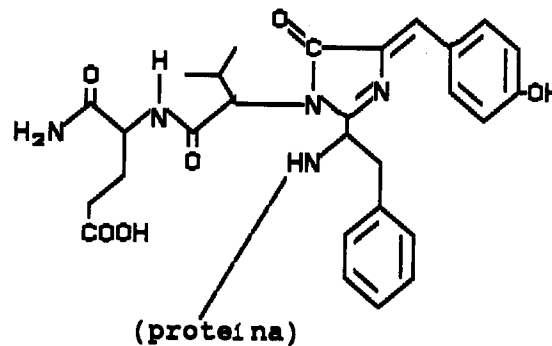


Figura 6

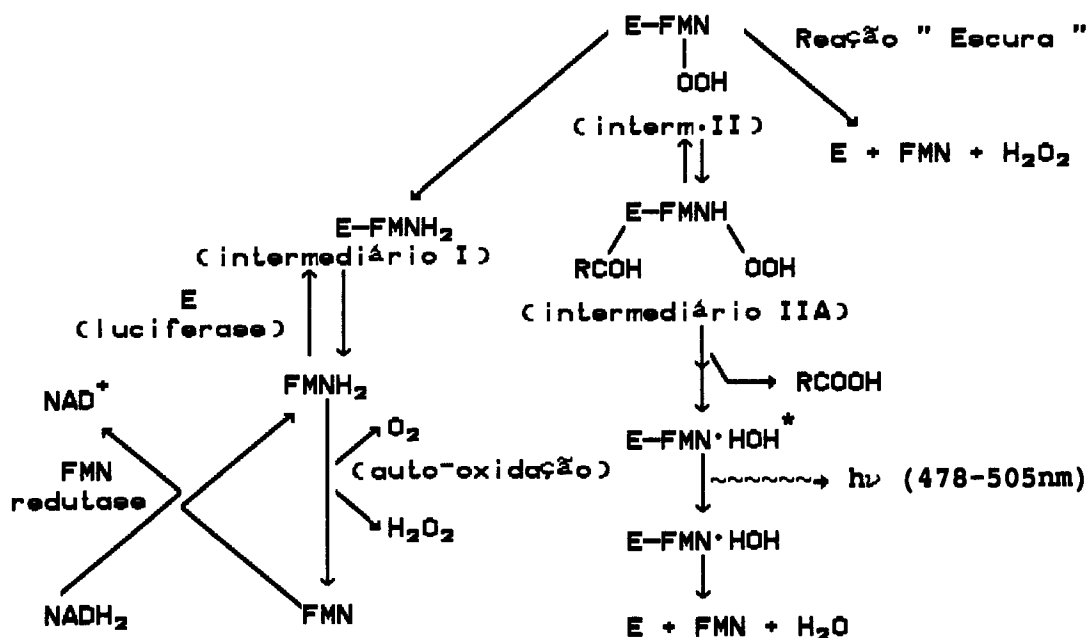
uso e do seu grau de oxidação.

A meia vida pode ser determinada aceleradamente pela técnica de temperatura elevada, porém o mecanismo da auto-oxidação poderá ser alterado com a temperatura e, com isso, os resultados obtidos nem sempre são coerentes com a observação prática. Um método baseado na medida da QL, mede o grau de oxidação de sólidos e líquidos. A intensidade da QL é função da taxa de oxidação do material.

A poluição do ar também pode ser analisada utilizando a QL. Ozônio pode ser determinado através da sua reação QL com o etileno, sendo o limite de detecção de 6-9 ppb⁷⁴.

