ERICK LEITE BASTOS

MECANISMOS E APLICAÇÕES DA QUIMILUMINESCÊNCIA DE
PERÓXIDOS CÍCLICOS

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração:
Química Orgânica

Orientador:
Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader

São Paulo
2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bastos, Erick Leite
B327m Mecanismos e aplicações da quimiluminescência de peróxidos
 cíclicos / Erick Leite Bastos. -- São Paulo, 2004.
 219p.

Tese (doutorado)– Instituto de Química da Universidade de
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Baader, Josef Wilhelm

1. Físico-química : Orgânica 2. Fotoquímica : Orgânica
3. Quimiluminescência : Físico-química : Orgânica I. T. II.
Baader, Josef Wilhelm, orientador.

547.13 CDD

“Mecanismos e aplicações da quimiluminescência orgânica”

ERICK LEITE BASTOS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Química Orgânica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. JOSEF WILHELM BAADER
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. OMAR ABDEL MONEIM ABOU EL SEOUD
IQ – USP

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
IQ – USP

Prof. Dr. MARCELO HENRIQUE GEHLEN
IQ SC – USP

Profa. Dra. ADRIANA VITORINO ROSSI
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO
20 de OUTUBRO 2004

... *mehr Licht!*

Johan Wolfgang von Goethe
(1749-1832)

Dizem que Goethe pediu mais luz,
Mehr Licht, no momento da morte.
Mas, como resposta,
Apenas abriram as janelas

Dirceu Villa em "Quase isso", *Ácaro* (2002), 1.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader, pela orientação e amizade.

Aos Profs. Drs. Etelvino Bechara, Gianluca Azzellini e Luiz Catalani, pela amizade e aconselhamento.

Aos meus companheiros de laboratório do passado e do presente, especialmente Sandra Maria da Silva e Luiz Ciscato, pela inestimável ajuda.

Ao Grupo de Pesquisa do Prof. Dr. Rainer Beckert, especialmente ao Prof. Dr. Dieter Weiß, pela gentileza com que me receberam em Jena.

À Prof^a. Dr^a. Ohara Augusto e à Dr^a. Edlaine Linares pela ajuda na realização dos experimentos de Ressonância Paramagnética de Elétron.

Aos funcionários do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, que contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa.

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Abreviaturas e Siglas	iii
Lista de Compostos	iv
Padronizações adotadas	viii
Prólogo	1
Aspectos gerais	3
Referências Gerais	12
Objetivos	13
1. Proteção de fenóis como <i>tert</i>-butildimetilsililéteres assistida por radiação de microondas na ausência de solvente	14
1.1 Resultados	16
1.2 Discussão	19
1.3 Material e Métodos	22
1.3.1 Purificação de reagentes	22
1.3.2 Aspectos gerais	22
1.3.3 Procedimento representativo de preparação	22
1.3.4 Caracterização dos compostos obtidos	23
1.4 Referências Bibliográficas	25
2. Síntese de 1,2-dioxetanos: Compostos-modelo no desenvolvimento de sondas quimiluminescentes com altos rendimentos quânticos	28
2.1 Resultados	33
[D1]: 4,4-dimetil-3-(<i>m-tert</i> -butildimetilsilanoxifenil)-1,2-dioxetano	33
[D2]: 4,4-dimetil-3-(<i>m-tert</i> -butildimetilsilanoxibenzil)-1,2-dioxetano	33
[D3]: 4,4-dimetil-3-(<i>p-tert</i> -butildimetilsilanoxifenil)-1,2-dioxetano	38
[D4]: 4,4-dimetil-3-(<i>p-tert</i> -butildimetilsilanoxibenzil)-1,2-dioxetano	39

[D5]: 3-(<i>m-tert</i> -butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano	41
[D6]: 3-(<i>m-tert</i> -butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4,4-diisopropil-1,2-dioxetano	43
[D7]: 3-(<i>m-tert</i> -butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4-(1,3,3-trimetil-biciclo[2.2.1]espiroheptanil)-1,2-dioxetano (E/Z)	44
[D8]: 3-(6- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxibezotiazolil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano	45
[D9]: 3,3-diisopropil-6-(<i>tert</i> -butildimetilsilaniloxi)dimetilluciferina -1,2-dioxetano	48
2.2 Discussão	50
2.3 Material e Métodos	54
2.3.1 Purificação de reagentes	54
2.3.2 Equipamentos	54
2.3.3 Procedimentos e soluções-estoque	55
2.3.4 Preparações	58
2.4 Referências Bibliográficas	94
3. Estudo sobre o efeito da viscosidade sobre os rendimentos quânticos de formação de estados eletronicamente excitados na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos	100
3.1 Resultados	104
3.2 Discussão	112
3.3 Material e Métodos	131
3.3.1 Medidas de viscosidade	131
3.3.2 Medidas de emissão de luz	131
3.3.3 Procedimento de realização de estudos cinéticos	132
3.4 Referências Bibliográficas	134
4. Cálculo da geometria de equilíbrio de 1,2-dioxetanos: Estudos sobre os parâmetros de ativação	137
4.1 Resultados	140
4.2 Discussão	145
4.3 Material e Métodos	148
4.3.1 Cálculos químicos	148
4.4 Referências Bibliográficas	149
5. Detecção de dióxido de carbono ânion radical no sistema peróxi-oxalato utilizando ressonância paramagnética de elétron	151
5.1 Resultados	154
5.2 Discussão	159
5.3 Material e Métodos	167
5.3.1 Purificação de reagentes e solventes	167
5.3.2 Equipamentos	167
5.3.3 Procedimentos e soluções-estoque	167
5.4 Referências Bibliográficas	167
6. Reação de luminol com peróxido de hidrogênio na presença de hemina: Novas perspectivas para uma antiga reação	171
6.1 Resultados	174

6.2 Discussão	185
6.3 Material e Métodos	193
6.3.1 Purificação de reagentes	193
6.3.2 Instrumentos	193
6.3.3 Calibração da fotomultiplicadora	193
6.3.4 Irradiação de PVP contendo luminol e hemina	194
6.3.5 Análise estatística	194
6.4 Referências Bibliográficas	195
Discussão Geral e Conclusões	199
Anexo 1 – Visão Geral sobre Cálculos Químicos	205
Anexo 2 – Transferência de elétron: Teoria de Marcus	212

Resumo

BASTOS, E. L. (2004) *Mecanismos e Aplicações da Quimiluminescência de Peróxidos Cíclicos*. São Paulo, 200 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

A quimiluminescência derivada da decomposição induzida de 1,2-dioxetanos e do sistema peróxi-oxalato pode ser explicada através do mecanismo de luminescência iniciada por troca de elétron – CIEEL (“Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence”). Esta proposta supõe uma transferência de elétron seguida de uma retro-transferência, que pode ocorrer de forma *intra* ou *intermolecular*, dependendo do sistema. A etapa de quimiexcitação do sistema peróxi-oxalato envolve uma retro-transferência de elétron *intermolecular*, da qual participam dois radicais-íons – um deles postulado como o dióxido de carbono radical-anion. Por outro lado, não existe consenso a respeito da via de retro-transferência de elétron na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos, que pode ocorrer de forma *intra* ou *intermolecular*.

Neste trabalho são apresentadas as sínteses de sete 1,2-dioxetanos, os resultados obtidos na investigação da via de quimiexcitação proposta no mecanismo CIEEL para a decomposição induzida de 1,2-dioxetanos e para o sistema peróxi-oxalato e a aplicação da quimiluminescência do luminol em matriz polimérica de poli(vinilpirrolidona) para a calibração de luminômetros de microplacas. Verificou-se, através do estudo do efeito da viscosidade do solvente sobre os rendimentos quânticos singlete na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos, uma dependência entre a eficiência de quimiexcitação e o efeito da cavidade de solvente, que foi racionalizada em termos de um modelo difusional e friccional. Estes resultados, associados a cálculos teóricos, tornaram possível postular um mecanismo *intramolecular* modificado para a decomposição induzida de 1,2-dioxetanos. No sistema peróxi-oxalato foi realizada uma tentativa de detecção direta

do dióxido de carbono ânion-radical através de medidas do sinal de ressonância paramagnética de elétron do aduto formado entre α -fenil-N-*tert*-butilnitrona (PBN), um *spin trap*, e o radical-anion. Apesar da leve discrepância entre as constantes de acoplamento do sinal observado em relação aos valores relatados na literatura para o aduto PBN-CO₂, a caracterização foi realizada preliminarmente através de espectroscopia de massas com injeção direta. Finalmente, foi desenvolvido um sistema para calibração de luminômetros de microplacas, baseado na quimiluminescência de luminol em matriz polimérica, que pode ser utilizado – adicionalmente – na quantificação de peróxido de hidrogênio, em concentrações μmol^{-1} , e agentes redutores com potencial anti-radicalar e antioxidante.

Palavras-chave: *quimiluminescência, 1,2-dioxetanos, CIEEL, peróxi-oxalato, luminol, microondas, cálculos químicos*

Abstract

BASTOS, E. L. (2004) *Mechanisms and Applications of Organic Peroxide Chemiluminescence*. São Paulo, 200 p. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

The chemiluminescence resulting from induced decomposition of 1,2-dioxetanes and the peroxyoxalate system can be explained by the Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence – CIEEL mechanism. This hypothesis postulates an electron transfer followed by a bond cleavage or rearrangement and back electron transfer which can occur in a *intra* or *intermolecular* way, depending on the system. The chemiexcitation step in the peroxyoxalate system involves an intermolecular back electron transfer, in which two radical ions participate – one of them is assumed to be carbon dioxide radical anion. However, there is no consensus about the back electron transfer path in the induced decomposition of 1,2-dioxetanes, which can occur in an *intra* or *intermolecular* way.

This work reports the synthesis of seven 1,2-dioxetane derivatives, the results obtained in the investigation of the chemiexcitation path proposed by the CIEEL mechanism for the induced decomposition of 1,2-dioxetanes and for the peroxyoxalate system, and the application of poly(vinylpyrrolidone) supported luminol chemiluminescence in the development of a microplate luminometer calibration method. It was possible to confirm, by the study of solvent viscosity effect on singlet quantum yields in induced 1,2-dioxetane decomposition, a dependence between chemiexcitation efficiency and the solvent cavity effect, which was rationalized based on a diffusional and frictional model. These results, together with theoretical calculations, allow us to postulate a modified intermolecular chemiexcitation mechanism for the induced decomposition of 1,2-dioxetanes. An attempt to detect directly the carbon dioxide radical

anion in the peroxyoxalate system was made based on the electron paramagnetic resonance detection of the α -phenyl-N-*tert*-butylnitrone (PBN)-CO₂ adduct. Despite small discrepancies between the observed and the previously reported hyperfine coupling constant values, the adduct characterization was confirmed by direct injection mass spectrometry. Finally, a microplate luminometer light intensity calibration system, based on polymeric matrix-supported luminol, was developed. This method can be used also to determine hydrogen peroxide at $\mu\text{ mol}^{-1}$ concentration and to quantify reducing agents with antiradical and antioxidant potential.

Keywords: *chemiluminescence, 1,2-dioxetanes, CIEEL, peroxyoxalate, luminol, microwaves, chemical calculation.*

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

A	Centro Aceitador de Elétron(s) em uma Reação Redox
ACN	Acetonitrila
ACT	Ativador
CG	Cromatografia à Gás
CIEEL	Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence (Luminescência Induzida por Troca de Elétrons)
CT	Transferência de Carga
D	Centro Doador de Elétron(s) em uma Reação Redox
DFM	Difenilmetano
$E_{p/2}^{ox}$	Potencial de Oxidação Voltamétrico de Meia Onda
EPR	Ressonância Paramagnética de Elétron
Eq.	Equação
Es	Energia Singlete
ET	Transferência de Elétrons
ϕ	Rendimento Quântico
ϕ_{CL}	Rendimento Quântico de Quimiluminescência
ϕ_{FL}	Rendimento Quântico de Fluorescência
ϕ_P	Rendimento Quântico de Fosforescência
FT-IR	Espectrofotometria no infravermelho por Transformada de Fourier
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IAE	Intermediário de Alta Energia
ISC	Cruzamento Entre Sistemas
LUMO	Orbital Molecular Não Ocupado de Menor Energia
MM	Massa Molar
MS	Espectroscopia de Massas
P.e.	Ponto de Ebulição
P.F.	Ponto de Fusão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SOMO	Orbital Molecular Semi-Ocupado
TBDMS	<i>tert</i> -Butildimetilsilano
TLC	Cromatografia em Camada Delgada
UV	Ultravioleta
Vis.	Visível

Lista de Compostos

fórmula estrutural	nome	abreviatura
3,3-dimetil-4-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-1,2-dioxetano	D1
3,3-dimetil-4-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxibenzil)-1,2-dioxetano	D2
3,3-dimetil-4-(4- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-1,2-dioxetano	D3
3,3-dimetil-4-(4- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxibenzil)-1,2-dioxetano	D4
3-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano	D5
3-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-3-metoxi-4,4-diisopropil-1,2-dioxetano	D6

(E/Z) 3-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-3-metoxi-4-(1,3,3-trimetilbicio[2.2.1]espiroeptanil)-1,2-dioxetano	D7
3-(6- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxibenzotiazolil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano	D8
3,3-diisopropil-6-(<i>tert</i> -butildimetilsilaniloxi)dimetil-luciferina-1,2-dioxetano	D9
3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenilbenzaldeído	E1
3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenilacetaldeído	E2
4- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenilbenzaldeído	E3
4- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenilacetaldeído	E4
3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenilmetanoato de metila	E5
6-(<i>tert</i> -butildimetilsilaniloxi)benzotiazolil-2-metanoato de metila	E6

	dimetil-6-(<i>tert</i> -butildimetilsilanilo)oxiluciferina	E9
	3-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-2-metilpropeno	O1
	4-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-2-metil-2-buteno	O2
	3-(4- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-2-metilpropeno	O3
	4-(4- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-2-metil-2-buteno	O4
	1-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-1-metoxi-2-espiroadamantililideno	O5
	1-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-1-metoxi-2,2-diisopropililideno	O6
	(<i>E/Z</i>) 1-(3- <i>tert</i> -butildimetilsilaniloxifenil)-1-metoxi-2-espiro(2,2,6-trimetil-biciclo[2.2.1]heptanilideno	O7
	1-(6-(<i>tert</i> -butildimetilsilanilo)benzotiazoli)-1-metoxi-2-espiroadamantililideno	O8
	2,2-diisopropil-6-(<i>tert</i> -butildimetilsilanilo)dimetil-luciferilideno	O9

α -fenil-N-tert-butilnitrona	PBN
N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina	DMPO
Bis(2,4,6-triclorofenil)oxalato	TCPO
9,10-difenilantraceno	DPA
Imidazol	IMI-H
1,2-dioxetanodiona	DDO
poli(vinilpirrolidona)	PVP
cloreto de tert-butildimetilsilano	TBDMSCI

Padronizações Adotadas

Os termos fotoquímicos utilizados nesta Tese de Doutorado estão em conformidade com aqueles deferidos pelo Comitê Brasileiro para Assuntos de Química junto à IUPAC, publicados por Neumann, M. G.; Burrows, H. D. *Química Nova* **16**, 71 (1993).

A nomenclatura dos compostos orgânicos, exceto compostos bicíclicos e com substituintes espiro, foi gerada eletronicamente pelo complemento para ISIS-Draw v. 2.5, Autonom. Os nomes são gerados de acordo com as regras definidas pela IUPAC: *Nomenclature of Organic Chemistry*, Seções A-H, The Blue Book, Pergamon: Oxford, 1979.

Prólogo

Nesta Tese de Doutorado são descritos os resultados obtidos durante o período entre junho de 2000 e junho de 2004 no estudo de mecanismo de reações químicas quimiluminescentes envolvendo 1,2-dioxetanos e ésteres oxálicos, além do desenvolvimento de aplicações analíticas utilizando luminol.

A tese é dividida em oito partes. Com exceção dos **Aspectos Gerais**, onde são apresentados os fundamentos necessários para a compreensão do trabalho pelo *não* especialista, e da **Conclusão**, que discute os resultados de forma a consolidar o trabalho, os demais capítulos contém uma breve introdução, material e métodos, resultados, discussão e bibliografia.

A *síntese orgânica* é contemplada no **Capítulo 1**, que descreve a utilização de radiação de microondas na proteção de fenóis como *tert*-butildimetilsililéteres e no **Capítulo 2** no qual são apresentadas as sínteses de cinco 1,2-dioxetanos (**D1-D5**) e das olefinas precursoras de mais 4 (**D6-D9**). Cada composto preparado é apresentado através de sua rota retrossintética, que foi devidamente codificada de forma a permitir o acesso rápido à parte experimental. Dioxetanos são precedidos do código **D**, emissores do código **E**, olefinas do código **O** e outros compostos seguem ordem alfabética. Reações são apresentadas, em letra minúscula, segundo o dioxetano ao qual se referem e à sua seqüência na preparação, assim a reação *d3r1* remete à primeira reação para a preparação do dioxetano **D3**.

O **Capítulo 3** consiste no estudo da dependência dos rendimentos quânticos de quimiluminescência obtidos na decomposição induzida por íons fluoreto de 1,2-dioxetanos *tert*-butildimetilsilaniloxifenil-substituídos com a viscosidade do meio. Foram utilizados dois sistemas distintos de solvente: tolueno/difenilmetano e acetonitrila/carbonato de propileno. Os resultados foram racionalizados frente à teoria de

transferência de elétron de Marcus e segundo as equações de Burshtein de retrotransferência de elétron, em associação com cálculos teóricos.

No **Capítulo 4**, o cálculo químico em nível semiempírico (AM1) e *ab initio* (6-31G*) é utilizado como ferramenta no estudo do efeito do padrão de substituição sobre a estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos. Destes estudos foi feita uma tentativa de racionalização das propriedades estruturais que conferem maior estabilidade a esta classe de compostos, com o objetivo de preparar compostos com maior aplicabilidade.

No **Capítulo 5** foi realizada uma tentativa de identificação de dióxido de carbono radical ânion no sistema peróxi-oxalato através de estudos de ressonância paramagnética de elétron e espectrometria de massas de adutos formados entre radicais e “*spin traps*” adequados. O objetivo desta etapa foi verificar a ocorrência do mecanismo de quimiluminescência induzida por troca de elétrons (CIEEL), proposto por Schuster para sistemas quimiluminescentes, e ainda alvo de controvérsia.

Finalmente, no **Capítulo 6**, um novo método de calibração de fotomultiplicadoras de luminômetros de placas, que emprega luminol em matriz polimérica, foi desenvolvido. O método permite ainda a detecção de peróxido de hidrogênio e substâncias redutoras.

Aspectos gerais

A ocorrência de seres vivos capazes de emitir luz visível é um dos mais intrigantes fenômenos naturais e é o ponto inicial do interesse humano sobre os mecanismos químicos que levam à luminescência. Esta *bioluminescência* foi descrita pela primeira vez pelo filósofo grego Anaximenes de Mileto em cerca de 500 a.C. e, mesmo depois de 2500 anos, continua a ser fonte de inspiração, representada aqui pela xilogravura “*Dolphins in phosphorescent sea*” de Maurits Cornelius Escher (Figura 1).

Figura 1. “*Dolphins in phosphorescent sea*”. A inspiração para esta xilogravura, criada por M. C. Escher em 1923, foi a bioluminescência que se observa quando golfinhos nadam em regiões com altos níveis de plâncton bioluminescente.

Organismos bioluminescentes se apresentam em uma infinidade de *taxa* e até mesmo reinos, passando por bactérias, fungos, dinoflagelados, moluscos, anelídeos, equinodermos, cordados e insetos, entre outros. Apesar do sistema enzimático responsável pela emissão variar conforme a espécie, identifica-se genericamente o substrato como luciferina e a enzima que media o processo de bioluminescência de luciferase, nomenclatura que remete ao latim *lucifer*, que significa “portador da luz”.

Em grego, *lucifer* corresponde a *phosphoros* – nome no qual Hennig Brandt se inspirou para batizar, em 1669, seu recém-descoberto elemento, o fósforo (“*phosphorus*”), capaz de emitir luz na presença de oxigênio. Interessantemente, Brandt não somente descobriu um novo elemento quando aqueceu o resíduo de evaporação de

urina na presença de carvão, ele também descobriu a *quimiluminescência*. Apesar de ter chamado o fenômeno de fosforescência, a reação entre fósforo elementar e oxigênio resulta, além do respectivo trióxido, em emissão de luz.

A expressão *fosforescência* é amplamente utilizada na descrição da emissão de luz proveniente de diversos materiais, fato que pode ser ilustrado recorrendo a Julio Verne, no primeiro parágrafo de seu “Vinte Mil Léguas Submarinas”, que descreve “... um objeto comprido, em forma de fusão, às vezes rodeado por uma espécie de fosforescência, muito mais corpulento e rápido do que uma baleia.”

Embora a *fosforescência* e *fluorescência* estejam intimamente ligadas à *quimiluminescência*, a origem dos três fenômenos é distinta. Ao ser irradiada, uma molécula pode sofrer uma transição eletrônica a partir do estado fundamental para um estado excitado, como resultado da promoção de um elétron de um orbital ocupado (ligante ou não ligante) para um orbital desocupado de maior energia (antiligante). Para moléculas orgânicas convencionais – excluindo radicais – o estado fundamental se caracteriza pela presença de um par de elétrons com spin opostos no orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), com somatória de número quântico de spin na molécula (n) igual a zero. Esta configuração, conforme a relação $S=2n+1$, é descrita com multiplicidade de spin singlete ($S=1$) e deve ser mantida no estado excitado como prevêem as regras de seleção da mecânica quântica, o que significa que o spin do elétron promovido para o orbital de mais alta energia deve ser mantido.

Uma vez no estado eletronicamente excitado, a energia absorvida deve ser, de alguma forma, liberada ou consumida. Dentre as diversas possibilidades existentes inclui-se o *decaimento radiativo*. A *Fluorescência* é definida como a transição radiativa entre estados com mesma *multiplicidade de spin*, ou seja, uma transição singlete-singlete permitida. Dependendo da geometria das espécies envolvidas e de fatores externos que favorecem a ocorrência de mudança de superfície eletrônica, como o acoplamento spin-orbital, é possível a formação de estados com multiplicidade de spin *triplete* ($n=1$ como resultado da inversão de spin; $S=3$), a partir de estados excitados singlete. A *fosforescência* é a transição radiativa entre estados com diferente *multiplicidade de spin*, uma transição triplete-singlete proibida. O fato de uma transição ser proibida não significa que ela não possa ocorrer, apenas indica que sua probabilidade é baixa, o que resulta em tempos de vida de emissão de fosforescência bastante superiores à fluorescência.

A formação de estados excitados pode ocorrer na ausência de uma fonte de irradiação, como resultado de uma transformação química, em um processo chamado de

quimiexcitação. Desta forma, *quimiluminescência* – em uma definição mais ampla – é a emissão radiativa de uma espécie excitada formada através de uma transformação química. Entretanto, para uma reação bastante exotérmica, a ocorrência de produtos no estado excitado seria – à primeira vista – termodinamicamente muito menos favorável que sua formação no estado fundamental. A racionalização deste fenômeno pode ser feita utilizando-se como modelo a *Teoria de Transferência de Elétrons* de Marcus, que prediz correlação entre $\Delta G^\ddagger$, energia de ativação para a transferência de elétron, e sua força motriz (ΔG_{er} , Eq. 1).

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G_{es} + \frac{\lambda}{4} \cdot \left(1 + \frac{\Delta G_{er}}{\lambda} \right)^2 \quad \text{Eq. 1}$$

ΔG_{es} é um termo eletrostático que reflete perda ou ganho na energia livre eletrostática quando os reagentes formam um complexo de encontro, e λ é a energia de reorganização do sistema. Para reações de transferência de elétron, nas quais pelo menos uma das espécies é eletricamente neutra, $\Delta G_{es} = 0$. Se $\Delta G_{er} < \lambda$, o aumento da exotermicidade da reação resulta no aumento da velocidade de reação, no intervalo conhecido como “normal” (Figura 2).

As velocidades de reações endotérmicas irão aumentar junto à força motriz até que a velocidade atinja seu valor máximo: $\Delta G_{er} = \lambda$, condição na qual não existe barreira de ativação para a reação ($\Delta G^\ddagger = 0$). Entretanto, o aumento adicional na força motriz resulta em um aumento da energia de ativação ($\Delta G^\ddagger > 0$) e na diminuição da velocidade da reação. Esta condição é conhecida como região “invertida” – pois ela contraria o conceito que a velocidade aumenta com a exotermicidade.

Figura 2. Variação da energia livre de transferência de elétron e da energia de reorganização conforme o aumento da exotermicidade da reação

Aplicando esta teoria a reações que podem resultar em emissão de quimiluminescência, o aumento da exotermicidade, *além dos limites da região normal de Marcus*, é acompanhado pelo aumento da energia de ativação para a formação de produtos no estado fundamental. Desta forma, a velocidade da reação para a formação dos produtos no estado fundamental diminui com o aumento da exotermicidade e a transferência menos exotérmica o que resulta na formação do estado excitado pode concorrer eficientemente com a reação mais exotérmica que leva à produtos no estado fundamental (Figura 3).

Figura 3. Curvas de Morse representando uma reação quimiluminescente genérica.

Estes fatores, todavia, ainda não garantem a ocorrência de quimiluminescência e alguns aspectos geométricos e energéticos devem ser observados. Em primeiro lugar, a energia liberada no processo deve ser suficiente para promover a excitação de um cromóforo, o que – no caso de substâncias orgânicas – se traduz em cerca de 40 a 120 kcal mol⁻¹. Além disso, o passo de quimiexcitação deve ser instantâneo e, portanto, esta energia deve ser liberada em um único passo. Deve existir ainda certa congruência geométrica entre os estados envolvidos na transição eletrônica. Baseado neste princípio, chamado de *Princípio de Franck-Condon*, pode-se afirmar que uma transformação química na qual o estado de transição na etapa de excitação possui geometria similar àquela do produto excitado tende a uma maior possibilidade de resultar em quimiluminescência.

A eficiência de emissão de luz em uma reação quimiluminescente é relatada como *rendimento quântico* (ϕ), e se refere à razão entre o número de mols de fótons emitidos e o número de mols de substrato consumido. Para reações bioluminescentes, como o caso do sistema luciferina/luciferase de vaga-lume, a eficiência do processo está

próxima a 100%, ou seja, cada molécula de luciferina está associada à emissão de um fóton. Quando comparado a uma lâmpada incandescente, que tem uma taxa de conversão de cerca de 10%, este é um valor exorbitante.

Reações quimiluminescentes eficientes, por outro lado, possuem rendimentos quânticos que variam entre 1 e 40 %. A grande maioria dos sistemas conhecidos envolve a formação de peróxidos, muitas vezes na forma de compostos cíclicos de quatro membros, cuja clivagem satisfaz as exigências necessárias para a formação de produtos eletronicamente excitados. O Esquema 1 apresenta os principais intermediários peroxidicos formados nas reações mais conhecidas que resultam em emissão de luz.

Esquema 1

São apresentados, de cima para baixo, lofina, luminol, 1,2-dioxetanos, sistema peróxi-oxalato, ésteres de acridina, indóis e o sistema luciferina/ luciferase de vaga-lume. Apesar de muitos destes intermediários não terem sido isolados até o momento, são apresentados aqueles com maior aceitação na comunidade científica. Como pode ser observado, existem basicamente quatro tipos de intermediários, 1,2-dioxetanos, 1,2-dioxetanonas, endoperóxidos e, no caso do sistema peróxi-oxalato, a 1,2-dioxetanodiona.

O envolvimento de 1,2-dioxetanos e α -peróxilactonas como *intermediários de alta energia* (IAE) é postulado em certas reações de oxidação na medida em que sua clivagem térmica deveria ser altamente exotérmica em função da liberação da tensão de anel de quatro membros na formação de ligações carbonílicas fortes, identificadas nos produtos de diversas reações bioluminescentes e quimiluminescentes.

A clivagem térmica de 1,2-dioxetanos, diferentemente da maioria das reações quimiluminescentes, representa um sistema simples onde a decomposição unimolecular de uma molécula relativamente estável leva à formação de dois compostos carbonílicos, um deles no estado excitado – singlete ou triplete (Esquema 2)..

Esquema 2

Sua estrutura no estado fundamental se aproxima à apresentada por aldeídos e cetonas no estado excitado, o que, respeitadas certas condições energéticas, favorece a quimiexcitação. Entretanto, esta reação não representa um bom modelo para reações bioluminescentes, uma vez que o rendimento quântico de formação de estados triplete ($0,3 \text{ E mol}^{-1}$) é muito maior do que o do singlete ($10^{-3} \text{ E mol}^{-1}$), o que ocasiona baixos rendimentos de quimiluminescência *direta*. Ao contrário de estados singlete, estados excitados triplete são preferencialmente desativados de forma não radiativa, tornando os

rendimentos quânticos de fosforescência em solução na presença de oxigênio muito mais baixos do que os de fluorescência. O uso de aceptores de energia adequados com altos rendimentos quânticos de fluorescência, os chamados *sensibilizadores*, garante que a quimiluminescência possa ocorrer de forma *indireta*.

A quimiluminescência de α -peróxilactonas (1,2-dioxetanona), entretanto, pode ser utilizada como sistema modelo no estudo de processo de bioluminescência. Apesar de sua presença ter sido postulada como intermediários em diversos sistemas bioluminescentes, apenas algumas α -peróxilactonas foram isoladas e estudadas devido a dificuldades sintéticas e à sua labilidade térmica e frente à decomposição catalítica. Seu vínculo com a bioluminescência não está associado à sua decomposição térmica, na qual observam-se rendimentos quânticos de formação de estados excitados triplete mais altos do que os singlete, mas com processos que envolvem transferência de elétron. A presença de alguns hidrocarbonetos aromáticos – que posteriormente foram denominados ativadores (ACT) – aceleram a velocidade de decomposição de peróxidos cíclicos específicos, como α -peróxilactonas e peróxi-ésteres acíclicos, e aumentam os rendimentos quânticos de formação de produtos excitados singlete. Constatou-se, ainda, que a velocidade de decomposição dependia da concentração e do potencial de oxidação do ativador, do qual originava-se a emissão de fluorescência observada. Neste ponto, foi possível vislumbrar uma drástica variante no mecanismo de quimiexcitação: de uma clivagem térmica homolítica, que favorece a formação de estados triplete, para um processo no qual um fluoróforo facilmente oxidável – ou grupo intramolecular – participa de um processo de transferência de elétrons *intra* ou *intermolecular* que resulta na formação preferencial de estados singlete. Esta quimiluminescência *induzida* foi a pedra fundamental para o estudo do mecanismo da reação quimiluminescente com maior rendimento quântico conhecido: o sistema peróxi-oxalato.

Na presença de ativadores, a reação entre ésteres oxálicos ou cloreto de oxalila e peróxido de hidrogênio resulta em emissão de quimiluminescência com rendimentos quânticos de até 40%. Tendo em vista seu potencial de aplicação, este sistema foi intensamente estudado, sendo que atualmente são postuladas duas espécies como possíveis intermediários de alta energia: uma α -peróxilactona dissubstituída ou a 1,2-dioxetanodiona. Apesar das evidências experimentais que apontam em direção à 1,2-dioxetanodiona – que já foi descrita como o *Santo Graal* dos cientistas envolvidos com quimiluminescência – provas de sua existência ainda são controversas.

A eficiência na formação de estados excitados singlete na interação *intermolecular* do sistema peróxi-oxalato tem seu análogo *intramolecular* na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos. O estudo acerca do envolvimento de íons-radicais nos altos rendimentos quânticos de formação de estados excitados singlete na oxidação quimiluminescente de ésteres de acridina e no sistema peróxi-oxalato encontrou sustentação na decomposição de 1,2-dioxetanos aril-substituídos contendo substituintes doadores de elétron na porção aromática. Apesar de bastante instáveis, observou-se que a decomposição deste tipo de composto resultava na formação quase que exclusiva de espécies eletronicamente excitadas singlete.

Apesar de interessante, dioxetanos, até meados dos anos 80, tinham sua aplicação limitada, já que sua emissão se originava exclusivamente de sua decomposição térmica e as espécies formadas eram preferencialmente tripletes. O passo seguinte no estudo de 1,2-dioxetanos permitiu não só utilizar substâncias químicas e enzimas como indutores de sua quimiluminescência como também traçou um paralelo entre quimiluminescência e bioluminescência. O desenvolvimento de 1,2-dioxetanos contendo fenóis protegidos como substituintes permitiu que a emissão fosse “disparada” por agentes químicos ou enzimáticos de desproteção. A formação de um fenolato induz a decomposição do dioxetano, seguida – após diversos passos – de quimiexcitação e formação de espécies singletes. Este fenômeno vai de encontro com a bioluminescência de diversas luciferinas. Em todos os casos, estes substratos podem ser convertidos – química ou enzimaticamente – a peróxidos cíclicos, e sua estrutura contém um fluoróforo fenólico, que permite a ativação do 1,2-dioxetano formado em função do pH.

Imagina-se que a porção fenólica de baixo potencial de oxidação transfere, de forma *intramolecular*, um elétron ao anel peroxídico e desencadeia uma cascata de eventos que resulta em quimiexcitação. Apesar desta proposta mecanística ainda ser alvo de investigação, a aplicação de 1,2-dioxetanos como sondas enzimáticas foi imediata. Inicialmente, foram desenvolvidos compostos protegidos por grupos fosfato sensíveis a fosfatases, grupo de enzimas de grande interesse em análises clínicas, biologia celular e molecular. O estudo de diversos fatores estruturais, como a posição do grupo doador de elétron no anel aromático ou o padrão de substituição do anel peroxídico permitiu o desenvolvimento de substratos estáveis comerciais para esterases, lipases, colinesterases e outras enzimas.

Ao que tudo indica, a possibilidade de desenvolvimento de um novo sistema quimiluminescente totalmente diferente do que se conhece atualmente parece remota. Neste sentido, e considerando o estágio de desenvolvimento das aplicações analíticas que

utilizam quimiluminescência, é difícil associar o estudo mecanístico ao desenvolvimento de novas aplicações. Nos últimos dez anos, a disparidade entre o volume de publicações que descrevem a aplicação de sistemas quimiluminescentes frente à investigação mecanística é um indicador claro.

Parece claro que 1,2-dioxetanos, em suas diversas variações, são intermediários fundamentais de grande parte das reações quimiluminescentes. Porém, em um exemplo significativo, apesar do mecanismo da etapa de quimiexcitação da reação entre luminol e peróxido de hidrogênio ainda não ter sido desvendado, a participação de anéis peroxídicos de quatro membros foi descartada. Ainda assim, luminol é a substância mais utilizada em ensaios analíticos.

Luminol, aparentemente, é tão eficiente na geração de estados eletronicamente excitados quanto em esconder seu mecanismo. Desde sua descoberta, em 1928, o luminol passou de uma mera curiosidade em demonstrações químicas a uma peça fundamental em métodos analíticos de alta sensibilidade. A utilização de uma infinidade de oxidantes, variando de hipoclorito a peroxinitrito, resulta na quimiluminescência de luminol. De alguma forma, sua utilização transcende o entendimento de seu mecanismo. Esta transcendência, que hoje atinge não só a quimiluminescência, também pode ser atribuída ao sistema peróxi-oxalato e à decomposição induzida de 1,2-dioxetanos. O estudo da etapa de quimiexcitação destes sistemas – vez por outra – indica que o mecanismo de troca de elétrons é falho na descrição de algumas observações experimentais. Esclarecer o mecanismo não deve – neste ponto – aprimorar a aplicação destes sistemas, mas atende à necessidade científica de explorar e esclarecer fenômenos naturais.

Revisões Indicadas

- Adam, W. e G. Cilento (1982). *Chemical and Biological Generation of Excited States*. New York, Academic Press.
- Adam, W., D. Reinhardt, e C.R. Saha Moller (1996). "From the firefly bioluminescence to the dioxetane-based (AMPPD) chemiluminescence immunoassay: A retroanalysis." *Analyst* **121**(11): 1527-1531.
- Baader, W.J., C. V. Stevani, E. L. Bastos, (2004). "Chemiluminescence of organic peroxides" in *Organic Peroxides*. (Ed. Rappoport, Z.), Chichester, Wiley.
- Bronstein, I. e L. J. Kricka (1989). "Clinical applications of luminescent assays for enzymes and enzyme labels." *J. Clin. Lab. Anal.* **3**(5): 316-322.
- Bronstein, I. e P. McGrath (1989). "Chemiluminescence lights up." *Nature* **338**(6216): 599-600.
- Campbell, A. K. (1988). *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*. Chichester, Ellis Horward Ltd.
- Hercules, D. M. (1969). "Chemiluminescence from electron-transfer reactions." *Acc. Chem. Res.* **2**: 301-307.
- Lechtken, P. e N. J. Turro (1974). "Peroxyoxalate Chemiluminescence - Chemiexcitation of high- energy excited-states in acceptor molecules." *Mol. Photochem.* **6**(1): 95-99.
- Marcus, R. A. (2000). "Tutorial on rate constants and reorganization energies." *J. Electroanal. Chem.* **483**(1-2): 2-6.
- Matsumoto, M. (2004). "Advanced chemistry of dioxetane-based chemiluminescent substrates originating from bioluminescence" *J. Photochem. Photobiol., C* **5**: 27-53.
- Schaap, A. P. (1988). "Chemical and enzymatic triggering of chemiluminescent 1,2-dioxetanes." *J. Biolumin. Chemilumin.* **2**(4): 252-252.
- Schuster, G. B., B. Dixon, J. Y. Koo, S. P. Schmidt, e J. P. Smith (1979). "Chemical mechanisms of chemiluminescence and bioluminescence - Reactions of high-energy content organic compounds." *Photochem. Photobiol.* **30**(1): 17-26.
- Schuster, G. B. e S. P. Schmidt (1982). "Chemiluminescence of organic compounds." *Adv. Phys. Org. Chem.* **18**: 187-238.
- Wilson, T. (1995). "Comments on the mechanisms of chemiluminescence and bioluminescence." *Photochem. Photobiol.* **62**(4): 601-606.

Objetivos

Síntese de novos 1,2-dioxetanos sujeitos a decomposição induzida com altos rendimentos quânticos singlete e aprimoramento dos métodos de preparação previamente utilizados pelo Grupo de Pesquisa.

Diferenciar entre uma via de retro-transferência de elétron *intra* e *intermolecular* na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos através do estudo do efeito da viscosidade de solvente sobre os rendimentos quânticos de quimiexcitação.

Obter evidências experimentais diretas para a ocorrência do mecanismo CIEEL na reação peróxi-oxalato através da detecção do dióxido de carbono radical ânion empregando técnicas de ressonância paramagnética de elétron associada ao uso de *spin traps* e espectroscopia de massas.

Utilizar cálculos teóricos como ferramenta na interpretação de resultados experimentais obtidos na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos e no estudo da relação entre suas estruturas, estabilidade térmica e rendimentos de quimiexcitação.

Desenvolver um método de calibração de luminômetros de placa com viabilidade comercial baseado na quimiluminescência do luminol em matriz polimérica de poli(vinilpirrolidona).

Proteção de fenóis como *tert*-butildimetilsililéteres assistida por radiação de microondas na ausência de solvente

A proteção temporária de fenóis utilizando diversos agentes sililantes desempenha um papel fundamental na síntese moderna.^{1,2} Desde seu desenvolvimento por Corey *et al.*,³ o grupo protetor *tert*-butildimetilsilila (TBDMS) é amplamente utilizado devido à sua estabilidade frente a uma grande variedade de reagentes e à facilidade com que pode ser introduzido e removido em condições brandas. Normalmente, reações entre cloreto de *tert*-butildimetilsilano (TBDMSCl) e compostos fenólicos são realizadas na presença de catalisadores como imidazol ou 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e resultam em altos rendimentos de formação de TBDMS éteres.^{3,4} Entretanto, estas reações são lentas e envolvem o uso de solventes orgânicos como DMF ou THF.⁵

No espectro eletromagnético, a região da radiação de microondas é localizada entre a radiação infravermelha e as ondas de rádio. Microondas têm o comprimento de onda entre 1 mm – 1 m, correspondendo a frequências entre 0,3 e 300 GHz. Sabe-se há muito tempo que microondas podem ser utilizadas para aquecer materiais.⁶ Nos últimos 10 anos, o uso de radiação de microondas (μ W) se tornou uma ferramenta muito popular na simplificação e otimização de reações orgânicas.^{7,8} Tipicamente, os produtos desejados são obtidos com altos rendimentos e em períodos mais curtos de reação. Além disso, algumas reações podem ser realizadas na ausência de solventes, favorecendo a química ambientalmente correta (“green chemistry”).⁹

Khalafi-Nezhad *et al.* descrevem um método de sililação de álcoois e fenóis utilizando cloreto de triisopropila (TIPSCl) e imidazol na presença de radiação de microondas.¹⁰ Hexametildisilazano (HMDS) também foi utilizado como agente sililante na proteção de fenóis assistida por microondas.^{11,12} Todavia, a facilidade de desproteção de TBDMS éteres empregando diversas substâncias que incluem fluoreto de

tetrabutylamônio (TBAF),³ KF,^{13,14} KOH/EtOH,¹⁵ LiCl,¹⁶ ZrCl₄,¹⁷ Cs₂CO₃,¹⁸ entre outras,¹ se reflete em grande vantagem na preparação de compostos orgânicos multifuncionais.¹⁹ Recentemente, foi relatado um novo método de *tert*-butildimetilsililação de fenóis que utiliza aquecimento dielétrico de microondas e iodo como catalisador.²⁰ Porém, esta metodologia requer alta potência de microondas, amplo excesso de agente sililante e etapa de extração empregando solventes orgânicos.

Neste capítulo, é descrita a conversão de diversos compostos fenólicos aos seus TBDMS éteres empregando TBDMSCl e imidazol através de síntese assistida por microondas na ausência de solvente.

1.1 Resultados

A reação envolve o aquecimento dielétrico de uma mistura de TBDMSCl, o composto fenólico e imidazol, na ausência de solvente. Após um minuto de irradiação, em potência superior a 90 W, a mistura de reação, que inicialmente se apresentava como uma mistura de sólidos, funde-se em duas fases líquidas. Os rendimentos obtidos na proteção de 3-hidroxibenzaldeído na forma de TBDMS éter após 1 minuto de irradiação apresentam valores ótimos com potência em cerca de 270 W (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da potência de irradiação de microondas sobre os rendimentos da reação entre 3-hidroxibenzaldeído e TBDMSCl (1,2 eq.) com imidazol (2,0 eq.) como catalisador

produto	potência (W)	rendimento (%) ^a
90	36
	180	74
	270	81
	360	74
	450	61

^a rendimentos cromatográficos (CG) após 1 min. de irradiação

Diferentes condições experimentais foram testadas para aumentar os rendimentos de conversão (Tabela 2). Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se um pequeno excesso de TBDMSCl (1,2 eq.) e 2,0 eq. de imidazol.