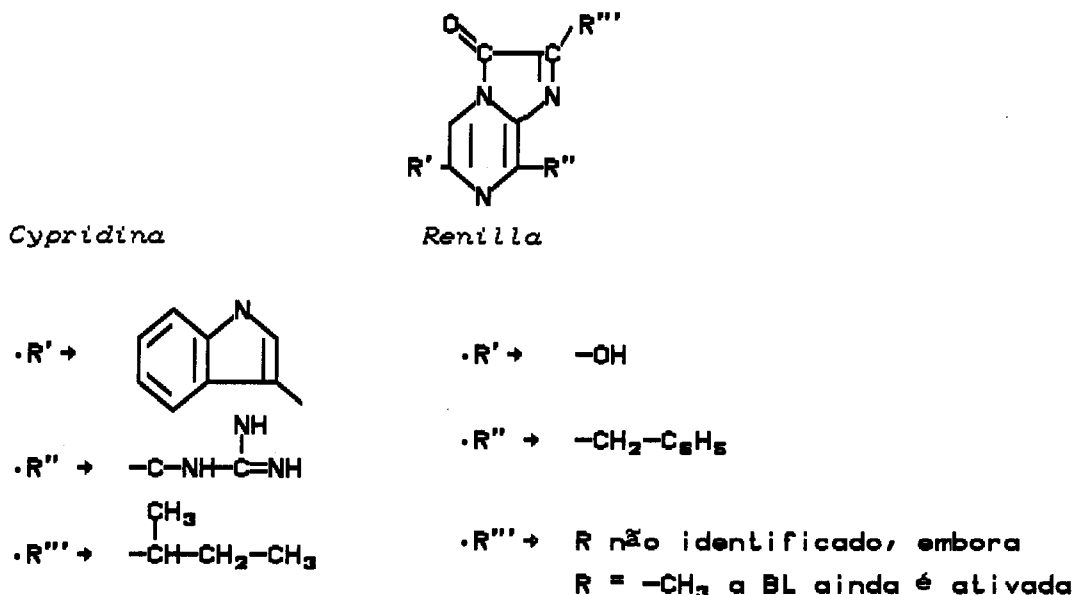
Os óxidos de nitrogênio⁷⁵, os maiores poluentes produzidos por veículos automotores e combustíveis fósseis, podem ser determinados pela reação QL com O₃, podendo ser detectado 0,02 ppm^{77,78}. SO₂, presente no ar em concentração de aproximadamente 40 mg/m³, pode ser analisado passando-se amostras de ar por uma solução aquosa de tetracloromercurato que converte o SO₂ no complexo diclorossulfitomercurato. A oxidação do complexo por KMnO₄ é QL e a intensidade é proporcional à concentração de SO₂⁷⁹.

A determinação de hidrocarbonetos na exaustão de automóveis também pode ser realizada por uma reação QL na fase gasosa com oxigênio⁸⁰. Olefinas e hidrocarbonetos aromáticos podem ser detectados, contudo o método é mais sensível para



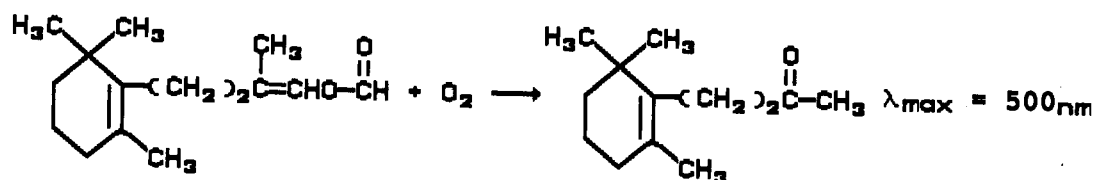
Esquema II

I-Estrutura básica da luciferina do *Cypridina* e *Renilla* (Comparação)

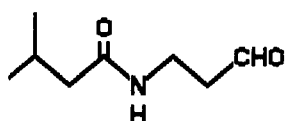


II- Luciferinas de outras espécies:

A. *Latia* (molusco de água doce)

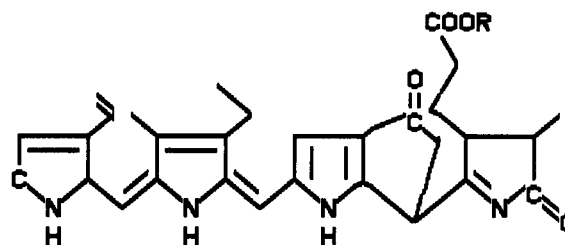


B. Diplocárdia (Anelídeo)



$\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$

C. Dinoflagelado



$\lambda_{\max} = 475 \text{ nm}$

Figura 7

olefinas. Contaminantes tais como CO, CO₂, SO₂ e NO₂ não interferem.