Tabela 2. Efeito da concentração de reagentes sobre a proteção de 3-hidroxibenzaldeído na forma de TBDMS éter

produto	TBDMSCl ^a	imidazol ^a	rendimento (%)
1,0	1,0	71 ^b
	1,2	1,0	81 ^b
	2,0	1,0	88 ^b
	1,0	2,0	87 ^b
	1,2	2,0	97 ^b
	1,5	2,0	98 ^b
	2,0	2,0	97 ^b
	1,0	3,0	90 ^c
	1,5	3,0	99 ^c

^a em equivalentes

^b rendimentos de isolamento após destilação direta

^c rendimentos de isolamento após etapa de extração

O uso de grande excesso de imidazol (> 2,0 eq.) resulta na conversão completa ao produto sililado. Entretanto, a destilação direta do produto é difícil nestas condições, exigindo uma etapa de extração antes da purificação. Grande excesso de agente sililante

deve ser também evitado devido à evolução de vapores do frasco de reação, sem aumento significativo nos rendimentos.

A dependência do tempo de irradiação sobre a eficiência de formação de 3-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)benzaldeído também foi investigada. Como apresentado na Figura 1, a maior eficiência é obtida quando a mistura é irradiada por 3 a 6 minutos. Períodos mais longos de irradiação levam ao escurecimento da mistura de reação e a rendimentos de obtenção dos sililéteres discretamente mais baixos.

Figura 1. Dependência do rendimento de formação de 3-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)benzaldeído com o tempo de irradiação a 180 W. Os rendimentos se referem à quantidade de produto purificado por destilação direta. As barras de erro indicam o valor médio $\pm$ sd de pelo menos três experimentos.

A consistência do método foi examinada através de sua utilização na conversão de diversos substratos fenólicos, com diferentes padrões de substituição, aos seus respectivos TBDMS éteres (Tabela 3). Em todos os casos, sililéteres foram obtidos em rendimentos bons ou excelentes através da utilização de baixa potência de irradiação (90 W) por 2 minutos e, após um período de resfriamento, 2 minutos adicionais a 180 W. O uso de dois ciclos de irradiação resultou em melhores rendimentos do que a irradiação contínua a 90 ou 180 W por 4 minutos. Os produtos foram caracterizados por ^1H -RMN e ^{13}C -RMN e comparação com dados espectroscópicos relatados anteriormente.^{5,10} A utilidade do método foi também confirmada pela monosilação de catecol e pela proteção de resorufina (**S10**), um indicador de fluorescência amplamente utilizado em métodos analíticos.²¹

Tabela 3. Proteção assistida por microondas de fenóis com TBDMSCl/imidazol em condições livres de solvente

entrada	reagente	produto	rendimento (%) ^a
S1			89
S2			86
S3			97
S4			93
S5			91
S6			88
S7			84
S8			92
S9			76
S10			79

^a rendimentos de isolamento de produto após destilação direta

1.2 Discussão

Sililéteres são grupos de fundamental importância na proteção de álcoois e fenóis. Possuem estrutura genérica OSiR_3 , e a variação do grupo R leva a diferentes graus de estabilidade. Em geral, sililéteres são clivados em meio aquoso ácido ou alcalino, mas a velocidade de hidrólise varia sensivelmente com o seu padrão de substituição e grau de impedimento.¹

Um dos grupos protetores sililésteres mais utilizados é o *tert*-butildimetilsilila ($\text{O-Si}(\text{CH}_3)_2t\text{-Bu}$, abreviado como O-TBDMS ou O-TBS). O grupo TBDMS é mais estável a bases e ácidos aquosos (pH 4 a 12) do que outros sililésteres, sendo ainda estável a nucleófilos, compostos organometálicos, hidrogenação (exceto em meio ácido), hidretos e agentes oxidantes.¹ A desproteção pode ser feita em meio ácido aquoso, mas o método mais comum de clivagem utiliza uma fonte de íons fluoreto, TBAF ou KF na maioria dos casos. Estas características tornaram o grupo TBDMS o sililéter mais utilizado na preparação de 1,2-dioxetanos com substituintes fenólicos protegidos, na medida em que a clivagem do anel peroxídico – que resulta em emissão de quimiluminescência – é induzida pela formação do fenolato resultante da remoção do grupo protetor.

A preparação de fenóis protegidos com o grupo TBDMS é feita em DMF à temperatura ambiente por 10 horas através da reação entre o fenol com TBDMSCl em presença de imidazol.^{3,4} A reação também pode ser realizada em THF com tempos de reação em torno de 14 horas.⁵ A principal vantagem da síntese orgânica assistida por microondas é a diminuição do período de reação. Utilizando-se radiação de microondas o tempo de reação é reduzido para aproximadamente 4 minutos em rendimentos semelhantes.

Não se sabe ao certo a origem do efeito das microondas sobre as reações químicas. Uma tentativa de racionalização dos efeitos pode ser feita considerando-se que a velocidade de uma reação pode ser descrita pela *Equação de Arrhenius* (Eq. 1).

$$k = Ae^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad \text{Eq. 1}$$

Existem basicamente duas formas de aumentar a velocidade de uma reação química: alterando o fator pré-exponencial *A*, que descreve a mobilidade molecular e depende da frequência de vibração da molécula na interface de reação, ou variando-se a energia livre para formação do estado de transição, ou seja, a energia livre de ativação

($\Delta G^\ddagger$).^{22,23} Microondas induzem o aumento das vibrações moleculares podendo afetar o fator pré-exponencial. Entretanto, diversos autores propõem que a irradiação com microondas produz uma alteração no termo exponencial, através da estabilização de estados de transição polares.²⁴

Efeitos de microondas resultam das interações matéria-onda e, devido ao fenômeno de polarização dipolar, quanto maior a polaridade da molécula, mais pronunciado é o efeito de aumento da temperatura pelas microondas. Em termos de reatividade e cinética, um efeito específico deve ser considerado de acordo com o mecanismo de reação e – principalmente – em relação às mudanças de polaridade do sistema durante o curso da reação. Em mecanismos que envolvem espécies polares, quando a polaridade aumenta durante a reação, do estado inicial até o estado de transição, podem ser observados efeitos específicos de microondas. O resultado depende essencialmente do meio e do mecanismo de reação. Se a estabilização do estado de transição (TS, ‡) é mais efetiva do que aquela do estado inicial, observa-se um aumento da reatividade devido à diminuição da energia livre de ativação (Figura 2).

Figura 2. Estabilização relativa de um estado de transição mais polar quando comparado aos reagentes – mecanismo polar

Segundo o *Postulado de Hammond*, se uma determinada reação necessita de uma pequena energia de ativação, $\Delta G^\ddagger$, o estado de transição parece com o reagente. Conseqüentemente, a polaridade modifica-se pouco durante o curso da reação e apenas um pequeno efeito específico de microondas é observado. Em contraste, em reações com maior energia de ativação, o estado de transição parece com o produto, possibilitando que a influência de efeitos de polaridade possa ser mais pronunciada. Desta forma, conclui-se

que sistemas que envolvem reações mais lentas tendem a apresentar maiores efeitos sob irradiação de microondas do que aquelas mais rápidas.²⁵⁻³³

Os experimentos são realizados em um equipamento de microondas doméstico e, por razões de segurança, utilizam-se apenas sólidos, já que a possível saturação da câmara de irradiação com vapores inflamáveis resulta em risco explosão. Além disso, a reação é realizada colocando-se o frasco contendo os reagentes em um bquer de plástico contendo vermiculite.⁷

Devido ao grande excesso de imidazol, a destilação direta – sem o uso de solvente na etapa de extração – era dificultada. Atualmente as reações têm sido realizadas com um excesso de 2 vezes de imidazol. Além disso, percebeu-se que intervalos longos a baixa potência são mais favoráveis que curtos intervalos em alta potência. Desta forma, as reações foram realizadas durante 2 minutos a 180 W, ocorre o resfriamento seguido de duas etapas de aquecimento à mesma potência por 1 minuto. A redução do excesso de cloreto de *tert*-butildimetilsilano de 1,5 para 1,1 eq. praticamente eliminou a evolução de vapores do equipamento de microondas.

Os tempos de reação para obtenção dos maiores rendimentos de formação de produto estão entre 4 e 6 minutos. Após este período ocorre a formação de um material negro bastante viscoso resultado da decomposição dos reagentes. Pode-se especular que o grande desempenho desta reação esteja, além do efeito das microondas sobre os parâmetros termodinâmicos da reação, na fusão rápida do imidazol. Nas condições empregadas, o imidazol atuaria - além de como catalisador - como solvente.

Em resumo, foi desenvolvido um método brando e eficiente para a proteção de fenóis como TBDMS éteres empregando radiação de microondas. Esta metodologia requer curtos períodos de reação na medida em que o aquecimento dielétrico proporcionado pela irradiação de microondas acelera o processo. Além disso, a reação é realizada na ausência completa de solventes, o que reduz sensivelmente a produção de resíduos, um objetivo atual em síntese orgânica. O método foi aplicado para a proteção de 10 compostos contendo OH fenólico, obtendo-se rendimentos de produtos isolados sempre superiores a 75 %.

1.3 Material e Métodos

1.3.1 Purificação de reagentes

Todos os reagentes foram adquiridos na mais alta pureza disponível comercialmente e utilizados sem purificação posterior, com exceção de 3-(2-metilpropenil)fenol, 3-(3-metil-2-butenil)fenol e resorufina que foram preparados como descrito na literatura.^{5,34,35}

1.3.2 Aspectos gerais

A formação de produtos foi acompanhada através de cromatografia gasosa em um cromatógrafo a gás Shimadzu CG14A equipado com um detector de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna capilar (Supelco SBP-1701, sílica fundida 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm de espessura de filme). A purificação dos produtos foi realizada empregando-se um equipamento de destilação de bolas Kugelrohr (Büchi Glass Oven B-580), sob pressão reduzida. Espectros de ¹H e ¹³C foram obtidos em CDCl₃ utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna em um equipamento Bruker AC-200F e espectros de massa em um CG-MS Hewlett-Packard 5890/5988.

1.3.3 Procedimento representativo de preparação

O composto fenólico, cloreto de *tert*-butildimetilsilano (1,2 eq.) e imidazol (2,0 eq.) são combinados em um balão de fundo redondo. Este frasco é colocado dentro de um béquer, envolvido por vermiculite e o conjunto é posicionado dentro da cavidade de irradiação de um forno de microondas (Samsung MW6730W, 900 W) a 10 cm da borda do prato giratório. A mistura de reação é então aquecida por 2 minutos em potência de 90 W. Após o ciclo de aquecimento ser completado, duas fases líquidas são formadas dentro do frasco. Após um período de resfriamento (2 – 3 min), a mistura de reação é aquecida novamente em potência de 180 W até que o reagente fenólico tenha sido consumido completamente, determinado por TLC. Os produtos são purificados através de destilação de bolas à pressão reduzida utilizando um equipamento Kugelrohr. Se uma etapa de extração é necessária, adiciona-se água a mistura de reação (100 mL), seguida de extração com Et₂O (3 × 25 mL). As fases orgânicas combinadas são secas sob MgSO₄ e o

solvente é evaporado sob pressão reduzida. Os produtos são purificados por destilação de bolas à pressão reduzida. Todas as irradiações são feitas em sistema aberto.

1.3.4 Caracterização dos compostos obtidos

(3-bromofenoxi)*tert*-butildimetilsilano (S1) P.e. (2 mmHg): 119 – 128 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{Hex}/\text{AcOEt}, 5/1)$: 0,92. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,61-7,34 (m, 4H), 1,52 (s, 9H), 1,01 (s, 6H). MS m/z : 286 (M^+).

(4-bromofenoxi)*tert*-butildimetilsilano (S2) P.e. (3 mmHg): 119 – 125 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{Hex}/\text{AcOEt}, 5/1)$: 0,90. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,35 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 6,75 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,07 (s, 6H). MS m/z : 286 (M^+).

3-(*tert*-butildimetilsilanilóxi)benzaldeído (S3) P.e. (2 mmHg): 128 – 135 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{Hex}/\text{AcOEt}, 5/1)$: 0,95. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 9,99 (s, 1H), 7,65-6,99 (m, 4H), 0,90 (s, 9H), 0,12 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 192,17, 158,02, 137,87, 130,07, 126,56, 123,55, 119,85, 25,58, 18,16, -4,46. MS m/z : 236 (M^+).

4-(*tert*-butildimetilsilanilóxi)benzaldeído (S4) P.e. (2 mmHg): 120 – 130 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{Hex}/\text{AcOEt}, 5/1)$: 0,89. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 9,86 (s, 1H), 7,75 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 6,91 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 0,98 (s, 9H), 0,23 (s, 6H). MS m/z : 236 (M^+).

ácido 3-(*tert*-butildimetilsilanilóxi)benzóico metiléster (S5) P.e. (2 mmHg): 125 – 128 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{Hex}/\text{AcOEt}, 5/2)$: 0,88. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,64-6,99 (m, 4H), 3,89 (s, 3H), 0,97 (s, 9H), 0,19 (s, 6H). MS m/z : 266 (M^+).

tert-butildimetil[3-(2-metilpropenil)fenoxi]silano (S6) P.e. (3 mmHg): 132 – 138 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{Hex}/\text{AcOEt}, 5/1)$: 0,85. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 6,90 (m, 4H), 6,17 (s, 1H), 1,82 (s, 3H), 1,79 (s, 3H), 0,94 (s, 9H), 0,21 (s, 6H). MS m/z : 262 (M^+).

tert-butildimetil[3-(3-metilbut-2-enil)fenoxi]silano (S7) P.e. (0,5 mmHg): 100 – 110 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{Hex}/\text{AcOEt}, 1/1)$: 0,68. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 6,96-6,43 (m, 4H), 5,13-5,12 (m, 1H), 3,09 (d, $J=7,5$ Hz, 2H), 1,56 (s, 3H), 1,52 (s, 3H), 0,82 (s, 9H), 0,06 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 155,6, 143,3, 132,4, 129,1, 123,1, 121,3, 120,1, 117,2, 34,2, 25,8, 25,7, 18,2, 17,9, -4,4. MS m/z : 276 (M^+).

tert-butildimetil(3-nitrofenoxi)silano (S8) P.e. (2 mmHg): 110 – 120 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{Hex}/\text{AcOEt}, 5/1)$: 0,68. $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 156,20, 149,22, 130,37, 122,12, 115,99, 110,67, 25,82, 25,73, 18,21, 17,99, -4,47. MS m/z : 253 (M^+).

2-(*tert*-butildimetilsilanilóxi)fenol (S9) P.e. (2 mmHg): 119 – 128 °C. R_f (SiO₂, n-Hexano): 0,36. ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 7,21-7,02 (m, 4H), 5,69 (bs, 1H), 1,03 (s, 9H), 0,26 (s, 6H). MS m/z: 224 (M⁺).

7-(*tert*-butildimetilsilanilóxi)resorufina (S10) P.e. (2 mmHg): 135 – 145 °C. R_f (SiO₂, Metanol): 0,51. ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 7,61 (s, 1H), 7,05 (m, 2H), 6,62 (bs, 3H), 0,90 (s, 9H), 0,07 (s, 6H). MS m/z: 327 (M⁺).

1.4 Referências Bibliográficas

1. Greene, T. W., Wuts, P. G. M. (1999). *Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley, New York.
2. Kocieński, P. J. (2003). *Protecting Groups*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
3. Corey, E. J., Venkateswarlu, A. (1972). "Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives". *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 6190.
4. Corey, E. J., Tius, M. A., Das, J. (1980). "Total synthesis of (+-)-aphidicolin". *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 1742.
5. Nery, A. L. P., Weiss, D., Catalani, L. H., Baader, W. J. (2000). "Studies on the intramolecular electron transfer catalyzed thermolysis of 1,2-dioxetanes". *Tetrahedron* **56**: 5317.
6. Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Rousell, J. (1986). "The use of microwave ovens for rapid organic synthesis". *Tetrahedron Lett.* **27**: 279.
7. Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., Waestman, J. (2001). "Microwave-assisted organic synthesis - a review". *Tetrahedron* **57**: 9225.
8. Perreux, L., Luopy, A. (2001). "A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to reaction medium, a mechanistic consideration". *Tetrahedron* **57**: 9199.
9. Larhed, M., Moberg, C., Halberg, A. (2002). "Microwave-accelerated homogeneous catalysis in organic chemistry". *Acc. Chem. Res.* **35**: 717.
10. Khalafi-Nezhad, A., Alamdari, R. F., Zekri, N. (2000). "Efficient and selective protection of alcohols and phenols with triisopropylsilyl chloride/imidazole using microwave irradiation". *Tetrahedron* **56**: 7503.
11. Mojtahedi, M. M., Saidi, M. R., Balourtchian, M., Heravi, M. M. (2002). "Silylation of hydroxy groups with HMDS under microwave irradiation and solvent-free conditions". *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **177**: 289.
12. Bandgar, B. P., Kasture, S. P. (2001). "Chemoselective protection of hydroxyl groups and deprotection of silyl ethers". *Monatsh. Chem.* **132**: 1101.
13. Stork, G., Hudrlik, P. F. (1968). "Isolation of ketone enolates as trialkylsilyl ethers". *J. Am. Chem. Soc.* **60**: 4462.
14. Liotta, C. L., Harris, H. P. (1974). "Chemistry of naked anions. I. Reactions of the 18-crown-6 complex of potassium fluoride with organic substrates in aprotic organic solvents". *J. Am. Chem. Soc.* **96**: 2250.
15. Jiang, Z., Wang, Y. (2003). "A mild, efficient and selective cleavage of aryl tert-butyldimethylsilyl ethers using KOH in ethanol". *Chem. Lett.* **32**: 568.

16. Farràs, J., Serra, C., Vilarrasa, J. (1998). "Cleavage of tert-butyldimethylsilyl ethers by chloride ion". *Tetrahedron Lett.* **39**: 327.
17. Sharma, G. V. M., Srinivas, B., Krishna, P. R. (2003). "A facile zirconium(IV) chloride catalysed selective deprotection of t-butyldimethylsilyl (TBDMS) ethers". *Tetrahedron Lett.* **44**: 4689.
18. Jiang, Z., Wang, Y. (2003). "A mild, efficient and selective deprotection of t-butyldimethylsilyl-protected phenols using cesium carbonate". *Tetrahedron Lett.* **44**: 3859.
19. Heathcock, C. H., McLaughlin, M., Medina, J., Hubbs, J. L., Wallace, G. A., Scott, R., Claffey, M. M., Hayes, C. J., Ott, G. R. (2003). "Multigram synthesis of the C29-C51 subunit and completion of the total synthesis of althohyrin C (spongistatin 2)". *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12844.
20. Saxena, I., Deka, N., Sarna, J. C., Tsuboi, S. (2003). "A convenient method for protection and deprotection of alcohols and phenols as alkylsilyl ethers catalyzed by iodine under microwave irradiation". *Synth. Commun.* **33**: 4185.
21. Vazques, M. J., Rodriguez, B., Zapatero, C., Tew, D. G. (2003). "Determination of phosphate in nanomolar range by an enzyme-coupling fluorescent method". *Anal. Biochem.* **320**: 292.
22. Binner, J. G. P., Hassine, N. A., Cross, T. E. (1995). "The possible role of the preexponential factor in explaining the increased reaction-rates observed during the microwave synthesis of titanium carbide". *J. Mater. Sci.* **30**: 5389.
23. Langa, F., de la Cruz, P., de la Hoz, A., Díaz-Ortiz, A., Díez-Barra, E. (1997). "Microwave irradiation: more than just a method for accelerating reactions". *Contemp. Org. Synth.* **4**: 373.
24. Berlan, J., Giboreau, P., Lefeuvre, S., Marchand, C. (1991). "Organic-synthesis in microwave field - First example of specific activation under homogeneous conditions". *Tetrahedron Lett.* **32**: 2363.
25. Wilson, N. S., Roth, G. P. (2002). "Recent trends in microwave-assisted synthesis". *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **5**: 620.
26. Xu, Y., Wan, L. F., Salehi, H., Deng, W., Guo, Q. X. (2004). "Microwave-assisted one-pot synthesis of trisubstituted imidazoles on solid support". *Heterocycles* **63**: 1613.
27. Luo, J. R., Hunyar, C., Feher, L., Link, G., Thumm, M., Pozzo, P. (2004). "Theory and experiments of electromagnetic loss mechanism for microwave heating of powdered metals". *Appl. Phys. Lett.* **84**: 5076.
28. Das, S. K. (2004). "Application of microwave irradiation in the synthesis of carbohydrates". *Synlett*: 915.
29. Liu, M. O., Tai, C. H., Wang, W. Y., Chen, J. R., Hu, A. T., Wei, T. H. (2004). "Microwave-assisted synthesis and reverse saturable absorption of phthalocyanines and porphyrins". *J. Organomet. Chem.* **689**: 1078.

30. Corsaro, A., Chiacchio, U., Pistara, V., Romeo, G. (2004). "Microwave-assisted chemistry of carbohydrates". *Curr. Org. Chem.* **8**: 511.
31. Nuchter, M., Ondruschka, B., Bonrath, W., Gum, A. (2004). "Microwave assisted synthesis - A critical technology overview". *Green Chem.* **6**: 128.
32. Roy, I., Gupta, M. N. (2003). "Applications of microwaves in biological sciences". *Curr. Sci.* **85**: 1685.
33. Swamy, K. M. K., Yeh, W. B., Lin, M. J., Sun, C. M. (2003). "Microwave-assisted polymer-supported combinatorial synthesis". *Curr. Med. Chem.* **10**: 2403.
34. Eichler, H. (1934). "Ein neues Verfahren zur Herstellung der Chinoxazone". *J. Prakt. Chem.* **139**: 113.
35. Nery, A. L. P., Röpke, S., Catalani, L. H., Baader, W. J. (1999). "Fluoride-triggered decomposition of *m*-silyloxyphenyl-substituted dioxetanes by an intramolecular electron transfer (CIEEL) mechanism". *Tetrahedron Lett.* **40**: 2443.

Síntese de 1,2-dioxetanos: Compostos-modelo no desenvolvimento de sondas quimiluminescentes com altos rendimentos quânticos

Intuitivamente poder-se-ia crer que 1,2-dioxetanos, anéis peroxídicos de quatro membros, fossem instáveis demais para existir. A fragilidade da ligação peroxídica associada à tensão de anel, fragilidade da ligação O-O e ainda a formação de compostos carbonílicos estáveis em sua clivagem são alguns dos argumentos que corroborariam esta suposição. Após o primeiro relato da formação de um suposto 1,2-dioxetano na oxidação de tetrakis(4-nitrofenil)etileno por ácido crômico feito por Blitz em 1897,¹ descrições esparsas postularam a existência desta classe de compostos nos anos seguintes.² Todavia, a dificuldade de caracterização e sua ocorrência apenas em reações de oxidação muito específicas fizeram dos 1,2-dioxetanos uma curiosidade química até a primeira metade dos anos 1960. Neste ponto, a proposta de envolvimento de 1,2-dioxetanos como intermediários transientes em reações que resultavam em quimiluminescência como as oxidações de lofina,³ ésteres de acridina,⁴ indóis,⁵ ésteres oxálicos,⁶ aminoetilenos⁷ e – principalmente – a bioluminescência de vaga-lume^{8,9} fez aumentar incrivelmente o interesse em sua preparação e pelo estudo de suas propriedades.

A primeira síntese bem sucedida de um 1,2-dioxetano foi feita por Kopecky e Munford em 1969.¹⁰ A ciclização do β -bromohidroperóxido derivado de 2-metil-2-butenos em meio alcalino resultou na obtenção do trimetil-1,2-dioxetano, que se mostrou relativamente estável ($t_{1/2}$ (60 °C) $\sim$ 20 min). Entretanto, esta primeira descrição foi recebida com certo ceticismo pela comunidade científica. A confirmação da existência de 1,2-dioxetanos veio com a preparação do 3,4-dietoxi-1,2-dioxetano e do tetrametoxi-1,2-dioxetano por dois grupos de pesquisa independentes.^{11,12} Ambos foram obtidos através da oxidação das respectivas olefinas por oxigênio singlete. Diversas metodologias foram

posteriormente desenvolvidas para a preparação de 1,2-dioxetanos, porém sua aplicação é específica a certos substratos.² Desta forma, a ciclização de β -bromohidroperóxidos e a fotooxigenação de olefinas são as técnicas mais amplamente utilizadas até os dias atuais.

A ciclização de β -bromohidroperóxidos ou *Método de Kopecky* consiste em duas etapas: a conversão da olefina a um β -bromohidroperóxido através da utilização de uma fonte do bromo positivo em presença de excesso de peróxido de hidrogênio anidro, e a subsequente ciclização mediada por base, geralmente em condições de catálise de transferência de fase líquido-líquido (Eq. 1).^{10,13,14}

Utiliza-se 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína como fonte de bromo devido à sua solubilidade em solventes orgânicos, estabilidade e – principalmente – o favorecimento da formação de produtos monobromados.¹⁵ A presença de água residual no sistema, especialmente originada do peróxido de hidrogênio, resulta na formação de halohidrina. Assim, peróxido anidro é obtido através da extração de solução aquosa concentrada com éter etílico e posterior secagem das frações orgânicas reunidas com agente secante adequado.¹⁵ Deve-se destacar, neste ponto, que peróxidos concentrados são potencialmente explosivos e medidas de segurança adequadas como proteção de policarbonato e temperaturas inferiores a 0 °C devem ser tomadas para minimizar o risco de acidente.

β -Bromohidroperóxidos podem ser explosivos, e sua purificação deve ser feita preferencialmente por recristalização. Sua conversão a 1,2-dioxetanos pode ser feita por base, no caso de haletos primários e secundários, ou por íons prata.^{10,13,15} Entretanto, a presença de íons metálicos e outras impurezas no meio de reação e as dificuldades de purificação intrínsecas deste tipo de composto acabam por reduzir sensivelmente os rendimentos.¹⁶ Após sua purificação, 1,2-dioxetanos devem ser armazenados em solução sob ar, já que tendem a explodir na ausência de oxigênio graças à decomposição em cadeia envolvendo espécies carbonílicas excitadas.¹⁷ O método proposto por Kopecky é bastante geral, porém sua grande desvantagem são seus baixos rendimentos, quase sempre inferiores a 30%.¹⁸

Uma alternativa ao método proposto por Kopecky é a adição de oxigênio singlete à olefinas. Uma das formas de gerar oxigênio singlete é a irradiação de uma solução contendo um corante adequado, tipicamente porfirinas ou rosa de bengala, saturada de

oxigênio no chamado procedimento de fotooxigenação.¹⁹⁻²¹ Utilizando-se uma fonte de luz adequada ($\lambda \geq 500$ nm; lâmpada de Na) e olefinas ricas em elétrons, os rendimentos de conversão são superiores a 70%.¹⁸

A fotooxigenação de olefinas contendo hidrogênios alílicos, no entanto, tende a resultar na formação de hidroperóxidos alílicos em lugar de 1,2-dioxetanos, na chamada reação *ene*.²²⁻²⁴ Apesar disso, em alguns poucos casos a concorrência entre a formação de 1,2-dioxetanos e hidroperóxidos alílicos favorece a formação de peróxidos cíclicos.²³

Apesar das dificuldades sintéticas, na segunda metade dos anos 1970, 1,2-dioxetanos eram sintetizados sistematicamente, já que as indicações de sua participação em reações quimiluminescentes tinham pela primeira vez fundamentação experimental em sua termólise, que resulta em emissão de luz.²⁵ Entretanto, a baixa intensidade de emissão acompanhada de rendimentos quânticos de quimiluminescência menores de 0,1% tornava a emissão resultante da termólise de 1,2-dioxetanos incompatível com sistemas quimi e bioluminescentes eficientes.

Este impasse começou a ser solucionado apenas em 1982, quando Schaap e Gagnon sintetizaram um dioxetano contendo substituinte fenólico, que ao ser desprotonado resultava na clivagem do anel peroxídico acompanhada de forte emissão de luz.²⁶ Apesar dos rendimentos quânticos desta reação ainda estarem muito aquém daqueles observados para o sistema luciferina/luciferase de vaga-lume, a comparação entre os dois sistemas permitiu que a síntese de 1,2-dioxetanos fosse sistematizada e que sua quimiluminescência pudesse ser induzida. Desta forma, nos anos seguintes, Schaap e colaboradores projetaram novos compostos cuja quimiluminescência pudesse ser induzida por diferentes agentes químicos e enzimáticos.²⁷⁻³² A racionalização da síntese de 1,2-dioxetanos indica que a aplicabilidade destes compostos depende da facilidade de preparação, da presença de uma fonte de energia estável, de uma porção aromática com substituinte doador de elétron protegido em posição *meta* e um fluoróforo como porção emissora.³³

Em 1989, Irena Bronstein e colaboradores baseados nestes conceitos, sintetizaram o 3-metoxi-3-(*m*-fosfatofenil)espiroadamantil-1,2-dioxetano (AMPPD).³⁴⁻³⁶ A remoção

do grupo fosfato por fosfatase alcalina resultava na clivagem do anel peroxidico com a consequente excitação e emissão de fluorescência do 3-(metoxycarbonil)fenolato. A presença do grupo espiroadamantil garantiu estabilidade térmica ao dioxetano, enquanto que o grupo metoxi favoreceu a preparação por fotooxigenação. O AMPPD é o 1,2-dioxetano melhor sucedido em aplicações analíticas.³⁷⁻⁴¹ Sua utilização como substituto a radioisótopos em imunoenaios evoluiu para a detecção de diversas biomoléculas devido à sua sensibilidade que pode chegar a attomoles (10^{-20}) de substrato.⁴¹

Apesar de centenas de novos compostos terem sido preparados nos últimos 15 anos, pouco avanço foi atingido nas abordagens sintéticas para obtenção de 1,2-dioxetanos. A fotooxigenação é o método mais utilizado em sua preparação e quase sempre o grupo adamantil é utilizado para conferir estabilidade térmica.

Dioxetanos contendo fenóis *meta* e *para* substituídos por grupos protetores trialkylsilyl, diretamente ligados ou afastados do anel peroxidico por um grupo metilênico, foram preparados anteriormente pelo Grupo de Pesquisa utilizando a metodologia de Kopecky a partir das respectivas olefinas.^{42,43} Este capítulo apresenta aquele que era um dos objetivos intrínsecos deste trabalho: a tentativa de otimização da síntese destes dioxetanos (**D1 a D4**), bem como das respectivas espécies emissoras (**E1 a E4**).

A preparação dos aldeídos emissores não só permite o cálculo dos rendimentos quânticos de quimiexcitação, quanto garante a universalização da síntese das olefinas precursoras, o que favorece o trabalho de pesquisa.

Além disso, é descrita a síntese do análogo sililado do AMPPD (**D5**), alvo de patente, que foi realizada através de duas metodologias diferentes. A preparação deste composto era fundamental para viabilizar estudos mecanísticos que comparam este 1,2-dioxetano e os previamente estudados pelo Grupo (**D1** a **D4**).

A substituição do grupo adamantil pelo grupo diisopropil (**D6**) e pelo grupo 1,3,3-trimetil-biciclo[2.2.1]espiroheptanil (**D7**) possibilita o estudo das propriedades de estabilização de grupos volumosos sobre 1,2-dioxetanos. Além disso, a tentativa de síntese do 3-(6-*tert*-butildimetilsilaniloxibezotiazolil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano (**D8**) e do 3,3-diisopropil-6-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)dimetiluciferina-1,2-dioxetano (**D9**) constituem o passo inicial para o estudo futuro de sistemas-modelo para a investigação acerca da bioluminescência do vaga-lume.

2.1 Resultados

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos na síntese de 1,2-dioxetanos e seus precursores. Na tentativa de se criar um sistema de referência cruzada para identificar os compostos e as reações a que se referem, cada substância preparada recebeu uma letra, que indica o grupo ao qual pertence, seguida de um número que indica sua ordem de preparação. Foram definidos os prefixos **D**, que se refere a 1,2-dioxetanos, **O** para olefinas, **E** para emissores e letras para os demais compostos. Desta forma, **D1** se refere ao primeiro 1,2-dioxetano preparado, cujo precursor é a olefina **O1** e a espécie emissora de sua decomposição é **E1**. As reações, sempre apresentadas na forma de rota retrossintética no início de cada seção, apresentam o composto a ser preparado seguido ordem da reação na sequência da síntese. Desta forma, **d1r1** se refere à primeira reação para obtenção do 1,2-dioxetano **D1**. Para facilitar a diferenciação, códigos para reação são apresentados em letra minúscula, enquanto os para designar substâncias em letras maiúsculas. Na *parte experimental*, cada reação é apresentada em detalhes, assim como a descrição detalhada do procedimento e a caracterização de cada composto.

[D1]: 4,4-dimetil-3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1,2-dioxetano

A obtenção das olefinas precursoras de 1,2-dioxetanos é, de forma geral, o ponto central da síntese desta classe de composto. A metodologia utilizada anteriormente pelo Grupo de Pesquisa para a preparação da olefina **O1** baseia-se na *reação de Wittig*.⁴⁴ A

etapa inicial consiste na preparação do sal de fosfônio, que sob a ação de uma base forte resulta na ilida correspondente que reage com aldeídos e cetonas através de um mecanismo de adição dipolar. A preparação deste composto (reação [d1r1]) se dá pela reação S_N2 entre trifenilfosfina e brometo de isopropila em xileno sob atmosfera inerte, a 160 °C por 90 horas. Utilizando síntese assistida por microondas foi possível reduzir o tempo de preparação para 8 minutos, com um aumento do rendimento de 18% para 30%. De forma análoga, a etapa de proteção do aldeído a ser utilizado no acoplamento (reação [d1r2]) foi feita através da síntese assistida por microondas. Esta metodologia possibilitou uma redução do tempo de reação de 14 horas para 4 minutos e, neste caso, com a vantagem adicional de eliminar o uso de solvente nesta etapa.

A formação da ilida de fósforo é obtida através da reação entre o sal de fosfônio e *n*-butillítio (*n*-BuLi). De modo a evitar o ataque da base ao aldeído, esta reação tem sido realizada pelo grupo em uma mistura de DMSO/THF.⁴³ A adição de *n*-BuLi a esta mistura de solventes resulta na formação do ânion de DMSO (ânion dimesil), que atua como base na formação da ilida do sal de fosfônio. Apesar da eficiência deste método, foi utilizada também uma variante da reação de Wittig em hexano, na presença de SiO₂ em temperatura ambiente (reação [d1r3]).⁴⁵ A purificação da olefina **O1**, em ambos os métodos, se deu por destilação à pressão reduzida com o auxílio de um equipamento de destilação de bolas rotatórias (Kugelrohr). A olefina foi obtida em um rendimento de 51 % (*n*-BuLi/DMSO) e 75 % (SiO₂) e identificada, em ambos os casos, por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C.

Em seguida foi feita a conversão da olefina ao respectivo dioxetano via β-bromo-hidroperóxido.¹⁰ A preparação dos hidroperóxidos (reação [d1r4]) é feita através da adição lenta (cerca de 5 horas) de uma fonte eletrofílica de bromo (1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína sólida) à olefina dissolvida em uma solução de peróxido de hidrogênio anidro em éter etílico resfriada à cerca de - 40 °C. Não houve etapa de purificação devido à instabilidade dos compostos frente à sílica, mesmo utilizando cromatografia radial preparativa em camada delgada.

A etapa seguinte envolve o fechamento do anel peroxídico através da ciclização do β-bromo-hidroperóxido por ação de base (reação [d1r5]). Esta reação é realizada em uma mistura de diclorometano e água, em condições de catálise de transferência de fase líquido-líquido, empregando o éter 18-coroa-6 como catalisador. Os produtos brutos foram purificados por cromatografia radial preparativa em camada delgada, em quantidades não superiores a 1 g de produto bruto, em cerca de 1 hora. Com esta

metodologia foi possível obter **D1** com rendimento de 66 %. Sua caracterização foi feita por RMN de ^1H e ^{13}C .

[D2]: 4,4-dimetil-3-(*m*-*tert*butildimetilsilanoxibenzil)-1,2-dioxetano

A rota para obtenção do 1,2-dioxetano **D2** difere daquela utilizada para a obtenção de **D1** no que se refere à obtenção da olefina. Enquanto para **D1** utiliza-se a reação de Wittig para a preparação da olefina precursora, no caso de **D2** a olefina é gerada através do acoplamento entre o brometo fenólico protegido e 2-metil-4-bromo-2-buteno via conversão halogênio-metal.

Esta conversão resulta, no sistema em estudo, em baixos rendimentos na obtenção da olefina desejada, o que contrasta com a praticidade do acoplamento entre o aldeído e o sal de fosfônio de 2-bromopropano na reação de Wittig. Além disso, a decomposição induzida de 1,2-dioxetanos resulta na quimiexcitação de, no caso de **D1** a **D4**, um aldeído aromático (**E1** e **E3**) ou alifático com substituinte aromático na posição 2 (**E2** e **E4**). Esta espécie deve ter seus parâmetros fotofísicos avaliados para permitir que a eficiência de quimiexcitação seja calculada. Desta forma, foi proposta a síntese do 2-(3-(*m*-*tert*butyldimethylsilyloxyphenyl)etanal (**E2**).

Apesar de E2 ter sido sintetizado anteriormente pelo Grupo via oxidação branda do álcool correspondente, as dificuldades na obtenção do álcool precursor via reação de Grignard e a impossibilidade de realizar um caminho análogo para os compostos *p*-trialquilsilil substituídos (Esquema 1) resultaram na busca de alternativas para a síntese de aldeídos fenólicos com grupos metilênicos como espaçadores.⁴³

Esquema 1

Optou-se pela homologação do 1-(3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)metanal em um carbono através de duas abordagens distintas: (i) a hidrólise da glicida resultante da *condesação de Darzens* entre o 1-(3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)metanal e brometo de fenacila em presença de LDA como base (Esquema 2 (*cima*), reação [d2r5]) e (ii) a hidrólise de enóis-éteres, obtidos pela reação de 1-(3-(*m*-*tert*-

butildimetilsilanoxifenil)metanal com cloreto de metoximetilenotriphenilfosfônio, em uma reação de Wittig (Esquema 2 (*baixo*), reação [d2r6]).⁴⁶⁻⁴⁸

Esquema 2

O método utilizando a condensação de Darzens resultou, via catálise ácida ou básica, em diversos produtos na etapa de hidrólise da glicida a aldeído, não sendo possível isolar o composto desejado. Desta forma, optou-se pela via envolvendo enóis-éteres. Entretanto, na etapa de hidrólise em meio ácido o grupo protetor *tert*-butildimetilsilila também é hidrolisado, resultando na necessidade de uma nova etapa de proteção.

Desta forma, esta etapa foi realizada através da preparação do enól-éter desprotegido, empregando radiação de microondas em presença de sílica gel, seguida da hidrólise e subseqüente proteção do aldeído homologado. A vantagem desta metodologia está na ausência de uma nova etapa de proteção após a hidrólise ácida do enól-éter e nos altos rendimentos na obtenção deste composto, sem a presença de solvente, com um tempo de reação de 4 minutos. O aldeído homólogo foi obtido com rendimentos globais de 80% após a purificação. Entretanto, a análise cromatográfica, realizada através de cromatografia em fase gasosa, revelou a presença de um outro composto, que foi identificado como o reagente de partida 1-(3-(*m-tert*-butildimetilsilanoxifenil)metanal. Não foi possível purificar o 2-(3-(*m-tert*-butildimetilsilanoxifenil)etanal de forma a garantir a ausência do aldeído não homologado.

Porém, na etapa final do trabalho, os álcoois *o*-, *m*- e *p*-hidroxifenilíco se tornaram comercialmente disponíveis. Concomitantemente, foi descrito na literatura um procedimento para oxidação do álcool *para* substituído para o respectivo aldeído empregando dicromato de piridina (PDC) (Esquema 3).⁴⁹ A reação utilizando o isômero *meta* foi realizada à temperatura ambiente, em uma mistura anidra de CH₂Cl₂/AcOEt 2:1 sob atmosfera inerte (reação [d2r7]). Após 5 horas de reação o reagente de partida foi

totalmente consumido. Entretanto, após purificação cromatográfica em coluna (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 2:1) o produto purificado foi obtido com um rendimento de somente 27%.

Esquema 3

Apesar do insucesso na obtenção dos aldeídos puros através de reações de homologação, o produto foi obtido empregando-se uma reação de oxidação simples a partir de reagentes comerciais, viabilizando a preparação da olefina via acoplamento de Wittig (reação [d2r9]). Apesar da otimização da preparação da olefina **O2**, os rendimentos na preparação do 4,4-dimetil-3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxybenzil)-1,2-dioxetano não puderam ser significativamente melhorados apesar dos esforços neste sentido. Os rendimentos de formação do β -bromohidroperóxido são bastante satisfatórios empregando-se a metodologia descrita anteriormente. Entretanto, sua conversão ao dioxetano correspondente teve um rendimento máximo de 12%, superiores aos obtidos anteriormente pelo grupo, porém ainda bastante baixos. Desta forma, a vantagem desta abordagem sintética está na preparação do aldeído emissor **E2** e na universalização da preparação dos dioxetanos **D1** a **D4**.

[D3]: 4,4-dimetil-3-(*p*-*tert*-butildimetilsilanoxyfenil)-1,2-dioxetano

A tentativa de obtenção de **D3** foi feita de forma análoga à **D1**. O acoplamento de Wittig entre o sal de fosfônio (reação [d3r3]), obtido a partir da reação mediada por microondas entre 2-bromopropano e trifenilfosfina (reação [d1r1]), e o aldeído fenólico

protegido resultou na formação da olefina em rendimentos satisfatórios (65%). A conversão da olefina ao β -bromohidroperóxido (reação [d3r4]) transcorreu sem problemas e o composto não foi purificado. Entretanto, não foi possível isolar o 1,2-dioxetano após da reação de fechamento de anel (reação [d3r5]). Apesar da presença de uma nova mancha peroxídica na análise por TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2 $R_f=0,37$) durante o percurso da reação além daquela pertencente ao β -bromohidroperóxido, provavelmente indicando a formação do 1,2-dioxetano, nenhum composto peroxídico foi isolado após a etapa de extração.

[D4]: 4,4-dimetil-3-(*p*-*tert*-butildimetilsilanoxibenzil)-1,2-dioxetano

A preparação de **D4**, bem como sua purificação, foram descritas anteriormente pelo Grupo de Pesquisa.⁴³ Atualmente, a etapa de proteção do *p*-bromofenol tem sido realizada com o auxílio de radiação de microondas na presença de excesso de 2 eq. de imidazol. Apesar dos baixos rendimentos (ca. 30%) a reação entre o 4-bromo-*tert*-butildimetilsililoxibenzeno e *n*-BuLi, formando o composto organolítico, que pela adição ao 2-metil-4-bromo-2-butenol resulta na olefina desejada, transcorreu sem dificuldades, de forma análoga ao composto *m*-substituído. A adição de DBH foi feita durante um período de 1,5 horas e resultou no respectivo β -bromo-hidroperóxido que não foi purificado. A etapa de ciclização foi realizada imediatamente a uma temperatura de 15 °C durando cerca de 2,5 horas. O dioxetano resultante não foi purificado sendo mantido a uma temperatura de -80 °C.