O gás níquel carbonila, extremamente tóxico, pode ser detectado pela reação QL com ozônio na presença de CO, podendo ser detectada 0,01 ppb. A reação produz óxido de níquel (Ni²⁺) excitado, por um processo de cadeia que gera muitos fótons a partir de cada molécula⁸¹.

O sistema luminol é utilizado na determinação de H₂O₂ em concentrações de 10⁻¹⁸ M, usando o complexo cobalto (Co³⁺) trietanolamina⁸² ou ferricianeto⁸³ ou ainda peroxidase⁸⁴ como ativadores. Este último envolve um sistema de injeção por fluxo e utiliza um intensificador QL, permitindo analisar até 80 amostras/hora.

As vantagens inerentes aos sistemas luminescentes, tais como sensibilidade, praticidade, baixo custo e ausência de riscos durante o manuseio, conduziram à exploração da BL e QL como ferramenta analítica em química clínica e investigação científi-

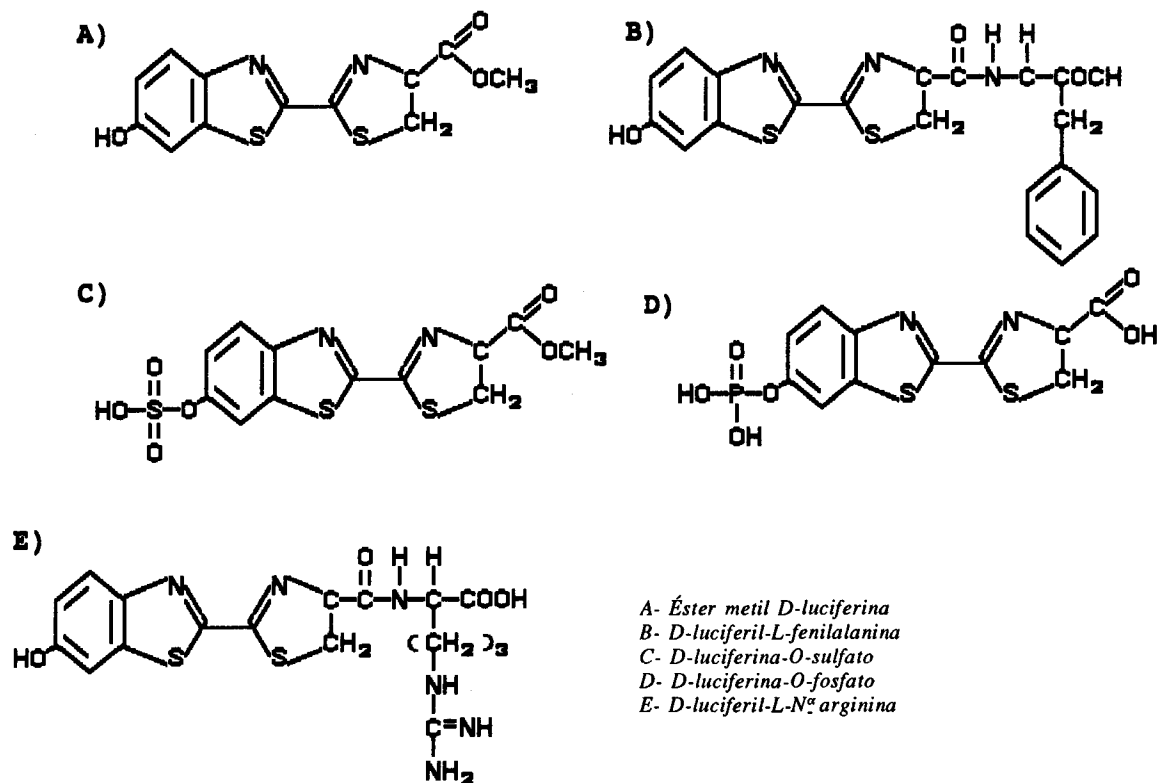
ca. Dentre os principais campos de aplicações ressaltam-se:

5.1 Microbiologia

A dosagem de ATP através da reação catalisada pela luciferase de vaga-lume, consiste num método largamente empregado para contagem de células, bem como, para detecção de microorganismos como *Staphylococcus aureus*⁸⁵ e *Leptospira interrogans*⁸⁶, dentre outros. Essa reação luminescente tanto pode ser avaliada em secreções orgânicas (sangue, urina, plasma) como no controle de qualidade de alimentos⁸⁷, tendo como inconveniente o fato de não ser específica.

5.2 Enzimologia

Enzimas, em geral as de oxi-redução, substratos ou cofatores de reações, são passíveis de abordagem direta ou indireta através da BL, utilizando luciferase solúvel ou co-imobilizada com



A- Éster metil D-luciferina
 B- D-luciferil-L-fenilalanina
 C- D-luciferina-O-sulfato
 D- D-luciferina-O-fosfato
 E- D-luciferil-L-N^o arginina

Figura 8

Tabela 1. Ensaio BL para Enzimas, Substratos e Cofatores

ENSAIOS	SENSIBILIDADE	REFERÊNCIA
ENZIMA		
Álcool Deidrogenase	0,015-3 pmol	88
ATPase	—	89
SUBSTRATOS E COFATORES		
ATP		90-92
Etanol	0,0004-0015%	88,93
Glucose	150-1500 pmol	94,95
NADH	10 pmol-200 nmol	96

as demais enzimas do sistema estudado. A tabela 1 apresenta algumas aplicações da luminescência em enzimologia.

5.3 Imunologia

Hormônios, drogas e outras substâncias presentes em baixo nível em fluidos orgânicos são, comumente, medidos por testes radioativos ou colorimétricos. Com o desenvolvimento de imunoenaios baseados na luminescência, diversos sistemas apresentam-se disponíveis comercialmente.

Estes métodos empregam uma proteína com alta especificidade, tal como anticorpo, ligada a um marcador QL ou BL (luciferina, luciferase, luminol e outros).

O uso da BL de vaga-lume em imunoenaios tem algumas limitações devido à complexidade e instabilidade do sistema especialmente quando os substratos são expostos ao vidro e à luz ultravioleta. Porém W. Miska e R. Geiger⁶³ em 1986,

desenvolveram alguns derivados da luciferina, apresentados a seguir, que são muito mais estáveis e de maior poder de uso. (Figura 8)

A utilização da QL e BL está bastante avançada. Existem diversas outras aplicações inclusive em sondas de DNA¹ que estão sendo largamente empregadas, principalmente em determinações de paternidade e no campo da criminalística (Ciência Forense).

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos professores Miguel Fascio, Wilson A. Lopes, Maria de Lourdes M. R. Dias e Jailson B. de Andrade do Instituto de Química da UFBA, bem como aos graduandos em Química André Gomes Alay Esteves e Anselmo Eucana de Oliveira, pela orientação e apoio no preparo dessa revisão.

REFERÊNCIAS

1. Beck, S. and Koster, H.; *Anal. Chem.*, (1990) **62**, 2258.
2. Whitehead, T. P.; Kricka, L. J.; Carter, T. J. N., and Thorpe, G. H. G.; *Clin. Chem.*, (1979) **25**, 1531.
3. Dudley, R. F., BS, *Laboratory Medicine*, (1990) **21**, 216.
4. McEroy, W. D., *Proc. Natl. Sci., U. S.*, (1974) **33**, 342.
5. Strehler, B. L., and Totter, J. R.; *Arch. Biochem. Biophys.* (1952) **40**, 28.
6. Schroeder, H. R.; Vogelhut, P. O.; Carrico, R. J., et al.; *Anal. Chem.*, (1976) **48**, 1933.
7. Koo, J. Y.; Shmidt, S. P., and Schuster, G. B., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1978) **75** (1), 30.
8. Roswell, D. F.; White, E. H.; *Methods in Enzimology*, (1978) LVII, 409.
9. Bechara, E. J. H.; Duran, N.; Zinner, K.; Augusto, O.; Baptista, R. C.; Faljoni, A.; Vidigal, C. C. C.; Shimizu, Y.; Haun, M.; Faria Oliveira, O. M. M. e Cilento, G., *Química Nova*, (1978) **1**, 8.