Assim como para a preparação de **D2**, uma nova abordagem baseada no acoplamento de Wittig empregando *p*-fenetilaldeído foi utilizada. Como dito anteriormente, a reação de oxidação do *p*-fenetilalcool empregando PDC já havia sido tentada anteriormente em nosso Grupo de Pesquisa, sem sucesso.⁴³ Entretanto, a utilização de uma outra condição experimental empregando este agente oxidante⁴⁹ permitiu a obtenção do aldeído em rendimentos de 21% (reação [d4r5]). Após etapa de proteção, o acoplamento de Wittig (reação [d4r7]) resultou na formação da olefina em rendimentos de 59%. A grande vantagem deste método esta na obtenção do aldeído emissor do 1,2-dioxetano **D4**, na medida em que os rendimentos quânticos singlete de sua decomposição induzida podem agora ser calculados.

[D5]: 3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano

A preparação do 3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano foi descrita inicialmente por Schaap *et al.*^{28,29,50,51} Entretanto, a via de obtenção da olefina precursora foi descrita apenas recentemente.⁵² Desta forma, diversos pesquisadores sugeriram vias de obtenção deste composto, dentre eles o Prof. Dieter Weiß da Friedrich Schiller Universität – Jena, Alemanha, com o qual nosso Grupo de Pesquisa mantém colaboração (*vide rota retrosintética acima*). Apesar do sucesso do Prof. Weiß em obter o composto através desta rota, não foi possível conseguir bons rendimentos na obtenção do acetal α -alcoxilfosforado em nosso laboratório. Entretanto, durante a etapa do trabalho realizada na Alemanha, foi possível obter o fosfinóxido necessário para uma reação de Wadsworth-Emmons (reação [d5r4]), uma variação do acoplamento de Wittig que resulta na formação de olefinas impedidas.⁵³ A reação de acoplamento utiliza *n*-BuLi como base na formação da ilida de fósforo e resultou na formação da olefina espirosubstituída em rendimentos de 56%.

Uma rota alternativa baseada em reações recentemente descritas na literatura foi planejada pelo Grupo.^{54,55} A etapa inicial consiste na proteção do 1-(3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)metanal através de síntese assistida por microondas, seguida de sua esterificação utilizando o complexo V_2O_5 - H_2O_2 em metanol (reação [d5r7]).⁵⁵ A ordem

destas reações pode ser invertida, com a conseqüente proteção do éster. Os resultados em ambos os casos são excelentes com um rendimento global, até esta etapa, superior a 90%.

Em seguida, ocorre o acoplamento entre o *m-tert*-butildimetilsilanoxifenil metanoato de metila e a 2-adamantanona na chamada *reação de McMurry* (reação [d5r8]).⁵⁴ Diversas tentativas foram feitas até que os rendimentos desta reação fossem satisfatórios. Apesar de se tratar de um procedimento bastante complicado, que requer condições bastante severas – LiAlH_4 , Et_3N , TiCl_3 em refluxo durante 7 horas – foi possível obter um rendimento de aproximadamente 70% nesta etapa.

Neste ponto, foi necessária a montagem de um aparato para a fotoxigenação da olefina espirosubstituída (reação [d5r6]). Em um tubo de quartzo de 1 polegada foi colocada uma lâmpada halógena de 500 W de potência com fios soldados aos conectores, que foram isolados utilizando-se silicone, resina epóxi e uma capa plástica. Os fios foram conectados a um reostato ligado à corrente elétrica. Em uma rolha, que se adaptou ao bocal do tubo, foram inseridos dois tubos de vidro para permitir a circulação de água. Este aparato é necessário para dissipar o calor gerado pela lâmpada, evitando assim a termólise do dioxetano produzido. O conjunto foi inserido dentro de um reator fotoquímico resfriado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ que continha uma solução da olefina e quantidades catalíticas de tetrafenilporfirina (TPP) em diclorometano seco (Figura 1). Durante a irradiação foi borbulhado O_2 seco dentro da solução durante duas horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (TLC) até que o reagente de partida foi totalmente consumido.

Um aspecto interessante do dioxetano D5 é seu comportamento frente à revelação da placa de TLC com uma solução aquosa ácida de KI. Tipicamente estes peróxidos são revelados através da aplicação de iodeto que é oxidado a iodo, o que resulta na formação de uma mancha marrom-alaranjada na placa. Além disso, quando submetida à revelação

em câmara de iodo, 1,2-dioxetanos apresentam uma peculiar mancha branca, resultante do contraste entre a formação de periodato de coloração branca e o resto da placa que se torna amarelada. Entretanto, o AMFPD – devido à sua estabilidade – não oxida o iodeto a iodo prontamente, nem apresenta a mancha branca característica quando revelado em câmara de iodo. Para visualizar este composto com KI, a placa deve ser aquecida para que resulte na esperada mancha marrom. Por isso, e devido à forte quimiluminescência induzida deste composto, as placas são reveladas com uma solução de fluoreto de tetrabutylamônio (TBAF), que resulta em uma forte emissão de quimiluminescência de coloração ciano proveniente da mancha cromatográfica referente ao 1,2-dioxetano.

Figura 1. Fotoxigenador montado a partir de lâmpada halógena de 500 W resfriada

[D6]: 3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4,4-diisopropil-1,2-dioxetano

A síntese de D6 tinha por objetivo comparar a estabilização de 1,2-dioxetanos proporcionada pelo grupo diisopopil em relação ao grupo espiroadamantil. A rota empregada foi análoga àquela utilizada na preparação de D5 e transcorreu sem problemas. A etapa inicial consiste na proteção do 1-(3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)metanal através de síntese assistida por microondas (reação [d1r2]), seguida de sua esterificação utilizando o complexo $V_2O_5-H_2O_2$ em metanol/ H_2O

(reação [d5r6]).⁵⁵ O acoplamento entre o éster fenólico protegido e diisopropilcetona foi feito em presença de titânio coloidal em meio alcalino na reação de McMurry.⁵⁴ A olefina foi purificada por cromatografia de coluna (SiO_2 , AcOEt/Hexano 4:1) resultando em um óleo amarelo em rendimentos de 35%. Foi feita uma fotooxigenação em microescala de **D6** que resultou na formação de uma substância que emite luz na presença de TBAF, no comprimento de onda referente à emissão de fluorescência de **E5**, como seria esperado. Devido à instabilidade deste tipo de composto, o dioxetano será preparado no futuro, quando for dado prosseguimento ao estudo da estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos.

[D7]: 3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4-(1,3,3-trimetil-biciclo[2.2.1]espiroheptanil)-1,2-dioxetano (E/Z)

A síntese de **D7** tinha por objetivo comparar a estabilização de 1,2-dioxetanos proporcionada pelo grupo 22,6-trimetil-biciclo[2.1.2]heptano em relação ao grupo espiroadamantil. A rota empregada foi análoga àquela utilizada na preparação de **D5** e **D6** e, novamente, transcorreu sem problemas. A etapa inicial consiste na proteção do 1-(3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)metanal através de síntese assistida por microondas, seguida de sua esterificação utilizando o complexo $\text{V}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}_2$ em metanol/ H_2O .⁵⁵ O acoplamento entre o éster fenólico protegido e (-)-fenchona foi feito em presença de titânio coloidal em meio alcalino na reação de McMurry (reação [d7r1]). A olefina foi purificada por cromatografia de coluna (SiO_2 , AcOEt/Hexano 4:1) resultando em um óleo amarelo em rendimentos de 25%. Foi feita uma fotooxigenação em microescala de **D7** que resultou na formação de uma substância que emite luz na presença de TBAF, no comprimento de onda referente à emissão de fluorescência de **E5**, como seria esperado. Devido à instabilidade deste tipo de composto, o dioxetano será preparado e caracterizado no

futuro, quando for dado prosseguimento ao estudo da estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos.

[D8]: 3-(6-*tert*-butildimetilsilaniloxibenzotiazolil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano

A decomposição induzida de 3-(6-*tert*-butildimetilsilaniloxibenzotiazolil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano (**D8**) por uma fonte de fluoreto adequada (TBAF ou KF/18-coroa-6) deve resultar em altos rendimentos quânticos de quimiluminescência em vários solventes, incluindo água. Este comportamento se deve, entre outros motivos, pelos altos rendimentos quânticos de fluorescência da fonte emissora, o éster do ácido hidroxibenzotiazólico **E8** (Esquema 4).^{33,35}

Esquema 4

A síntese de **D8** depende da fotoxigenação de 2-(adamantil-2-ilidenometoximetil)-6-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)benzotiazol. A olefina pode ser preparada por acoplamento de McMurry entre 2-adamantanona e o éster metílico do ácido 6-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)benzotiazol-2-ico (**E8**).⁵⁶

Crescenzi *et al.* descrevem que a adição de 1,4-benzoquinona à cisteína-metiléster resulta na formação de cloreto de (R)-2-amino-3-(2,5-dihidroxifenilsulfanil)propano em rendimentos superiores a 90% (reação [d8r1]). Utilizando 1,4-benzoquinona recém purificada por resublimação ou recristalização de éter de petróleo e cisteína-metiléster comercial foi obtido um sólido higroscópico amarelo em rendimentos variando entre 74 a 88%.

O passo seguinte consiste na formação de metil-2-metoxi-7-hidroxi-2H-benzo[1,4]tiazina-3-carboxilato (**A8**) pelo tratamento do sal resultante da reação d8r1 com $K_3Fe(CN)_6$ em condições alcalinas, como descrito por Lowe e colaboradores (reação [d8r2]).⁵⁷ Diversas dificuldades foram encontradas nesta fase da preparação, incluindo uma etapa de extração bastante lenta (cerca de 2 horas) causada pela presença de sais de ferro (II) e (III) na mistura de reação.

A descrição de Lowe é uma modificação do procedimento apresentado por McCapra e Razavi que resulta em uma mistura dos compostos **A8** e **B8**. Entretanto, em nossas mãos mesmo após mais de 10 tentativas, diversos outros produtos – incluindo diversas substâncias fluorescentes – foram encontradas em quantidades consideráveis. Apesar disso, confirmando os resultados obtidos por Lowe, nossos dados de TLC indicam que após purificação por coluna flash, uma mistura contendo **A8** e **B8** é o produto majoritários da reação d8r2. Entretanto, o R_f calculado a partir das manchas observadas na cromatografia em camada delgada (composto fluorescente azul com uma mancha não fluorescente no meio) diverge consideravelmente dos valores relatados (SiO_2 – AcOEt-hexano, 1:1 $R_{fLowe}=0,21$; $R_{fBastos}=0,44$).

A contração de anel de **A8** (reação [d8r3]) resultou na formação de **B8** em cerca de 60% (rendimento bruto). Apesar disso, o composto decompõe parcialmente em contato com sílica gel e não foi possível encontrar uma mistura de solventes adequada para utilização de alumina como fase estacionária, dificultando sua purificação por cromatografia de coluna, o que tornou o rendimento de obtenção de **B8** purificado bastante reduzido (~5 %).

Esperava-se que a proteção de **B8** na forma de silil-éter fosse uma etapa trivial da síntese (reação [d8r4]). Dois métodos foram usados: (i) procedimento convencional

utilizando imidazol e cloreto de *tert*-butildimetilsilano em THF seco e (ii) proteção assistida por microondas de laboratório.^{58,59} Em ambos os casos, dois compostos bastante fluorescentes (SiO_2 – AcOEt-hexano, 1:1 $R_f=0,78$ and $0,85$) foram formados. Ambos se decompõem em presença de sílica gel ou na presença de água, resultando no que – aparentemente – é o mesmo composto com fluorescência verde (SiO_2 – AcOEt-hexano, 1:1 $R_f=0,43$). Tratamento do benzotiazol protegido com TBAF também resulta em um composto com fluorescência verde (SiO_2 – AcOEt-hexano, 1:1 $R_f=0,27$) em lugar da formação de E8 como esperado. Todas as tentativas de purificação deste composto para viabilizar sua caracterização fracassaram. Entretanto, o benzotiazol protegido apresenta características de fluorescência – incluindo solvatocromismo – que demandam investigações adicionais.

Apesar das dificuldades, a mistura de compostos obtidos na reação d8r4 foi utilizada em uma tentativa de acoplamento com 2-adamantanona em presença de cloreto de titânio, hidreto de lítio e alumínio e trietilamina, em uma variação da reação de McMurry. Após purificação em coluna (SiO_2 – AcOEt-heptano 2:1), um óleo amarelo foi isolado em rendimentos de 4%. A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicam a formação do 2-(adamantil-2-ilideno-metoximetil)-6-(*tert*-butildimetilsilanilo) benzotiazol (O8).

A reação de fotooxigenação foi realizada em um equipamento doméstico que consistia em um frasco Schlenk modificado que permite o fluxo de gás através de um tubo, que atingia a solução em seu interior, inserido dentro de um recipiente de vidro contendo etanol a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ e duas fontes de luz ($2 \times 1000\text{W}$, Figura 2, reação [d8r6]). O composto foi fotooxigenado em CD_2Cl_2 na presença de tetrafenilporfina (TPP). Todavia, não foi observada formação de peróxido em duas tentativas.

Figura 2. Esquema do fotooxigenador caseiro utilizado na tentativa de preparação de D8

[D9]: 3,3-diisopropil-6-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)dimetil-luciferina-1,2-dioxetano

Neste ponto do trabalho, nosso objetivo era obter um 1,2-dioxetano que tivesse como substituinte um grupo dimetil-luciferina protegido, além de dois grupos isopropila. A preparação deste composto-modelo contribuiria não somente para o desenvolvimento de novos métodos analíticos como também no esclarecimento dos mecanismos de quimiexcitação da luciferina de vaga-lume. A desproteção de **D9** em meio aquoso possivelmente resulta na formação de dimetil-oxiluciferina no estado excitado levando a sua emissão de fluorescência (Esquema 5). Deve-se ressaltar que o sistema luciferina-luciferase de vaga-lume possui o maior rendimento quântico de bioluminescência conhecido, de cerca de 90%.^{26,60} Sendo assim, a preparação deste dioxetano pode conduzir a uma nova classe de compostos com propriedades excepcionais.

Esquema 5

A síntese de luciferina ainda se apresenta como um desafio para químicos orgânicos sintéticos do mundo todo. Branchini compilou, recentemente, todas as metodologias empregadas nesta síntese.⁶¹ Basicamente, estes métodos são baseados na formação de um anel tiazolônico acoplado ao 6-hidroxibenzotiazol. A rota para a preparação de **D9** utiliza uma mercaptana derivada do ácido láctico como reagente na formação do anel tiazólico da luciferina e derivados. Esta metodologia foi empregada na preparação de **E9** (reação [4+1]), um sólido amarelo-alaranjado, em rendimento de ~100 %, que foi identificado por RMN ¹H e ¹³C. Posteriormente **E9** será convertido à olefina diisopropilsubstituída através do método de *Barton-Kellogg*.⁶² A olefina será, no futuro, convertida ao dioxetano por fotooxigenação em diclorometano à baixa temperatura.

Esta etapa do trabalho fornece as bases para a síntese de **D9**, que será utilizado como composto-modelo no desenvolvimento de substratos quimiluminescentes de alta eficiência, baseados na luciferina de vaga-lume.

2.2 Discussão

A otimização da síntese dos dioxetanos e espécies emissoras previamente estudadas pelo grupo se originou, entre outros motivos, pela necessidade de se obterem os compostos **D3** e **D4** para possibilitar o cálculo de seus rendimentos quânticos singlete e de quimiluminescência. Além disso, existiam discrepâncias entre as rotas propostas para dioxetanos arílicos *meta* e *para* substituídos já que foram executadas em períodos diferentes na cronologia de pesquisa do grupo. Desta forma, unificar a síntese e melhorar os rendimentos testando novas metodologias para a preparação dos compostos – algo que nunca havia sido feito em nosso laboratório, já que a síntese não representa o principal interesse da pesquisa – nos pareceu algo adequado para viabilizar a continuidade da pesquisa.

A síntese assistida por microondas foi utilizada na etapa de proteção de fenóis, na preparação de sais de fosfônio e no acoplamento de Wittig, e se apresentou como uma alternativa sintética simples que reduziu o tempo de obtenção do dioxetano **D1**, por exemplo, de 12 dias para 4. Com o sucesso dos acoplamentos de Wittig para a formação de olefinas, a opção de tentar universalizar a preparação de todos os dioxetanos estudados pelo grupo nos pareceu natural. Uma vantagem adicional residia na necessidade de síntese dos aldeídos (**E1** – **E4**), espécies emissoras de fluorescência deste tipo de dioxetano, na proposta sintética o que possibilitava a realização de medidas de rendimentos quânticos de fluorescência, fundamentais para o cálculo dos rendimentos quânticos de quimiexcitação.

A via de obtenção mais óbvia para os aldeídos é a oxidação dos álcoois correspondentes. Entretanto, havia dois problemas nesta abordagem: os fenetilálcoois não eram comerciais e a oxidação com agentes oxidantes convencionais aparentemente não funcionava para os derivados *para* substituídos.^{43,63} Desta forma novas rotas de obtenção foram postuladas. Tanto a hidrólise de enóis-éteres quanto a de glicidas, formadas pela reação de Darzens, são métodos que homologam aldeídos em um carbono, e poderiam ser utilizados como reagentes na preparação dos aldeídos. A síntese de Darzens não permitiu a obtenção dos aldeídos e, apesar do sucesso da preparação dos aldeídos utilizando a hidrólise de enóis-éteres, a impossibilidade de isolar o produto sem o aldeído reagente como contaminante foi decepcionante. Este fato se constitui em um grave problema, sabendo-se que os rendimentos quânticos singlete de dioxetanos preparados a partir do 1-(3-(*m-tert*-butildimetilsilanóxifenil)metanal (**E1**) são iguais a 1,0, enquanto que os

obtidos a partir do 2-(3-(*m-tert*-butildimetilsilanóxi)fenil)etanal (**E2**) são 0,01, a mínima presença de uma mistura dos dois dioxetanos derivados (**D1** e **D2**) resultaria no comprometimento dos valores de rendimento quântico obtido.⁴²

Atualmente, os fenetil-álcoois substituídos em padrão *orto*-, *meta*- e *para*- são disponíveis comercialmente. Utilizando o procedimento descrito por Guiso *et al.*,⁴⁹ foi possível obter os aldeídos **E2** e **E4** através da oxidação dos respectivos álcoois com PDC. Com isso é possível, atualmente, obter os 1,2-dioxetanos **D1**, **D2**, **D3** e **D4** empregando a mesma via sintética, que consiste no acoplamento entre o aldeído adequado com o sal de fosfônio derivado do 2-bromopropano na presença de *n*-BuLi como base em uma reação de Wittig, seguida da oxidação a 1,2-dioxetano pelo método de Kopecky.

A purificação de β -bromohidroperóxidos e 1,2-dioxetanos é a etapa mais crítica da síntese. Devido ao caráter lábil destes compostos, boa parte do produto é perdido quando se utilizam métodos cromatográficos convencionais. Para a síntese de **D1** a **D4** não houve purificação dos β -bromohidroperóxidos, já que os mesmos já haviam sido previamente caracterizados e sua purificação cromatográfica resulta em decomposição significativa.⁶⁴ O uso de cromatografia em camada delgada radial (Chromatotron) na purificação dos 1,2-dioxetanos se refletiu em um aumento dos rendimentos em relação aos obtidos anteriormente. Apesar disso, **D3** e **D4** ainda permanecem como compostos de difícil obtenção. O 1,2-dioxetano **D3** aparentemente é formado durante o percurso de reação. Entretanto, sofre decomposição quase completa na etapa de extração. Mesmo armazenado em solução, **D4** se decompõe em temperaturas de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em cerca de uma semana.

A preparação do AMFPD (**D5**) foi necessária devido às diferentes características entre este tipo de 1,2-dioxetano e os previamente estudados em nosso grupo. Além disso, as dúvidas que se originaram em estudos físico-químicos utilizando este dioxetano poderiam ser esclarecidas através da reprodução dos estudos realizados por Adam *et al.* (*Cap. 3*).^{63,65,66} Sua alta estabilidade térmica frente a condições que normalmente seriam suficientes para decompor os dioxetanos **D1** e **D2** – os mais estáveis estudados por nosso grupo – facilitou em muito os estudos cinéticos sistemáticos (*Cap. 3*). A rota de preparação deste composto foi desenvolvida recentemente no laboratório e inclui a oxidação de 3-hidroxibenzaldeído ao éster metílico correspondente através da utilização de um complexo de vanádio(V) e peróxido de hidrogênio. Em seguida, após a proteção do éster, a olefinação é realizada através da reação de McMurry, uma reação complexa que resulta em baixos rendimentos na formação de produtos. Depois de algumas tentativas empregando diferentes condições experimentais que envolviam redutores e

procedimentos variados,^{52,54} a utilização de TiCl_3 e LiAlH_4 em THF na presença de trietilamina em refluxo por 5-7 horas – com um excesso de apenas 20% da cetona empregada, no caso a 2-adamantanona – resultou em rendimentos superiores a 60%. Outra rota, desenvolvida pelo Prof. Dieter Weiß da Friedrich Schiller Universität – Jena, baseia-se no acoplamento do tipo Wadsworth-Emmons entre um fosfinóxido aromático e 2-adamantanona, na presença de *n*-BuLi como base, para a obtenção da olefina. Apesar de bem sucedida, esta rota é muito mais difícil operacionalmente do que o método que emprega a reação de McMurry.

Houve ainda a necessidade da construção de um aparato de fotoxigenação. Este aparato é de operação delicada, já que uma lâmpada de 500 W de potência ligada a uma fonte de tensão de 100 V estará sob um fluxo de água corrente. A reação transcorreu sem maiores dificuldades, com a formação eficiente de oxigênio singlete pela sensibilização de oxigênio pela tetrafenilporfirina (TPP), e resultou na formação do dioxetano espirosubstituído, que – após o isolamento da TPP através de recristalização em metanol – foi purificado através de cromatografia de camada delgada radial.

A mesma reação de McMurry foi utilizada para acoplar o 3-*tert*-butildimetilsililoxifenilmetanoato de metila (**E5**) com diisopropilcetona e com (-)-fenchona, obtendo assim as olefinas que levarão aos dioxetanos **D6** e **D7**, respectivamente. O objetivo da síntese destes 1,2-dioxetanos é avaliar o efeito de diversos grupos volumosos sobre a estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos.

Os compostos **D8** e **D9** são compostos-modelo no estudo da bioluminescência do sistema luciferina/luciferase de vaga-lume e as tentativas de preparação foram feitas durante um estágio de 4 meses na Alemanha. Esperava-se que a etapa crítica para a preparação de **D8** fosse o acoplamento de McMurry que resulta na olefina. Contudo, esta reação transcorreu sem problemas, enquanto que a obtenção do éster protegido foi bastante complicada, demandando um longo período de tempo.

Apesar do sucesso na obtenção da olefina, não foi possível obter o 1,2-dioxetano. A presença de grupos sulfeto poderia resultar na sua oxidação durante a fotoxigenação e na formação de uma sulfona ou um sulfoxido, o que dificultaria bastante a obtenção do composto desejado. Entretanto, Cemola e Iesce estudaram recentemente a oxidação de grupos contendo enxofre por oxigênio singlete concluindo que a formação de sulfonas depende fortemente das condições de reação e da presença de grupos atraentes de elétrons (EWG) como substituintes (Esquema 6).⁶⁷

Observa-se que, segundo os autores, nas condições empregadas para a fotoxigenação de **O8** (CH_2CD_2 , -20°C), esperar-se-ia que a formação de **D8** fosse favorecida em função da oxidação do sulfeto, que ocorre – preferencialmente – em solventes polares. Outros fatores podem estar relacionados ao insucesso. Algumas condições experimentais empregadas na síntese são diferentes daquelas utilizadas normalmente em nosso grupo de pesquisa. A escolha do solvente (CD_2Cl_2), a temperatura (-15°C) e a preparação da vidraria podem ter interferido na eficiência da reação, já que não se sabe nada acerca da estabilidade de **D8**.

A 6-(tert-butildimetilsililoxi)dimetil-luciferina, composto fundamental na preparação de **D9** foi obtido com sucesso através de um acoplamento entre ciano-6-hidroxibezotiazol protegido e a mercaptana dimetilada derivada do ácido láctico. No futuro, será realizada uma tentativa de acoplamento do tipo McMurry com diisopropilcetona na tentativa de obter a olefina que deriva o 1,2-dioxetano. No caso negativo será tentado o método de Barton-Kellogg que emprega a tioamina e diazoalcanos para a formação de uma nova ligação C-C insaturada.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Purificação de reagentes e solventes

2.3.1.1 Solventes orgânicos

Os solventes orgânicos foram tratados de forma convencional, como relatado por Perrin e Armarego.⁶⁸ *Acetonitrila (ACN)* foi destilados à pressão reduzida na presença de CaH_2 (25 g/L) e armazenada sobre peneira molecular de 4 Å. *Acetato de Etila (AcOEt)* foi destilado à pressão reduzida na presença de CaCl_2 (25 g/L) e armazenada sobre peneira molecular de 4 Å. *Dimetilsulfoxido (DMSO)* foi aquecido a cerca de 130°C em presença de CaH_2 (25 g/L) por cerca de 4 horas e, em seguida, destilado à pressão reduzida e armazenado sobre peneira molecular de 4 Å. *Éter etílico (Et₂O)* foi aquecido a refluxo na presença de H_2SO_4 concentrado (100 mL/L) por 4 horas e, então, destilado. Ao destilado adicionaram-se fios de sódio e uma ponta de espátula de benzofenona. Antes do uso, o solvente foi aquecido a refluxo até apresentar coloração azul e, em seguida, destilado. *Tetraidrofurano (THF)* foi destilado via coluna de vigreux e, ao destilado adicionaram-se fios de sódio e uma ponta de espátula de benzofenona. Antes do uso, o solvente foi aquecido a refluxo até apresentar coloração azul e, em seguida, destilado. *Xileno e Tolueno*, em grau espectroscópico, foram deixados sob EDTA pernoite, filtrados e destilados na presença de sódio metálico.

2.3.1.2 Reagentes

Os reagentes comerciais foram obtidos em alto grau de pureza (>96%) e foram utilizados sem purificação prévia, exceto quando indicado. Os sais inorgânicos empregados em reações sensíveis à umidade foram secos em forno à vácuo.

2.3.2 Equipamentos

2.3.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em um espectrômetro Brucker modelo Avance DMX-300 (300 MHz), em um espectrômetro Varian (300 MHz) e em um espectrômetro Brucker modelo AC-200 (200 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) dos espectros obtidos estão relatados em partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno em todas as amostras (0,03% em massa). São relatadas multiplicidades como: *s*, singleto; *d*, dubleto; *t*, tripleto; *q*, quarteto; *quint*, quinteto; *sext*, sexteto; *sept*, septeto; *oct*, octeto; *m*,

múltiplo; *dd*, duplo dubleto; *dq*, duplo quarteto; *ddd*, duplo duplo dubleto; *dqd*, duplo quádruplo dubleto; *b*, largo. As constantes de acoplamento (*J*) são apresentadas em Hertz (Hz).

2.3.2.2 Espectrometria de massa

Os espectros de massa de baixa resolução (LRMS) foram registrados em um espectrômetro de massa Shimadzu modelo GC/MS-QP5000 conectado a um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC-17A equipado com uma coluna SPB-5 de 30 m.

2.3.2.3 Cromatografia em fase gasosa

Para os ensaios de cromatografia gasosa utilizaram-se um cromatógrafo à gás Shimadzu modelo GC-14A com colunas capilares do tipo SPB-1 (25 m e 50 m), SPB-5 (30 m), com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um microcomputador DX2-66, que foi utilizado como registrador e integrador.

2.3.2.4 Cromatografia em camada delgada analítica

Os ensaios de cromatografia em camada delgada (TLC) analítica foram feitos em placas de Kieselgel 60 F₂₅₄ (sílica com indicador de fluorescência) sobre alumínio (Merck) e placas de óxido de alumínio sobre poliestireno (Aldrich). A revelação das placas foi feita sob luz ultravioleta, em câmara de iodo, em solução de ácido fosfomolibdico e, no caso de substâncias com a presença de função peroxidica, com solução aquosa de KI pH 3,8.

2.3.2.5 Cromatografia em camada delgada preparativa radial

Foram usadas placas de vidro redondas recobertas com uma camada de 2 mm ou 4 mm de espessura de Kieselgel 60 F₂₅₄ (sílica com indicador de fluorescência) contendo gesso. A aplicação da amostra e a eluição radial destas placas (a amostra é aplicada na parte central da placa e as frações são recolhidas pela borda da placa) foi efetuada em um aparelho denominado *Chromatotron* modelo 7924T da *Harrison Research*. A eluição foi efetuada a temperatura ambiente e a revelação das placas foi feita com luz ultravioleta.

2.3.2.6 Cromatografia de coluna

A purificação de substâncias através de cromatografia de coluna empregou sílica gel (SiO₂, 70 – 230 e 230 – 400 mesh) ou alumina neutra (Al₂O₃, ~150 mesh), como fase estacionária. Foram utilizadas colunas de vidro em diversas dimensões, incluindo colunas

de 25 cm de comprimento e diâmetro interno entre 2 e 7 cm, preparadas analogamente a funis de vidro sinterizado, com a fase móvel em fluxo contínuo.

2.3.2.7 Destilações finais

Foi utilizado um equipamento de destilação rotatória *Kugelrohr*, da Büchi, modelo AT 801F. O equipamento é constituído de frascos adaptados a um rotor móvel operando com temperatura controlada automaticamente entre 30 e 210 °C.

2.3.2.8 Fotoxigenadores

Foram utilizados dois tipos de equipamentos caseiros para fotoxigenação. A montagem 1 é constituída de um tubo de quartzo de 1 polegada contendo uma lâmpada halógena de 500 W de potência com fios soldados aos conectores, que foram isolados utilizando-se silicone, resina epoxi e uma capa plástica. Os fios foram conectados a um reostato ligado à corrente elétrica. Em uma rolha, que se adaptou ao bocal do tubo, foram inseridos dois tubos de vidro para permitir a circulação de água, necessária para dissipar o calor gerado pela lâmpada. O conjunto foi inserido dentro de um reator fotoquímico que permite borbulhamento de gás oxigênio e resfriado a – 80 °C.

A montagem 2 é constituída de um frasco do tipo Schlenck com a tampa modificada com uma oliva e um tubo interno que permite o fluxo de oxigênio através da solução em seu interior, inserido dentro de um recipiente de vidro contendo etanol a – 20 °C e duas fontes de luz (2 × 1000W).

2.3.3 Procedimentos e soluções-estoque

2.3.3.1 Titulação de *n*-butilítio

A solução de *n*-BuLi em hexano, de concentração nominal 1,9 M, foi titulada com 2-metil-propan-2-ol (*tert*-butanol), utilizando-se 1,10-fenantrolina como indicador, como descrito na literatura.⁶⁹

Em um balão de duas bocas provido de agitação magnética e sob fluxo de nitrogênio, foram colocados cerca de 20 mL de hexano anidro e alguns cristais de 1,10-fenantrolina. Em seguida, foram adicionados, com o auxílio de uma seringa, 2 mL da solução do organometálico, tornando a mistura amarelo-alaranjado. O *tert*-butanol seco foi então adicionado, gota a gota, à mistura até que a solução se torne amarelo-clara, característica da forma protonada da fenantrolina. Pela massa do álcool utilizada na titulação determina-se a concentração da solução titulada. O procedimento é repetido

algumas vezes no mesmo balão, até a massa do álcool consumido se apresente praticamente constante.

2.3.3.2 Preparação da solução de peróxido de hidrogênio em éter etílico

Extraem-se 20 mL de uma solução aquosa 60 % v/v de peróxido de hidrogênio com éter etílico (2 × 20 mL). A fase etérea é seca sobre MgSO_4 na geladeira por cerca de 10 horas. Em seguida, a solução é filtrada e a concentração de peróxido é determinada espectrofotometricamente.

2.3.3.3 Determinação da concentração de peróxidos ⁷⁰

As concentrações das soluções peroxídicas foram determinadas através do seguinte procedimento: a uma cubeta de 3mL (caminho ótico de 1 cm) contendo 2 mL de solução 0,05 M de iodeto de potássio em tampão acetato ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ pH = 3,8; $\mu = 0,01$) adiciona-se 6 μL de uma solução 10^{-5} M de peroxidase de raiz forte (HRP). Em seguida mede-se a variação da absorbância após a adição de 10 μL da solução de H_2O_2 em éter etílico previamente diluída em água (1:100). A concentração peroxídica é calculada a partir do valor da absorbância a 353 nm, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de $2,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. No caso de 1,2-dioxetanos, as soluções estoque devem ser preparadas em metanol seco, ou em solvente polar mais adequado, e quantidades inferiores à 10 μL devem ser adicionadas à solução de iodeto em meio ácido.

2.3.4 Preparações

[D1]: 4,4-dimetil-3-(*m*-*tert*butildimetilsilanoxifenil)-1,2-dioxetano

[d1r1]: brometo de isopropiltrifenilfosfônio

[d1r1] Método A: Em uma ampola de vidro resistente dissolveram-se 18,5 g (150 mmol) de 2-bromobutano e 39,3 g (150 mmol) de trifenilfosfina em 80 mL de xileno seco. Depois de selada, a ampola foi mantida em estufa a 160 °C por cerca de 90 horas. Ao final deste período, observou-se a formação de um sólido branco que foi lavado com porções de éter de petróleo gelado (2 × 50 mL) e, em seguida, seco sob vácuo em equipamento Kugelrohr a 100 °C por cerca de 4 horas. Obtiveram-se 36,4 g (92,9 mmol) de um sólido branco, que foi pulverizado com o auxílio de um almofariz. MM. 385,28 g mol⁻¹ (C₂₁H₂₂BrP)
Rendimento: 61,9 %. **Ponto de fusão:** 232-236 °C.

[d1r1] Método B: A um tubo de quartzo de 4 cm de diâmetro adicionaram-se 1,23 g (100 mmol) de 2-bromopropano e 2,62 g (100 mmol) de trifenilfosfina, que foram dissolvidos em 15 mL de xileno seco. O frasco foi fechado com o auxílio de uma rolha de borracha,

vedado com uma tampa de teflon e colocado, em seguida, em um béquer – onde foi recoberto com vermiculite. O béquer foi colocado dentro da cavidade do forno de microondas a 10 cm da borda do prato. O forno de microondas foi posicionado dentro de uma capela, com a porta virada para a parede. A reação foi submetida a uma potência de 540 W por 5 minutos, 1 minuto à temperatura ambiente e um novo ciclo de 540 W por 3 minutos. Ao final deste período observou-se a formação de um sólido branco que foi lavado com porções de éter de petróleo gelado (2×50 mL) e, em seguida, seco sob vácuo em equipamento Kugelrohr a 100°C por cerca de 4 horas. Obtiveram-se 3,55 g (92,1 mmol) de um sólido branco, que foi pulverizado com o auxílio de um almofariz. MM. $385,28\text{ g mol}^{-1}$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{BrP}$) *Rendimento*: 92,1 %. *Ponto de fusão*: $234\text{--}236^\circ\text{C}$.

[d1r2]: *m*-tert-butildimetilsililoxifenilbenzaldeído

[d1r2] Método A: A um balão de uma boca de 125 mL, munido de agitação magnética e sob atmosfera de argônio, adicionam-se 24,4 g (200 mmol) de 3-hidroxibenzaldeído e 30,2 g (200 mmol) de cloreto de *tert*-butildimetilsilano, dissolvidos em 80 mL de THF seco. Adiciona-se rapidamente à solução 14,9 g de imidazol (220 mmol) dissolvidos em 40 mL de THF seco. A suspensão ocre resultante foi agitada pernoite à temperatura ambiente. Após este período, a suspensão foi filtrada e o precipitado foi lavado com éter etílico (3×20 mL), e as fases orgânicas combinadas foram lavadas com água gelada (2×100 mL) e secas sobre MgSO_4 . O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se 31,7 g de produto bruto, um líquido viscoso amarelo-alaranjado. Este foi destilado à pressão reduzida, resultando em 24,6 g (200 mmol) de produto purificado, um líquido levemente amarelado, que foi identificado por ^1H -RMN. MM. $236,38\text{ g mol}^{-1}$ ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{Si}$) *Rendimento*: 90 % *Ponto de ebulição* 128°C (2 mmHg).

^1H -RMN – δ (200 MHz, TMS, ppm) 9,97 (s, 1H, COH); 7,65–7,04 (m, 4H, HAr); 0,90 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$); 0,12 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

[d1r2] Método B: A um frasco de cintilação de 20 mL adicionam-se 6,0 g (49 mmol) de 3-hidroxibenzaldeído, 10 g (66 mmol) de cloreto de *tert*-butildimetilsilano e 10,0 g (147 mmol) de imidazol. O frasco aberto foi então colocado na cavidade de um equipamento de microondas, a 10 cm da borda do prato de aquecimento, e aquecido por 2 min a uma potência de 90 W. Após este período, observou-se a formação de duas fases, sendo a inferior de coloração marrom escuro. Retomou-se o aquecimento durante 2 minutos a uma potência de 180 W, o que resultou na formação de um óleo quase negro no fundo do frasco e na leve evolução de um vapor branco. Adicionou-se éter etílico (3 × 20 mL) à suspensão e a mistura foi particionada. A fase orgânica foi lavada com água gelada (2 × 20 mL) e seca sobre MgSO₄. O solvente foi retirado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se 13,4 g de produto bruto, um líquido viscoso marrom-alaranjado. Este foi destilado à pressão reduzida, resultando em 10,7 g (45,2 mmol) de um líquido levemente amarelo que foi identificado por ¹H-RMN. MM. 236,38 g mol⁻¹ (C₁₃H₂₀O₂Si) *Rendimento*: 93 % *Ponto de ebulição* 128 °C (2 mmHg).

¹H-RMN – δ (200 MHz, TMS, ppm) 9,97 (s, 1H, COH); 7,65-7,04 (m, 4H, HAr); 0,90 (s, 9H, (CH₃)₃CSi); 0,12 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

[d1r3]: 1-(*m-tert*-butildimetilsililoxifenil)-2-metilpropeno

[d1r3] Método A: A um balão de três bocas de 500 mL munido de agitação magnética, funil de adição com equalizador de pressão, condensador de refluxo e sob atmosfera de argônio foram adicionados 110 mL de DMSO seco e 200 mL de THF seco. A solução foi resfriada sob agitação a – 15 °C e a ela adicionaram-se 35 mL (75 mmol) de solução de *n*-BuLi em hexano (2,16 M). Após a adição, a solução levemente amarela foi mantida em banho de gelo a 0 °C, sob agitação, por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados, a 0 °C, 27 g (70 mmol) de brometo de isopropiltrifenilfosfônio. Ao final da adição do sólido a solução apresentava uma coloração vermelho-vinho. Em seguida, com auxílio do funil de adição, foi adicionada, em cerca de 30 minutos, uma solução de 16,5 g (69,8 mmol) de 3-*tert*-butildimetilsilanoxibenzaldeído em 60 mL de DMSO. A mistura, passou a apresentar uma coloração amarelo-clara, foi agitada por mais uma hora à temperatura ambiente, sendo aquecida, após este período, a 70 °C por uma hora e meia, mantendo-se a agitação. Após o aquecimento, a solução foi vertida em 200 mL de água gelada e a

solução resultante foi extraída com hexano (4×100 mL). A fase orgânica foi filtrada por uma coluna sílica de 2 cm e, em seguida, seca sob MgSO_4 . A eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida forneceu 12,3 g de produto bruto, um líquido amarelado. Após destilação à pressão reduzida foram obtidos 9,4 g (36 mmol) da olefina, que foi identificada por $^1\text{H-RMN}$. MM. $262,46 \text{ g mol}^{-1}$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{OSi}$) *Rendimento: 51 %*. *Ponto de ebulição (2 mmHg): 129 °C*.

$^1\text{H-RMN} - \delta$ (200 MHz, TMS, ppm): 6,9 (m, 4H, HAr); 6,2 (s, 2H, CH); 2,19(m, 2H, CCH_3); 1,86 (s, 3H, CCH_3), 1,12 (m, 3H, CCH_3); 0,94 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,21 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)

[d1r3] Método B: A um balão de uma boca, munido de agitação magnética, condensador de refluxo com equalizador de pressão e borbulhador adicionaram-se 120 mg (0,51 mmol) de *tert*-butildimetilsililoxibenzaldeído e 400 mg de sílica gel (60-200 mesh). A mistura resultante foi agitada por 5 minutos e, após este período, 80 mL de hexano seco foram adicionados seguidos de 221 mg (0,57 mmol) de brometo de isopropiltrifenilfosfônio. A mistura resultante foi agitada por 3 horas a 25 °C. Após este período, a mistura de reação foi filtrada através de um funil coberto com uma camada de 3 cm de sílica e o resíduo foi lavado com uma mistura de hexano/acetato de etila 20:1. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, o que resultou em 99,7 mg (0,38 mmol) de um óleo que foi identificado por $^1\text{H-RMN}$. MM. $262,46 \text{ g mol}^{-1}$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{OSi}$) *Rendimento: 75 %*. *Ponto de ebulição (2 mmHg): 129 °C*.

$^1\text{H-RMN} - \delta$ (200 MHz, TMS, ppm): 6,9 (m, 4H, HAr); 6,2 (s, 2H, CH); 2,19(m, 2H, CCH_3); 1,86 (s, 3H, CCH_3), 1,12 (m, 3H, CCH_3); 0,94 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,21 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$)

[d1r4]: 2-bromo-2-metil-1-*m-tert*-butildimetilsilanoxifenil-1-hidroperoxilpropano

A um balão de 3 bocas de 50 mL, munido de funil de adição, agitação magnética e sob atmosfera de nitrogênio, foram colocados 5,2 g (20 mmols) de 1-*tert*-butildimetilsiloxifenil-2-metilpropeno. À olefina resfriada a 0°C adicionaram-se, rapidamente, 20,0 mL (160 mmols) de uma solução de H₂O₂ 8,0 M em éter etílico. Após a adição de peróxido de hidrogênio, a temperatura da mistura de reação foi levada a -40°C. Em seguida, foram adicionados, em pequenas porções no decorrer de 4 horas, de forma a evitar que a coloração da mistura se torne alaranjada, 5,50 g (19,2 mmols) de 1,3-dibromo-5,5-dimetil-hidantoína (1,3-dibromo-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona, DBH) sólida. Após a adição, permitiu-se que a mistura de reação atingisse 0°C, onde a mistura foi lavada com soluções aquosas saturadas geladas de (1 × 100 mL) Na₂CO₃, (1 × 100 mL) NaHCO₃, (1 × 100 mL) (NH₄)₂SO₄ e, por fim, com água gelada (1 × 100 mL). A fase etérea foi seca sobre MgSO₄, sob refrigeração. A evaporação do solvente forneceu 4,82 g (12,4 mmol) de produto bruto, um óleo amarelado, que não foi purificado devido à sua instabilidade. MM. 375,37 g mol⁻¹ (C₁₆H₂₇BrO₃Si) *Rendimento Bruto*: 62 %.