10. Leong, M. M. L. and Fox, G. R.; *Anal. Biochem.*, (1988) **172**, 145.
11. Hodgson, M. and Jones, P.; *J. of Bioluminescence and Chem.*, (1982) **3**, 21.
12. Misra, H. P., and Squatrito, P. M.; *Arch. Biochem. Biophys.*, (1982) **215**, 59.
13. Thorpe, G. H. G., and Kricka, L. J.; In *Enzymology* (De Luca, M., and McElroy, W. D., Eds.) Academic Press, New York, (1986) **133**, 331-353.
14. Thorpe, G. H. G.; Kricka, L. J.; Gillsepie, E.; Moseley, S.; Amess, R.; Baggett, N., and Whitehead, T. P.; *Anal. Biochem.*, (1985) **145**, 90.
15. Thorpe, G. H. G.; Kricka, L. J.; Moseley, S. B., and Whitehead, T. P.; *Clin. Chem.*, (1985) **31**, 1335.
16. Leong, M. M. L.; Fox, G. R., and Hayward, J. S.; *Anal. Biochem.*, (1988) **168**, 107.
17. Leong, M. M. L.; Milstein, C., and Pannell, R.; *J. Histochem. Cytochem.*, (1986) **34**, 1645.
18. Uidea, M. S.; Warner, B. D.; Running, J. A.; Stempier, M.; Clyne, J. M.; Horn, T.; *Nucl. Acids. Res.*, (1980) **16**, 4937.
19. Pollard-Knight, D.; Read, Ch. A.; Downs, M. J.; Howard, L. A.; Lead Better, M. R.; Pheby, S. A.; McNaughton, E.; Syms, A.; Brady, M. A. W.; *Anal. Biochem.*, (1982) **185**, 84.
20. Amiet, R. G.; *J. Chem. Educ.*, (1982) **59**, 163.
21. Weeks, I.; Beheshti, I.; McCapra, F.; Campbell, A. K., and Woodhead, J. S.; *Clin. Chem.*, (1983) **29**, 1474.
22. Kopecky, K. R., and Mumford, C.; *Can. J. Chem.*, (1969) **47**, 709.
23. Edward, B.; Sparks, A.; Voyota, J. C.; Strong, R.; Murphy, O., and Bronstein, I.; *J. Org. Chem.*, (1990) **55**, 6225.
24. McElroy, W. D., and Sliger, H. H., *The Chemistry of Light Emission Advances in Enzymology*, (1963) XXV, 119-167.
25. Streler, B. L., *J. Am. Chem. Soc.*, (1953) **75**, 1264.
26. Streler, B. L., and Shoup, C. S., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1953) **47**, 815.
27. Gonsalus, I. C., and Stanier, R. Y., *The Bacteria*, vol III, pp 479-507, Edit. Academic Press. (1961).
28. Hastings, J. W., *J. Mol. Evol.*, (1983) **19**, 309.
29. Biggley, W. H.; Swift, E.; Buchanan, R. J., and Seliger, H. H., *J. Gen. Physiol.* (1969) **54**, 96.
30. Morin, J. G., and Hastings, J. W., *J. Cell. Physiol.*, (1971) **77**, 305.
31. Morin, J. G.; and Hastings, J. W., *J. Cell. Physiol.*, (1971) **77**, 318.
32. Morin, J. G., and Cooke, J. M., *J. Exp. Biol.* (1971) **54**, 707.
33. Nicol, J. A. C., *J. Esp. Biol.* (1955) **32**, 299.
34. Nicol, J. A. C., *J. Esp. Biol.* (1955) **32**, 619.
35. Nicolas, M. T., *CR Acad. Sci. Paris ser D* (1979) **289**, 177.
36. Ohtsuka, H.; Ruidie, N. G.; Wampler, J. E., *Biochemistry* (1976) **15**, 1001.
37. Shimomura, O.; Johnson, F. H., *Biochemistry* (1968a) **7**, 1734.
38. Shimomura, O.; Johnson, F. H., *Biochemistry* (1968b) **7**, 2574.
39. Kennedy, D., *Luminescência Biológica, em: A célula Viva* (Texto do Scientific American), (1969) pp 126-139, Editora da Universidade de São Paulo, Editora Polígono São Paulo (1969).
40. Zinner, K., *Ciência e Cultura*, (1981) **33**, 626.
41. Johnson, F. H.; Shimomura, O.; Saiga, Y.; Gershman, L.; Reynolds, G. T., and Waters, J. R., *J. Cell. Physiol.*, (1962) **60**, 85.
42. Kishi, Y.; Goto, T.; Hirata, Y.; Shimomura, O., and Johnson, F. H.; *Tetrahedron Lett.*, (1966) 3427.