[d1r5]: 4,4-dimetil-3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1,2-dioxetano

A um balão de 3 bocas de 50 mL munido de funil de adição e agitação mecânica adicionou-se uma solução contendo 1,8 g (4,8 mmol) de 2-bromo-2-metil-1-*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil-1-hidroperoxilpropano bruto dissolvidos em 10 mL de CH₂Cl₂. A solução foi resfriada a 0°C e a ela foram adicionados, rapidamente e sob intensa agitação, 20 mL de uma solução aquosa 2,0 M de KOH, seguido de uma ponta de espátula de éter 18-coroa-6. A suspensão alaranjada foi agitada intensamente por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as fases foram separadas e a fase orgânica foi lavada com solução saturada gelada de NaCl (1 × 100 mL) e água gelada (1 × 100 mL) e, em seguida, seca sob refrigeração sobre MgSO₄ por dez minutos. Foi obtido 1,6 g de produto bruto, que foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa radial (*Chromatothron*), resultando em 930 mg (3,15 mmol) do 1,2-dioxetano purificado, que foi identificado por ¹H-RMN. . MM. 294,46 g mol⁻¹ (C₁₆H₂₆O₃Si) *Rendimento*: 66 %.

¹H-RMN – δ (200 MHz, TMS, ppm): 7,66-7,40 (m, 4H, HAr); 6,1 (s, 1H, CH); 1,64 (s, 6H, CH₃); 0,90 (s, 9H, SiC(CH₃)); 0,14 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

[D2]: 4,4-dimetil-3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxilbenzil)-1,2-dioxetano **[d2r1]: 3-bromofenoxi-*tert*-butildimetilsilano**

[d2r1] Método A: A um balão de uma boca de 250 mL, munido de agitação magnética e sob atmosfera de argônio, adicionou-se uma solução de 34,6 g (200 mmol) de 3-hidroxibenzaldeído e 30,2 g (200 mmol) de cloreto de *tert*-butildimetilsilano, dissolvidos em 100 mL de THF seco. Em seguida, adicionou-se rapidamente à solução, de coloração amarelo-alaranjada, uma solução de 15,1 g (219 mmol) de imidazol dissolvidos em 50 mL de THF seco. Houve a formação de uma suspensão ocre que foi agitada pernoite. Após o período de agitação, a suspensão foi filtrada e o precipitado foi lavado com cerca de 50 mL de éter etílico, e as fases orgânicas combinadas foram lavadas com água gelada (2 × 100 mL) e secas sobre MgSO₄. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório, obtendo-se 52,4 g de produto bruto, um líquido viscoso alaranjado. Este foi destilado à pressão reduzida (2 mmHg), resultando em 49,7 g (173 mmol) de produto bruto, um líquido levemente amarelado, que foi identificado por ¹H-RMN. MM. 287,27 g mol⁻¹ (C₁₂H₁₉BrOSi) *Rendimento*: 86,5 %. *Ponto de ebulição* (2 mmHg): 125 °C. ¹H-RMN – δ (200 MHz, TMS, ppm). 7,61-7,34 (m, 4H, *H*-Ar); 1,52 (s, 9H, SiC(CH₃)); 1,02 (s, 6H, Si(CH₃)₂)

[d2r1] Método B: A um frasco de cintilação adicionaram-se 3,5 g (20 mmol) de *m*-bromofenol, 4,0 g (26 mmol) de cloreto de *tert*-butildimetilsilano e 2,7 g (40 mmol) de imidazol. O frasco aberto foi colocado na cavidade de um equipamento de microondas, a 10 cm da borda do prato de aquecimento, e aquecido por 2 min a uma potência de 180 W. Após este período, observou-se a formação de duas fases, sendo a inferior de coloração marrom escuro. Retomou-se o aquecimento durante 2 minutos a uma potência de 180 W, que resultou na formação de um óleo quase negro no fundo do frasco e na leve evolução de um vapor branco. O produto bruto foi destilado diretamente, sem etapa de extração, em equipamento de destilação rotatório Kugelrohr, resultando em 3,8 g (20 mmol) do produto, que foi identificado por ^1H -RMN. MM. 287,27 g mol $^{-1}$ (C₁₂H₁₉BrOSi) *Rendimento*: 99 %.

^1H -RMN – δ (200 MHz, TMS, ppm). 7,61-7,34 (m, 4H, *H*-Ar); 1,52 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 1,02 (s, 6H, Si(CH₃)₂)

[d2r2]: *tert*-butildimetil-[3-(3-metil-but-2-enil)-fenoxi]silano

A um balão de três bocas de 250 mL, munido de agitação magnética, funil de adição com equalizador de pressão, condensador de refluxo e sob atmosfera de argônio foram colocados 20 g (70 mmol) de 3-bromofenoxi-*tert*-butildimetilsilano dissolvidos em 50 mL de éter etílico seco. A solução foi resfriada, sob agitação, a $-60\text{ }^\circ\text{C}$, e em seguida adicionaram-se lentamente 34 mL (71 mmol) de solução de *n*-BuLi 2,09 M em hexano. Após atingir a temperatura ambiente, a mistura de reação foi agitada por cerca de 30 minutos. Ao final deste período, a mistura foi resfriada a $0\text{ }^\circ\text{C}$ e adicionou-se uma solução de 10,5 g (70,2 mmol) de 4-bromo-2-metil-2-butenol dissolvidos em 40 mL de éter etílico seco. Após a adição, a agitação foi mantida por mais duas horas à temperatura ambiente. A mistura de reação foi lavada com água ($2 \times 100\text{ mL}$) e a fase orgânica foi seca sob MgSO_4 . A eliminação do solvente em evaporador rotatório forneceu 22,4 g de produto bruto, um líquido viscoso amarelo-alaranjado. Após destilação à pressão reduzida (2 mmHg) obtiveram-se 14,8 g de uma mistura. Foi identificada 3,21 g (11,6 mmol) da olefina em uma fração purificada cromatograficamente, que foi identificada por ^1H -RMN. Foram obtidos picos de impurezas com tempo de retenção 7,28 (isômero), 16,9 (não identificado). MM. 276,49 g mol $^{-1}$ (C₁₇H₂₈OSi) *Rendimento Experimento 1*: 16,6 %

“produto impuro” (3,21 g $\equiv$ 11,6 mmol). *Rendimento Experimento 2*: 20 % “produto impuro” (3,87 g $\equiv$ 14 mmol). *Ponto de ebulição* (2 mmHg): 129 °C.

LRMS – m/z (% intensidade): 276 ($M^+ - t\text{-Bu}$; 96,4), 219 ($M^+ - t\text{-Bu}$; 84,9), 204 ($M^+ - t\text{-Bu}(\text{CH}_3)$; 30,9), 161 ($M^+ - t\text{-Bu}(\text{CH}_3)_2$; 84,7).

¹H-RMN – δ (200 MHz, TMS, ppm): 6,96-6,51 (m, 4H, HAr); 5,2 (m, 1H, CH); 3,09 (d, 2H, CH₂); 1,56 (s, 3H, CCH₃), 1,52 (s, 3H, CCH₃); 0,92 (s, 9H, SiC(CH₃)); 0,09 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

[d2r3]: 3-bromo-3-metil-1-*m*-tert-butildimetilsilanoxifenil-2-hidroperoxilbutano

A um balão de 50 mL de três bocas munido de funil de adição, agitação magnética e sob atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se 3,1 g (11 mmols) de 1-(*p*-tert-butildimetilsiloxifenil)-3-metil-2-buten-1-ol. A olefina foi resfriada a 0°C e 20,0 mL (120 mmols) de uma solução de H₂O₂ 6,0 M em éter etílico foram adicionados rapidamente. Após a adição de todo o peróxido de hidrogênio, a temperatura da mistura de reação foi abaixada para – 40°C e, em seguida, adicionaram-se 1,6 g (5,8 mmols) de 1,3-dibromo-5,5-dimetil-hidantoina sólida, em pequenas porções, no período de 2 horas. Após a adição, espera-se até que a mistura de reação atinja 0°C, quando então esta é lavada com soluções aquosas saturadas geladas de (1 × 100 mL) Na₂CO₃, (1 × 100 mL) NaHCO₃, (1 × 100 mL) (NH₄)₂SO₄ e, por fim, com água gelada (1 × 100 mL). A fase etérea foi seca sobre MgSO₄ pernoite na geladeira. A evaporação do solvente forneceu 890 mg de produto bruto que não foi purificado. MM. 389,40 g mol⁻¹ (C₁₇H₂₉BrO₃Si) *Rendimento bruto*: (890 mg $\equiv$ 2,28 mmol) 21%

[d2r4]: 4,4-dimetil-3-(*m*-tert-butildimetilsilanoxibenzil)-1,2-dioxetano

A um balão de três bocas, munido de agitador mecânico e funil de adição adicionou-se uma solução de 3,4 g (8,8 mmol) de 3-bromo-3-metil-1-*m*-tert-

butildimetilsilanoxifenil-2-hidroperoxilbutano em 50 mL de CH_2Cl_2 . Em seguida, a 0°C e ao abrigo da luz, adicionaram-se durante um período de 20 min 15 mL de uma solução aquosa 1,7 M de KOH (25 mmols) seguida de uma ponta de espátula (quantidade catalítica) de 18-coroa-6. Após 1,5 h, a mistura de reação foi lavada sucessivamente com solução saturada gelada de NaCl ($2 \times 20\text{mL}$) e com água gelada ($2 \times 10\text{mL}$). A fase orgânica foi seca sob MgSO_4 durante dez minutos a 0°C , filtrada e o solvente retirado à pressão reduzida. A purificação do produto bruto foi feita por cromatografia em camada delgada preparativa radial (*Chromatothron*), com a mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hex}$ 2:1 como eluente ($R_f=0,60$), resultando em 720 mg (3,30 mmol) do 1,2-dioxetano purificado, que foi identificado por $^1\text{H-RMN}$. MM. 308,49 g mol^{-1} ($\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Si}$) *Rendimento*: 38 %.

$^1\text{H-RMN} - \delta$ (ppm): 7,09-6,48 (m, 4H, *H-ar*); 5,26-5,19 (m, 1H, *H-4*); 3,11-3,19 (m, 1H, *H-5*); 2,81-2,71 (m, 1H, *H-5*); 1,42 (s, 3H, *H-2*); 1,18 (s, 3H, *H-1*); 0,77 (s, 9H, *H-14*); 0,01 (s, 6H, *H-12*).

[d2r5]: 2-*tert*-butildimetilsililoxifeniletanal

α -Bromo-acetofenona

A um balão de três bocas munido de funil de adição, agitação mecânica e condensador de refluxo adiciona-se uma solução de 50,0 g (420 mmol) de acetofenona em 50 mL de éter anidro. A solução foi resfriada em banho de gelo a 0°C , adicionando-se – em seguida – 0,5 g de cloreto de alumínio seco e 67,0 g (21,5 mL, 420 mmol) de bromo. A coloração alaranjada característica do bromo desaparece rapidamente após o gotejamento. Ao final da adição, a mistura tornou-se levemente rosa e o éter e o brometo

de hidrogênio foram retirados à pressão reduzida. O produto, na forma de sólido marrom-amarelado foi filtrado e lavado diversas vezes com uma mistura de 10 mL de água e 10 mL de éter de petróleo, até que obtiveram-se cristais incolores. O produto foi recristalizado a partir de metanol resultando em 63,0 g (316 mmol) de α -bromoacetofenona que foi identificada por $^1\text{H-RMN}$. MM. 199,04 g mol $^{-1}$ (C $_8$ H $_7$ BrO)
Rendimento: 75 %.

$^1\text{H-RMN}$ – $\delta(\text{CDCl}_3)$: 8,01-7,5 (m, 5H, *H*Ar); 4,47 (s, 2H, CH $_2$ Br).

3-(3-*tert*-butildimetil-silaniloxifenil)-oxiranilfenilmetanona

A um balão de três bocas, munido de agitação magnética, funil de adição, condensador de refluxo e sob atmosfera de argônio, a -78°C , adicionaram-se – gota à gota – 9,4 mL (6,0 mmol) de LDA a uma solução de 0,8 g (4,0 mmol) de bromoacetofenona em 10 mL de THF seco. A mistura resultante foi agitada por uma hora findas as quais adicionou-se uma solução de *tert*-butildimetilsililoxifenilbenzaldeído em 10 mL de THF seco, pré-resfriado a -78°C . A mistura de coloração ocre foi agitada por 2 h, e após este período atingiu temperatura ambiente em cerca de uma hora. A reação foi finalizada pela adição de 10 mL de uma solução aquosa de NaHCO $_3$. A mistura de reação foi extraída com éter (3 $\times$ 50 mL) e as fases orgânicas reunidas foram lavadas (2 $\times$ 10 mL de NaHCO $_3$, 1 $\times$ 10 mL de H $_2$ O) e subseqüentemente secas sob MgSO $_4$. Após evaporação obteve-se 1,52 g de um óleo marrom-amarelado. O produto foi purificado em coluna de sílica eluída com hexano:acetato de etila 2:1, e resultou em 0,8 g (2,2 mmol) de um óleo amarelado que foi identificado por $^1\text{H-RMN}$. MM. 354,51 g mol $^{-1}$ (C $_{21}$ H $_{26}$ O $_3$ Si)
Rendimento: 55 %

$^1\text{H-RMN}$ – $\delta(\text{CDCl}_3)$: 7,94-6,81 (m, 9H, *H*Ar); 4,42 (d, 1H, *H*ep); 4,35 (d, 1H, *H*ep); 0,9 (s, 9H, Si(CH $_3$) $_3$); 0,10 (s, 6H, Si(CH $_3$) $_2$).

2-*tert*-butildimetilsililoxifeniletanal

A um balão de três bocas, munido de agitação magnética, funil de adição, condensador de refluxo e sob atmosfera de argônio, em banho de gelo a 0 °C, adicionou-se uma solução de 354 mg (1,00 mmol) de 3-(3-*tert*-butildimetilsilaniloxifenil)oxiranilfenilmetanona em 20 mL de solvente adequado. A esta solução adicionou-se 1,2 eq. do reagente correspondente em solução (*a.* etóxido de sódio/metanol; *b.* trifluoreto de boro eterado; *c.* ácido perclórico/metanol; *d.* ácido clorídrico/metanol/água). A solução é agitada e acompanhada por cromatografia em camada delgada até que o reagente tenha sido totalmente consumido. A mistura de reação é lavada (3 × NaHCO₃, 2 × H₂O) e extraída com éter etílico. Os produtos brutos foram submetidos a ¹H-RMN, não apresentando o sinal característico de aldeído em nenhum dos casos.

[d2r6]: 2-*tert*-butildimetilsililoxifeniletanal

3-(2-metoxivinil)-fenoxi- *tert*-butildimetilsilano

A um balão de três bocas, munido de agitação magnética, funil de adição, condensador de refluxo e sob atmosfera de argônio, adicionou-se 465 mg (1,20 mmol) de brometo de metoximetiltrifenilfosfônio dissolvidos em 50 mL de THF anidro. A solução foi resfriada a -60 °C e, em seguida foram adicionados lentamente, 0,8 mL (1,3 mmol) de solução de *n*-BuLi 1,6 M em hexano. Deixou-se a mistura atingir temperatura ambiente e manteve-se a agitação por 30 minutos. Após este período, a mistura foi resfriada a 0 °C e uma solução contendo 236 mg (0,99 mmol) do aldeído protegido em THF seco à mistura. A reação foi mantida à temperatura ambiente durante mais 2 horas. A mistura de reação foi lavada com água (2 × 100 mL) e a fase orgânica foi seca sob MgSO₄. A eliminação do solvente em evaporador rotatório forneceu 256 mg de produto bruto, um óleo amarelo. Após purificação por cromatografia de coluna (sílica, hexano/acetato de etila 1:1), obtiveram-se 238 mg (0,90 mmol) de um óleo amarelo que foi caracterizado por ¹H-RMN. MM. 264,44 g mol⁻¹ (C₁₅H₂₄O₂Si) *Rendimento: 90 %*

¹H-RMN – δ(CDCl₃): 7,2-6,89 (m, 4H, HAr); 6,83 (d, 1H, CH); 5,58 (d, 1H, CH); 3,53 (s, 3H, CH₃O); 0,9 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0,12 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

3-(2-metoxivinil)-fenol

Com o auxílio de um almofariz, pulverizou-se uma mistura de sólidos contendo 0,48 g (3,93 mmol) de 3-hidroxibenzaldeído, 1,5 g de silica gel (60 – 200 mesh) e 1,5 g (3,9 mmol) de brometo de metoximetiltrifenilfosfônio. Sob fluxo de argônio, a mistura de sólidos foi adicionada a um frasco de cintilação que foi colocado dentro de um béquer e recoberto com vermiculite até a altura da tampa. O béquer foi posicionado dentro da cavidade do forno de microondas a 10 cm da borda do prato, e irradiado durante 4 min a 180 W. A mistura tornou-se uma pasta marrom-alaranjada. Adicionou-se metanol à mistura que foi, em seguida, filtrada. Após a evaporação do metanol, o resíduo foi dissolvido em éter etílico, e a fase orgânica lavada (2 × 20 mL) com uma solução de NaHCO₃ e seca sob MgSO₄. A análise por TLC (SiO₂, hex/AcOEt 2:1) indicou a presença do reagente ($R_f=0,2$) e uma mancha com $R_f=0,9$. Após evaporação do solvente sob pressão reduzida obteve-se um óleo marrom que foi dissolvido em hexano resultando na precipitação de um sólido levemente rosa. O produto bruto foi recrystalizado a partir de hexano onde foram obtidos 270 mg (1,79 mmol) do composto, que foi identificado por ¹H-RMN. MM. 150,17 g mol⁻¹ (C₉H₁₀O₂) *Rendimento: 46 %*

¹H-RMN – δ(CDCl₃): 7,38-6,95 (m, 4H, HAr); 6,91 (d, 1H, CH); 5,60 (d, 1H, CH); 5,26 (bs, 1H, OH), 3,53 (s, 3H, CH₃O).

3-hidroxifenilacetaldeído

Em um balão de duas bocas munido de condensador de refluxo com borbulhador e septo de borracha, e sob atmosfera de argônio, adicionou-se uma solução de 150 mg (1 mmol) de 3-(2-metoxivinil)-fenol em 50 mL de acetona. Resfriou-se a mistura a 0 °C e adicionou-se, com o auxílio de uma seringa, 2 mL de uma solução 0,2 M de ácido clorídrico. Deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente, e monitorou-se a reação durante oito horas por cromatografia em camada delgada. Adicionou-se água e mistura de reação foi extraída com éter etílico (3 × 15 mL). A fase orgânica foi lavada com água (2 × 50 mL) e seca sob MgSO₄. A eliminação do solvente em evaporador rotatório forneceu

126 mg (0,90 mmol) de produto bruto, um sólido marrom, que foi recristalizado utilizando metanol. *Rendimento*: 90 %.

$^1\text{H-RMN}$ – $\delta(\text{CDCl}_3)$: 9,64 (t, 1H, COH); 7,19-6,65 (m, 4H, HAr); 3,55 (d, 2H, CH₂); 5,31 (bs, 1H, OH).

[d2r7]: 3-hidroxifenilacetaldeído

Em um frasco do tipo Schlenck, foi adicionada uma solução contendo 277 mg (2 mmol) de álcool *m*-hidroxifenílico em uma mistura seca de 2:1 acetato de etila/diclorometano. Em seguida, à temperatura ambiente, sob agitação e atmosfera inerte, adicionou-se 1,5 g (4 mmol) de PDC, em uma porção, ao álcool. A reação foi acompanhada por TLC até que o reagente de partida tenha sido consumido. A mistura de reação foi filtrada, lavada com água (2 × 250 mL), a fase orgânica foi seca sob MgSO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa radial (*Chromatotron*) e resultou em 97 mg (0,71 mmol) de um óleo levemente amarelado. *Rendimento*: 35,5 %.

A caracterização foi feita, em caráter provisório, por comparação de padrão.

[d2r8]: 2-*tert*-butildimetilsiloxifeniletanal

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o 2-(*m*-hidroxifenil)etanal (97 mg, 0,71 mmol), cloreto de *tert*-butildimetilsilano (128,4 mg, 0,85 mmol, 1,2 eq.) e imidazol (97 mg, 1,42 mmol, 2,0 eq.). Este frasco foi colocado dentro de um béquer, envolvido por vermiculite e o conjunto foi posicionado dentro da cavidade de irradiação de um forno de microondas (Samsung MW6730W, 900 W) a 10 cm da borda do prato giratório. A mistura de reação foi aquecida por 2 minutos em potência de 90 W. Após o ciclo de aquecimento ser completado, duas fases líquidas se formaram dentro do frasco. Após um período de resfriamento (2 – 3 min), a mistura de reação foi aquecida novamente em potência de 180 W até que o reagente fenólico foi completamente consumido, como determinado por TLC. Adicionou-se água a mistura de reação (100

mL), que foi seguida de extração com Et₂O (3 × 25 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por destilação de bolas à pressão reduzida utilizando um equipamento Kugelrohr resultando em 175 mg (0,70 mmol) de composto que foi caracterizado por ¹H-RMN. A irradiação foi feita em sistema aberto. *Rendimento*: 99 %

¹H-RMN – δ(CDCl₃): 9,72 (t, 1H, COH); 6,60-7,01 (m, 4H, HAr); 3,64 (d, 2H, CH₂), 0,99 (s, 9H, SiC(CH₃)); 0,09 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

[d2r9]: tert-butildimetil-[3-(3-metil-but-2-enil)-fenoxi]silano

Em um balão de três bocas de 500 mL munido de agitação magnética, funil de adição com equalizador de pressão, condensador de refluxo e sob atmosfera de argônio foram adicionados 20 mL de DMSO seco e 30 mL de THF seco. A solução foi resfriada sob agitação a – 15 °C e a ela foram adicionados 0,35 mL (0,75 mmol) de solução de *n*-BuLi em hexano (2,16 M). Após a adição a solução de coloração amarelo clara foi mantida em banho de gelo a 0 °C, sob agitação, por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados, a 0 °C, 0,27 g (0,70 mmol) de brometo de isopropiltrifenilfosfônio. Ao final da adição do sólido a solução apresentava uma coloração vermelho-vinho. Em seguida, com auxílio do funil de adição, foi adicionada, em cerca de 30 minutos, uma solução de 175 mg (0,70 mmol) de 3-*tert*-butildimetilsilaniloxifenilacetaldeído em 10 mL de DMSO. A mistura de coloração amarelo-clara, foi agitada por mais uma hora à temperatura ambiente, sendo aquecida, após este período, a 70 °C por uma hora e meia, mantendo-se a agitação. Após o aquecimento, a solução foi despejada em 50 mL de água gelada e a solução resultante foi extraída com hexano (4 × 20 mL). A fase orgânica foi filtrada por uma coluna sílica de 2 cm e, em seguida, seca sob MgSO₄. A eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida forneceu 215 mg de produto bruto, um líquido amarelado. Após destilação à pressão reduzida foram obtidos 105 mg (0,38 mmol) da olefina, que foi identificada por ¹H-RMN. *Rendimento*: 54,3 %. *Ponto de ebulição* (2 mmHg): 125-129 °C.

¹H-RMN – δ (ppm): 6,96-6,51 (m, 4H, HAr); 5,2 (m, 1H, CH); 3,09 (d, 2H, CH₂); 1,56 (s, 3H, CCH₃), 1,52 (s, 3H, CCH₃); 0,92 (s, 9H, SiC(CH₃)); 0,09 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

[D3]: 4,4-dimetil-3-(*p*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1,2-dioxetano **[d3r2]: *tert*-butildimetil-[4-(3-metil-but-2-enil)-fenoxi]silano**

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o 2-(*m*-hidroxifenil)etanal (1,2 g, 10 mmol), cloreto de *tert*-butildimetilsilano (1,8 g, 12 mmol, 1,2 eq.) e imidazol (1,4 g, 20 mmol, 2,0 eq.). Este frasco foi colocado dentro de um béquer, envolvido por vermiculite e o conjunto é posicionado dentro da cavidade de irradiação de um forno de microondas (Samsung MW6730W, 900 W) a 10 cm da borda do prato giratório. A mistura de reação foi aquecida por 2 minutos em potência de 90 W. Após o ciclo de aquecimento ser completado, duas fases líquidas se formaram dentro do frasco. Após um período de resfriamento (2 – 3 min), a mistura de reação foi aquecida novamente em potência de 180 W até que o reagente fenólico foi consumido completamente, como determinado por TLC. Adicionou-se água à mistura de reação (50 mL), e os compostos orgânicos foram extraídos com Et₂O (3 × 25 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por destilação de bolas à pressão reduzida utilizando um equipamento Kugelrohr, resultando em 2,3 g (9,8 mmol) de composto que foi caracterizado por ¹H-RMN. A irradiação foi feita em sistema aberto. P.e. (2 mmHg): 120 – 130 °C. R_f(SiO₂, Hexano/Acetato de Etila; 5/1): 0,89. *Rendimento*: 98%

$^1\text{H-RMN} - \delta$ (ppm): 9,86 (s, 1H), 7,75 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 6,91 (d, $J=8,8$, 2H), 0,98 (s, 9H), 0,23 (s, 6H)

[d3r3]: 1-(*p*-*tert*-butildimetilsililoxifenil)-2-metilpropeno

Em um balão de três bocas de 500 mL munido de agitação magnética, funil de adição com equalizador de pressão, condensador de refluxo e sob atmosfera de argônio foram adicionados 40 mL de DMSO seco e 50 mL de THF seco. A solução foi resfriada sob agitação a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a ela foram adicionados 5,0 mL (10 mmol) de solução de *n*-BuLi em hexano (2,16 M). Após a adição a solução de coloração amarelo clara foi mantida em banho de gelo a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação, por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados, a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3,8 g (10 mmol) de brometo de isopropiltrifenilfosfônio. Ao final da adição do sólido a solução apresentava uma coloração vermelho-vinho. Em seguida, com auxílio do funil de adição, foi adicionada, em cerca de 30 minutos, uma solução de 2,4 g (10 mmol) de 4-*tert*-butildimetilsililoxifenilformaldeído em 30 mL de DMSO. A mistura de coloração amarelo-clara, foi agitada por mais uma hora à temperatura ambiente, sendo aquecida, após este período, a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora e meia, mantendo-se a agitação. Após o aquecimento, a solução foi despejada em 100 mL de água gelada e a solução resultante foi extraída com hexano ($2 \times 100\text{ mL}$). A fase orgânica foi filtrada por uma coluna sílica de 2 cm e, em seguida, seca sob MgSO_4 . A eliminação do solvente em evaporador rotatório forneceu 4,2 g de produto bruto, um líquido amarelado. Após destilação à pressão reduzida foram obtidos 1,7 g (6,5 mmol) da olefina, que foi identificada por $^1\text{H-RMN}$. *Rendimento*: 65 %. *Ponto de ebulição* (2 mmHg): $130\text{ }^{\circ}\text{C}$.

$^1\text{H-RMN} - \delta$ (ppm): 7,13 (d, 2H, $^3J=8,2$ Hz, HAr), 6,68 (d, 2H, $^3J=8,2$ Hz HAr); 6,13 (s, 1H, CH); 1,71 (s, 3H, CCH_3), 1,70 (s, 3H, CCH_3); 0,99 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); 0,13 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

[d3r4]: 2-bromo-2-metil-1-(*p*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1-hidroperoxilpropano

Em um balão de 50 mL de 3 bocas provido de funil de adição, agitação magnética e sob atmosfera de nitrogênio, foram colocados 1,7 g (6,5 mmol) de 3-(*p*-*tert*-butildimetilsiloxifenil)-2-metil-2-propeno. A olefina foi resfriada a 0°C e se adicionou, rapidamente, 20 mL (120 mmols) de uma solução de H₂O₂ 6,0 M em éter etílico. Após a adição de todo o peróxido de hidrogênio, a temperatura da mistura de reação foi abaixada para -40°C e, em seguida, adicionou-se 3,7 g (13 mmol) de 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína sólida, em pequenas porções no período de 2 horas, verificando que a mistura de reação não apresentasse coloração alaranjada.

Feita a adição, deixou-se a mistura reacional atingir 0°C e lavou-se esta com soluções aquosas saturadas geladas de (1 × 100 mL) Na₂CO₃, (1 × 100 mL) NaHCO₃, (1 × 100 mL) (NH₄)₂SO₄ e, por fim, com água gelada (1 × 100 mL). A fase etérea foi seca sobre MgSO₄ pernoite na geladeira. A evaporação do solvente forneceu 1,5 g de produto bruto que não foi purificado.

[D4]: 4,4-dimetil-3-(*p*-*tert*-butildimetilsilanoxibenzil)-1,2-dioxetano **[d4r1]: 4-bromo-(*tert*-butildimetilsililoxi)benzeno**

Em um frasco de cintilação foram colocados 35,0 g (202 mmols) de *p*-bromofenol, 30,0 g (200 mmol) de cloreto de *tert*-butildimetilsilano e 272 g (400 mmol) de imidazol. O frasco aberto foi então colocado na cavidade de um equipamento de microondas, a 10 cm da borda do prato de aquecimento, e aquecido por 2 min a uma potência de 180 W. Após este período, observou-se a formação de duas fases, sendo a inferior de coloração marrom escuro. Retomou-se o aquecimento durante 2 minutos a uma potência de 180 W, que resultou na formação de um óleo quase negro no fundo do frasco e na leve evolução de um vapor branco. O produto bruto foi destilado diretamente, sem etapa de extração, em equipamento de destilação rotatório Kugelrohr, resultando em 51,2 g (178 mmol) de composto, que foi identificado por ^1H -RMN. Rendimento: 89 %. P.e. (3 mmHg): 119 – 125 °C. $R_f(\text{SiO}_2, \text{hexano}/\text{AcOEt}; 5:1)=0,90$.

^1H -RMN – δ (ppm): 7,35 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 6,75 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,07 (s, 6H).

[d4r2]: 1-(4-(*tert*-butil-dimetil-sililoxi)-fenil)-3-metil-2-buteno

Em um balão de 3 bocas de 125 mL munido de condensador de refluxo, funil de adição com equalizador de pressão, agitação magnética e sob atmosfera de argônio foram colocados 14,4 g (50,1 mmols) de 4-bromo-*tert*-butildimetilsililoxibenzeno dissolvidos em 50 mL de éter etílico seco. A solução foi resfriada, sob agitação, a -60°C e, em seguida, foram adicionados, lentamente, 24 mL (50 mmols) de solução de *n*-BuLi 2,11 M em hexano. Deixou-se a solução atingir a temperatura ambiente e agitou-se por cerca de 30 minutos. Ao final deste período, o balão foi resfriado a 0°C e foi adicionada, lentamente, uma solução de 7,45 g (50 mmols) de 1-bromo-3-metil-2-buteno dissolvidos em 20 mL de éter etílico seco. Após a adição, deixou-se a mistura de reação atingir a temperatura ambiente, sendo mantida a agitação por mais 2 horas.

Por fim, a mistura foi lavada com água gelada (2 × 100 mL) e a fase orgânica foi seca sobre MgSO_4 . A eliminação do solvente em evaporador rotatório forneceu 13,1 g de produto bruto, um líquido amarelo. Este foi destilado a pressão reduzida, obtendo-se 5,4 g (19,5 mmol) da olefina pura, que foi caracterizada por ^1H -NMR. Rendimento: 39 %. Ponto de ebulição: 102-107°C (0,25 mmHg). $R_f(\text{SiO}_2, \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexano } 1:1)=0,68$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): 0,18 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 0,97 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 1,70 (s, 3 H, $=\text{CCH}_3$); 1,74 (s, 3 H, $=\text{CCH}_3$); 3,26 (d, 1 H, CH_2 , $J=11,1$ Hz); 5,30 (t, 1 H, $=\text{CH}$, $J=11,1$ Hz); 6,74 (d, 2 H, H arom.); 7,01 (d, 2 H, H arom.)

[d4r3]: 2-bromo-1-(4-(*tert*-butildimetilsililoxi)fenil)-3-hidroperóxi-3-metilbutano

Em um balão de 50 mL de 3 bocas provido de funil de adição, agitação magnética e sob atmosfera de nitrogênio, foram colocados 2,10 g (7,60 mmols) de 4-(4-(*tert*-butildimetilsililoxi)fenil)-2-metil-2-buten-1-ol. A olefina foi resfriada a 0°C e se adicionou, rapidamente, 20 mL (120 mmols) de uma solução de H_2O_2 6,0 M em éter etílico. Após a adição de todo o peróxido de hidrogênio, a temperatura da mistura de reação foi abaixada para -40°C e, em seguida, adicionou-se 1,15 g (4,02 mmols) de 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoina sólida, em pequenas porções no período de 2 horas.

Feita a adição, e após atingir 0°C a mistura foi lavada com soluções aquosas saturadas geladas de (1×100 mL) Na_2CO_3 , (1×100 mL) NaHCO_3 , (1×100 mL) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e, por fim, com água gelada (1×100 mL). A fase etérea foi seca sobre MgSO_4 pernoite na geladeira. A evaporação do solvente forneceu 2,5 g de produto bruto que não foi purificado. R_f : 0,16 (CH_2Cl_2 / hexano – 1:1, em SiO_2)

[d4r4]: 3-(4-(*tert*-butildimetilsililoxi)benzil)-4,4-dimetil-1,2-dioxetano

Em um balão de 3 bocas de 50 mL equipado com funil de adição e agitação mecânica foram colocados 2,5 g do 4-(4-(*tert*-butildimetilsililoxi)fenil)-2-bromo-3-hidroperóxido-2-metilbutano bruto dissolvidos em 15 mL de CH_2Cl_2 . A solução foi resfriada a 0°C e a ela foram adicionados, rapidamente e sob intensa agitação, 15 mL de uma solução aquosa 2,0 M de KOH e uma ponta de espátula do éter 18-corona-6. A emulsão amarelada foi agitada intensamente por 1,5 horas a 0°C , período durante o qual a reação foi monitorada por TLC (eluente: CH_2Cl_2 /hexano – 1:1).

Em seguida, as fases foram separadas e a fase orgânica foi lavada com solução saturada gelada de NaCl (1×20 mL) e água gelada (1×20 mL) e em seguida seca por

uma hora sobre MgSO_4 na geladeira. Obteve-se 1,7 g de produto bruto, que foram purificados por cromatografia em camada delgada preparativa radial, resultando em 100 mg (0,32 mmol) do dioxetano purificado. *Rendimento*: 4,3 %, a partir da olefina correspondente. R_f : 0,38 (CH_2Cl_2 /hexano – 1:1, em SiO_2)

$^1\text{H-RMN} - \delta$ (ppm): 7,01 (d, 2H, $H\text{-Ar}$); 6,76 (d, 2H, $H\text{-Ar}$); 3,19 (dd, 1H, CH_2); 2,92 (dd, 1H, CH_2); 1,59 (s, 3H, CCH_3); 1,53 (s, 3H, CCH_3); 0,97 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,17 (s, 6H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$).

[d4r5]: *p*-hidroxifeniletanal

Em um frasco do tipo Schlenck, foi adicionada uma solução contendo 277 mg (2 mmol) de álcool *p*-hidroxifenílico em uma mistura seca de 2:1 acetato de etila/diclorometano. Em seguida, à temperatura ambiente, sob agitação e atmosfera inerte, adicionou-se 1,5 g (4 mmol) de PDC, em uma porção, ao álcool. A reação foi acompanhada por TLC até que o reagente de partida foi totalmente consumido. A mistura de reação foi filtrada, lavada com água (2×250 mL), a fase orgânica foi seca sob MgSO_4 e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa radial (*Chromatothron*) e resultou em 80,8 mg (0,59 mmol) de um óleo levemente amarelado. *Rendimento*: 29,5 %.

[d4r6]: (*p*-*tert*-butildimetilsililoxifenil)etanal

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o 2-(*p*-hidroxifenil)etanal (81,0 mg, 0,59 mmol), cloreto de *tert*-butildimetilsilano (107 mg, 0,71 mmol, 1,2 eq.) e imidazol (81,0 mg, 1,18 mmol, 2,0 eq.). Este frasco foi colocado dentro de um béquer, envolvido por vermiculite e o conjunto foi posicionado dentro da cavidade de irradiação de um forno de microondas (Samsung MW6730W, 900 W) a 10 cm da borda do prato giratório. A mistura de reação foi aquecida por 2 minutos em potência de 90 W. Após o ciclo de aquecimento ser completado, duas fases líquidas se formaram dentro do frasco. Após um período de resfriamento (2 – 3 min), a mistura de reação foi aquecida novamente em potência de 180 W até que o reagente fenólico foi completamente consumido, como determinado por TLC. Adicionou-se água a mistura de reação (100 mL), que foi seguida de extração com Et₂O (3 × 25 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por destilação de bolas à pressão reduzida utilizando um equipamento Kugelrohr resultando em 140 mg (0,56 mmol) de composto. A irradiação foi feita em sistema aberto. Rendimento: 95 %

[D5]: 3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-Dioxetano

[d5r1]: ácido 2,2-dimetilpropanóico-3-formilfeniléster

Em um balão de três bocas de 250 mL, contendo 100 mL de CH_2Cl_2 são adicionados 2,0 g (16 mmol) de 3-hidroxibenzaldeído e 2,7 mL (19 mmol) de trietilamina a 0°C. À solução de coloração castanha resultante, com a ajuda de um funil de adição, foram adicionados gota a gota sob forte agitação 2,1 mL (17 mmol) de cloreto de pivaloila recém destilado, durante 15 minutos. A mistura foi então agitada por 2 horas em temperatura ambiente. Finalmente a mistura de reação foi tratada com 2,5 mL de HCl 1,0 M por cerca de 1 minuto. A fase orgânica foi lavada com água (2×40 mL) e seca sob MgSO_4 . O produto resultante, 1,85 g de um óleo marrom, foi armazenado sob argônio e utilizado sem purificação no passo seguinte.

[d5r2]: *m*-pivaloil-dimetoximetilbenzeno

Em um balão de 3 bocas de 500 mL, 800 mg de ácido *p*-toluenosulfônico dissolvidos em 25 mL de metanol foram adicionados a 1,85 g (8,97 mmol) de ácido 2,2-dimetilpropanóico-3-formilfeniléster. Em seguida, foram adicionados gota a gota, com o auxílio de um funil de adição, 1,0 mL (9,15 mmol) de trimetil ortoformato. A mistura foi agitada por 1 hora e se tornou ligeiramente aquecida. Após a adição de 500 mg de NaHCO_3 , o solvente foi evaporado sob vácuo em um banho a 40 °C. O produto resultante é um óleo amarelo que foi filtrado em coluna de sílica (4 cm) sob pressão de N_2 . Resíduos de solvente foram removidos à vácuo, obtendo-se 1,23 g (4,87 mmol) o acetal bruto sob a forma de um óleo amarelo claro. *Rendimento*: 55% a partir do reagente bruto.

$^1\text{H-RMN} - \delta$ (ppm): 7,12-6,98 (m, 4H, H-Ar); 5,48 (s, 1H, CH); 3,24 (s, 6H, OCH_3); 1,19 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-RMN} - \delta$ (ppm): 27,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 38,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 53,1 (OCH_3); 112,2 ($\text{C}(\text{OMe})_2$); 118,8 (C-Ar); 120,7 (C-Ar); 124,3 (C-Ar); 129,1 (C-Ar); 137,7 (C-Ar); 151,3 (C-Ar, Piv); 174,3 (C=O, Piv).

[d5r3]: 3-(dietoxifosforilmetoximetil)fenilpivalato

Em um frasco tipo Schlenck foram dissolvidos 1,23 g (4,87 mmol) de *m*-pivaloil-dimetoximetilbenzeno em 50 mL de CH₂Cl₂ seco. Em seguida adicionou-se, em uma porção, 809 mg (4,87 mmol) de trietóxi-fosfina. A mistura de reação foi mantida sob agitação sob atmosfera inerte em temperatura ambiente durante 5 horas. Após este período, a mistura foi resfriada a – 55 °C e adicionaram-se 1,8 mL (5 mmol) de BF₃·Et₂O recém destilado. Após 2 horas a análise por TLC indicou que todo reagente de partida havia sido consumido. A mistura de reação foi vertida sob 100 mL de água e os compostos orgânicos extraídos com Et₂O (3 × 25 mL). As fases orgânicas reunidas foram secas sob MgSO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Foram obtidos 1,34 g de produto bruto, um óleo amarelo viscoso, que foi purificado por coluna cromatográfica (SiO₂, hexano/AcOEt 3:1) resultando em 760 mg (2,12 mmol) de composto que foi caracterizado por ¹H-RMN. *Rendimento*: 43 %.

¹H-RMN – δ (ppm): 7,21-7,02 (m, 4H, *H*-Ar); 4,48-4,53 (m, 5H); 3,26 (s, 6H, OCH₃); 1,18 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,14-1,18 (m, 6H, OCH₂CH₃).

[d5r4]: 1-(*m*-fenilpivaloil)-1-metoxi-2-espiroadamantilideno

Em um balão de três bocas, munido de agitação magnética, funil de adição, condensador de refluxo e sob atmosfera de argônio, adicionaram-se 359 mg (1 mmol) de 3-(dietoxifosforilmetoximetil)fenilpivalato dissolvidos em 50 mL de THF anidro. A solução foi resfriada a – 78 °C e, em seguida foram adicionados lentamente, 625 μ L (1 mmol) de solução de *n*-BuLi 1,6 M em hexano. Após atingir temperatura ambiente a agitação foi mantida por 30 minutos. Após este período, a mistura foi resfriada a 0 °C e

foi adicionada, lentamente, uma solução contendo 151 mg (1 mmol) de 2-adamantanona em THF seco. A reação foi mantida à temperatura ambiente durante mais 2 horas.

A mistura de reação foi lavada com água (2×100 mL), e a fase orgânica foi seca sob MgSO_4 . A eliminação do solvente em evaporador rotatório forneceu 280 mg de produto bruto, um óleo amarelo viscoso. Após purificação por cromatografia de coluna (SiO_2 , hexano/ AcOEt 5:1) e evaporação do solvente, obteve-se 187 mg (0,53 mmol) de um óleo amarelo. *Rendimento*: 53 %.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,37-6,87 (m, 4H, $H\text{-Ar}$); 3,34 (s, 3H, OCH_3); 2,98 (s, 1H, Ad); 2,10-1,19 (m, 13H, Ad); 1,12 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

[d5r5]: 1-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1-metoxi-2-espiroadamantilideno

Em um balão de reação foram dissolvidos 187 mg (0,53 mmol) de 1-(*m*-fenilpivaloil)-1-metoxi-2-espiroadamantilideno em etanol. Em seguida adicionou-se 500 μL de uma solução recém preparada de etóxido de sódio 1,0 M em etanol. A mistura de reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas. Após este período adicionou-se 1 mL de uma solução 10 mM de HCl e os compostos orgânicos foram extraídos com Et_2O . A fase orgânica foi seca sob MgSO_4 e o solvente evaporado sob pressão reduzida resultando em 100 mg (0,37 mmol) de um sólido incolor que não foi purificado.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o adamantilideno-metoximetilfenol 100 mg (0,37 mmol), cloreto de *tert*-butildimetilsilano (67,5 mg, 0,45 mmol, 1,2 eq.) e imidazol (50,4 mg, 0,74 mmol, 2,0 eq.). Este frasco foi colocado dentro de um béquer, envolvido por vermiculite e o conjunto é posicionado dentro da cavidade de irradiação de um forno de microondas (Samsung MW6730W, 900 W) a 10 cm da borda do prato giratório. A mistura de reação foi aquecida por 2 minutos em potência de 90 W. Após o ciclo de aquecimento ser completado, duas fases líquidas se formaram dentro do frasco. Após um período de resfriamento (2 – 3 min), a mistura de reação é aquecida novamente em potência de 180 W até que o reagente fenólico tenha sido consumido completamente, como determinado por TLC. Adicionou-se água à mistura de reação (100 mL), que foi seguida de extração com Et_2O (3×25 mL). As fases orgânicas

combinadas foram secas sob MgSO_4 e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por destilação de bolas à pressão reduzida utilizando um equipamento Kugelrohr. A irradiação foi feita em sistema aberto.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,29-6,79 (m, 4H, $H\text{-Ar}$); 3,45 (s, 3H, OCH_3); 2,61 (s, 1H, Ad); 1,90-1,23 (m, 13H, Ad); 0,99 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,18 (s, 6H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$).

[d5r6]: 3-(*m-tert*-butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano

No tubo de reação de um fotoxigenador foram adicionados 1,0 g (2,6 mmol) de 1-(*m-tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1-metoxi-2-espiroadamantilideno dissolvido em 100 mL de diclorometano seco e quantidades catalíticas de tetrafenilporfirina (TPP). O aparato foi resfriado a -80°C e oxigênio começou a ser borbulhado pela mistura de reação, enquanto uma lâmpada de 500 W resfriada foi acionada por duas horas. A mistura de reação foi evaporada à secura, com o auxílio de um evaporador rotatório e metanol foi adicionado, resultando na precipitação da TPP. Após filtragem, através de uma pipeta Pasteur contendo lã de vidro como filtro, o metanol foi evaporado, resultando em 1,2 g de produto bruto que foi purificado através de cromatografia radial em camada delgada. Foram obtidos 830 mg (1,99 mmol) do produto purificado na forma de um óleo amarelado, que foi identificado por $^1\text{H-RMN}$. *Rendimento*: 76,5 %.

$^1\text{H-RMN} - \delta$ (ppm): 7,30-6,86 (m, 4H, $H\text{-Ar}$); 3,24 (s, 3H, OCH_3); 3,02 (s, 1H, Ad); 1,90-1,23 (m, 13H, Ad); 0,99 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,19 (s, 6H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$).

[d5r7]: *m*-tert-butildimetilsililoxifenilmetanoato de metila

Em um balão de duas bocas munido de agitação magnética, condensador de refluxo, septo e sob atmosfera de argônio, adicionaram-se uma solução de NaHCO_3 (8,4 g/50 mL de mistura MeOH/água 9:1) e 3,5 g (15 mmol) de 3-terbutildimetilsililoxifenilformaldeído dissolvido em 25 mL de MeOH, obtendo-se uma solução marrom clara. Em seguida, com o auxílio de um funil de adição adicionaram-se 3,12 g (19,8 mmol) de Br_2 em MeOH até que a mistura de reação se tornou laranja. A agitação foi mantida e a reação foi monitorada por TLC até que todo reagente de partida foi totalmente consumido. A mistura resultante foi vertida sobre água e extraída com éter, a fase orgânica foi seca e evaporada obtendo-se 4,50 g de um óleo marrom que foi purificado em cromatografia de coluna (SiO_2 , hexano/AcOEt 5:1) resultando em 850 mg (3,19 mmol) do produto desejado que foi identificado por ^1H -RMN. *Rendimento*: 21 %

^1H -RMN (CDCl_3) δ : 7,75-7,06 (m, 4H, -ArH); 3,99 (s, 3H, -OCH₃); 0,92 (s, 9H, Si(CH₃)₃); 0,09 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

[d5r7]: *m*-hidroxifenilmetanoato de metila

Em um balão de uma boca, munido de agitação magnética, em banho de gelo, foram colocados 15,3 g (125 mmol) de *m*-hidroxibenzaldeído dissolvidos em 400 mL de uma solução 9:1 metanol/água, 4 mL de HClO_4 70% (49,6 mmol). A mistura foi agitada por 10 minutos. Separadamente, em um balão de uma boca em banho de gelo, 235 mg (3,2 mmol) de pentóxido de vanádio foram adicionados, em uma porção, a 40 mL de H_2O_2 60% (846 mmol), sob agitação, até que todo o pentóxido foi dissolvido e a solução tornou-se marrom-avermelhada (~30 min). Esta solução é adicionada rapidamente, a 0°C à mistura contendo *m*-hidroxibenzaldeído. A mistura de reação resultante foi agitada e monitorada por TLC até que todo o reagente foi consumido. Parte do solvente foi rotaevaporado e adicionaram-se 300 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com uma solução a 5% de bicarbonato de sódio (2 × 50 mL) e água (2 × 50 mL), ou até que o papel indicador de KI indique a ausência de peróxido, e seca sob MgSO_4 . O

solvente foi evaporado à pressão reduzida e o produto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica com hexano:acetato de etila 16:1 como eluente, para obter 14,7 g (96,6 mmol) metil-*m*-hidroxibenzoato de metila que foi caracterizado por ¹H-RMN e IV. *Rendimento*: 77%.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7,63 (d, 2H, -ArH); 7,09 (d, 2H, -ArH), 5,81 (brs, 1H, -OH, troca D₂O), 3,93 (s, 3H, -OCH₃).

IV (CHCl₃) cm⁻¹: 3302, 2952, 1717, 1598, 1455, 1296, 892, 829.

3-*tert*-butildimetilsililoxifenilmetanoato de metila

Em um frasco de cintilação foram colocados 7,5 g (49,3 mmol) de *m*-hidroxifenilmetanoato de metila, 10 g (65 mmol) de cloreto de *tert*-butildimetilsilano e 10,0 g (147 mmol) de imidazol. O frasco aberto foi então colocado na cavidade de um equipamento de microondas, a 10 cm da borda do prato de aquecimento, e aquecido por 2 min a uma potência de 90 W. Após este período, observou-se a formação de duas fases, sendo a inferior de coloração marrom escuro. Retomou-se o aquecimento durante 2 minutos a uma potência de 180 W, que resultou na formação de um óleo quase negro no fundo do frasco e na leve evolução de um vapor branco. Adicionou-se água à mistura de reação (100 mL), que foi seguida de extração com Et₂O (3 × 25 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por destilação de bolas à pressão reduzida utilizando um equipamento Kugelrohr resultando em 11,9 g (44,8 mmol) de composto que foi identificado por ¹H-RMN. *Rendimento*: 91 % P.e. (2 mmHg): 125 – 128 °C. R_f(SiO₂, hexano/AcOEt, 5/2): 0,88.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ: 7,64-6,99 (m, 4H), 3,89 (s, 3H), 0,97 (s, 9H), 0,19 (s, 6H).

[d5r8]: 1-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1-metoxi-2-espiroadamantilideno

A um balão de reação de 3 bocas munido de condensador de refluxo, funil de adição e sob atmosfera inerte foram adicionados 40 mL de THF seco a TiCl_3 (29,3 g; 190 mmol). Em seguida foram adicionados à 0°C, com o auxílio de uma seringa e sob agitação constante, 50 mL (100 mmol) de uma solução 2,0 M de LiAlH_4 em THF. A mistura negra foi mantida sob agitação até atingir temperatura ambiente, o que levou cerca de 10 min. Adicionaram-se 16,8 mL (120 mmol) de trietilamina e a suspensão foi refluxada por 30 min. Após este período, uma solução contendo 5,0 g (18,8 mmol) de *tert*-butildimetilsilanilo(benzotiazol-2-carboxilato de metila e 3,38 g (22,5 mmol) de 2-adamantanona em 50 mL de THF seco foi adicionada durante um período de 25 minutos. O refluxo foi mantido por mais 5 horas e a reação foi acompanhada por TLC. Em seguida, deixou-se a mistura atingir temperatura ambiente e adicionaram-se 100 mL de água. A mistura foi então particionada em 100 mL de água e 100 mL de Et_2O e os componentes orgânicos foram extraídos com acetato de etila (3×50 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO_4 e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna flash (SiO_2 , AcOEt -heptano, 1:3) resultando em 2,80 g (7,27 mmol) de composto. *Rendimento*: 39 %.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,29-6,79 (m, 4H, H-Ar); 3,45 (s, 3H, OCH_3); 2,61 (s, 1H, Ad); 1,90-1,23 (m, 13H, Ad); 0,99 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,18 (s, 6H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$).

[D6]: 3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4,4-diisopropil-1,2-Dioxetano

[d6r1]: 1-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1-metoxi-3,3-diisopropiladamantilideno

A um balão de reação de 3 bocas munido de condensador de refluxo, funil de adição e sob atmosfera inerte foram adicionados 20 mL de THF seco a 2,9 g TiCl_3 (19 mmol). Em seguida foram adicionados à 0°C, com o auxílio de uma seringa e sob agitação constante, 5 mL (10 mmol) de uma solução 2,0 M de LiAlH_4 em THF. A mistura negra foi mantida sob agitação até atingir temperatura ambiente, o que levou cerca de 10 min. Adicionaram-se 1,7 mL (12 mmol) de trietilamina e a suspensão foi refluxada por 30 min. Após este período, uma solução contendo 500 mg (1,88 mmol) de *tert*-butildimetilsilaniloxi)benzotiazol-2-carboxilato de metila e 257 mg (2,26 mmol) de diisopropilcetona em 50 mL de THF seco foi adicionada durante um período de 25 minutos. O refluxo foi mantido por mais 5 horas e a reação foi acompanhada por TLC. Em seguida, deixou-se a mistura atingir temperatura ambiente e adicionaram-se 100 mL de água. A mistura foi então particionada em 100 mL de água e 100 mL de Et_2O e os componentes orgânicos foram extraídos com acetato de etila (3×50 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO_4 e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna flash (SiO_2 , AcOEt-heptano, 1:3) resultando em 237 mg (0,68 mmol) de composto. *Rendimento*: 30 %.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,04-6,61 (m, 4H, $H\text{-Ar}$); 3,46 (s, 3H, OCH_3); 2,58-2,52 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1,15-1,12 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-}i\text{-Pr}$); 1,01 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,21 (s, 6H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$).

[D7]: 3-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-3-metoxi-4-(1,3,3-trimetilbíciclo[2.2.1]espiroheptanil)-1,2-Dioxetano (E/Z)

[d7r1]: 1-(*m*-*tert*-butildimetilsilanoxifenil)-1-metoxi-3-espiro(2,2,6-trimetilbiciclo[2.2.1]heptano)adamantilideno

A um balão de reação de 3 bocas munido de condensador de refluxo, funil de adição e sob atmosfera inerte foram adicionados 20 mL de THF seco a 2,9 g TiCl_3 (19 mmol). Em seguida foram adicionados à 0°C, com o auxílio de uma seringa e sob agitação constante, 5 mL (10 mmol) de uma solução 2,0 M de LiAlH_4 em THF. A mistura negra foi mantida sob agitação até atingir temperatura ambiente, o que levou cerca de 10 min. Adicionaram-se 1,7 mL (12 mmol) de trietilamina e a suspensão foi refluxada por 30 min. Após este período, uma solução contendo 500 mg (1,88 mmol) de *tert*-butildimetilsilaniloxi)benzotiazol-2-carboxilato de metila e 344 mg (2,26 mmol) de (-)fenchona em 50 mL de THF seco foi adicionada durante um período de 25 minutos. O refluxo foi mantido por mais 5 horas e a reação foi acompanhada por TLC. Em seguida, deixou-se a mistura atingir temperatura ambiente e adicionaram-se 100 mL de água. A mistura foi então particionada em 100 mL de água e 100 mL de Et_2O e os componentes orgânicos foram extraídos com acetato de etila (3×50 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO_4 e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna flash (SiO_2 , AcOEt -heptano, 1:3) resultando em 282 mg (0,73 mmol) de composto. *Rendimento*: 39 %.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : 7,12-6,78 (m, 4H, *H*-Ar); 3,47 (s, 3H, OCH_3); 2,06-1,21 (m, 16H, *H*-Fench); 0,99 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,19 (s, 6H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_2$).

[D8]: 3-(6-*tert*-butildimetilsilaniloxibezotiazolil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano

[d8r1]: cloreto de (R)-2-amino-3-(2,5-dihidroxifenilsulfanil)propanoato de metila

A uma solução de cloreto de L-cisteína metil-éster (1,0 g; 5,82 mmol) em água destilada (20 mL), uma solução de 1,4-benzoquinona (0,63 g; 5,82 mmol) em metanol (25 mL) foi adicionada gota-a-gota, sob agitação, por 1 hora. Após este período, a mistura de reação foi concentrada à pressão reduzida, extraída com acetato de etila (2 × 50 mL) e a fase aquosa foi evaporada à secura, resultando em 1,32 g (4,75 mmol) de um sólido higroscópico amarelo-alaranjado. *Rendimento*: 82%

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): δ = 3,20 (dd, 1H, $^3J=4,9$ Hz, $^2J=15,5$ Hz, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{S}$), 3,29 (s, 3H, OCH_3), 3,54 (dd, 1H, $^3J=4,9$ Hz, $^2J=15,5$ Hz, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{S}$), 4,22 (t, 1H, $^3J=4,8$ Hz, CH), 6,66 (dd, 1H, $^4J=2,9$ Hz, $^3J=8,8$ Hz, ArH-5), 6,71 (d, 1H, $^3J=8,8$ Hz, ArH-6), 6,82 (d, 1H, $^4J=2,9$ Hz, ArH-3).

[d8r2]: 2-metoxi-7-hidroxi-2H-benzo[1,4]tiazino-3-carboxilato de metila

A uma solução de cloreto de (R)-2-amino-3-(2,5-dihidroxifenilsulfanil)propanoato de metila (2,66 g, 9,52 mmol) em metanol (20 mL), foi adicionada uma mistura de $K_3Fe(CN)_6$ (1,0 M em água, 36 mL, 36 mmol) e NaOH (4,0 M em água, 2,4 mL, 9,6 mmol) e a suspensão marrom resultante foi agitada por 1 hora. Após este período, foi adicionada água (250 mL) e a fração aquosa foi extraída com acetato de etila (5 × 30 mL). A fase orgânica foi seca sob $MgSO_4$ e subsequentemente compostos voláteis foram removidos sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna flash (SiO_2 , AcOEt-Heptano, 1:1), resultando em uma mistura inseparável de 2-metoxi-7-hidroxi-2H-benzo[1,4]tiazino-3-carboxilato de metila e 6-hidroxibenzotiazol-2-carboxilato de metila. R_f (SiO_2 , AcOEt-Heptano, 1:1)=0,46.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ = 3,10 (s, 3H, $CHOCH_3$), 3,99 (s, 3H, $CO(O)CH_3$), 5,66 (s, 1H, CH), 6,81 (dd, 1H, $^3J=2,7$ Hz, $^4J=8,8$ Hz, ArH-6), 6,85 (d, 1H, $^3J=2,7$ Hz, ArH-5), 7,63 (d, 1H, $^4J=8,8$ Hz, ArH-8), 10,29 (brs, 1H, OH)

[d8r3]: 6-hidroxibenzotiazolil-2-carboxilato de metila

A uma solução contendo 2-metoxi-7-hidroxi-2H-benzo[1,4]tiazino-3-carboxilato de metila e 6-hidroxibenzotiazol-2-carboxilato de metila (830 mg, 0,45 mmol) em metanol (8 mL), foi adicionada uma solução de HCl (1,0 M, 8 mL). Após agitação por 24 horas, foi adicionada água destilada e a mistura foi extraída do CH_2Cl_2 (2 × 25 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob $MgSO_4$ e os demais compostos voláteis foram retirados sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna (SiO_2 , AcOEt-Heptano, 1:1), que resultou em 320 mg (0,24 mmol, 54 %) de um sólido amarelo. R_f (SiO_2 , AcOEt-Heptano, 1:1)=0,46.

Decomp. > 207 °C

1H -NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 3,94 (s, 3H, $CO(O)CH_3$), 7,10 (dd, 1H, $^4J=2,4$ Hz, $^3J=8,9$ Hz, ArH-5), 7,47 (d, 1H, $^4J=2,7$ Hz, ArH-7), 8,00 (d, 1H, $^3J=8,9$ Hz, ArH-4), 10,30 (brs, 1H, OH)

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 53,2 (CH_3), 106,6 (C-7), 117,8 (C-5), 125,8 (C-4), 138,1 (C-8), 146,3 (C-9), 153,6 (C-2), 157,8 (C-6), 160,6 (C=O).

MS (ESI): m/z calculado para $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{S}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 210,0, encontrado: 210,1.

[d8r4]: *tert*-butildimetilsilaniloxi)benzotiazolil-2-carboxilato de metila (R1).

r4D1v1: Método convencional

A uma solução de 6-hidroxibenzotiazol-2-carboxilato de metila (2,3 g, 11 mmol) e cloreto de *tert*-butildimetilsilano (0,7 g, 11 mmol) em THF anidro, adicionaram-se lentamente uma solução de imidazol (0,98 g, 14 mmol) em THF. A solução resultante foi agitada durante a noite. A análise por TLC (SiO_2 , AcOEt -heptano, 1:2) indicou a formação de duas substâncias diferentes. Adicionou-se água à mistura de reação, seguido da etapa de extração com Et_2O (3×25 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO_4 e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna flash (SiO_2 , AcOEt -heptano, 1:2) resultando em 990 mg (3,06 mmol, 28 %).

r4D1v2: Método assistido por microondas

Em um frasco adequado para cavidade de microondas são adicionados 6-hidroxibenzotiazol-2-carboxilato de metila (2,30 g, 11 mmol) e cloreto de *tert*-butildimetilsilano (0,7 g, 11 mmol, 1,2 eq.) e imidazol (0,98 g, 14 mmol, 2 eq.). O recipiente foi colocado na cavidade interna de um equipamento de Microondas. A mistura foi aquecida por 2 minutos a uma potência de 90 W. Uma vez que o ciclo de aquecimento foi concluído, observa-se a formação de duas fases líquidas. Após um período de resfriamento, uma nova etapa de aquecimento dielétrico foi iniciada (2 min, 180 W). A mistura de reação foi adicionada a 100 mL de água e os compostos orgânicos foram extraídos com Et_2O (3×25 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO_4 e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna flash (SiO_2 , AcOEt -heptano, 1:2) resultando em 605 mg (1,87 mmol, 17 %). Todas os procedimentos envolvendo microondas foram realizados em sistema aberto.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 0,12 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0,90 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$); 3,95 (s, 3H, $\text{CO}(\text{O})\text{CH}_3$), 7,09 (dd, 1H, $^4J=2,7$ Hz, $^3J=8,8$ Hz, ArH-5), 7,45 (d, 1H, $^4J=2,7$ Hz, ArH-7), 8,04 (d, 1H, $^3J=8,8$ Hz, ArH-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = -6,8 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 20,7 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 53,4 (CH_3), 106,7 (C-7), 117,8 (C-5), 125,9 (C-4), 138,1 (C-8), 146,3 (C-9), 153,9 (C-2), 157,6 (C-6), 160,5 ($\text{C}=\text{O}$).

[d8r5]: 2-(adamantan-2-ilidenometoximetil)-6-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)benzotiazol

A um balão de reação de 3 bocas munido de condensador de refluxo, funil de adição e sob atmosfera inerte foram adicionados 40 mL de THF seco a TiCl_3 (1,5 g, 10 mmol). Em seguida foram adicionados à 0°C , com o auxílio de uma seringa e sob agitação constante, 2,5 mL (0,19 g, 5 mmol) de uma solução 2,0 M de LiAlH_4 em THF. A mistura negra foi mantida sob agitação até atingir temperatura ambiente, o que levou cerca de 10 min. Adicionaram-se 0,7 mL (5 mmol) de trietilamina e a suspensão foi refluxada por 30 min. Após este período, uma solução contendo *tert*-butildimetilsilaniloxi)benzotiazol-2-carboxilato de metila (605 mg, 1,93 mmol) e 2-adamantanona (300 mg, 2 mmol) em 20 mL de THF seco foi adicionada durante um período de 15 minutos. O refluxo foi mantido por mais 5 horas e a reação foi acompanhada por TLC. Em seguida, deixou-se a mistura atingir temperatura ambiente e adicionaram-se 100 mL de água. Os componentes orgânicos foram extraídos com acetato de etila (3×50 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas sob MgSO_4 e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna flash (SiO_2 , AcOEt -heptano, 1:2) resultando em 230 mg (0,54 mmol, 27 %). R_f (SiO_2 , EtOAc -heptano, 1:2)=0,52.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 0,10 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0,96 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$); 1,27-1,54 (m, 10H, Ad-H); 2,24 (m, 2H, Ad-H); 3,58 (s, 3H, OCH_3), 7,03 (dd, 1H, $^4J=2,7$ Hz, $^3J=8,8$ Hz, ArH-5), 7,59 (d, 1H, $^4J=2,7$ Hz, ArH-7), 8,04 (d, 1H, $^3J=8,8$ Hz, ArH-4).

^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = -6,9 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 21,3 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 31,1 (Ad), 32,9 (Ad), 36,4 (Ad), 39,5 (Ad) 53,1 (OCH_3), 111,2 (C-7), 117,8 (C-5), 125,9 (C-4), 139,8 (CAr-S), 147,2 (CAr-N), 149,3 (S-C=N), 153,9 (C-OTBDMS), 159,1 (C-COCH₃)

[d8r6]: 3-(6-*tert*-butildimetilsilaniloxibenzotiazolil)-3-metoxi-4-espiroadamantil-1,2-dioxetano

Uma solução de 2-(adamantan-2-ilidenometoximetil)-6-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)benzotiazol (100 mg, 0,2 mmol) em 15 mL de CD_2Cl_2 é adicionada a um frasco tipo Schlenk modificado. Quantidades catalíticas de tetrafenilporfirim foram adicionadas. Oxigênio começou a ser borbulhado lentamente pela solução e em seguida colocou-se o frasco imerso em um frasco Dewar contendo etanol a -20°C . A amostra foi irradiada por uma lâmpada de sódio de alta pressão de 1000 W enquanto um fluxo contínuo de oxigênio era borbulhado. O progresso da reação foi monitorado por TLC. Não houve formação de compostos peroxidicos, como indicado pela revelação das placas de TLC por uma solução ácida de KI.

[D9]: 3,3-diisopropil-6-(*tert*-butildimetilsilaniloxi)dimetil-luciferina-1,2-dioxetano

[d9r1]: 6-hidroxi-dimetiloxiluciferina

Sob atmosfera de argônio, 2-ciano-6-hidroxibenzotiazol (50 mg, 0,28 mmol) foi dissolvido em uma mistura de 5,5 mL de metanol e 5,5 mL de água. A mistura de reação foi agitada enquanto 75 μ L (80 mg, 0,67 mmol) de 2-mercapto-2-propionato de metila foram adicionados lentamente. Em seguida foram adicionadas 3-4 gotas de uma solução 1 M de NaOH, até que o pH da mistura de reação fosse 8-9 e fosse observada a viragem da solução de amarelo para laranja e ocorresse a formação de um precipitado. Após 45 minutos à temperatura ambiente, o precipitado foi filtrado e lavado com duas porções de 5 mL de HCl 1% em água. Após secagem sob vácuo, foram obtidos 75 mg (0,28 mmol, 100%) de um sólido cristalino amarelo alaranjado.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 1,53 (s, 3H, CH_3); 1,56 (s, 3H, CH_3); 7,02 (dd, $J^5=2,3$ Hz, $J^3=7,1$ Hz, 1H, HAr); 7,40 (d, $J^5=2,3$ Hz, 1H, HAr); 7,91 (d, $J^3=7,1$ Hz, 1H, HAr).

2.4 Referências Bibliográficas

1. Blitz, H. (1897). "*Justus Liebig's Ann. Chem.* **296**: 238.
2. Adam, W., Cilento, G. (1982). Chemical and Biological Generation of Excited States. Academic Press, New York.
3. White, E. H., Harding, M. J. C. (1964). "The chemiluminescence of lophine and Its derivatives". *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 5686.
4. McCapra, F., Richardson, D. G. (1964). "The mechanism of chemiluminescence: A new chemiluminescent reaction". *Tetrahedron Lett.* **5**: 3167.
5. McCapra, F., Chang, Y. C. (1966). "Chemiluminescence of indolyl peroxide". *Chem. Commun.*: 522.
6. Rauhut, M. M. (1969). "Chemiluminescence from concerted peroxide decomposition reactions". *Acc. Chem. Res.* **2**: 80.
7. Winberg, H. E., Downing, J. R., Coffman, D. D. (1965). "Chemiluminescence of tetrakis-dimethylamino-ethylene". *J. Am. Chem. Soc.* **87**: 2054.
8. Thomas, A. H., Seliger, H. H., White, E. H., Cass, M. W. (1967). "Chemiluminescence of firefly luciferin. Model for the bioluminescent reaction and identification of the product excited state". *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 7148.
9. McCapra, F., Chang, Y. C., Francois, V. P. (1968). "Chemiluminescence of a firefly luciferin analogue". *Chem. Commun.*: 22.
10. Kopecky, K. R., Mumford, C. (1969). "Luminescence in thermal decomposition of 3,3,4-trimethyl-1,2-dioxetane". *Can. J. Chem.* **47**: 709.
11. Bartlett, P. D., Schaap, A. P. (1970). "Stereospecific formation of 1,2-dioxetanes from cis- diethoxyethylenes and trans-diethoxyethylenes by singlet oxygen". *J. Am. Chem. Soc.* **92**: 3223.
12. Mazur, S., Foote, C. S. (1970). "Chemistry of singlet oxygen .9. A stable dioxetane from photooxygenation of tetramethoxyethylene". *J. Am. Chem. Soc.* **92**: 3225.
13. Kopecky, K. R., Lockwood, P. A., Filby, J. E., Reid, R. W. (1973). "4-Methyl-3,3-pentamethylene-1,2-dioxetane - Lack of its formation in ozonation of ethylenecyclohexane in pinacolone". *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **51**: 468.
14. Kopecky, K. R., Lopezastre, J. A. (1980). "Thermolysis and photolysis of 3,3,4,4-dibutano-1,2-dioxetane". *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **58**: 2089.
15. Kopecky, K. R., Filby, J. E., Mumford, C., Lockwood, P. A., Ding, J. Y. (1975). "Preparation and thermolysis of some 1,2-dioxetanes". *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **53**: 1103.

16. Wilson, T., Landis, M. E., Baumstar, A. I., Bartlett, P. D. (1973). "Solvent-effects on chemiluminescent decomposition of tetramethyl-1,2-dioxetane - Competitive dark pathways". *J. Am. Chem. Soc.* **95**: 4765.
17. Lechtken, P., Yekta, A., Turro, N. J. (1973). "Tetramethyl-1,2-dioxetane - Mechanism for an autocatalytic decomposition - Evidence for a quantum chain reaction". *J. Am. Chem. Soc.* **95**: 3027.
18. Kopecky, K. R. (1982). Synthesis of 1,2-dioxetanes. *Em "Chemical and Biological Generation of Excited States"* (Adam, W., Cilento, G., eds.), p. 85. Academic Press, New York.
19. Schaap, A. P., Faler, G. R. (1973). "Convenient synthesis of adamantylideneadamantane". *J. Org. Chem.* **38**: 3061.
20. Schaap, A. P., Thayer, A. L., Faler, R., Zaklika, K., Blossey, E. C., Neckers, D. C. (1976). "Photo-oxygenations with heterogeneous sensitizers". *J. Photochem.* **5**: 191.
21. Schaap, A. P., Thayer, A. L., Zaklika, K. A., Valenti, P. C. (1979). "Photo-oxygenations in aqueous solution with a hydrophilic polymer-immobilized photosensitizer". *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 4016.
22. Richards, W. H., Hodge, V. F. (1971). "Neighboring peroxide anion and 1,2-dioxetane intermediate - Kinetic and product study of basic decomposition of chloro-*tert*-butyl-hydroperoxide". *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 3996.
23. Jefford, C. W., Kohmoto, S. (1982). "The effect of solvent on competing hydroperoxide and dioxetane formation on photosensitized oxygenation of olefins". *Helv. Chim. Acta* **65**: 133.
24. Chan, Y. Y., Zhu, C., Leung, H. K. (1985). "Sensitized photooxygenation .1. Reaction of singlet oxygen with 3,4-dihydro-6-methyl-2-pyran-5-carboxylic acid ethyl-ester - Isolation of hydroperoxides and evidence of the transformation of one of them to dioxetane". *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 5274.
25. Adam, W., Duran, N., Simpson, G. A. (1975). "Singlet acetone efficiency and importance of triplet acetone induced decomposition of tetramethyl-1,2-dioxetane from direct chemiluminescence". *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 5464.
26. Schaap, A. P., Gagnon, S. D. (1982). "Chemiluminescence from a phenoxide-substituted 1,2-dioxetane - A model for firefly bioluminescence". *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 3504.
27. Schaap, A. P., Handley, R. S., Giri, B. P. (1987). "Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes .1. Aryl esterase-catalyzed chemiluminescence from a naphthyl acetate-substituted dioxetane". *Tetrahedron Lett.* **28**: 935.
28. Schaap, A. P., Chen, T. S., Handley, R. S., Desilva, R., Giri, B. P. (1987). "Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes .2. fluoride-induced chemiluminescence from *tert*- butyldimethylsilyloxy-substituted dioxetanes". *Tetrahedron Lett.* **28**: 1155.

29. Schaap, A. P., Sandison, M. D., Handley, R. S. (1987). "Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes .3. Alkaline phosphatase-catalyzed chemiluminescence from an aryl phosphate-substituted dioxetane". *Tetrahedron Lett.* **28**: 1159.
30. Schaap, A. P. (1988). "Chemical and enzymatic triggering of chemiluminescent 1,2- dioxetanes". *J. Biolumin. Chemilumin.* **2**: 252.
31. Schaap, A. P. (1988). "Chemiluminescent substrates for alkaline-phosphatase and beta-galactosidase - Application to ultrasensitive enzyme-linked immunoassays and DNA probes". *J. Biolumin. Chemilumin.* **2**: 253.
32. Schaap, A. P., Akhavan, H., Romano, L. J. (1989). "Chemiluminescent substrates for alkaline-phosphatase - Application to ultrasensitive enzyme-linked immunoassays and DNA probes". *Clin. Chem.* **35**: 1863.
33. Adam, W., Reinhardt, D., SahaMoller, C. R. (1996). "From the firefly bioluminescence to the dioxetane-based (AMPPD) chemiluminescence immunoassay: A retroanalysis". *Analyst* **121**: 1527.
34. Bronstein, I., Edwards, B., Voyta, J. C. (1989). "1,2-Dioxetanes - Novel chemiluminescent enzyme substrates - Applications to immunoassays". *J. Biolumin. Chemilumin.* **4**: 99.
35. Bronstein, I., Kricka, L. J. (1989). "Clinical applications of luminescent assays for enzymes and enzyme labels". *J. Clin. Lab. Anal.* **3**: 316.
36. Bronstein, I., McGrath, P. (1989). "Chemiluminescence lights up". *Nature* **338**: 599.
37. Olesen, C. E. M., Martin, C. S., Voyta, J. C., Edwards, B., Bronstein, I. (1999). "Dioxetane substrates for alkaline phosphatase labels". *J. Clin. Ligand Assay* **22**: 129.
38. Dodeigne, C., Thunus, L., Lejeune, R. (2000). "Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review". *Talanta* **51**: 415.
39. Kricka, L. J., Voyta, J. C., Bronstein, I. (2000). "Chemiluminescent methods for detecting and quantitating enzyme activity". *Methods Enzymol.* **305**: 370.
40. Olesen, C. E. M., Yan, Y. X., Liu, B., Martin, D., D'Eon, B., Judware, R., Martin, C., Voyta, J. C., Bronstein, I. (2000). "Novel methods for chemiluminescent detection of reporter enzymes". *Methods Enzymol.* **326**: 175.
41. Garcia-Campana, A. M., Baeyens, W. R. G., Cuadros-Rodriguez, L., Barrero, F. A., Bosque-Sendra, J. M., Gamiz-Gracia, L. (2002). "Potential of chemiluminescence and bioluminescence in organic analysis". *Curr. Org. Chem.* **6**: 1.
42. Nery, A. L. P. (1997). Estudo da Termólise de Dioxetanos Catalisada por Transferência Intramolecular de Elétron. Em "Tese de Doutorado", Universidade de São Paulo, São Paulo.

43. Röpke, S. (2000). Síntese e Estudo de 1,2-Dioxetanos Contendo Substituintes *p*-Sililóxfenila: O Efeito do Padrão de Substituição Sobre as Características Quimiluminescentes. Em "Dissertação de Mestrado", Universidade de São Paulo, São Paulo.
44. Wittig, G., Boll, W., Kruck, K. H. (1962). "Über phosphin-alkylene als olefinbildende reagenzien .6. Zur synthese von alkyl- und aryl-vinylathern auf der phosphylen-basis". *Chem. Ber. -Recl.* **95**: 2514.
45. Patil, V. J., Mavers, U. (1996). "Wittig reactions in the presence of silica gel". *Tetrahedron Lett.* **37**: 1281.
46. Borch, R. F. (1972). "A new procedure for the Darzens synthesis of glycidic esters". *Tetrahedron Lett.* **36**: 3761.
47. Johnson, C. R., Bade, T. R. (1982). "Dianions derived from alfa-halo acids. The Darzens condensation revisited". *J. Org. Chem.* **47**: 1205.
48. Palomo, C., Oiarbide, M., Sharma, A., Gonzáles-Rego, M. C., Linden, A., Garcia, J. M., Gonzáles, A. (2000). "Camphor-based α -bromo ketones for the assymetric Darzens reaction". *J. Org. Chem.* **65**: 9007.
49. Guiso, M., Bianco, A., Marra, C., Cavarischia, C. (2003). "One-pot synthesis of 6-hydroxyisochromans: The example of demethyl-oxa-coclaurine". *Eur. J. Org. Chem.* **17**: 3407.
50. Schaap, A. P., Handley, R. S., Giri, B. P. (1987). "Chemical and Enzymatic Triggering of 1,2-Dioxet Anes .1. Aryl Esterase-Catalyzed Chemiluminescence from a Naphthyl Acetate- Substituted Dioxetane". *Tetrahedron Letters* **28**: 935.
51. Schaap, A. P. (1988). "Chemical and Enzymatic Triggering of Chemiluminescent 1,2- Dioxetanes". *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **2**: 252.
52. Sabelle, S., Renard, P. Y., Pecorella, K., de Suzzoni-Dezard, S., Creminon, C., Grassi, J., Mioskowski, C. (2002). "Design and synthesis of chemiluminescent probes for the detection of cholinesterase activity". *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 4874.
53. Roeschlaub, C. A., Sammes, P. G. (2000). "Use of the Wadsworth-Emmons reaction for preparing hindered vinyl ethers and related 1,2-dioxetanes". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 2243.
54. Sabelle, S. P., Hydrio, J., Leclerc, E., Mioskowski, C., Renard, P. Y. (2002). "McMurry intermolecular cross-coupling between an ester and a ketone: scope and limitations". *Tetrahedron Lett.* **43**: 3645.
55. Gopinath, R., Patel, B. K. (2000). "A catalytic oxidative esterification of aldehydes using V_2O_5 - H_2O_2 ". *Org. Lett.* **2**: 577.
56. Schaap, A. P., Faler, G. R. (1973). "Mechanism of 1,2 cycloaddition of singlet oxygen to alkenes - Trapping a perepoxide intermediate". *J. Am. Chem. Soc.* **95**: 3381.

-
57. Lowik, D., Tisi, L. C., Murray, J. A. H., Lowe, C. R. (2001). "Synthesis of 6-hydroxybenzothiazole-2-carboxylic acid". *Synthesis* **12**: 1780.
58. Nery, A. L. P., Röpke, S., Catalani, L. H., Baader, W. J. (1999). "Fluoride-triggered decomposition of *m*-silyloxyphenyl- substituted dioxetanes by an intramolecular electron transfer (CIEEL) mechanism". *Tetrahedron Lett.* **40**: 2443.
59. Bastos, E. L., Ciscato, L. F. M. L., Baader, W. J. (2004). "Microwave-assisted protection of phenols as *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) ethers under solvent-free conditions". *Synth. Commun.*: no prelo.
60. Koo, J. Y., Schmidt, S. P., Schuster, G. B. (1978). "Bioluminescence of firefly - Key steps in formation of electronically excited state for model systems". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 30.
61. Branchini, B. R. (2000). "Chemical synthesis of firefly luciferin analogs and inhibitors". *Methods Enzymol.* **305**: 188.
62. Barton, D. H., Guziec, F. S., Shahak, I. (1974). "Olefin synthesis by 2-fold extrusion processes .2. Synthesis of some very hindered olefins". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1**: 1794.
63. Adam, W., Bronstein, I., Trofimov, A. V., Vasil'ev, R. F. (1999). "Solvent-cage effect (viscosity dependence) as a diagnostic probe for the mechanism of the intramolecular chemically initiated electron-exchange luminescence (CIEEL) triggered from a spiroadamantyl-substituted dioxetane". *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 958.
64. Nery, A. L. P., Weiss, D., Catalani, L. H., Baader, W. J. (2000). "Studies on the intramolecular electron transfer catalyzed thermolysis of 1,2-dioxetanes". *Tetrahedron* **56**: 5317.
65. Adam, W., Bronstein, I., Vasil'ev, R. F., Trofimov, A. V. (2000). "Back electron transfer in electron-exchange chemiluminescence of oxyaryl-substituted spiroadamantyl dioxetane, an analog of firefly bioluminescence". *Russ. Chem. Bull.* **49**: 659.
66. Adam, W., Matsumoto, M., Trofimov, A. V. (2000). "Viscosity dependence of the chemically induced electron- exchange chemiluminescence triggered from a bicyclic dioxetane". *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 8631.
67. Cermola, F., Iesce, M. R. (2002). "Substituent and solvent effects on the photosensitized oxygenation of 5,6-dihydro-1,4-oxathiins. Intramolecular oxygen transfer vs normal cleavage of the dioxetane intermediates". *J. Org. Chem.* **67**: 4937.
68. Armarego, W. L. F., Perrin, D. D. (1998). Purification of Laboratory Chemicals. Butterworth-Heinemann, Oxford.
69. Watson, S. C., Eastham, J. F. (1967). "Colored indicators for simple direct titration of magnesium and lithium reagents". *J. Organomet. Chem.* **9**: 165.
-

70. Cotton, M. L., Dunford, H. B. (1973). "Studies on horseradish peroxidase. XI. On the nature of compounds I and II as determined from the kinetics of the oxidation of ferrocyanide". *Can. J. Chem.* **51**: 582.

Estudo sobre o efeito da viscosidade sobre os rendimentos quânticos de formação de estados eletronicamente excitados na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos

A quimiexcitação é a etapa chave para a ocorrência de reações de quimiluminescência. Entretanto, existe grande controvérsia a respeito dos mecanismos de conversão de energia química a energia de excitação eletrônica.¹ Em analogia à eletroquimiluminescência (ECL), onde a aniquilação um par de íons-radicais formados pela interação de reagentes com eletrodos carregados resulta na formação de um produto no estado eletronicamente excitado, pôde-se postular que uma transferência *intra* ou *intermolecular* de elétron resultaria na formação de íons-radicais o que após aniquilação, e conseqüente retro-transferência de elétron, levaria à formação de produtos excitados.²

Este mecanismo conhecido como mecanismo de luminescência iniciada quimicamente por troca de elétrons (*Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence*, CIEEL) foi inicialmente proposto por Schuster² para o difenonilperóxido (6,7-dioxa-dibenzo[a,c]cicloocteno-5,8-diona), sendo relatado posteriormente para outros peróxidos orgânicos de alta energia (Figura 1).^{3,4} A geração de estados excitados através deste mecanismo pode ocorrer tanto via transferência de elétron intermolecular, quanto intramolecular.

Postulam-se duas transferências de elétron no mecanismo CIEEL. A primeira é endotérmica e representa a etapa limitante da reação. Na medida em que a mudança na energia livre para esta reação diminui na região normal de Marcus, a velocidade da reação aumenta conforme o aumento da força motriz do processo.

O segundo passo do mecanismo CIEEL é a fragmentação do peróxido reduzido. É sabido que reações de transferência de elétron endotérmicas são “instantaneamente” reversíveis.^{5,6} Desta forma, pode-se esperar que reações de transferência de elétrons que

formam o radical cátion doador e o peróxido radical ânion irão automaticamente reverter e não haverá reação global. Entretanto, o passo fundamental para o prosseguimento da reação é a fragmentação rápida do ânion radical. Desta forma, a reação de transferência de elétron torna-se irreversível pelas rápidas reações químicas subsequentes. É importante ressaltar que o alongamento da ligação peroxídica ocorre antes da transferência de elétron do doador, diminuindo a barreira intrínseca de ativação, na forma da energia de reorganização interna (λ_i), possibilitando a transferência de elétron. Depois da quebra da ligação peroxídica – a qual acontece imediatamente após ou concomitantemente à transferência eletrônica – a retro-transferência de elétron não é mais possível, o que torna o processo, como um todo, irreversível.