43. Kishi, Y.; Goto, T.; Inoue, S.; Sugiura, S., and Kishimoto, H., *Tetrahedron Lett.*, (1966) 3445.
44. Kishi, Y.; Goto, T.; Eguchi, S.; Hirata, Y.; Watanabe, E., and Aoyama, T., *Tetrahedron Lett.*, (1966) 3434.
45. Stone, H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, (1968) **31**, 386.
46. De Luca, M., and Demps, E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1970) **40**, 117.
47. Buck, J. B., *Physiol. Zool.*, (1973) **10**, 412.
48. Bechara, E. J. H., *Advances in Oxygenated Processes*, (1988) **1**, 123.
49. Inoue, S.; Okade, K.; Kakoi, H.; Goto, T., *Chem. Lett.*, (1977) 257.
50. Johnson, F. H.; Sugiyama, N.; Shimomura, O.; Saiga, Y.; Haneda, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1961) **47**, 468.
51. Okada, K.; Iio, H.; Kubota, I., and Goto, T., *Tetrahedron Lett.*, (1974) 2771.
52. Sliger, H. H., and McElroy, W. D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1964) **52**, 75.
53. Sliger, H. H., and Morton, R. A., *Photophysiology*, (1968) **4**, 296.
54. Sliger, H. H., and McElroy, W. D., *Archives of Biochemistry and Biophys.*, (1960) **88**, 136.
55. Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*. Third Edition, New York. John Wiley & Sons, Inc. (1978), vol 5, p 416-450.
56. De Luca, M., and McElroy, W. D., *Methods in Enzymology*, (1979) LVII, 3.
57. Branchini, B. R.; Marschner, T. M., and Montemurro, A. M., *Anal. Biochem.*, (1980) **104**, 386.
58. Bowie, L. J., *Methods in Enzymology*, (1978) LVII, 15.
59. White, E. H.; McCapra, F., and Field, G. F., *J. Am. Chem. Soc.*, (1963) **85**, 337.
60. White, E. H.; Rapaport, E.; Hopkins, T. A., and Seliger, H. H., *J. Am. Chem. Soc.*, (1969) **91**, 2178.
61. Hopkins, T. A.; Seliger, H. H.; White, E. H.; Cass, M. W., *J. Am. Chem. Soc.*, (1967) **89**, 7148.
62. McCapra, F., and Razavi, Z., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1976) 153.
63. Miska, W., and Geiger, R., *J. Clin. Chem. Biochem.*, (1987) **25**, 23.
64. De Wet, J. R.; Wood, K. V.; Helinski, D. R., and DeLuca, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1985) **82**, 7870.
65. De Wet, J. R.; Wood, K. V.; DeLuca, M.; Helinski, D. R., and Subramani, S., *Molecular and Cellular Biology*, (1987) **7**, 725.
66. Denburg, J. L., and McElroy, W. D., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1970) **141**, 668.
67. Ueda, I.; Kamaya, H., and Eying, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1976) **73**, 481.
68. Seitz, W. R., and Hercules, D. M. (ref. 76, pag. 427).
69. Seitz, W. R.; Suydam, W. W., and Hercules, D. M., *Anal. Chem.*, (1972) **44**, 957.
70. Seitz, W. R., and Hercules, D. M., *Anal. Chem.*, (1972) **44**, 2143.
71. Buyas, I., and Erdey, L., *Talanta*, (1963) **10**, 467.
72. Kenny, F., and Kurtz, R. B., *Anal. Chem.*, (1953) **25**, 1550.
73. Kenny, F., and Kurtz, R. B., *Anal. Chem.*, (1951), **23**, 382.
74. Mckee, H. C., *J. Air Pollut. Control Assoc.*, (1976) **26**, 124.
75. Andrade, J. B. e Sarno, P., *Química Nova*, (1990) **13**, 213.
76. Lee, D. C., and Wilson, T. in Cormier, M. J.; Hercules, M. J., and Lee, J., eds., *Chemiluminescence and Bioluminescence*, Penum Press, New York, (1973).
77. Fotijn, A.; Golomb, D., and Hodgeson, J. H., (ref. 76, pag. 393).