O próximo passo do mecanismo CIEEL é a fragmentação e conseqüente formação de um novo par de íons radicais. Esta reação, normalmente incluindo a clivagem de uma ligação carbono-carbono, eleva o potencial de redução do ânion radical. De uma forma simplificada, pode-se dizer que o fluxo de energia na reação ocorre de ligações químicas para o potencial de redução da espécie aceptora de elétron. Se o rompimento da ligação ocorre rapidamente, então o radical cátion do doador e o radical ânion do acceptor serão formados ainda na mesma cavidade de solvente.²

A etapa seguinte envolve a aniquilação, proposta inicialmente para o caso da eletroluminescência, que sendo suficientemente exotérmica pode promover o estado excitado de uma das espécies, em todos os casos conhecidos o ativador – o doador inicial de elétron, cujo radical ânion age como acceptor de elétron nesse passo. A emissão de luz do decaimento deste estado excitado completa a proposta do mecanismo de luminescência iniciada por troca de elétron, em sua variante intermolecular.

Figura 1. Seqüência proposta para o mecanismo CIEEL intermolecular, por Schuster, para a formação de estados eletronicamente excitados. Figura modificada para um acceptor peroxídico e um doador – na quimiluminescência induzida chamado de ativador.

Uma extensão da hipótese mecanística CIEEL é uma proposta intramolecular, onde o doador (ativador) seria parte do acceptor peroxídico. A bioluminescência de vaga-lume, um exemplo de CIEEL intramolecular de alto rendimento quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}), tem sido utilizada como modelo para o desenvolvimento de novas sondas para imunoenaios que empregam quimiluminescência.^{7,8} Apesar disso,

estudos a respeito da relação entre a estrutura de dioxetanos e sua eficiência não oferecem um mecanismo geral de quimiexcitação satisfatório.¹ O modelo mais bem sucedido em aplicações clínicas que envolvem o sistema CIEEL consiste em um dioxetano termooestável, substituído com um grupo adamantil, com um íon fenolato protegido.⁹⁻¹¹

Em uma série de artigos recentes, Adam *et al.* procuraram elucidar a etapa de quimiexcitação do mecanismo CIEEL, distinguindo entre uma via direta (retro-transferência intramolecular) e a quimiexcitação via retro-transferência de elétron intermolecular.¹²⁻¹⁵ Um conhecimento detalhado dos processos CIEEL-induzidos deve fornecer os detalhes mecanísticos necessários para o desenvolvimento racional de sistemas CIEEL mais efetivos, para um amplo campo de aplicações biológicas, químicas e médicas.⁸ O Esquema 1 ilustra as alternativas mecanísticas para o processo CIEEL do 3-(2'-spiroadamantano)-4-metoxi-4-(3''-butildimetilsililoxi)fenil-1,2-dioxetano (D5).¹² A sequência CIEEL é iniciada pela transferência de elétron intramolecular (ET) do fenolato, gerado pela desproteção do sililoxifeniléter pela ação de íons fluoreto, ao orbital antiligante σ^* da ligação peroxídica, concomitantemente com a clivagem da ligação O-O. Esta transferência de elétron inicial é postulada como a etapa limitante devido à quantidade de energia requerida para remover um elétron do grupo fenolato e transferi-lo para a ligação peroxídica.^{1,4,8}

Esquema 1

A formação do íon metil *m*-oxibenzoato excitado, o emissor CIEEL, pode ocorrer via retro-transferência de elétron intra (BET_{intra}) ou intermolecular (BET_{inter}), neste caso através de fragmentos radiculares envolvidos em uma cavidade de solvente.

Entretanto, a validade do mecanismo de retro-transferência intermolecular é questionada em termos do processo CIEEL intermolecular, considerando que uma alternativa à BET_{inter} poderia ser um complexo de transferência de carga, no qual o ativador (o emissor de quimiluminescência) é gerado simultaneamente à clivagem do peróxido, como no caso do difenoilperóxido e do endoperóxido antracênico.¹

O aumento da viscosidade utilizando uma mistura de solventes de baixa constante dielétrica favoreceria a cavidade de solvente em torno dos fragmentos íon-radicaís originados do produto de clivagem da ligação peroxídicas, o que aumentaria o rendimento quântico de quimiluminescência da reação. Este evento foi confirmado experimentalmente e a hipótese de formação de exciplexos foi descartada através de um estudo fotoquímico das espécies envolvidas.¹²

Em trabalhos anteriores do grupo foram estudadas as propriedades de quimiluminescência induzida dos 1,2-dioxetanos **D1** e **D2**.^{16,17} O rendimento quântico singlete para a decomposição induzida de **D1** é 1,0, enquanto que para **D2** o valor calculado foi 0,01, fato que pode ser justificado pela proximidade do anel peroxídico ao centro aromático doador em **D1** e ao distanciamento causado por um grupo metilênico em **D2**.¹⁷ Estes valores, bastante altos considerando a estrutura de **D1** e **D2**, permitem inferir que a quimiexcitação ocorra através de uma variação *intramolecular* do mecanismo CIEEL, na qual ocorre a clivagem da ligação peroxídica, seguida da formação de uma espécie neutra e de um fragmento biradicalar carregado negativamente.¹⁷ A proximidade da geometria entre esta espécie carregada e do emissor excitado permitiria sua mudança de superfície potencial resultando na emissão de quimiluminescência. Desta forma, os rendimentos quânticos de emissão *não* seriam sujeitos a variação com a viscosidade, na medida em que não existe dependência difusional no processo.

Este capítulo relata os estudos acerca das propriedades de quimiluminescência de **D1** e **D5** em sistemas de solvente que permitam a obtenção de gradiente de viscosidade, sem alteração significativa de outros parâmetros termodinâmicos, de forma a fornecer dados que permitam inferir acerca de uma via *inter* ou *intramolecular* de quimiexcitação.

3.1 Resultados

Foi investigada a dependência dos rendimentos quânticos singlete (ϕ_s) na decomposição induzida de 4,4-dimetil-3-(*m*-*tert*butildimetilsilanoifenil)-1,2-dioxetano (**D1**) e 3-(*m*-*tert*butildimetilsilanoifenil)-3-metoxi-4-spiroadamantil-1,2-dioxetano (**D5**) por fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) com o efeito de cavidade de solvente. Este tipo de estudo foi proposto inicialmente por Adam e colaboradores que utilizaram, como sistema de solvente com gradiente de viscosidade, diferentes proporções de uma mistura de difenilmetano (DFM) e benzeno. Devido à toxicidade de benzeno, optou-se por substituí-lo por tolueno. Os valores da constante dielétrica e do índice de refração são semelhantes entre tolueno, benzeno e difenilmetano, garantindo que o termo de reorganização de solvente de Marcus (λ_s) permaneça inalterado.^{12,18} A baixa polaridade destas misturas, tanto DFM/benzeno quanto DFM/tolueno, evita efeitos sobre o emparelhamento de íons, e o estudo de efeito de cavidade de solvente é favorecido pela ausência de ligações de hidrogênio.¹²

Fluoreto de tetrabutilamônio é capaz de remover o grupo protetor *tert*-butildimetilsilila da porção fenólica de um dioxetano de forma a induzir sua quimiluminescência. TBAF é um sal comercializado em sua forma anidra, triidratada e solução 1 M em THF. Quando uma solução de TBAF em THF é adicionada a solventes de baixa polaridade, como benzeno, tolueno e difenilmetano, observa-se precipitação, mesmo em quantidades inferiores a 5 µL de solução 1 M em THF. Originalmente, Adam *et al.* efetuaram uma diluição 1:1 da solução de TBAF em THF com DMSO seco para a realização do estudo com o sistema de solvente DFM/benzeno.¹²⁻¹⁴ Supõe-se que a utilização de DMSO visa o aumento da solubilidade do TBAF na mistura de solvente, mesmo considerando que em porcentagens inferiores a 3% v/v ainda se observe a formação de precipitado após sua adição. Entretanto, mesmo em concentrações tão baixas, a presença de DMSO poderia resultar em efeitos indesejáveis sobre a polaridade da mistura de solvente, o que comprometeria a interpretação dos resultados obtidos.

Para verificar as características das misturas de solvente empregadas e o papel de DMSO sobre a polaridade do sistema foram realizados experimentos de medida de parâmetro de polaridade empírica de Reichardt. Inicialmente, o efeito da variação na proporção entre DFM e tolueno sobre a polaridade do meio foi investigado (Figura 2).¹⁹ Para isso, empregou-se a betaina $E_T(30)$, cujo

solvatocromismo – mudança na posição (e algumas vezes intensidade) de uma banda de absorção UV-Vis acompanhada pela mudança na polaridade do meio – compreende todo o espectro visível.²⁰ Este deslocamento da banda de absorção π - π^* , induzido pela polaridade do solvente, é característico do caráter de transferência de carga e resulta em um parâmetro empírico da polaridade do solvente que é dado pela fórmula:

$$E_T(30)/(kcal.mol^{-1}) = \frac{28590}{\lambda_{max}} \quad \text{Eq. 1}$$

Adicionaram-se quantidades de até 43% de tolueno em uma solução da betaina $E_T(30)$ em DFM. Esta adição não resultou em alteração na banda de transferência de carga (830 nm, $E_T(30)=34,44 kcal.mol^{-1}$), indicando que a polaridade permanece constante em misturas entre estes dois solventes. Entretanto, ao se adicionarem 2% v/v de DMSO à mistura ocorre um deslocamento hipsocrômico de 53 nm resultando em uma banda na região de 777 nm ($E_T(30)=36,79 kcal.mol^{-1}$). Para efeito de comparação, o valor de $E_T(30)$ para o THF puro é $37,40 kcal.mol^{-1}$.¹⁹⁻²³

Figura 2. Espectro de absorção da betaina $E_T(30)$ para a mistura difenilmetano/tolueno na ausência e presença de DMSO.

Devido aos efeitos de DMSO sobre a polaridade do sistema, foi realizada uma tentativa de obter condições experimentais que evitassem o uso deste solvente. Após exaustivas séries de experimentos, foi possível – sem a utilização de DMSO – desenvolver um protocolo minucioso que permitiu a obtenção de resultados reprodutíveis, mesmo tendo-se uma mistura heterogênea com a presença de microgotas em uma fase amarelada, no fundo da cela de fluorescência, ao final de cada experimento. A uma mistura heterogênea recém-sonicada de TBAF em difenilmetano/tolueno adicionam-se, com o auxílio de uma pipeta automática, 30 μ L de uma solução de **D1** em tolueno. Este protocolo permitiu a obtenção de resultados razoavelmente reprodutíveis, porém cinéticas realizadas em misturas heterogêneas tendem a ser pouco confiáveis, e qualquer variação

mínima no procedimento resulta em uma total discrepância nos resultados obtidos (Figura 3).

Figura 3. Cinética de decaimento da quimiluminescência induzida de D1 em uma mistura DFM/tolueno (de cima para baixo). [D1]: 11,7 μ M; [TBAF]: 4,94 mM

A integral da curva de emissão, em uma dada viscosidade, fornece um valor de área de emissão proporcional ao número de fótons emitido do sistema. A partir deste valor e de sua comparação com um padrão secundário de luz, neste caso o sistema luminol, é possível calcular o ϕ_{CL} , que pode ser convertido ao rendimento de quimiexcitação (ϕ_S) considerando-se o ϕ_{FL} do emissor, cujo valor médio ($0,029 \pm 0,010$) é constante na mistura DFM/tolueno. A Tabela 1 apresenta o cálculo da média dos rendimentos quânticos de quimiluminescência e de quimiexcitação para a decomposição induzida de D1 por TBAF em meio com gradiente de concentração entre DFM/tolueno.

Tabela 1. Áreas e ϕ_{CL} médios para a decomposição de D1, em sistema de solvente DFM/tolueno emulsionado, induzida por uma solução 1 M de TBAF em THF.

χ_{DFM}	η (cP)	Área /10 ⁹ (ua)	$\sigma_{95\%}$ /10 ⁹	ϕ_{CL} (E mol ⁻¹)	$\sigma_{95\%}$	ϕ_S (E mol ⁻¹)	$\sigma_{95\%}$	k_{obs} (s ⁻¹)
0,0	0,51	0,939	0,04	0,0060	0,0003	0,203	0,004	0,0068
0,1	0,70	0,967	0,02	0,0061	0,0001	0,207	0,002	0,0056
0,2	0,82	1,047	0,20	0,0067	0,0010	0,227	0,010	0,0053
0,4	1,05	0,971	0,03	0,0062	0,0002	0,210	0,003	0,0049
0,6	1,42	1,112	0,02	0,0071	0,0001	0,241	0,002	0,0044
0,8	2,17	1,132	0,07	0,0072	0,0004	0,244	0,005	0,0041
0,9	2,57	1,165	0,20	0,0074	0,0010	0,251	0,010	0,0040
1,0	2,67	1,232	0,07	0,0078	0,0004	0,264	0,005	0,0039

[D1]: 11,7 μ M; [TBAF]: 4,94 mM. O fator médio de conversão de área para ϕ_{CL} foi calculado em $6,38 \cdot 10^{-12}$ E ua⁻¹ a partir do padrão luminol para um espectrofluorímetro SPEX Fluorlog 1681 (tensão na fotomultiplicadora 950 V, monocromador em posição espelho a 90°, fendas do monocromador com abertura de 8 mm, com suporte de celas termostatizável e com agitação magnética mantido a $25 \pm 0,5$ °C). Os desvios padrão foram calculados a partir de um conjunto de 21 experimentos com intervalo de confiança de 95% (N=21). ϕ_S calculados a partir da equação $\phi_{FL}/\phi_{CL} = \phi_S (\pm \phi_S \times (s^2 \phi_{CL}/\phi_{CL} + s^2 \phi_{FL}/\phi_{FL}))^{1/2}$ utilizando ϕ_{FL} médio para E1 $0,029 \pm 0,010$. χ_{DFM} é a fração molar de difenilmetano na mistura DFM/tolueno e η é o valor experimental da viscosidade da mistura.

Observou-se que, nestas condições, o aumento da viscosidade acarreta em um aumento de somente cerca de 1,3 vezes do ϕ_s (Figura 4). Este valor é consideravelmente inferior ao reportado por Adam *et al.* para **D5** medido em cerca de 2,5 vezes.

Figura 4. Dependência entre o rendimento quântico singleto de **D1** e a viscosidade do meio. [**D1**]: 11,7 μ M; [TBAF]: 4,94 mM em gradiente de DFM/tolueno.

Entretanto, não foi possível obter resultados reprodutíveis (segundo teste ANOVA) com o dioxetano **D5** utilizando esta metodologia. Optou-se por repetir o procedimento de Adam *et al.* exatamente como descrito no artigo original, ou seja, com a adição de 2% v/v de DMSO à mistura. Apesar de ainda permanecer heterogênea, os resultados empregando este sistema são reprodutíveis ($P < 0,05$) tanto para **D1** quanto para **D5** e indicam uma variação significativa da intensidade máxima de emissão e do valor das constantes cinéticas quando o meio varia de DFM puro para tolueno puro (Figura 5).

Figura 5. Cinética de decaimento da quimiluminescência induzida de **D1** e **D5**, respectivamente em uma mistura difenilmetano:tolueno. [**D1**]: 0,7 μ M; [**D5**]: 90 μ M e [TBAF]: 2,47 mM

As Tabela 2 e Tabela 3 apresentam os resultados obtidos e o cálculo da média dos rendimentos quânticos de quimiluminescência e de quimiexcitação para a decomposição induzida de **D1** e **D5** por TBAF, dissolvido em THF/DMSO 1:1, em meio com gradiente de concentração entre DFM/tolueno.

Tabela 2. Áreas e ϕ_{CL} médios para a decomposição de D1, em sistema de solvente DFM/tolueno, induzida por uma solução 0,5 M de TBAF em THF/DMSO 1:1.

χ_{DFM}	η (cP)	Área /10 ⁵ (ua)	$\sigma_{95\%}/10^5$	ϕ_{CL} (E mol ⁻¹)	$\sigma_{95\%}$	ϕ_S (E mol ⁻¹)	$\sigma_{95\%}$	k_{obs} (s ⁻¹)
0,0	0,51	1,5879	0,3	0,0050	0,0009	0,1693	0,01	0,0022
0,2	0,82	2,0666	0,2	0,0065	0,0005	0,2203	0,01	0,0023
0,4	1,05	2,3209	0,1	0,0073	0,0004	0,2474	0,01	0,0024
0,6	1,42	2,6214	0,3	0,0082	0,0009	0,2795	0,02	0,0026
0,8	2,17	3,2421	0,2	0,0102	0,0005	0,3457	0,02	0,0028
1,0	2,67	3,5371	0,1	0,0112	0,0004	0,3771	0,02	0,0029

[D1]: 0,7 μ M; [TBAF]: 2,47 mM. O fator médio de conversão de área para ϕ_{CL} foi calculado em $3,145 \cdot 10^{-10}$ E ua⁻¹ a partir do padrão luminol para um espectrofluorímetro Varian Eclipse (tensão na fotomultiplicadora 750 V, monocromador em posição espelho a 90°, fendas do monocromador com abertura de 10 nm, com suporte de celas termostaticável e com agitação magnética mantido a $25 \pm 0,5$ °C). Os desvios padrão foram calculados a partir de um conjunto de 9 experimentos com intervalo de confiança de 95% (N=9). ϕ_S calculados a partir da equação $\phi_{FL}/\phi_{CL} = \phi_S (\pm \phi_S \times (s^2 \phi_{CL}/\phi_{CL} + s^2 \phi_{FL}/\phi_{FL}))^{1/2}$ utilizando ϕ_{FL} médio para E1 $0,029 \pm 0,020$ χ_{DFM} é a fração molar de difenilmetano na mistura DFM/tolueno e η é o valor experimental da viscosidade da mistura.

Tabela 3. Áreas e ϕ_{CL} médios para a decomposição de D5, em sistema de solvente DFM/tolueno emulsionado, induzida por uma solução 0,5 M de TBAF em THF/DMSO 1:1.

χ_{DFM}	η (cP)	Área /10 ⁶ (ua)	$\sigma_{95\%}/10^3$	ϕ_{CL} (E mol ⁻¹)	$\sigma_{95\%}$	ϕ_S (E mol ⁻¹)	$\sigma_{95\%}$	k_{obs} (s ⁻¹)
0,0	0,51	0,4222	0,04	0,020	0,002	0,087	0,02	0,00033
0,2	0,82	0,5542	0,05	0,026	0,003	0,114	0,02	0,00047
0,4	1,05	0,6304	0,04	0,030	0,002	0,130	0,03	0,00050
0,6	1,42	0,7723	0,05	0,036	0,002	0,159	0,03	0,00053
0,8	2,17	0,9724	0,06	0,046	0,003	0,200	0,04	0,00059
1,0	2,67	1,0851	0,10	0,051	0,005	0,224	0,05	0,00062

[D5]: 90 μ M; [TBAF]: 2,47 mM. O fator médio de conversão de área para ϕ_{CL} foi calculado em $4,73 \cdot 10^{-8}$ E ua⁻¹ a partir do padrão luminol para um espectrofluorímetro Varian Eclipse (tensão na fotomultiplicadora 750 V, monocromador em posição espelho a 90°, fendas do monocromador com abertura de 10 nm, com suporte de celas termostaticável e com agitação magnética mantido a $25 \pm 0,5$ °C). Os desvios padrão foram calculados a partir de um conjunto de 9 experimentos com intervalo de confiança de 95% (N=9). ϕ_S calculados a partir da equação $\phi_{FL}/\phi_{CL} = \phi_S (\pm \phi_S \times (s^2 \phi_{CL}/\phi_{CL} + s^2 \phi_{FL}/\phi_{FL}))^{1/2}$ utilizando ϕ_{FL} médio para E5 $0,23 \pm 0,10$ χ_{DFM} é a fração molar de difenilmetano na mistura DFM/tolueno e η é o valor experimental da viscosidade da mistura.

Nesta condição, a variação dos rendimentos quânticos de quimiexcitação obtidos quando se varia a mistura de solvente DFM/tolueno de tolueno puro para DFM puro foi de 2,3 vezes para D1 e 2,6 vezes para D5, valores compatíveis com aqueles reportados por Adam *et al.* (Figura 6).

Figura 6. Dependência da média dos rendimentos quânticos de quimiexcitação obtidos pela decomposição induzida por fluoreto de D1 (E) e D5 (D) com a viscosidade do meio DFM/tolueno.

O efeito da adição de DMSO sobre a polaridade do sistema, mesmo em concentrações bastante reduzidas, provocou dúvidas a respeito da adequação da mistura DFM/tolueno ao estudo. Desta forma, foi realizada uma busca na literatura por um sistema alternativo de solventes de maior polaridade, que permitisse a completa incorporação do TBAF. Maroncelli e Gardecki estudaram extensivamente as propriedades da mistura entre carbonato de propileno e acetonitrila e seus resultados sugerem que a energia de reorganização do solvente para a mistura binárias destes solventes é praticamente constante apesar da diferença de 2 cP entre suas viscosidades.²⁴ Carbonato de propileno e acetonitrila são solventes apróticos polares, os quais espera-se que interajam de forma similar com solutos polares, principalmente através de forças dipolares não específicas. Os valores de $E_T(30)$ indicam que as polaridades destes dois compostos são basicamente indistinguíveis e ambos são levemente mais polares que DMSO. Além disso, não ocorre alteração significativa do comprimento de onda da banda de transferência de carga da betaina $E_T(30)$ para misturas entre os dois solventes (Figura 7).

Figura 7: Espectro de absorção da betaina $E_T(30)$ para a mistura carbonato de propileno/acetonitrila em diversas proporções

Utilizando esta mistura de solventes foi estudado o efeito da viscosidade sobre a decomposição induzida dos dioxetanos **D1** e **D5** por TBAF. Não houve nenhum problema relacionado à solubilidade de nenhum dos reagentes nesta mistura, e os resultados se apresentaram reprodutíveis (Figura 8). Especial atenção deve ser dada ao tratamento de carbonato de propileno, que deve ser destilado de sódio metálico sob atmosfera inerte imediatamente antes do experimento.

Figura 8. Cinética de decaimento da quimiluminescência induzida de **D1** e **D5** em uma mistura entre carbonato de propileno e acetonitrila. [**D1**]: 7,5 μM ; [**D5**]: 4,5 μM e [TBAF]: 4,94 mM

As Tabela 4 e Tabela 5 apresentam os resultados obtidos e o cálculo da média dos rendimentos quânticos de quimiluminescência e de quimiexcitação para a decomposição induzida de **D1** e **D5** por TBAF, dissolvido em THF/DMSO 1:1, em meio com gradiente de concentração entre PC/ACN.

Tabela 4. Áreas e ϕ_{CL} médios para a decomposição de **D1**, em sistema de solvente DFM/tolueno, induzida por uma solução 0,5 M de TBAF em THF/DMSO 1:1.

χ_{DFM}	η (cP)	Área / 10^4 (ua)	$\sigma_{95\%} / 10^4$	ϕ_{CL} (E mol^{-1})	$\sigma_{95\%}$	ϕ_S (E mol^{-1})	$\sigma_{95\%}$	k_{obs} (s^{-1})
0,00	0,34	0,9484	0,01	0,0154	0,003	0,4043	0,06	0,063
0,25	0,58	1,2987	0,02	0,0210	0,005	0,5536	0,09	0,045
0,50	0,97	1,5580	0,01	0,0252	0,003	0,6642	0,10	0,037
0,75	1,54	1,8406	0,02	0,0298	0,005	0,7847	0,10	0,030
1,00	2,38	2,2182	0,02	0,0359	0,005	0,9457	0,10	0,029

[**D1**]: 7,5 μM ; [TBAF]: 2,47 mM. O fator médio de conversão de área para ϕ_{CL} foi calculado em $1,623 \cdot 10^{-6} \text{ E ua}^{-1}$ a partir do padrão luminol para um espectrofluorímetro Varian Eclipse (tensão na fotomultiplicadora 750 V, monocromador em posição espelho a 90° , fendas do monocromador com abertura de 10 nm, com suporte de celas termostatizável e com agitação magnética mantido a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Os desvios padrão foram calculados a partir de um conjunto de 9 experimentos com intervalo de confiança de 95% ($N=9$). ϕ_S calculados a partir da equação $\phi_{FL}/\phi_{CL} = \phi_S (\pm \phi_S \times (s^2 \phi_{CL}/\phi_{CL} + s^2 \phi_{FL}/\phi_{FL}))^{1/2}$ utilizando ϕ_{FL} médio para **E1** $0,029 \pm 0,020$. χ_{DFM} é a fração molar de difenilmetano na mistura DFM/tolueno e η é o valor experimental da viscosidade da mistura.

Tabela 5. Áreas e ϕ_{CL} médios para a decomposição de **D5**, em sistema de solvente DFM/tolueno emulsionado, induzida por uma solução 0,5 M de TBAF em THF/DMSO 1:1.

χ_{DFM}	η (cP)	Área /10 ³ (ua)	$\sigma_{95\%}$ /10 ³	ϕ_{CL} (E mol ⁻¹)	$\sigma_{95\%}$	ϕ_S (E mol ⁻¹)	$\sigma_{95\%}$	k_{obs} (s ⁻¹)
0,00	0,34	0,8057	0,07	0,2647	0,02	0,5881	0,07	0,124
0,25	0,58	0,9368	0,08	0,3077	0,03	0,6839	0,08	0,108
0,50	0,97	1,0436	0,10	0,3428	0,04	0,7618	0,09	0,981
0,75	1,54	1,2165	0,06	0,3996	0,02	0,8880	0,10	0,088
1,00	2,38	1,3121	0,10	0,4310	0,03	0,9579	0,10	0,086

[**D5**]: 4,5 μ M; [TBAF]: 2,47 mM. O fator médio de conversão de área para ϕ_{CL} foi calculado em 4,73 10⁻⁸ E ua⁻¹ a partir do padrão luminol para um espectrofluorímetro Varian Eclipse (tensão na fotomultiplicadora 750 V, monocromador em posição espelho a 90°, fendas do monocromador com abertura de 10 nm, com suporte de celas termostatizável e com agitação magnética mantido a 25 $\pm$ 0,5 °C). Os desvios padrão foram calculados a partir de um conjunto de 9 experimentos com intervalo de confiança de 95% (N=9). ϕ_S calculados a partir da equação $\phi_{FL}/\phi_{CL} = \phi_S (\pm \phi_S \times (s^2 \phi_{CL}/\phi_{CL} + s^2 \phi_{FL}/\phi_{FL}))^{1/2}$ utilizando ϕ_{FL} médio para **E5** 0,23 $\pm$ 0,10 χ_{DFM} é a fração molar de difenilmetano na mistura DFM/tolueno e η é o valor experimental da viscosidade da mistura.

Utilizando-se a mistura PC/ACN, foi observada, em analogia ao sistema DFM/tolueno, dependência entre o ϕ_S e a viscosidade do meio. Observou-se uma variação de 2,3 vezes para **D1** e 1,6 vezes para **D5**. Os resultados obtidos para este sistema são apresentados na Figura 9.

Figura 9. Dependência da média dos rendimentos quânticos de quimiexcitação obtidos pela decomposição induzida por fluoreto de **D1** (**E**) e **D5** (**D**) com a viscosidade do meio PC/ACN.

3.2 Discussão

De acordo com o mecanismo CIEEL intramolecular, uma transferência total de um elétron (SET) ocorre do oxianion do fenol para o orbital antiligante σ^* da ligação O–O, como ilustrado no Esquema 1. Segundo a proposta de quimiexcitação *intermolecular*, propõe-se que a clivagem de uma espécie transiente leva à formação de um par de radicais em uma cavidade de solvente. O contato entre estes fragmentos aumenta a probabilidade de uma retro transferência de elétron (BET), que resultaria – no caso da decomposição induzida de 1,2-dioxetanos – na formação de uma espécie eletronicamente excitada singlete. Neste contexto, a difusão das espécies para fora da cavidade de solvente resultaria na diminuição da eficiência de quimiexcitação singlete.

Baseado nesta proposta, pode-se inferir que o processo de BET deva ser influenciado pela viscosidade do meio de solvente. Adam *et al.* estudaram a dependência entre a cavidade de solvente e a eficiência de quimiexcitação para a decomposição induzida do 1,2-dioxetano **D5** por TBAF.¹² Este estudo foi realizado utilizando-se uma mistura de solventes de diferentes viscosidades, porém com constante dielétrica e índice de refração semelhantes. Em teoria, seria possível através deste estudo diferenciar uma aniquilação *intermolecular* entre radicais-íons de uma possível via de quimiexcitação direta, ou via *intramolecular*, para a qual não se esperaria uma dependência entre o rendimento de quimiexcitação e a viscosidade do meio. Observou-se um considerável efeito da viscosidade (aumento de 2,6 vezes do ϕ_s para uma variação de ~2 cP) na decomposição induzida de **D5**, o que levou Adam a sugerir uma via de retro-transferência de elétron *intermolecular* para o mecanismo CIEEL.

Em um trabalho posterior, Adam e colaboradores investigaram o efeito da viscosidade para dioxetanos *p*-oxifenil-substituídos.¹⁵ Verificou-se que, também para este isômero, a eficiência de quimiexcitação é afetada pela viscosidade do meio. A conhecida diferença entre os ϕ_s entre isômeros *meta* e *para* foi justificada em termos de uma possível diferença no valor da constante de velocidade do passo de retro-transferência de elétron. No caso do isômero *meta*, graças a efeitos de conjugação no estado excitado que favorecem a quimiexcitação conhecidos como *efeito meta*, o valor da constante é cerca de 200 vezes maior do que para o valor medido para o isômero *para*, justificando seu rendimento bastante inferior. Burshtein, baseado nos resultados obtidos por Adam, desenvolveu uma teoria para a ocorrência de quimiluminescência decorrente de uma retro-transferência de elétron, que dependeria de fatores difusionais e de conversão de

spin.²⁵ Aplicando-se este modelo, pode-se inferir diferenças entre as energias dos estados excitados dos dois regioisômeros, o que acaba por afetar a velocidade de BET, entretanto a magnitude do efeito não pode ser totalmente explicada.

Em seguida, Adam e colaboradores, dentre estes Masakatsu Matsumoto, investigaram a dependência do ϕ_s com a viscosidade para o 5-*tert*-butil-1-(3-*tert*-butildimetilsilaniloxi)fenil-4,4-dimetil-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptano (**D10**).¹⁴ O aspecto interessante deste dioxetano bicíclico é a impossibilidade dos fragmentos radiculares de difundirem em solução, não sendo sujeitos a efeitos de cavidade de solvente. Surpreendentemente, observou-se um efeito da viscosidade de solvente para este dioxetano apesar de menor (1,4 vezes). Para racionalizar este fenômeno, Adam propôs uma via alternativa de formação direta de produtos no estado fundamental, que dependeria de uma alteração conformacional de **D10**. O Esquema 2 mostra que a conformação inicial do par de radicais-íons formados a partir da clivagem do dioxetano **D10** tem o radical carbonílico na proximidade do grupo éster. Este arranjo geométrico garante uma alta probabilidade de uma retro-transferência de elétron com a formação de um produto eletronicamente excitado. Rotações ao redor da ponte metilênica no dirradical competem com o processo de retro-transferência direta, separando o par de radicais íons e, desta forma, diminuem a probabilidade de aniquilação. Durante esta mudança conformacional o fragmento radical carbonílico se aproxima do grupo fenoxílica, o que gera a possibilidade de uma retro-transferência de elétron que deve resultar preferencialmente em um produto no estado fundamental. Este argumento é baseado em cálculos semiempíricos AM1 que indicaram que no estado fundamental do oxifeniléster a maior densidade eletrônica é concentrada na porção oxifenílica, quanto que no estado excitado π - π^* (S_2) a maior densidade se concentra na carbonila do éster. Como esperado, o equilíbrio conformacional tem o valor de sua constante (k_{ROT}) diminuído em um meio mais viscoso, fato que no caso de **D10** favorece a quimiexcitação. Diminuindo-se a viscosidade espera-se que a mudança conformacional diminua os ϕ_s . Esta suposição foi sustentada pela adequação dos resultados experimentais à um modelo de efeito friccional, que leva em conta o papel das propriedades de excesso do solvente sobre seu efeito sobre mudanças conformacionais, que no caso alteram os rendimentos de quimiexcitação.

Aparentemente, o mecanismo de quimiexcitação *intermolecular* é o mais adequado na racionalização da dependência da viscosidade com a eficiência de quimiexcitação de 1,2-dioxetanos. Entretanto, nenhum indício experimental aponta para uma transferência completa de um elétron para clivagem da ligação peroxídica, de forma que uma transferência de carga (CT) poderia induzir a clivagem. Além disso, já nos

trabalhos iniciais a respeito da quimiexcitação de 1,2-dioxetanos verificou-se que o processo de transferência de elétron deveria ser reversível, em analogia à sugestão feita por Thérèse Wilson.¹

Esquema 2

A proposta *intramolecular* com excitação direta é, portanto, uma alternativa que não pode ser descartada, apesar de nenhuma evidência experimental direta para sua ocorrência ter sido apresentada até o momento. A ocorrência de uma transferência de carga *intramolecular* tem sido sugerida em diversos trabalhos teóricos. Takano e colaboradores²⁶ descrevem o processo como uma transferência endotérmica de carga, induzida pelo estiramento da ligação O-O resultando em um dirradical transiente que teria uma estrutura eletrônica que pode ser descrita como a sobreposição das configurações do estado fundamental e do complexo de transferência de carga, o que levaria à quimiexcitação direta. Além disso, estudos experimentais indicam que a população térmica do estado de transferência de carga excitado de 1,2-dioxetanos bicíclicos com substituintes aromáticos, é sujeita à quebra de anel com a formação de produtos no estado excitado.²⁷

Em uma revisão recente, Matsumoto reúne os pontos principais dos estudos teóricos envolvendo a proposta mecanística CIEEL.²⁸ Além disso, apresenta resultados de sua investigação, em associação com Jiro Tanaka, realizada através de cálculo *ab initio* de orbital molecular, que apontam para a formação, via CT da porção fenólica doadora para o anel peroxidico, de um dirradical transiente, o qual se decompõe diretamente em dois compostos carbonílicos, um no estado fundamental e outro no estado eletronicamente

excitado singlete. Segundo o autor, esta transformação seria possível graças a uma transferência do dirradical da superfície potencial singlete (S_0) para a superfície singlete excitada (S_1) do emissor.

Nestes termos, o mecanismo *intra* e *intermolecular* parece ser o pólo do estudo da quimiexcitação em processos envolvendo o mecanismo CIEEL. No caso da via *intermolecular*, a BET deve ocorrer tão rapidamente de forma que a probabilidade de conversão de spin do par de radicais íons da configuração singlete para a triplete seja pequena, já que este tipo de evento está relacionado a contatos sequenciais de recombinação. Apesar dos resultados obtidos por Adam *et al.* apontarem para a ocorrência de uma via *intermolecular* na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos, algumas evidências experimentais apontam para algumas falhas nesta proposta. O 5-*tert*-butil-1-(3-*tert*-butildimetilsilanilo)fenil-4-metil-2,6,7-trioxatriciclo[3.3.2.0]decano apresenta uma alta eficiência de quimiluminescência induzida por TBAF ($\phi_{\text{CL}}=0,32$; $\phi_{\text{s}}=0,9$, em DMSO).²⁸ Este dioxetano possui dois anéis de cinco membros ligados um ao outro em conformação *trans*, como observado por cristalografia de raios-X.²⁸ Um par de radicais íons, se produzido, no qual o radical carbonílico e o grupo éster estão juntos através de uma configuração *trans* ao anel ciclopentano, deve mudar sua conformação de forma análoga ao dioxetano **D10** (Esquema 2), fato que acarretaria na diminuição do ϕ_{s} , segundo a proposta de quimiexcitação *intermolecular*. Apesar disso, os altos rendimentos quânticos obtidos para este dioxetano não estão de acordo com esta proposta (Esquema 3).

Apesar de todos os dados acima, o estudo da dependência da viscosidade com os ϕ_{s} na decomposição de **D1** induzida por TBAF aponta – inicialmente – em direção à proposta de uma via de quimiexcitação *intermolecular*. Foi observado, tanto no sistema de solvente DFM/tolueno quanto PC/ACN, um aumento sistemático dos rendimentos de quimiexcitação com o aumento da viscosidade do meio. Todavia, a realização deste tipo de estudo tem em sua etapa crítica a escolha dos solventes. Para isso, um sistema ideal seria constituído de uma mistura de solventes cuja única propriedade passível de variação fosse a viscosidade. Entretanto, tal mistura não é conhecida. A teoria de transferência de elétron de Marcus, entretanto, prediz que misturas de solventes com mesma constante dielétrica e mesmo índice de refração não alteram a energia livre de uma reação de transferência de elétron, motivo pelo qual Adam *et al.* utilizaram difenilmetano e benzeno, cujo λ_{s} tem seu valor praticamente constante em 0,004 eV para qualquer proporção dos solventes e cuja variação de viscosidade é de cerca de 2 cP.

Esquema 3

Entretanto, os rendimentos quânticos calculados por nosso grupo para a classe de dioxetanos trissubstituídos evidenciam um mecanismo de retro-transferência de elétron concomitante com a formação de fragmentos radiculares, de forma *intramolecular*.^{16,17} Desta forma, simplificar-se-ia que o aumento da viscosidade do solvente não afetasse o rendimento quântico de quimiluminescência para a reação de decomposição induzida deste tipo de dioxetano. Foram realizados experimentos empregando a decomposição induzida de **D1** por íons fluoreto em um gradiente de viscosidade do sistema de solvente tolueno/difenilmetano – cujas propriedades são semelhantes ao sistema benzeno/difenilmetano. Entretanto, inicialmente o TBAF foi utilizado na ausência de DMSO, já que estudos utilizando a sonda solvatocrômica $E_T(30)$ indicaram que apesar da polaridade do sistema difenilmetano/tolueno permanece constante quando se variam as proporções dos dois reagentes a adição de DMSO ao sistema, mesmo em concentrações muito baixas (abaixo de 2 % v/v) causa uma grande variação do parâmetro empírico de polaridade. Os resultados obtidos com estes experimentos indicam que a área de emissão não varia com a viscosidade do meio (Figura 10). Entretanto, o fato da fonte de íons fluoreto – TBAF – não ser completamente solúvel no meio de solvente apolar suscitou dúvidas a respeito da validade dos valores obtidos.

Figura 10. Dependência na viscosidade com o rendimento quântico singlete (Φ_{st}). À esquerda os resultados obtidos por Adam *et al.* para o sistema de solvente benzeno:difenilmetano com D5. À direita os valores obtidos com o sistema tolueno:difenilmetano para o dioxetano D1.

Neste ponto cabe uma pequena discussão a respeito da realização destes experimentos. Ingenuamente, acreditávamos que o estudo do efeito da viscosidade sobre os Φ_{CL} da decomposição induzida de 1,2-dioxetanos sililoxifenil-substituídos por fluoreto seria a etapa mais rápida e simples do trabalho, e que resultaria na confirmação, *ou não*, de uma etapa de retro-transferência de elétron *intramolecular*. Experimentos cinéticos foram realizados semanalmente durante cerca de três anos, o que resultou em um conjunto de dados de mais de 100 séries de experimentos nas mais diversas condições.

A análise dos dados brutos foi feita através de teste ANOVA. Desta forma, determinou-se que os experimentos em condições de emulsão não eram reprodutíveis na forma como seria desejável a um estudo não tendencioso. Esta baixa reprodutibilidade dos resultados também com o dioxetano D5, o mesmo utilizado originalmente no estudo de Adam *et al.*, foi uma forte evidência para que as condições do experimento fossem reavaliadas. Desta forma, optou-se por adicionar, como descrito no artigo original,¹² DMSO à mistura de solventes no que, se imagina, seja um recurso para solubilizar o TBAF, apesar do possível efeito deste solvente sobre o sistema.

Entretanto, apesar das implicações da variação de polaridade ao se adicionar DMSO, o TBAF permanece não completamente solúvel nestas condições e o sistema permanece heterogêneo. Apesar disso, a reprodutibilidade do experimento sofreu uma grande melhora. Os resultados indicam a variação da área de emissão – e por consequência do rendimento quântico singlete – para ambos os dioxetanos. Os resultados obtidos por Adam *et al.* com D5 foram reproduzidos observando-se uma variação de cerca de três vezes na área de emissão quando se passa de tolueno puro para difenilmetano puro. No caso de D1, a variação foi pouco menor, cerca de 2,5 vezes.

Neste ponto, os resultados experimentais nos levaram a supor que a hipótese de uma retro-transferência de elétron *intermolecular* está sendo comprovada tanto na decomposição de **D5** quanto de **D1**. Entretanto, o uso da mistura DFM/tolueno não nos parecia adequada para o estudo devido à sua baixa polaridade, que tornava impossível a solubilização da fonte de íons fluoreto mesmo na presença de DMSO. Em todas as condições empregadas o meio de reação permanece heterogêneo – até mesmo quando se utilizam pequenos volumes de TBAF em THF. A presença de microgotas com intensidade de emissão mais forte durante o curso da reação, quando não se emulsiona o meio através de agitação mecânica, permite supor que os eventos na escala microscópica são mais complexos do que se imagina, e diversos processos dentre eles uma possível solvatação preferencial do 1,2-dioxetano por THF ou DMSO, podem dificultar a interpretação dos resultados experimentais.

Desta forma, optou-se por utilizar a mistura carbonato de propileno/acetonitrila devido à sua característica polar evitaria a formação de precipitado. Além disso, as propriedades de equilíbrio de solvatação são suficientemente similares nestes dois solventes de forma que não se espera a ocorrência de solvatação preferencial em suas misturas. Apesar do valor de suas constantes dielétricas ser bastante diferentes (36 para ACN contra 65 para PC) a variação em seu índice de refração mantém o parâmetro de reorganização de solvente de Marcus bastante próximo para os solventes puros. Além disso, o parâmetro de polaridade empírica $E_T(30)$ dos solvente é bastante próximo, apesar do tempo de solvatação dos dois solventes diferir em uma ordem de grandeza.

Os experimentos empregando esta mistura se apresentaram sensivelmente mais reprodutíveis do que aqueles utilizando a mistura DFM/tolueno. Além disso, enquanto o efeito médio obtido em DFM/tolueno foi de cerca de 2,5 vezes, em PC/ACN este valor cai para cerca de 1,8. Um efeito similar foi observado quando este tipo de estudo foi realizado pela Dr^a Sandra Maria da Silva, durante seu doutoramento, com o sistema peróxi-oxalato.²⁹ Este sistema, cuja retro-transferência de elétron é sabidamente *intermolecular*, também teve seu efeito diminuído quando foram realizados experimentos na mistura PC/ACN. Desta forma, apesar das discrepâncias entre os dois sistemas, confirmou-se que – através do uso de misturas binárias de solvente para variar a viscosidade (η) de um meio de reação na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos – os resultados poderiam indicar a ocorrência de um processo *intermolecular* que leva à quimiexcitação. Os valores de rendimento quântico singlete de **D1** e **D5** calculados a partir do rendimento quântico de quimiluminescência de sua decomposição induzida por

íons fluoreto e do rendimento quântico de fluorescência das espécies emissoras (**E1** e **E5**) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de rendimento quânticos de fluorescência (ϕ_{FL}) dos emissores **E1** e **E5**, dos rendimentos quânticos de quimiluminescência (ϕ_{CL}) e singlete (ϕ_S) de **D1** e **D5** em tolueno, difenilmetano (DFM), carbonato de propileno (PC) e acetonitrila (ACN).

emissor	ϕ_{FL}^a	dioxetano	solvente	ϕ_S^b	ϕ_{CL}^c
E1	$0,029 \pm 0,009$	D1	tolueno	$0,19 \pm 0,07$	$0,005 \pm 0,001$
	$0,030 \pm 0,012$		DFM	$0,44 \pm 0,32$	$0,013 \pm 0,008$
	$0,041 \pm 0,008$		PC	$0,91 \pm 0,28$	$0,037 \pm 0,009$
	$0,037 \pm 0,011$		ACN	$0,68 \pm 0,30$	$0,025 \pm 0,008$
E5	$0,22 \pm 0,04$	D5	tolueno	$0,09 \pm 0,03$	$0,020 \pm 0,006$
	$0,24 \pm 0,09$		DFM	$0,32 \pm 0,13$	$0,053 \pm 0,008$
	$0,46 \pm 0,08$		PC	$0,94 \pm 0,23$	$0,431 \pm 0,017$
	$0,44 \pm 0,06$		ACN	$0,55 \pm 0,12$	$0,241 \pm 0,021$

^a medidos em função de padrão de fluoresceína;

^b calculados a partir da equação $\phi_{FL}/\phi_{CL} = \phi_S (\pm \phi_S \times (S^2 \phi_{CL}/\phi_{CL} + S^2 \phi_{FL}/\phi_{FL}))^{1/2}$

^c medidos em função do padrão luminol como descrito por Lee e Selinger.

Segundo Burshtein,²⁵ espera-se uma relação linear quando se representa graficamente o inverso do rendimento quântico de emissão em função do inverso da viscosidade do meio. O autor afirma que este comportamento, apesar de ser observado para os dados de Adam *et al.* para **D5**, não poderia ser explicado através do modelo de cavidade de solvente. Existe uma problemática dentro deste tipo de discussão que envolve a interconversão de estados entre os pares de radicais-ions. Burshtein indica que choques em pares de íons radicais possibilitam a conversão de estados singlete em triplete. Esta consideração é feita quando o autor propõe equações que justificam os resultados observados por Adam *et al.* empregando este tipo de equilíbrio. Resultados empregando o dioxetano **D5** para substituído apresentam a mesma dependência dos rendimentos quânticos com a viscosidade. Na medida em que o rendimento quântico de fluorescência do emissor é menor, deve existir uma diferença nos rendimentos de emissão, entretanto os rendimentos são quatro ordens de grandeza menores – um valor superior ao que seria esperado.

Apesar de não elucidar o problema, optou-se por aplicar o modelo de Burshtein de difusão de pares de radicais-ions para os valores obtidos experimentalmente para **D1** e **D5**. Na verdade, a relação descrita na Eq. 2 já havia sido utilizada por Adam em seu trabalho original. Entretanto a interpretação dos resultados obtidos foi feita, segundo Burshtein, de forma errônea. Adam *et al.* teriam justificado a linearidade observada através do decaimento exponencial da cavidade de solvente conforme a diminuição da

viscosidade e o modelo estocástico de colisões discretas, que não são instantâneas ou independentes.

$$\frac{1}{\phi} = \frac{1}{\phi_0} + \frac{A}{\eta} \quad \text{Eq. 2}$$

Para os experimentos realizados com a mistura de solvente DFM/tolueno, observa-se uma dependência linear no gráfico duplo recíproco entre o rendimento de quimiexcitação e a viscosidade do meio tanto para o dioxetano **D5**, como esperado, quanto para **D1**. Entretanto, durante a interpretação dos resultados empregando este modelo, consideraram-se os resultados obtidos para o dioxetano bicíclico **D10**. Como apresentado anteriormente, a decomposição deste dioxetano torna impossível a separação do par de radicais íons após a clivagem do anel peroxídico, não sendo sujeito – em primeira instância – ao efeito do solvente sobre a retro-transferência de elétron, já que os fragmentos radiculares estariam próximos aumentando a probabilidade de um evento de aniquilação. Entretanto, observou-se efeito da viscosidade sobre a quimiexcitação, que foi racionalizado em termos de um mecanismo de formação de produtos preferencialmente no estado fundamental em solventes de baixa polaridade, baseada no modelo friccional de mudança conformacional no volume livre de um dado solvente (Eq. 3). Decidiu-se, então aplicar a equação do modelo friccional nos resultados obtidos para **D1** e **D5**. No caso de **D5** o modelo foi aplicado tanto a partir dos valores de rendimento reportados na literatura quanto os obtidos experimentalmente.

$$\ln \frac{1-\phi_s}{\phi_s} = B - \alpha \ln \eta \quad \text{Eq. 3}$$

Onde α designa a fração da molécula sujeita a efeitos de viscosidade. Quando $\alpha < 1$ apenas parte da molécula estaria envolvida na transferência de elétron, enquanto valores maiores sugerem a participação da molécula como um todo; e B é uma constante que compreende efeitos rotacionais e translacionais da molécula.

Este modelo resultou em um alto coeficiente de ajuste linear tanto para **D1** quanto para **D5** (Figura 11 e Figura 12). Porém este é um resultado intrigante, já que – em um primeiro momento – não se esperaria dependência entre o rendimento de quimiexcitação e nenhuma mudança conformacional para nenhum dos compostos. O valor de α para o caso de **D5** foi calculado em 0,65 a partir de nossos dados experimentais. Utilizando os valores da literatura obtém-se um $\alpha=0,84$. Para **D1**, o valor de α foi semelhante ao encontrado para **D5**, 0,66 (Figura 11). Estes valores indicam que apenas uma parte da molécula é sujeita ao efeito da viscosidade.

Figura 11. São apresentados para o dioxetano D5, de baixo para cima, a dependência entre o rendimento quântico de quimiexcitação (ϕ_s) com o aumento da viscosidade do meio composto de uma mistura em diferentes proporções entre DFM/tolueno; o gráfico duplo recíproco – como proposto por Adam *et al.* e Burshtein – cuja linearidade corrobora com um efeito da cavidade de solvente sobre o mecanismo de quimiexcitação; e a dependência do logaritmo neperiano da viscosidade com o logaritmo neperiano do termo $(1-\phi_s)/\phi_s$, como descrito pelo modelo friccional para o volume livre de solventes,. São apresentados os cálculos para os valores experimentais obtidos por Adam *et al.* (esquerda) e os obtidos por nosso grupo de pesquisa (direita)

Figura 12. São apresentados, de baixo para cima, a dependência entre o rendimento quântico de quimiexcitação (ϕ_s) com o aumento da viscosidade do meio composto de uma mistura em diferentes proporções entre DFM/tolueno; o gráfico duplo recíproco e a dependência do logaritmo neperiano da

viscosidade com o logaritmo neperiano do termo $(1-\phi_s)/\phi_s$, como descrito pelo modelo friccional para o volume livre de solventes no qual se calculou um valor de $\alpha=0,65$, para o dioxetano D1.

Para o sistema PC/ACN, em contrapartida, apesar de um ajuste que – dentro de um erro que pode ser considerado aceitável – é linear no modelo difusional duplo recíproco, não apresenta uma correlação linear para o modelo friccional (Figura 13). Este efeito poderia ser justificado pela variação de suas propriedades de excesso, das quais depende o modelo friccional, que para a mistura PC/ACN fogem à idealidade. A viscosidade de excesso (η^E) é uma medida de interações *intermoleculares*. O sistema PC/ACN apresenta um desvio negativo do valor de η^E em qualquer proporção de seus componentes à 25 °C. De acordo com Moore e Ford, valores negativos de η^E são observados em sistemas compostos por espécies com dimensões moleculares diferentes e conseqüentemente forças de dispersão são responsáveis pelas interações.

Figura 13. São apresentados, de baixo para cima, a dependência entre o rendimento quântico de quimiexcitação (ϕ_s) com o aumento da viscosidade do meio composto de uma mistura em diferentes proporções entre PC/ACN; o gráfico duplo recíproco – como proposto por Adam *et al.* e Burshtein – cuja linearidade corrobora com um efeito da cavidade de solvente sobre o mecanismo de quimiexcitação; e a dependência do logaritmo neperiano da viscosidade com o logaritmo neperiano do termo $(1-\phi_s)/\phi_s$, como descrito pelo modelo friccional para o volume livre de solventes, no qual não se observa dependência linear, para os dioxetanos D1 (*esquerda*) e D5 (*direita*).

Os resultados conflitantes com a utilização dos modelos difusional e friccional nos levou a procurar experimentos de controle alternativos, ou seja, seria necessário aplicar os modelos a um sistema reconhecidamente *intermolecular* ou *intramolecular*. Como citado anteriormente, a Dr^a Sandra Maria da Silva, cujo doutoramento no Grupo de Pesquisa foi contemporâneo à realização deste trabalho, estudou o efeito da viscosidade

sobre o sistema peróxi-oxalato.²⁹ Detalhes sobre o mecanismo deste sistema são apresentados no Capítulo 5, entretanto é necessária uma rápida explanação de suas principais características. A reação de ésteres oxálicos adequados com peróxido de hidrogênio em presença de um composto fluorescente com baixo potencial de oxidação, chamado de ativador (ACT), resulta em quimiluminescência. Os resultados obtidos em estudos variando o ativador indicam que esta reação segue o mecanismo CIEEL intermolecular (Esquema 4). A interação de bis(2,4,6-triclorofenil) oxalato (TCPO) e peróxido de hidrogênio na presença de imidazol como base resulta em um intermediário de alta energia, representado aqui pela 1,2-dioxetanodiona (DDO). A interação deste intermediário com o ativador leva à formação de um complexo de transferência de carga, seguida de uma transferência de elétron que gera um par de radicais-íons. A aniquilação destas espécies, dentro de uma cavidade de solvente, resulta na formação do ativador no estado eletronicamente excitado singlete. Segundo esta proposta, o efeito da cavidade de solvente sobre os rendimentos de quimiexcitação poderia ser medido através da variação da viscosidade do meio, em analogia ao estudo empregando 1,2-dioxetanos.

Esquema 4

Os resultados obtidos pela Dr^a Sandra indicam uma variação de cerca de uma ordem de grandeza no ϕ_{S} quando a viscosidade do meio de reação entre TCPO e H_2O_2 , na presença de imidazol como base e 9,10-difenilantraceno (DPA) como ativador, é variada em 2 cP através da utilização de diferentes proporções de uma mistura entre DFM e tolueno.²⁹ A partir destes resultados, foram aplicadas as equações para o modelo difusional e friccional, de forma análoga à realizada no estudo dos dioxetanos **D1** e **D5**

(Figura 14). Observa-se que, interessantemente, o sistema peróxi-oxalato não obedece a dependência linear esperada pelo modelo difusional, apresentando um desvio positivo. Por outro lado, o modelo friccional se ajusta bastante bem aos resultados experimentais.

Figura 14. São apresentados, de baixo para cima, a dependência entre o rendimento quântico de quimiexcitação (ϕ_s) com o aumento da viscosidade do meio composto de uma mistura em diferentes proporções entre DFM/tolueno; o gráfico duplo recíproco do modelo difusional; e a dependência do logaritmo neperiano da viscosidade com o logaritmo neperiano do termo $(1-\phi_s)/\phi_s$, como descrito pelo modelo friccional para o volume livre de solventes, para a reação de TCPO com H_2O_2 catalisada por imidazol com DPA como ativador. [TCPO]: X mM; [H_2O_2]: X mM; [IMIH]: 0,5 mM; [DPA]: X mM.

Os valores das constantes encontradas nos ajustes e o valor de soma dos resíduos (R) para todos os ajustes são apresentados na Tabela 7. O valor calculado para α no sistema peróxi-oxalato foi 1,46, um valor superior a 1, conforme esperado para um processo que envolva fricção de toda a molécula no volume livre do solvente para a ocorrência de um processo de transferência de elétron. Desta forma, é possível inferir que no caso de D1 e D5, o modelo difusional não seja totalmente adequado para a interpretação dos resultados experimentais.

Tabela 7. Valores calculados para as variáveis das equações do modelo difusional e do modelo friccional para os dioxetanos D1, D5 e a reação peróxi-oxalato (TCPO).

composto	$\frac{1}{\phi} = \frac{1}{\phi_0} + \frac{A}{\eta}$			$\ln \frac{1-\phi_s}{\phi_s} = B - \alpha \ln \eta$		
	$1/\phi_s$	A	R	B	α	R
D1	1,97	2,07	0,99515	1,15	0,65	0,99925
D5(lit)	1,91	5,88	0,99938	1,93	0,85	0,99966
D5	2,96	4,54	0,99453	1,90	0,66	0,99943
TCPO	-87,4	268	0,96157	5,09	1,46	0,98834

Por analogia, pode-se inferir que o uso de misturas de solventes para o estudo do mecanismo de quimiexcitação do decomposição induzida de 1,2-dioxetanos deve ser revisto. Apesar dos resultados supostamente indicarem uma etapa *intermolecular* de retro-transferência de elétron, já que os rendimentos quânticos variam com a viscosidade, ainda existem algumas dúvidas sobre este tipo de estudo. Não se sabe ao certo se uma janela de 2 cP de viscosidade seria suficiente para fornecer dados acurados. Além disso, efeitos de solvatação preferencial, propriedades de excesso, efeito Schlieren,³⁰ e outras propriedades intrínsecas de misturas poderiam resultar na medida de artefatos. Porém o fator mais importante é que o ajuste dos resultados obtidos para a dependência viscosidade do meio com o ϕ_s para a decomposição induzida de **D1** e **D5** por TBAF ao modelo friccional pode ser justificado pela proposta mecanística apresentada no Esquema 5. Após a transferência de carga, concomitante com o estiramento da ligação O–O, o dirradical ânion resultante possui um grau de liberdade de rotação em torno da ligação C–C, que estabelece um equilíbrio entre uma espécie na qual as espécies carbonílicas carregadas se encontram próximas, de forma a – seja via um cruzamento de superfície potencial ou quebra da ligação C–C – resultar em um aldeído no estado eletronicamente excitado singlete. Por outro lado, quando ocorre rotação é possível propor pelo menos três possibilidades: (i) uma transferência de elétron para a porção oxifenílica; (ii) um distanciamento entre a superfície de clivagem e a superfície singlete excitada que levaria ao aldeído excitado resultando em uma menor probabilidade de formação do aldeído excitado, ou (iii) uma clivagem da ligação C–C que resulta em um par de radicais-íons que, devido à sua posição relativa, desfavorece a retro-transferência de elétron. Em todas estas alternativas, a formação de produtos no estado fundamental deve ser favorecida. Deve-se ressaltar que o rendimento singlete da via *intramolecular* (ϕ_{s1}^1) é supostamente maior do que em uma via *intermolecular* (ϕ_{s1}^2), e que ambos devem ser sensivelmente maiores do que os rendimentos a partir da conformação anti, desta forma – sem considerar a eventual formação de espécies triplete – $\phi_{s0}^1 < \phi_{s0}^2 < \phi_{s0}^3$.

O efeito da viscosidade sobre k_{ROT} diminui o grau de liberdade de rotação, favorecendo qualquer das vias que levam ao estado excitado, seja *inter* ou *intramolecular*. Nestes termos, o estudo da viscosidade não forneceria informação alguma sobre a via de quimiexcitação ou, pelo menos, não de uma forma independente que possa ser facilmente racionalizada.

O efeito da viscosidade do solvente sobre os ϕ_s da decomposição induzida dos dioxetanos **D1** e **D5** pode ser entendido através da combinação entre o modelo friccional e supondo-se, que a retro-transferência ocorre de forma intermolecular, como sugerido por Adam *et al.*. Segundo argumentos apresentados na literatura, uma transferência de elétron para a unidade fenólica do radical ânion resultaria na formação do estado fundamental do produto (Esquema 2) enquanto que a transferência de elétron para a porção éster deste ânion radical resultaria na formação do estado eletronicamente excitado. Esta proposta se baseia em cálculos AM1 que revelam que a excitação $\pi-\pi^*$ do

emissor na decomposição do dioxetano **D10** (Esquema 2) corresponde a uma transição eletrônica entre HOMO e LUMO+1. Além disso, os coeficientes do HOMO são mais altos na porção oxifenílica enquanto estes coeficientes apresentam-se maiores na funcionalidade éster no LUMO+1. Este deslocamento de densidade eletrônica com a ocorrência de uma transição do orbital molecular ocupado de mais alta energia para orbitais desocupados também é observado para as espécies emissoras **A1** a **A4** (Tabela 8).

Tabela 8. Coeficientes e energias dos HOMO e LUMO do tipo π , calculados através de método semiempírico AM1. Os esqueletos de carbono são apresentados inicialmente no plano do papel (coordenadas X,Y), enquanto os orbitais π estão orientados ao longo do eixo Z.

ânion	HOMO	$E_{\text{HOMO}}(\text{eV})$	LUMO	$E_{\text{LUMO}}(\text{eV})$
-3,153		3,890
-3,072		3,788
-3,542		4,391
-3,119		4,004

É proposta uma explicação para o comportamento dos dioxetanos **D1** e **D5** que diverge daquela da literatura para **D10**, pois se considera a ocorrência da retro-transferência de elétron concomitantemente com a clivagem da ligação C-C a partir dos diradicaais ânions *sin*-DR e *anti*-DR. Este passo deve resultar em estados excitados quando a geometria do estado de transição corresponde mais ao *syn*-DR, por outro lado, a formação do estado fundamental depende da semelhança entre o estado de transição com *anti*-DR (Esquema 6).

Utilizando-se este modelo é possível racionalizar todos os resultados experimentais obtidos, tanto do presente trabalho quanto dos relatados na literatura, envolvendo o estudo do efeito da viscosidade de solvente sobre os valores de ϕ_s . Com base no modelo friccional e supondo-se uma retro-transferência intramolecular de elétron,

concomitante com a clivagem da ligação C-C o ϕ_s seria determinado pela facilidade de rotação do biradical anion *syn*-DR para o conformero *anti*-DR (Esquema 6).

Esquema 6

O impedimento da rotação (k_{ROT}) em *syn*-DR pelo aumento da viscosidade do solvente (k_{ROT} diminui com o aumento de η) leva à formação eficiente de estados excitados, através da retro-transferência de elétron *intramolecular* para a função carbonílica a partir de *syn*-DR. Contrariamente, a retro-transferência de elétron a partir do *anti*-DR, neste caso para o grupo oxifenil, leva à formação do produto no estado fundamental.

A investigação teórica deste sistema corrobora com a ocorrência de uma via de quimiexcitação *intramolecular* (Figura 15). Em estudos da estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos, cálculos em nível uB3LYP/6-31G* de rotação da ligação C-C acarretavam, como esperado na formação de um estado de energia máxima, que era seguido da estabilização da espécie formada. Desta forma, foi realizado um cálculo análogo com **D1**. Ao ser desprotegido, formando um grupo oxifenil, o comprimento de ligação O–O de **D1**

aumenta de 1,4887 para 1,4941 Å com a manutenção do ângulo diedral C-OO-C em cerca de 12°. A rotação da ligação C-C é acompanhada do estiramento da ligação O-O e resulta em um ponto de máximo de energia (TS1). Este ponto refere-se a um intermediário formado por uma suposta transferência de carga. Propõe-se que a formação de carga na porção fenólica induza o estiramento da ligação peroxidica, o que favorece uma transferência de carga que acarreta na clivagem da ligação O-O e formação de um dirradical ânion, com a ligação C-C ainda intacta. Neste ponto calculou-se utilizando o método CIS/6-31G* a energia do estado excitado de D1 ânion. A coordenada de reação para sua clivagem, através da rotação da ligação C-C e estiramento da ligação O-O resultou em um poço potencial de energia bastante próxima àquela do dirradical ânion de D1 no estado fundamental (Figura 15).

Figura 15. Energia potencial para o processo de quimiexcitação do dioxetano D1, que ocorre através do cruzamento entre a superfície S_0 de um dirradical ânion, formado através da clivagem da ligação O-O em função da ocorrência de uma CT a partir de D1 desprotegido, e a superfície S_1 excitada que leva à formação de um aldeído dirradical ânion, que recombina resultando o aldeído excitado, que decai para o estado fundamental com emissão de luz. Cálculos obtidos com método HF/DFT-uB3LYP/6-31G* e CIS/6-31G*.

A proximidade entre estas superfícies favorecerá uma transferência não adiabática de S_0 para S_1 , de forma análoga à proposta na decomposição térmica de 1,2-dioxetanos para a superfície excitada tripleto. Neste ponto, a clivagem da ligação C-C fornecerá a energia necessária para a formação de uma molécula de acetona no estado fundamental e de um aldeído dirradicalar carregado negativamente no estado excitado S_1 (TS2), cuja retro-

transferência de elétron intramolecular resulta na formação do emissor **E1** na mesma superfície. Ou seja, o cruzamento do dirradical ânion de **D1** com a ligação C-C não rompida, da superfície do estado fundamental S_0 para a superfície excitada S_1 garante – após uma série de eventos que incluem uma retro-transferência *intramolecular* – a formação de uma espécie emissora estável no estado excitado singlete (Figura 15).

Em conclusão, o Esquema 6 resume a proposta mecanística para a decomposição induzida de 1,2-dioxetanos por retro-transferência *intramolecular* de elétrons, que é confirmada por cálculos teóricos. Conforme explicitado acima, este modelo está de acordo com os resultados experimentais obtidos por estudos envolvendo variação da viscosidade do meio. Além disso, esta proposta vai de encontro com os dados experimentais de outros sistemas quimiluminescentes que envolvem processos de transferência de elétron, que indicam que sistemas *intermoleculares* demonstram baixa eficiência de quimiexcitação (com a exceção principalmente do sistema peróxi-oxalato) enquanto sistemas *intramoleculares* apresentam alta eficiência de quimiexcitação.³¹

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Medidas de viscosidade

As medidas de viscosidade para as misturas de tolueno e difenilmetano (DFM) e carbonato de propileno (PC) e acetonitrila (ACN) foram realizadas em um reômetro Brookfield modelo LV.D VIII, cone CP40, ângulo $0,8^\circ$, volume 0,5 mL, raio 3,4 cm a 25°C . Os valores são reportados em cP (mPa.s).

tolueno/DFM (%)	η (cP)	σ
0	0,51	0,05
10	0,70	0,01
20	0,82	0,03
40	1,05	0,01
60	1,42	0,01
80	2,17	0,02
90	2,57	0,04
100	2,64	0,06

PC/ACN (%)	η (cP)	σ
0	0,34	0,09
20	0,52	0,03
40	0,79	0,05
60	1,15	0,01
80	1,72	0,03
100	2,38	0,08

Tabela 9. Compilação de parâmetros pertinentes para os solventes utilizados neste estudo.

solvente	CAS	M	ϵ	n	$\frac{1}{n^2} - \frac{1}{\epsilon}$	$E_T(30)$	π^*	V_M	η
benzeno	[71-43-2]	78,11	2,274	1,501	0,0041	34,3	0,59	89,4	0,50
tolueno (metilbenzeno)	[108-88-3]	92,14				33,9	0,54	106,9	0,51
difenilmetano (metil-1,1'-bifenil)	[101-81-5]	168,24						167,2	2,61
acetonitrila	[75-05-8]	41,05	35,94	1,344	0,5258	45,6	0,66	52,9	0,34
carbonato de propileno (4-metil-1,3-dioxolan-2-ona)	[108-32-7]	102,09	65,16	1,419	0,4813	46,0	0,83	85,1	2,38

CAS número de registro do solvente no *Chemical Abstracts*; M é a massa molar (g mol^{-1}); ϵ é a permissividade relativa (antiga constante dielétrica); n é o índice de refração; $E_T(30)$ é o parâmetro de Reichardt de polaridade; π^* é um parâmetro de polarizabilidade do solvente; V_M é o volume molar em $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$; η é a viscosidade a 25°C em cP.

3.3.2 Medidas de emissão de luz

Todas as medidas de emissão de luz realizadas durante os estudos das propriedades quimiluminescentes dos dioxetanos foram efetuadas em um fluorímetro Spex-Fluorlog modelo 1681, com suporte de celas termostatizável e em um fluorímetro Varian Eclipse a $25 \pm 0,5$ °C.

Em todos os experimentos realizados no fluorímetro SPEX utilizou-se a fotomultiplicadora refrigerada, a uma tensão de 950 V. Todas as medidas foram efetuadas com o monocromador do fluorímetro na posição espelho em right angle, com fendas da grade de difração com abertura de 8 mm. Para o equipamento Varian utilizou-se uma tensão de 750 V na fotomultiplicadora, com fendas da grade de difração com abertura de 5 nm

3.3 Procedimento de realização de estudos cinéticos

Após realizar experimentos utilizando diversos procedimentos, foi possível descrever um protocolo que permite a obtenção dos resultados mais reprodutíveis. Os solventes devem ser tratados sob argônio e recém destilados. As misturas não devem ser feitas com antecedência. Deve-se misturar as quantidades adequadas imediatamente antes do experimento. Com auxílio de uma pipeta volumétrica adicionam-se 3 mL de mistura (ou solvente puro) a uma cubeta de fluorescência. Rapidamente adiciona-se, com o auxílio de uma pipeta automática com ponteira teflonada, o volume adequado de 1,2-dioxetano. A cubeta é fechada e posicionada no suporte do aparelho, aonde pode ser termostatizada. Com o auxílio de uma microseringa retira-se do frasco sure seal a quantidade adequada de TBAF. O TBAF não deve ser retirado do frasco em grandes quantidades. Para evitar contaminação deve-se garantir que a microseringa esteja absolutamente limpa antes de sua utilização. Para isso deve-se utilizar EtOH, acetona e THF em lavagens sucessivas, seguida de secagem da seringa com gás inerte. A reação é iniciada pela adição de TBAF à solução de 1,2-dioxetano. A mistura é agitada vigorosamente e muito rapidamente e posicionada na cavidade de leitura. Todo o procedimento deve ser feito com a leitura do aparelho iniciada e em absoluta ausência de luz (Esquema 7).

Esquema 7

3.4 Referências Bibliográficas

1. Wilson, T. (1995). "Comments on the mechanisms of chemiluminescence and bioluminescence". *Photochem. Photobiol.* **62**: 601.
2. Schuster, G. B., Dixon, B., Koo, J. Y., Schmidt, S. P., Smith, J. P. (1979). "Chemical mechanisms of chemiluminescence and bioluminescence - Reactions of high-energy content organic compounds". *Photochem. Photobiol.* **30**: 17.
3. Adam, W., Cueto, O. (1979). "Cyclic peroxide .81. Fluorescer-enhanced chemiluminescence of alpha-peroxylactones via electron exchange". *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 6511.
4. Schuster, G. B., Schmidt, S. P. (1982). "Chemiluminescence of organic compounds". *Adv. Phys. Org. Chem.* **18**: 187.
5. Marcus, R. A. (1965). "On theory of chemiluminescent electron-transfer reactions". *J. Chem. Phys.* **43**: 2654.
6. Marcus, R. A. (2000). "Tutorial on rate constants and reorganization energies". *J. Electroanal. Chem.* **483**: 2.
7. Schaap, A. P., Gagnon, S. D. (1982). "Chemiluminescence from a phenoxide-substituted 1,2-dioxetane - A model for firefly bioluminescence". *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 3504.
8. Adam, W., Reinhardt, D., SahaMoller, C. R. (1996). "From the firefly bioluminescence to the dioxetane-based (AMPPD) chemiluminescence immunoassay: A retroanalysis". *Analyst* **121**: 1527.
9. Bronstein, I., Edwards, B., Voyta, J. C. (1989). "1,2-Dioxetanes - Novel chemiluminescent enzyme substrates - Applications to immunoassays". *J. Biolumin. Chemilumin.* **4**: 99.
10. Bronstein, I., Voyta, J. C., Lazzari, K. G., Murphy, O., Edwards, B., Kricka, L. J. (1990). "Improved chemiluminescent detection of alkaline-phosphatase". *BioTechniques* **9**: 160.
11. Bronstein, I., Voyta, J. C., Lazzari, K. G., Murphy, O., Edwards, B., Kricka, L. J. (1990). "Rapid and sensitive detection of DNA in southern blots with chemiluminescence". *BioTechniques* **8**: 310.
12. Adam, W., Bronstein, I., Trofimov, A. V., Vasil'ev, R. F. (1999). "Solvent-cage effect (viscosity dependence) as a diagnostic probe for the mechanism of the intramolecular chemically initiated electron-exchange luminescence (CIEEL) triggered from a spiroadamantyl-substituted dioxetane". *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 958.
13. Adam, W., Bronstein, I., Vasil'ev, R. F., Trofimov, A. V. (2000). "Back electron transfer in electron-exchange chemiluminescence of oxyaryl-substituted

- spiroadamantyl dioxetane, an analog of firefly bioluminescence". *Russ. Chem. Bull.* **49**: 659.
14. Adam, W., Matsumoto, M., Trofimov, A. V. (2000). "Viscosity dependence of the chemically induced electron- exchange chemiluminescence triggered from a bicyclic dioxetane". *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 8631.
15. Adam, W., Matsumoto, M., Trofimov, A. V. (2000). "Hydrogen-bonding effects on the fluorescence versus electron- transfer-initiated chemiluminescence spectra of the *m*- oxybenzoate ion derived from a bicyclic dioxetane". *J. Org. Chem.* **65**: 2078.
16. Nery, A. L. P., Röpke, S., Catalani, L. H., Baader, W. J. (1999). "Fluoride-triggered decomposition of *m*-silyloxyphenyl-substituted dioxetanes by an intramolecular electron transfer (CIEEL) mechanism". *Tetrahedron Lett.* **40**: 2443.
17. Nery, A. L. P., Weiss, D., Catalani, L. H., Baader, W. J. (2000). "Studies on the intramolecular electron transfer catalyzed thermolysis of 1,2-dioxetanones". *Tetrahedron* **56**: 5317.
18. Marcus, R. A. (1999). Electron transfer past and future. *Em "Electron Transfer: From Isolated Molecules to Biomolecules, Pt 1" (Jortner, J., Bixon, M., eds.), p. 1. Wiley, Chichester.*
19. Reichardt, C. (1979). "Empirical parameters of solvent polarity as linear free-energy relationships". *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **18**: 98.
20. Reichardt, C. (1997). "What is solvent polarity?" *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **45**: 759.
21. Laurence, C., Nicolet, P., Reichardt, C. (1987). "Polarity and acidity of solvents .1. Additions and corrections to the Et(30) scale". *Bull. Soc. Chim. Fr.*: 125.
22. Laurence, C., Nicolet, P., Lucon, M., Reichardt, C. (1987). "Polarity and acidity of solvents .2. Polarity of aromatic solvents". *Bull. Soc. Chim. Fr.*: 1001.
23. Laurence, C., Nicolet, P., Lucon, M., Dalati, T., Reichardt, C. (1989). "Polarity and acidity of solvents .3. Polarity of non-aromatic polychloro-substituted solvents". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*: 873.
24. Gardecki, J. A., Maroncelli, M. (1999). "Solvation and rotational dynamics in acetonitrile propylene carbonate mixtures: a binary system for use in dynamical solvent effect studies". *Chem. Phys. Lett.* **301**: 571.
25. Burshtein, A. I. (2003). "Diffusional and spin dependent theory of chemiluminescence resulting from backward electron transfer". *Chem. Phys.* **289**: 51.
26. Takano, Y., Tsunesada, T., Isobe, H., Yoshioka, Y., Yamaguchi, K., Saito, I. (1999). "Theoretical studies of decomposition reactions of dioxetane, dioxetanone, and related species. CT induced luminescence mechanism revisited". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **72**: 213.

27. Singh, S., Ullman, E. F. (2003). "Reversible formation of excited states in intramolecular donor assisted chemiluminescence reactions of dioxetanes". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 1756.
28. Matsumoto, M. (2004). "Advanced chemistry of dioxetane-based chemiluminescent substrates originating from bioluminescence". *J. Photochem. Photobiol., C* 5: 27.
29. Silva, S. M. (2004). Estudo da Etapa de Quimiexcitação do Sistema Peroxioxalato. Em "Tese de Doutorado", Universidade de São Paulo, São Paulo.
30. Goldstein, S., Czapski, G. (1999). "Viscosity effects on the reaction of peroxyxynitrite with CO₂: Evidence for radical formation in a solvent cage". *J. Am. Chem. Soc.* 121: 2444.
31. Baader, W. J., Stevani, C. V., Bastos, E. L. (2004). Chemiluminescence of organic peroxides. Em "Chemistry of Functional Groups" (Rappaport, Z., ed.). Wiley, Amsterdam.

Cálculo da geometria de equilíbrio de 1,2-dioxetanos: Estudos sobre os parâmetros de ativação

Quando os ângulos de ligação ($\angle\text{CCO}$) e o ângulo diedral (COOC) de peróxidos cíclicos de quatro membros são comparados com aqueles observados em peróxidos acíclicos, torna-se evidente a alta energia de tensão de anel à qual 1,2-dioxetanos estão submetidos. Sua clivagem térmica resulta na formação de dois fragmentos carbonílicos e na liberação de uma quantidade considerável de energia e, durante o processo, os critérios energéticos que permitem que uma reação química resulte em produtos eletronicamente excitados são atendidos.

Este conceito pode ser ilustrado através da decomposição térmica de tetrametildioxetano (TMD) em duas moléculas de acetona, para a qual os parâmetros termodinâmicos foram obtidos experimentalmente. Os valores de entalpia de reação (ΔH_0) e entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) para esta decomposição unimolecular são -61 e 25 kcal mol^{-1} , respectivamente, e resultam em um total de 86 kcal mol^{-1} de energia disponível no estado de transição da decomposição térmica de TMD. Levando-se em conta que as energias singlete e triplete da acetona são 84 kcal mol^{-1} e 78 kcal mol^{-1} , esta energia é suficiente para produzir uma das moléculas de acetona em um estado excitado $n\pi^*$. Quando se consideram as entalpias de reação para a decomposição térmica de dioxetanos e dioxetanonas, estimadas a partir de medidas termoquímicas em cerca de $69 - 90 \text{ kcal mol}^{-1}$, e suas energias de ativação, que variam entre 20 e 30 kcal mol^{-1} , conclui-se que esta classe de compostos provém a energia suficiente para a quimiexcitação de um fragmento carbonílico em sua decomposição térmica.¹⁻³

A decomposição térmica de 1,2-dioxetanos resulta – predominantemente – na formação de espécies carbonílicas no estado eletronicamente excitado triplete, de forma que a emissão direta de luz é escassa. Um considerável esforço experimental e teórico tem sido realizado para racionalizar a formação de espécies excitadas tripletes a partir da

decomposição de dioxetanos no estado fundamental singlete.^{4,6} Neste contexto, foram propostos três mecanismos para a clivagem térmica de 1,2-dioxetanos: (i) um mecanismo pericíclico concertado, (ii) um mecanismo dirradicalar e (iii) um mecanismo misto, que reúne aspectos dos dois anteriores. No mecanismo concertado, tanto a ligação O—O quanto a ligação C—C são clivadas simultaneamente, enquanto na proposta dirradicalar a ocorrência de uma clivagem homolítica da ligação O—O leva a um intermediário dirradicalar que, em seguida, sofre uma clivagem rápida de sua ligação C—C. Ambos os mecanismos supõe uma torção do anel peroxídico no estado de transição, com a diferença que a ligação C—C estaria intacta na proposta dirradicalar. Esta torção de um estado de transição do processo de clivagem também é postulada no mecanismo misto. Porém neste caso, esta espécie possui *caráter* dirradicalar e está sujeita, antes da formação do intermediário dirradicalar, a um cruzamento de superfície que resulta na formação de um fragmento carbonílico excitado triplete. Este mecanismo misto, também conhecido como mecanismo dirradicalar modificado, apresenta uma proposta satisfatória para o passo de quimiexcitação na decomposição unimolecular de dioxetanos simples.

Estudos teóricos sugerem que a quimiexcitação de 1,2-dioxetanos é um processo não adiabático proibido por spin. O mecanismo misto postula a mudança química da superfície potencial singlete (S_0) para a superfície triplete (T_1) e o conseqüente cruzamento inverso de T_1 para S_0 .⁷ No primeiro ponto de cruzamento, a interação spin-orbital deve ser efetiva devido à ortogonalidade entre os orbitais π - e σ - localizados no oxigênio. Por outro lado, existe apenas um pequeno acoplamento spin-orbital no segundo ponto de cruzamento, já que os orbitais dos radicais são significativamente deslocalizados na região em que a ligação C—C será clivada. O efeito geral é a transferência de uma população considerável de dirradicais, inicialmente formada da superfície S_0 , para a superfície T_1 , que resultam, em sua clivagem, em um fragmento carbonílico eletronicamente excitado triplete e outro no estado fundamental. A transferência do dirradical singlete da superfície S_0 para a superfície singlete excitada (S_1), de forma a levar ao composto carbonílico eletronicamente excitado singlete, tem presumivelmente uma probabilidade muito menor, já que a superfície S_1 deve estar, na maioria dos compostos orgânicos, em um nível energético superior à superfície triplete, que justifica a preferência pela via de quimiexcitação triplete. Adicionalmente, um estudo recente sugere ainda que o dirradical na superfície T_1 requer uma pequena energia de ativação para clivar em um fragmento carbonílico excitado triplete e outro no estado fundamental, mesmo que a clivagem da ligação O—O seja o passo limitante, e que o estado de transição desta transformação é o responsável pela eficiência da quimiexcitação triplete.

A estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos depende – fundamentalmente – de seu padrão de substituição. Por exemplo, bis-adamantilideno-1,2-dioxetano tem uma meia vida de 20 anos a 25 °C, enquanto alguns compostos desta classe são explosivos mesmo em temperaturas abaixo de 0 °C. A investigação da estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos em função de sua estrutura é importante não somente no estudo de sua quimiexcitação, como também no desenvolvimento de substratos quimiluminescentes eficientes para aplicação comercial.

Com base no mecanismo misto de decomposição de 1,2-dioxetanos, é razoável sugerir que a prevenção da rotação da ligação C-C evite o estiramento da ligação O-O e, com isso, aumente a estabilidade térmica de um dado peróxido cíclico. No caso do bisadamantilideno-1,2-dioxetano, a presença de quatro hidrogênios metilênicos equatoriais pertencentes aos grupos adamantil resultaria na fixação da rotação do anel peroxídico (cujo ângulo diedral COOC é 21°) aumentando sua estabilidade. Partindo-se do grupo adamantil é possível realizar um exercício interessante. Ao remover um grupo metilênico do grupo adamantil obtém-se o biciclo[3.3.1]nonilideno, cujo respectivo dioxetano apresenta estabilidade térmica similar ao bisadamantilideno-1,2-dioxetano. Ao se extrair mais dois dos grupos metilênicos restantes obtém-se um grupo diisopropil, substituinte que ainda possui efeito estabilizante acentuado. Estes dados poderiam indicar que substituintes volumosos tendem a estabilizar 1,2-dioxetanos. Entretanto os dados obtidos com grupos alquila impedidos, como metilciclopropil ou *tert*-butil, indicam que dioxetanos contendo estes substituintes tendem a ser menos estáveis do que os substituídos pelo grupo isopropil, por exemplo. Supostamente, estes grupos impedidos tendem a interagir com grupos vicinais de forma a aumentar o grau de rotação da ligação C-C tornando os 1,2-dioxetanos menos estáveis. Aparentemente existe um ângulo diedral limite da ligação COOC, que determina a estabilidade do peróxido cíclico.

Dentre os 1,2-dioxetanos bicíclicos, compostos com um anel de cinco ou sete membros associados ao anel peroxídico tendem a proporcionar maior estabilização do que os análogos contendo seis membros. Este efeito é atribuído à torção resultante da presença de um anel de seis membros, enquanto anéis de cinco e sete membros manteriam uma conformação planar do anel peroxídico, que seria mais apto a resistir melhor à torção necessária para sua decomposição.

Este capítulo descreve o cálculo teórico da geometria de equilíbrio para uma série de 1,2-dioxetanos com substituintes alquila. O efeito de suas características estruturais, como distância da ligação O-O e C-C e ângulo diedral C-OO-C é racionalizado em termos de seus parâmetros de ativação.

4.1 Resultados

A relação entre estrutura e estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos foi bastante estudada até meados dos anos 80, quando a decomposição induzida destes peróxidos e suas implicações mecanísticas permitiram o desenvolvimento de uma vasta gama de aplicações.⁸⁻¹¹ Diversos estudos, principalmente aqueles realizados pelo grupo do Prof. Waldemar Adam, visavam esclarecer as intrincadas relações entre o anel peroxídico e seus substituintes. Lechtken, P., em 1976, havia preparado e estudado uma série de 1,2-dioxetanos espirosubstituídos por grupos alifáticos bi- e tricíclicos, dentre eles o bisadamantil-1,2-dioxetano. Este veio a ser, juntamente com derivados mais volumosos, o dioxetano de mais alta estabilidade térmica obtido.¹²⁻¹⁵

Apesar do foco recente das pesquisas envolvendo 1,2-dioxetanos ser o desenvolvimento de sondas enzimáticas baseadas em sua decomposição induzida, os compostos desenvolvidos com esta finalidade possuem, além do anel aromático substituído, um grupo que permita o aumento de sua estabilidade térmica, visando uma melhor aplicabilidade. A escolha deste grupo estabilizante se dá de forma empírica, já que a natureza da estabilização não é clara até o momento. Utiliza-se tradicionalmente o grupo espiroadamantil para esta finalidade e mais recentemente dois grupos isopropila. Os efeitos destes grupos, segundo cálculos semiempíricos e *ab initio*, residiriam na restrição de rotação da ligação C-C e na estabilização proporcionada pelas interações entre hidrogênios no substituinte e os oxigênios peroxídicos.¹⁶

Recentemente foi implantada em nosso grupo de pesquisa a infra-estrutura para a realização de cálculos químicos de geometria de equilíbrio e energias em diversos níveis de teoria. Com isso, após uma vasta busca na literatura, obtiveram-se os parâmetros de ativação de aproximadamente 150 dioxetanos preparados e estudados entre os anos 60 e os dias atuais. Destes, foram selecionados 44 dioxetanos com substituintes alquílicos para estudo (Tabela 1). As geometrias de compostos em séries homólogas, ou seja, com mudança no padrão de substituição dentre um mesmo grupo de substituintes, foram sistematicamente estudadas utilizando-se três níveis distintos: semiempírico AM1, RHF/6-31G* e HF-DFT/B3LYP.