78. Sigsoby, J. E., et al., *Environ. Sci. Technol.*, (1973) **7**, 51.
79. Stauff, J., and Jalschke, W., *Atmos. Environ.*, (1975) **9**, 1038.
80. Fontijn, A., and Ellison, R., *Environ. Sci. Technol.*, (1975) **9**, 1157.
81. Stedman, D. H., and Tommuro, D. A., *Anal. Lett.*, (1976) **9**, 81.
82. Patrovsky, V., *Talanta*, (1976) **23**, 553.
83. a) Bostick, D. T., and Hercules, D. M., *Anal. Chem.*, (1975) **47**, 447; b) Auses, J. P.; Cooks, S. L., and Maloy, J. T., *Anal. Chem.*, (1975) **47**, 44.; c) Williams, D. D.; Huff, G. F., and Seitz, W. R., *Clin. Chem.*, (1976) **22**, 372.
84. Eremin, S. A.; Vlasenko, S. B.; Osipov, A. P.; Eremina, I. D., *Analytical Lett.*, (1989) **22**, 2037.
85. Tuncan, E. U., Martin, S. E., *Appl. Environ. Microbiol.*, (1987) **53**, 88.
86. Nervig, R. M.; Sebring, R. W., and Scheevel, K. F., *J. Biol. Standardiz.*, (1986) **14**, 21.
87. Kricka, L. J., *Anal. Biochem.*, (1988) **175**, 14.
88. Nabi, A., and Worsfold, P. J., *Analyst* (London) (1987) **112**, 531.
89. Hanocq-Quertier, J.; Baltus, E., and Schram, E., *J. Biolumin. Chemilumin.*, (1988) **2**, 17.
90. Afalo, C., and DeLuca, M., *Biochemistry* (1987) **26**, 3913.
91. Shepherd, E. P.; Gow, J. A., and Grorghiou, P. E., *Microbios* (1987) **52**, 39.
92. Gottlieb, C.; Svanborg, K.; Eneroth, P., and Bygdeman, M., *Fert. Steril.* (1988) **47**, 992.
93. Girotti, S.; Roda, A.; Ghini, S.; Piancentini, A. L.; Carrea, G., and Bovara, R., *Anal. Chem. Acta.* (1986) **183**, 187.
94. Idahl, L. A.; Sandstrom, P. E., and Sehlin, J., *Anal. Biochem.* (1986) **155**, 177.
95. Wieland, E.; Wilder-Smith, E., and Kather, H., *J. Clin. Chem. Biochem.* (1986) **24**, 399.
96. Karp, M. T., and Vuorinen, P. I. in *Methods in Enzimology* (Chytil, F., and McCormic, D. B., Eds.), (1986), vol 1, pp 253-268, CRR, Boca Raton, FL.