Tabela 1. Estrutura de 1,2-dioxetanos com substituintes alílicos estudados

Apesar de simples, a idéia deste tipo de estudo sistemático nunca foi explorada de forma profunda e os relatos envolvendo grupos de 1,2-dioxetanos são escassos.^{17,18} Foi realizada, quando aplicável, uma busca pelo confôrmero de menor energia seguida de otimização da geometria de equilíbrio em nível semiempírico AM1. Interessantemente, a energia livre de ativação ($\Delta G^\ddagger$) para estes compostos apresenta uma boa correlação com a distância O-O da ligação peroxídica em séries homólogas. Para o caso de 1,2-dioxetanos metil-substituídos, compostos cujas propriedades são bem descritas na literatura, obteve-se um índice de correlação R de -0,99419. No caso dos derivados etil-substituídos o índice de correlação obtido foi de -0,99160 (Figura 1).

Figura 1. Dependência entre a energia livre de ativação e a distância O-O do anel peroxídico obtida através de método semiempírico AM1.

A Figura 2 apresenta o perfil obtido quando verifica a correlação entre a distância da ligação O-O e a energia livre de ativação ($\Delta G^\ddagger$) para todos os 44 dioxetanos estudados.

Figura 2. Dependência entre a energia livre de ativação e a distância O-O do anel peroxídico, obtida através de método semiempírico AM1, para os dioxetanos 1 – 44.

Observa-se uma tendência, representada por uma reta, entre a estabilidade e o comprimento da ligação O-O. Entretanto, os dioxetanos 31, 33, 40, 41, 42, 43 e 44 parecem não obedecer esta relação. Considerando que a série entre 40 e 44 corresponde a 1,2-dioxetanos com substituintes volumosos, que contém pelo menos um grupo adamantil, optou-se por verificar a precisão do cálculo da geometria. Para isso, compararam-se os resultados obtidos através dos métodos AM1, HF6-31G* e DFTB3LYP/6-31G* para a geometria de dois 1,2-dioxetanos caracterizados por cristalografia de raios-X (Tabela 2 e Tabela 3)

Tabela 2. Comparação entre os parâmetros geométricos calculados e os valores experimentais para o *trans*-3,4-bis(bromometil)-3,4-dimetil-1,2-dioxetano e para o bisadamantilideno-1,2-dioxetano.

	dO-O (Å)				dC-C (Å)			
	AM1	HF6-31G*	B3LYP	Exp.	AM1	HF6-31G*	B3LYP	Exp.
1,33	1,41	1,49	1,44	1,57	1,55	1,56	1,51
1,32	1,41	1,48	1,48	1,58	1,57	1,57	1,55

Tabela 3. Comparação entre os parâmetros geométricos calculados e os valores experimentais para o *trans*-3,4-bis(bromometil)-3,4-dimetil-1,2-dioxetano e para o bisadamantilideno-1,2-dioxetano.

	diedro CO-OC (°)			
	AM1	HF6-31G*	B3LYP	Exp.
1,01	15,9	17,7	15,3
5,47	21,6	21,7	21,0

Observou-se que tanto para os comprimentos de ligação C-C e O-O quando para o ângulo diedral C-OO-C, foi obtida uma melhor correspondência entre os valores experimentais quando se utilizam os métodos DFT B3LYP ou HF6-31G*. Desta forma, a série de dioxetanos que varia entre o composto não substituído e tetrametildioxetano foi estudada empregando o método HF6-31G*. Interessantemente, quando este método é utilizado não se observa correlação entre a distância O-O com a energia livre de ativação (Figura 3).

Figura 3. Dependência entre a energia livre de ativação e a distância O-O do anel peroxidico, obtida através de método *ab initio* HF-6-31G*.

Em seguida, estudou-se o efeito do ângulo do diedro C-OO-C sobre a estabilidade de 1,2-dioxaciclobutano. Para isso foram realizados cálculos em nível DFT-B3LYP de geometria de equilíbrio para os conformêros resultantes da rotação da ligação C-C (Figura 4).

Figura 4. Dependência entre as distâncias de ligação C-C e O-O com o ângulo diedral e com a energia potencial de decomposição de 1,2-dioxaciclobutano.

O cálculo foi realizado mantendo-se a ligação O-O, de forma que ao atingir um ângulo diedral crítico ($>42^\circ$) observa-se uma mudança brusca tanto das distâncias de ligação C-C quanto O-O. Esta região representa uma diferença de energia de cerca de 19 kcal mol⁻¹ em relação ao estado inicial, valor bastante próximo ao $\Delta H^\ddagger$ obtido experimentalmente.

4.2 Discussão

Os primeiros trabalhos teóricos sobre a decomposição quimiluminescente de 1,2-dioxetanos foram baseados em argumentos de simetria de orbital.¹⁹ Foi previsto que uma retrociclicação suprafacial [2+2] deve levar a um produto carbonílico no estado eletronicamente excitado. Entretanto, este tipo de processo retrocíclico deve, através de uma reação química, popular o estado π,π^* , que é inacessível em termos de balanço energético. Uma análise mais profunda dos parâmetros de simetria da decomposição concertada revelou que um estado n,π^* da carbonila deveria ser formado.²⁰ Além disso e mais importante, este estudo predizia – bem antes da confirmação experimental – que um produto triplete n,π^* deveria ser formado preferencialmente. Especificamente foi indicado que a superfície para o estado menos energético $^Tn,\pi^*$ do produto carbonílico cruza a superfície excitada n,π^* do fragmento carbonílico conforme o modo vibracional de torção para fora do plano.

Numerosos cálculos semiempíricos foram realizados para a decomposição de 1,2-dioxetanos, incluindo cálculos CNDO/2 com e sem interação de configuração e MINDO/3 com configuração de interação.^{12,21} Apesar das opiniões divergentes a respeito da ordem de quebra das ligações O–O e C–C, em possibilidades que variam entre um mecanismo concertado – no qual as duas ligações quebram ao mesmo tempo – e um mecanismo no qual a homólise da ligação O–O é seguida de uma quebra rápida da ligação C–C, todos os cálculos indicam torção do anel peroxídico. Estados de transição torcidos são propostos em todos os casos, diferindo apenas a respeito do rompimento da ligação C–C. Baseado em considerações qualitativas foi postulado que o cruzamento de uma via radicalar para uma via que leva ao produto excitado triplete, antes de atingir um intermediário estável, é possível.²² Esta alternativa é bastante atraente e representa uma mistura entre as rotas dirradicalar e concertada. Este mecanismo misto foi utilizado para explicar os resultados experimentais obtidos para o tetraetildioxetano.²³

Os resultados obtidos através do método *ab initio* GVB postula um 1,4-dirradical como intermediário formado a partir da clivagem da ligação O–O e que, porém, mantém a ligação C–C intacta.²⁴ As oito possíveis configurações eletrônicas singlete e triplete do dirradical estão dentro de um limite energético de 3 kcal mol⁻¹ e correlacionam-se com os produtos nos estados eletronicamente excitados e no estado fundamental. O estado específico de spin que será populado depende de sua energia relativa em relação ao intermediário 1,4-dirradical. Por exemplo, para o dioxetano não substituído, a energia do

ponto de cruzamento de superfície T_{n,π^*} do formaldeído é cerca de 8 kcal mol⁻¹ mais baixa do que S_{n,π^*} , em relação ao dirradical. Desta forma, formaldeído é preferencialmente formado no estado eletronicamente excitado triplete, como observado nos resultados experimentais. Os estudos quantitativos a respeito da estabilidade do dirradical obtidos pelo método *ab initio* GVB confirmam os valores obtidos a partir de estimativas termoquímicas.

Segundo o dado experimental, com o aumento do grau de substituição, o anel peroxídico tende a se tornar mais estável termicamente. Desta forma, a tendência de estabilidade empírica é tetra > tri > di > mono > não substituídos. Este tipo de observação permitiu o desenvolvimento de 1,2-dioxetanos estáveis, como o bisadamantil-1,2-dioxetano. Entretanto, diversas propostas tentam explicar o efeito do padrão de substituição sobre a estabilidade térmica de 1,2-dioxetanos. Efeitos estéricos, correlação com massas moleculares, ângulo dihedral COOC são justificativas apresentadas na literatura.^{5,6,8,17,25,26}

O ângulo dihedral COOC é tido como o principal motivo de estabilização de 1,2-dioxetanos.⁵ Entretanto foi preparado recentemente pelo Prof. Dieter Weiß um dioxetano policíclico cuja estrutura deveria manter o anel peroxídico com um ângulo COOC de 0° (figura ao lado). Ou seja, sua estabilidade térmica deveria ser bastante alta. Contudo, este dioxetano se mostrou muito instável, com tempo de meia vida em temperatura ambiente de poucos minutos.

Esta revelação nos levou a estudar mais profundamente, através da utilização de cálculos em nível semiempírico e *ab initio*, os fatores responsáveis pela estabilidade térmica de alguns dioxetanos. Cabe, neste ponto, ressaltar que nosso objetivo com o cálculo teórico de 1,2-dioxetanos, neste momento, não era uma investigação completa dos problemas mecanísticos relacionados a esta classe de compostos, mas sim introduzir a ferramenta de cálculo teórico no Grupo de Pesquisa.

Neste contexto, o estudo foi iniciado pela busca na literatura por dados termodinâmicos de diversos compostos. Foram obtidos os valores de energia de ativação e energia livre de ativação para cerca de 150 dioxetanos. Devido ao número de átomos e ao volume de cálculos a ser realizado optou-se por estudar apenas 1,2-dioxetanos com substituintes alquil. Não foi observado, para estes compostos, correlação entre o ângulo diedral COOC com a energia livre de ativação, entretanto pôde-se observar um aumento da estabilidade térmica conforme o encurtamento da distância da ligação peroxídica. Em

compostos homólogos, com diferentes números de substituintes, pode-se observar uma dependência linear entre o comprimento da ligação peroxídica com a energia livre de ativação com índices de correlação bastante satisfatórios. Ao se graficar o comprimento da ligação O-O em função da energia livre de ativação de todos os 44 compostos calculados, observa-se uma tendência confirmando os resultados em séries homólogas. Entretanto alguns compostos fogem a esta tendência, principalmente todo o grupo contendo substituintes adamantil e 1,2-dioxetanos tricíclicos.

A comparação entre os valores obtidos através de cálculos teóricos com valores obtidos experimentalmente para geometrias de equilíbrio de 1,2-dioxetanos indica que - apesar da boa correlação entre estabilidade térmica e a distância O-O obtida através de cálculos semiempíricos - este nível da teoria não resulta em valores de distância de ligação C-C e O-O e ângulo diedral COOC compatíveis com os valores experimentais. Além disso, o estudo da série homóloga entre o 1,2-dioxetano não substituído e tetrametildioxetano empregando o método *ab initio* HF 6-31G* não indica correlação entre a distância O-O e a estabilidade térmica de dioxetanos alquílicos.

Em seguida foi estudado, em nível DFT B3LYP/6-31G* o efeito da rotação em torno da ligação C-C através da mudança do ângulo diedral C-OO-C. Os resultados indicam uma grande variação dos comprimentos de ligação O-O quando o ângulo diedral é maior que 42°, podendo ser um indicativo de sua clivagem. De forma análoga, nestas condições, observa-se um aumento brusco da distância de ligação C-C, que - analogamente poderia também ser atribuído a um processo de clivagem. A diferença de energia potencial relacionada a estes eventos se encontra entre 19 - 27 kcal mol⁻¹, região na qual foram medidos experimentalmente os valores de $\Delta H^\ddagger$ para dioxetanos alquílicos.

Desta forma, pode-se dizer que o exercício de cálculo apresentado neste capítulo obteve resultados interessantes e forneceu as bases para a aplicação desta ferramenta em sistemas mais complexos, como a decomposição induzida de 1,2-dioxetanos.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Cálculos Químicos

Os cálculos teóricos são baseados em métodos semiempíricos e *ab initio* com implemetados no programa Spartan '02 (Wavefunction, Inc.) e Gaussian 03 (Gaussian Inc.), em um computador Pentium IV 1,7 GHz com 1 Gb de memória RAM utilizando sistema operacional Linux Suse 9.1 Kernel 2.6.02. Grande parte dos cálculos incluiu otimização de geometria, frequências vibracionais e cálculos de coordenadas de reação intrínseca para as estruturas em um caminho de reação. Quando aplicável, as geometrias otimizadas foram caracterizadas através de suas frequências vibracionais.

As geometrias iniciais foram obtidas através de otimização de todos os conformeros possíveis empregando mecânica molecular pelo método MMFF94. Em seguida foram realizados cálculos semiempíricos em nível AM1, seguido de otimização adicional utilizando o método HF6-31G*(d). Adicionalmente, o método híbrido de três parâmetros de Becke (uB3LYP) com funções base 6-31G* (d) foi utilizado tanto para o estado fundamental (S_0) quanto para o estado tripleto (T_1). Todos os cálculos foram feitos com um espaço de 10 orbitais moleculares.

4.4 Referências Bibliográficas

1. Adam, W., Cilento, G. (1982). Chemical and Biological Generation of Excited States. Academic Press, New York.
2. Baader, W. J., Stevani, C. V., Bastos, E. L. (2004). Chemiluminescence of organic peroxides. *Em "Chemistry of Functional Groups"* (Rappaport, Z., ed.). Wiley, Amsterdam.
3. Matsumoto, M. (2004). "Advanced chemistry of dioxetane-based chemiluminescent substrates originating from bioluminescence". *J. Photochem. Photobiol., C* **5**: 27.
4. Lay, T. H., Bozzelli, J. W. (1997). "Enthalpies of formation of cyclic alkyl peroxides: Dioxane, 1,2-dioxetane, 1,2-dioxolane, and 1,2-dioxane". *Chem. Phys. Lett.* **268**: 175.
5. Wilsey, S., Bernardi, F., Olivucci, M., Robb, M. A., Murphy, S., Adam, W. (1999). "The thermal decomposition of 1,2-dioxetane revisited". *J. Phys. Chem. A* **103**: 1669.
6. Richardson, W. H. (1989). "Molecular mechanics explorations with 1,2-dioxetanes". *J. Org. Chem.* **54**: 4677.
7. Adam, W., Baader, W. J. (1985). "Effects of methylation on the thermal stability and chemiluminescence properties of 1,2-dioxetanes". *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 410.
8. Adam, W., Beinhauer, A., Hauer, H., Saha-Moeller, C. R. (1990). "Activation parameters and excitation yields of 1,2-dioxetanes of photogenotoxic interest". *J. Prakt. Chem.* **332**: 161.
9. Adam, W., Encarnacion, L. A. A. (1982). "The synthesis of spiroadamantane-1,2-dioxetanes". *Chem. Ber. -Recl.* **115**: 2592.
10. Adam, W., Curci, R. (1981). "Hyperenergetic molecules - Dioxetanes and dioxiranes". *Chim. Ind.* **63**: 20.
11. Baumstark, A. L., McCloskey, C. J., Williams, T. E., Chrisope, D. R. (1980). "Reaction of triarylphosphines with tetramethyl-1,2-dioxetane - Kinetics of formation and decomposition of 2,2-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-2,2,2-triaryl-1,3,2-dioxaphospholanes". *J. Org. Chem.* **45**: 3593.
12. Lechtken, P. (1978). "High-energetic molecules .6. MINDO-3 Calculations on thermolysis of 1,2-dioxetanes - Evidence for a CC biradical as transition-state of fragmentation to products in electronic ground-state". *Chem. Ber.* **111**: 1413.
13. Lechtken, P., Turro, N. J. (1974). "Peroxyoxalate chemiluminescence - Chemiexcitation of high-energy excited states in acceptor molecules". *Mol. Photochem.* **6**: 95.

14. Lechtken, P., Hohne, G. (1973). "Thermolysis of tetramethyl-1,2-dioxetane". *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **12**: 772.
15. Lechtken, P., Steinmetzer, H. C. (1975). "Photofragmentation of tetramethyl-1,2-dioxetane - Efficient example of an adiabatic photoreaction". *Chem. Ber. -Recl.* **108**: 3159.
16. Richardson, W. H., Lovett, M. B., Olson, L. (1989). "An estimate of the lifetime of 1,4-dioxybutane biradicals". *J. Org. Chem.* **54**: 3523.
17. Tanaka, C., Tanaka, J. (2000). "Ab initio molecular orbital studies on the chemiluminescence of 1,2-dioxetanes". *J. Phys. Chem. A* **104**: 2078.
18. Rodriguez, E., Reguero, M. (2002). "The DDCI method applied to reactivity: Chemiluminescent decomposition of dioxetane". *J. Phys. Chem. A* **106**: 504.
19. McCapra, F. (1968). "An application of theory of electrocyclic reactions to bioluminescence". *Chem. Commun.*: 155.
20. Kearns, D., Ehrenson, S. (1962). "LCAO MO theory of an organic biradical with a probable triplet ground state". *J. Am. Chem. Soc.* **84**: 739.
21. Dewar, M. J. S., Kirschne, S. (1974). "MINDO-3 study of thermolysis of dioxetane - Role of triplet state". *J. Am. Chem. Soc.* **96**: 7578.
22. Turro, N. J., Schuster, G. B., Bergman, R. G., Shea, K. J., Davis, J. H. (1975). "Mechanisms of energy storage and release - Chemiluminescent valence isomerizations - Evidence for a dewar benzene intermediate in a biscyclopropenyl to benzene rearrangement". *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 4758.
23. Bechara, E. J. H., Wilson, T. (1980). "Alkyl substituent effects on dioxetane properties - tetraethyl-3,4-di-normal-butyldioxetanes, dicyclohexylidene-3,4-di-normal-butyldioxetanes, and 3,4-dimethyl-3,4-di-normal-butyldioxetanes - A discussion of decomposition mechanisms". *J. Org. Chem.* **45**: 5261.
24. Harding, L. B., Goddard III, W. A. (1977). "Intermediates in chemiluminescent reaction of singlet oxygen with ethylene - *ab initio* studies". *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 4520.
25. Takano, Y., Tsunesada, T., Isobe, H., Yoshioka, Y., Yamaguchi, K., Saito, I. (1999). "Theoretical studies of decomposition reactions of dioxetane, dioxetanone, and related species. CT induced luminescence mechanism revisited". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **72**: 213.
26. Vasil'ev, R. F. (1999). "The problem of chemical energy conversion into light: Cyclic peroxides as models for studying chemical excitation processes by quantum-chemical calculations". *Kinet. Catal.* **40**: 172.

Deteccção de dióxido de carbono radical ânion no sistema peróxi-oxalato utilizando ressonância paramagnética de elétron

Ao observar a emissão de luz resultante da reação entre cloreto de oxalila e peróxido de hidrogênio na presença de rubreno, Edwin Chandross, então funcionário da Bell Labs, deu início ao estudo da quimiluminescência do sistema peróxi-oxalato.¹ Devido ao potencial de aplicação analítica deste sistema, seu mecanismo é alvo de investigação há mais de 40 anos. Porém, seus intermediários e o passo de quimiexcitação, conversão de energia química em energia de excitação eletrônica, ainda são alvo de controvérsia.

Rauhut *et al.*, durante a década de 1960, postularam um mecanismo que envolve a formação de um complexo de transferência de carga entre um intermediário de alta energia, formado na reação entre ésteres oxálicos e peróxido de hidrogênio, e um fluoróforo com potencial de oxidação adequado.²⁻⁴ Este fluoróforo, chamado de ativador (ACT), é oxidado em um elétron pelo intermediário de alta energia, que Rauhut imaginou ser a 1,2-dioxetanodiona, em um passo que forneceria a energia necessária para promover o ativador para o estado eletronicamente excitado singlete. Este mecanismo justifica a coincidência, observada anteriormente, entre a distribuição de comprimentos de onda de emissão de quimiluminescência com a emissão de fluorescência do ativador e permite correlacionar o potencial de oxidação do ativador com os Φ_{CL} observados.

Além da 1,2-dioxetanodiona, foram postulados diversos intermediários de alta energia muitas vezes sem fundamentação experimental.⁵⁻¹⁴ Estudos cinéticos convencionais foram realizados por vários autores com o objetivo de verificar as etapas da reação anteriores à formação do intermediário de alta energia. Stevani *et al.* estudaram a cinética da reação catalisada por imidazol (IMI) entre bis(2,4,6-triclorofenil)oxalato (TCPO) e peróxido de hidrogênio na presença de DPA como ativador e propuseram um

esquema mecanístico simplificado para a reação, determinaram as constantes de velocidade de três de seus passos e obtiveram evidências indiretas para a ocorrência da 1,2-dioxetanodiona (**DDO**) como intermediário de alta energia (Esquema 1).¹⁴

Esquema 1

Entretanto, este tipo de abordagem não permite obter informações diretas sobre todas as etapas desta reação, especialmente a etapa de quimiexcitação. Em um artigo de revisão, Stigbrand *et al.* analisaram os resultados obtidos no estudo do mecanismo desta reação e concluíram que nem a etapa de quimiexcitação, tampouco o intermediário de alta energia haviam sido caracterizados definitivamente.¹⁵

Muito recentemente, Bos *et al.* realizaram experimentos empregando cloreto de oxalila duplamente marcado com ¹³C, o que permitiu, através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, obter evidências diretas da formação de 1,2-dioxetanodiona como IAE do sistema peróxi-oxalato.¹⁶ Contudo, apesar desta confirmação, os resultados experimentais apresentados até o momento não permitem garantir a identidade das espécies envolvidas no passo de quimiexcitação.

A investigação de Schuster a respeito da emissão de quimiluminescência proveniente da reação entre alguns peróxidos com fluoróforos com diferentes E_{ox} , junto aos relatos de formação de estados eletronicamente excitados através da aniquilação de íons-radicais em eletroquimiluminescência permitiram postular o mecanismo CIEEL.¹⁷⁻¹⁹ Este mecanismo foi posteriormente associado ao sistema peróxi-oxalato e prevê uma transferência de elétron entre a 1,2-dioxetanodiona e o ativador, que resulta na formação, dentro da gaiola de solvente, de $CO_2^{\cdot-}$ e o cátion radical do ativador. Na retrotransferência de elétron entre $CO_2^{\cdot-}$ e o cátion radical do ativador, o ativador é formado o estado excitado singlete (Esquema 2).^{14,20}

Apesar de ser associado à bioluminescência de vaga-lume, processo com rendimentos quânticos de 88 %, o mecanismo CIEEL foi postulado utilizando-se como

modelo reações com Φ_{cl} na ordem de 10^{-4} .²¹ Este fato, aliado às dificuldades em estudar a etapa de quimiexcitação questionam a proposição do mecanismo CIEEL ao sistema peróxi-oxalato. Além disso, estudos empregando ativadores não convencionais não obedecem a correlação entre $\ln(k_{CAT}/k_D)$ e o potencial de oxidação do ativador, correlação esta prevista pelo mecanismo.¹⁴

Este capítulo descreve a tentativa de observar diretamente o $CO_2^{\cdot-}$ através da medida de ressonância paramagnética de elétron (EPR) do aduto radical formado pela reação entre o ânion-radical e o sequestrador de spin α -fenil-N-*tert*-butilnitrona (PBN).²² O Esquema 3 apresenta o escape do $CO_2^{\cdot-}$ da gaiola de solvente, com a posterior formação do aduto PBN- $CO_2^{\cdot-}$.

Esquema 2

Esquema 3

5.1 Resultados

Derivados do estudo de processos metabólicos, dois adutos radicalares de $\text{CO}_2^{\cdot-}$ têm suas propriedades relatadas na literatura: $\text{DMPO-CO}_2^{\cdot-}$ e $\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$.^{22,23} Utilizou-se PBN como *spin trap*, já que seu manuseio é mais simples do que *N*-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina (DMPO), que deve ser purificado antes do uso. As investigações foram realizadas utilizando uma variação do sistema peróxi-oxalato amplamente estudada, especialmente por nosso Grupo de Pesquisa, composta de bis(2,4,6-triclorofenil)oxalato (TCPO), imidazol (IMI), 9,10-difenilantraceno (DPA) e peróxido de hidrogênio.

A reação foi iniciada pela adição de TCPO a uma mistura de todos os outros reagentes e ao *spin trap* em dois diferentes solventes: acetato de etila e acetonitrila, ambos anidros e saturados de argônio. Foram ainda realizados experimentos em água deionizada. Para isso, após 1 min de reação em acetato de etila, o solvente foi evaporado à pressão reduzida e a mistura de sólidos resultante foi dissolvida em água deionizada saturada de argônio. A Figura 1 apresenta os espectros de EPR para as diferentes condições. Apesar do alargamento dos picos nos solventes orgânicos, observou-se um sinal característico de adutos de PBN composto por seis picos em todos os casos.^{22,23}

Como ésteres oxálicos em geral são bastante sensíveis à hidrólise, o sistema peróxi-oxalato é raramente empregado em meio aquoso. Porém, a evaporação do solvente durante a reação resultou em um sinal do aduto $\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$ muito melhor resolvido.

Diversos experimentos de controle foram realizados (Figura 2). Foi empregada uma mistura de TCPO, IMI, DPA em acetato de etila anidro ao

Figura 1. Espectros de EPR do sistema peróxi-oxalato em (A) acetato de etila, (B) acetonitrila e (C) água na presença de PBN como *spin-trap*. [TCPO]: 0,1 mM; [H_2O_2]: 10 mM; [IMI]: 1,0 mM; [DPA]: 1,0 mM; [PBN]: 50 mM

qual foi adicionado PBN em um excesso molar de 50 vezes em relação ao DPA. O experimento foi iniciado pela adição de TCPO aos outros reagentes, sempre na ausência de pelo menos um deles, e a imediata transferência de 200 μL de solução para a cela de EPR e realização da leitura do espectro. Na ausência de TCPO, nenhum sinal foi observado seja na presença ou ausência de DPA, peróxido de hidrogênio ou imidazol. Entretanto, quando apenas imidazol é retirado, observa-se a presença do sinal característico de aduto de PBN.

Segundo o mecanismo CIEEL, a presença de $\text{CO}_2^{\cdot -}$ depende da interação entre a 1,2-dioxetanodiona e DPA. Apesar disso, surpreendentemente, no sistema completo na ausência de DPA houve o surgimento de sinal similar ao observado no sistema completo.

A presença do sinal do aduto $\text{PBN-CO}_2^{\cdot -}$ na ausência de DPA foi investigada através de um estudo cinético, no qual as concentrações de PBN e DPA foram variadas. A adição de PBN à oxidação quimiluminescente de TCPO em presença de DPA provoca uma diminuição sistemática da área de emissão com o aumento da concentração do *spin trap*. Exemplos de curvas de emissão para uma série de quatro concentrações de DPA são apresentados na Figura 3, enquanto a Figura 4 apresenta a dependência da área de emissão em função da concentração de DPA enquanto varia-se a concentração de PBN presente.

Figura 2. Espectros de EPR do sistema peróxi-oxalato em acetato de etila na presença de PBN como spin-trap. [TCPO]: 0,1 mM; $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 10 mM; [IMI]: 1,0 mM; [DPA]: 1,0 mM; [PBN]: 50 mM. (A) Sistema completo; (B) ausência de TCPO; (C) ausência de TCPO e DPA; (D) ausência de DPA e H_2O_2 ; (E) ausência de DPA e (F) ausência de imidazol.

Figura 3. Cinética de decaimento da reação de TCPO com H_2O_2 catalisada por IMI em presença de DPA e PBN. [TCPO]: 0,1 mM; $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 10 mM; [IMI]: 1,0 mM; [DPA]: (A) 0,1 mM, (B) 0,5 mM, (C) 1,0 mM, (D) 5 mM; [PBN]: 0,01; 0,1; 1,0; 5,0 mM variando de cima para baixo.

Figura 4. Dependência da área de emissão em função da concentração de DPA na presença de diferentes concentrações de PBN. [TCPO]: 0,1 mM; $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 10 mM; [IMI]: 1,0 mM; [PBN] 0,05; 0,1; 1,0; 2,5; 5,0 mM variando de cima para baixo.

A partir dos resultados obtidos no estudo cinético, o possível seqüestro da fluorescência de DPA por PBN foi investigado utilizando o método de Stern-Volmer. Observa-se uma diminuição da área sob a curva de emissão de fluorescência de uma solução 0,01 mM de DPA em acetato de etila anidro conforme o aumento da concentração de PBN variando de 1 a 28,5 mM (Figura 5).

Figura 5. Espectro normalizado de fluorescência não corrigida de DPA em acetato de etila anidro na presença de PBN. [DPA]: 0,01 mM; [PBN]: 0,0; 1,0; 5,6; 9,9; 13,8; 17,3; 20,6; 23,5; 26,5; 28,6 mM. $\lambda_{EX} = 350$ nm, fenda de emissão 5 nm, fenda de excitação 5 nm, tensão da fotomultiplicadora 600 V, right angle.

Foram realizados experimentos de CG-MS e espectroscopia de massas para se obter o padrão de fragmentação dos componentes do sistema peróxi-oxalato na presença de PBN e tentar verificar diretamente a presença do aduto $PBN-CO_2^{\cdot-}$. A Figura 6 apresenta os espectros de massa dos componentes do sistema peróxi-oxalato completo contendo PBN obtidos através de um equipamento CG-MS. A Figura 7 apresenta o espectro de massa obtido através de injeção direta da mistura de reação contendo PBN ao espectrômetro de massas.

Figura 6. Espectro de massa dos componentes do sistema peróxi-oxalato durante o percurso da reação quimiluminescente. Os espectros foram obtidos após separação cromatográfica em cromatógrafo a gás da mistura de reação contendo PBN após 5 minutos de reação. [TCPO]: 0,1 mM; [H₂O₂]: 10 mM; [IMI]: 0,01 mM; [DPA]: 10 mM; [PBN]: 0,1 mM

Figura 7. Espectro de massa obtido através de injeção direta da mistura de reação contendo PBN após 5 minutos de reação. [TCPO]: 0,1 mM; [H₂O₂]: 10 mM; [IMI]: 0,01 mM; [DPA]: 10 mM; [PBN]: 0,1 mM

No espectro obtido por injeção direta, observa-se um pico com $m/z=221$, que pode ser atribuído ao aduto $\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$.

5.2 Discussão

O espectrômetro de ressonância paramagnética de elétron Bruker ER 200 D-SRC é de responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Ohara Augusto. Por sugestão da Prof^a. Augusto utilizou-se fenil-*tert*-butilnitrona (PBN) no lugar de *N*-óxido de dimetilpirrolidina (DMPO) como *spin trap* no estudo. DMPO é um líquido higroscópico que deve ser destilado à pressão reduzida antes do uso por conter impurezas que dificultam a interpretação dos espectros de seus adutos, enquanto PBN é um sólido, bastante solúvel em meio de solvente orgânico e cujo aduto $\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$ é bem caracterizado na literatura.

Já no primeiro experimento houve o surgimento de sinal, na forma de três bandas fragmentadas e largas (Figura 8, A). Connor *et al.* descrevem o efeito da presença de O_2 sobre PBN e seus adutos como uma dificuldade na obtenção de resultados experimentais satisfatórios em meio aquoso e, especialmente, orgânico.²⁴ Segundo o autor, oxigênio provoca alargamento dos picos e conseqüente diminuição da resolução do espectro e contribui para a formação de novos adutos de oxigênio, com sinais que interferem na interpretação dos espectros. Desta forma, após algumas tentativas borbulhando nitrogênio por dois minutos à mistura de reação, antes da adição de peróxido, foi possível observar as seis linhas características de adutos de PBN (Figura 8, B).

Figura 8. Espectro de EPR do sistema peróxi-oxalato em presença de PBN. (A) na presença de oxigênio; (B) saturado de nitrogênio. [TCPO]: 10 mM; [IMI]: 1 mM; $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 10 mM; [DPA]: 1 mM; [PBN]: 50 mM em acetato de etila anidro.

O borbulhamento feito diretamente em frascos de 500 μL é dificultado pela evaporação de solvente devido, mesmo à baixas temperaturas, aos volumes diminutos. Desta forma, todas as soluções foram preparadas em solventes borbulhados com argônio, mantidas sobre atmosfera inerte e borbulhadas por 2 minutos antes da adição de TCPO. As constantes de acoplamento hiperfino obtidos nos experimentos e os valores relatados na literatura são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre as constantes de acoplamento hiperfino obtidas em diversos solventes para o sistema peróxi-oxalato em presença de PBN e valores relatados na literatura para o aduto $\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$.

	a^N (mT)	a^H (mT)	a^N/a^H	Ref
Acetato de etila	1,329	0,195	6,815	
Acetonitrila	1,397	0,234	5,970	
$\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$ (Acetonitrila)	1,44	0,23	6,26	²²
$\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$ (Benzeno)	1,39	0,23	6,04	²²
Água	1,495	0,322	4,652	
$\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$ (Água)	1,59	0,46	3,46	²⁴

Não existem dados espectroscópicos na literatura a respeito do aduto $\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$ em acetato de etila. Desta forma, apesar da boa resolução do espectro, que permite a medida de constantes de acoplamento hiperfino, não é possível atribuir o sinal definitivamente ao aduto esperado, apesar da similaridade das constantes de acoplamento medidas ($a^N = 1,36$ mT e $a^H = 0,198$ mT) e as relatadas para solventes orgânicos (CHCl_3 : $a^N = 1,44$ mT e $a^H = 0,23$ mT, C_6H_6 : $a^N = 1,39$ mT e $a^H = 0,23$ mT). Optou-se por realizar o experimento em acetato de etila, evaporar o solvente após 10 minutos de seu início e adicionar água desmineralizada. O aduto $\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$ é bastante estável em meio aquoso, permitindo até o estudo *in vivo* da formação de $\text{CO}_2^{\cdot-}$.²³ Desta forma, seria possível comparar as constantes de acoplamento com aquelas relatadas na literatura. Os valores obtidos para as constantes de acoplamento em meio aquoso diferem daqueles relatados na literatura ($a^N = 1,54$ mT e $a^H = 0,33$ mT contra $a^N = 1,59$ mT e $a^H = 0,46$ mT relatados). Devido ao deslocamento observado em solventes orgânicos em relação à água, inicialmente cogitou-se que a presença residual de acetato de etila estivesse deslocando os sinais de forma a alterar as constantes de acoplamento. Contudo, um experimento foi realizado evaporando-se o acetato de etila em bomba de óleo, procedimento de alto risco considerando a presença de peróxido de hidrogênio que é sabidamente explosivo em estado sólido, e adicionando água desmineralizada saturada de argônio. Mesmo assim, as constantes permaneceram inalteradas em seus valores. O perfil do espectro indica a possibilidade de um outro aduto presente devido a três linhas residuais que são bastante aumentadas quando se utiliza uma solução de PBN preparada há mais de uma hora como *spin trap* (Figura 9).

Figura 9. Espectro de EPR do sistema peróxi-oxalato em presença de PBN em meio aquoso. (A) solução de PBN preparada 1 hora antes do experimento; (B) PBN recém preparado e saturado de nitrogênio. [TCPO]: 10 mM; [IMI]: 1 mM; [H₂O₂]: 10 mM; [DPA]: 1 mM; [PBN]: 50 mM em acetato de etila anidro.

Em condições experimentais ideais, o PBN reagiria apenas com o $\text{CO}_2^{\cdot-}$, formado através da reação entre o ACT e o IAE, que escapasse da gaiola de solvente. Dentro dos graus de liberdade do sistema, o escape dos íons radicais da gaiola de solvente diminuiria a probabilidade de aniquilação e conseqüente emissão de quimiluminescência. Porém, como o escape de $\text{CO}_2^{\cdot-}$ e do $\text{ACT}^{\cdot+}$ da gaiola de solvente leva somente a produtos no estado fundamental, o sequestro destes radicais não alteraria o rendimento quântico singlete da reação e a intensidade de emissão independeria da concentração de PBN (Esquema 4). Apesar disso, a presença de sinal na ausência de ACT (Figura 2), no caso DPA, e a diminuição do Φ_{CL} quando PBN é adicionado à reação indicam uma participação muito mais complexa do *spin trap* no sistema.

Esquema 4

Foram postuladas hipóteses para justificar o aparecimento de sinal na ausência de DPA. O *spin trap* poderia interagir diretamente com um dos componentes do sistema peróxi-oxalato, como o TCPO, DPA, imidazol ou peróxido de hidrogênio, o que poderia resultar em uma dependência da constante cinética de decaimento com a concentração de PBN (Esquema 5).

Esquema 5

Entretanto, pode-se observar que o k_{obs} não mostra variação significativa com a concentração de PBN, ao menos até que esta atinja 2,5 mM (Figura 10). Na presença de 5 mM de PBN observa-se um aumento de cerca de 2 vezes na constante de decaimento, porém, deve-se destacar que nestas condições, a intensidade de emissão é bastante reduzida, fato que leva a grande erros experimentais na determinação do k_{obs} . Deve-se mencionar, ainda, que em concentrações mais altas de PBN a intensidade é extremamente baixa, impedindo a obtenção de resultados confiáveis e que, conforme o esperado, k_{obs} não mostra dependência com a concentração de ativador. Destes resultados, pode-se concluir que, aparentemente, não há uma interação direta do PBN com os componentes do sistema.

Figura 10. Dependência entre a constante cinética de decaimento de primeira ordem (k_{obs}) com a concentração de PBN em diversas concentrações de DPA, em acetato de etila anidro. [TCPO]: 0,1 mM; [H₂O₂]: 10 mM; [IMI]: 1,0 mM; [PBN]: 0,05; 0,1; 1,0; 2,5; 5,0 mM; [DPA]: 0,1; 0,5; 1,0; 5 mM variando de cima para baixo.

Os resultados indicam que o aumento da concentração de PBN diminui o rendimento quântico singlete da reação, medido através da área de emissão (Figura 3 e Figura 4). Este efeito poderia ser atribuído, em um primeiro instante, a um seqüestro da fluorescência do ACT pelo *spin trap*, como evidenciado pelo gráfico de Stern-Volmer (Figura 5, Figura 11). Entretanto, um excesso de três ordens de grandeza de PBN sobre DPA ([PBN]:1 – 30 mM; [DPA]:0,01 mM) resulta em uma supressão de cerca de uma vez e meia sobre a intensidade de fluorescência, resultado incompatível com o efeito da

adição do *spin trap* sobre a quimiluminescência do sistema peróxi-oxalato, onde uma concentração de PBN igual a 29 mM resulta em uma diminuição da intensidade de quimiluminescência de 2,7 vezes, indicando que o efeito de seqüestro de fluorescência de DPA por PBN não pode ser considerado o efeito principal de PBN sobre os Φ_{Cl} .

Figura 11. Gráfico de Stern-Volmer do seqüestro da emissão de fluorescência de DPA por PBN. [DPA]: 0,01 mM; [PBN] 1 – 29 mM. $K_{SV} \sim 59 \text{ M}^{-1}$

Outra possibilidade é a reação de PBN com $\text{CO}_2^{\cdot-}$ dentro da gaiola de solvente (Esquema 6). Este evento levaria a dois caminhos de reação concorrentes: (i) a aniquilação dos íons radicais e conseqüente emissão e (ii) na formação do aduto $\text{PBN-CO}_2^{\cdot-}$, resultando na diminuição do rendimento quântico singlete e na diminuição da intensidade de emissão com o aumento da concentração de PBN (Esquema 6).

Esquema 6

Entretanto esta hipótese, além de ser pouco provável do ponto de vista cinético, não prediz dependência entre a concentração de DPA sobre o efeito de PBN sobre os Φ_{CL} , já que o aumento da concentração de DPA não interfere nos eventos ocorrendo dentro da gaiola de solvente. Para ilustrar a dependência da concentração de DPA sobre o efeito de PBN, foi graficada a razão entre os rendimentos quânticos na presença e ausência de PBN (Φ_{CL}/Φ_{PBN}) em função da concentração do *spin trap* em diversas concentrações de DPA, no que seria uma abordagem similar a um estudo de Stern-Volmer de supressão. Observa-se que em baixas concentrações de PBN, o seqüestro da emissão pelo *spin trap* segue a relação linear clássica de Stern-Volmer. Na medida em que a concentração de PBN é aumentada, o gráfico apresenta um desvio positivo do perfil de seqüestro, que pode ser justificado tanto como uma pré-associação no estado fundamental em altas concentrações de seqüestrador, no chamado seqüestro estacionário, quanto por um desvio da difusão livre em solução (Figura 12). Desta forma, os resultados indicam que esta hipótese poderia ser descartada.

Figura 12. Dependência da concentração de DPA sobre o efeito de PBN razão entre os rendimentos quânticos na presença e ausência do *spin trap*. [TCPO]: 0,1 mM; [IMI]: 1,0 mM, [H₂O₂]: 10 mM em acetato de etila anidro borbulhado com argônio.

Com a diminuição da concentração de DPA, a probabilidade de encontro entre PBN e a 1,2-dioxetanodiona aumenta em um processo controlado por difusão, levando a uma diminuição da emissão de quimiluminescência como observado na Figura 3.

O efeito da concentração de DPA sobre a diminuição dos Φ_{CL} na presença de PBN poderia ser explicado supondo-se que PBN concorra com DPA pelo intermediário de alta energia, atuando como um ativador. Esta hipótese baseia-se na semelhança entre o potencial de oxidação de PBN (1,47 V vs. SCE) e de ativadores típicos do sistema peróxi-oxalato (Figura 13).

Figura 13. Potencial de oxidação de diversos ativadores do sistema peróxi-oxalato e do PBN. Valores de potencial de meio pico em acetonitrila.^{40,47,48}

Neste caso, surgem duas possibilidades: (i) a via de reação convencional, na qual a 1,2-dioxetanodiona reage com DPA resultando, após diversos passos, em emissão e (ii) a reação entre a 1,2-dioxetanodiona com PBN formando $\text{CO}_2^{\cdot-}$ e o radical PBN, seguida da aniquilação, que resultaria na reciclagem do PBN com ausência de emissão, já que não foi possível medir fluorescência do *spin trap* em fluorímetros convencionais, ou na recombinação produzindo um aduto não radicalar no estado fundamental. Em ambos os casos, o rendimento quântico singlete diminui com o aumento da concentração de PBN e o aumento da concentração de DPA diminui o efeito do PBN (Esquema 7). Desta forma, pode-se inferir que o *spin trap* concorre com o DPA pelo IAE, uma reação que pode ser o caminho principal, apesar de seu E_{ox} consideravelmente mais alto, tendo em vista que este se encontra em uma concentração 50 vezes superior que o DPA. Com uma aproximação pode-se prever o comportamento de PBN como ativador sobre a cinética do sistema partindo dos valores de k_{cal}/k_D para PPO, que apresenta E_{ox} bastante próximo ao DPA. Para este ativador o valor de k_{cal}/k_D é $0,9 \cdot 10^{-2}$, enquanto que para DPA o valor é de $3,4 \cdot 10^{-2}$. Esta diferença indica que seria necessária uma diferença de 3,8 vezes na concentração de PPO, e com aproximação PBN, para que sua atividade fosse comparada com DPA.

Esquema 7

Através de experimentos de CG-MS não foi possível observar o pico cromatográfico referente ao aduto. Entretanto, os experimentos empregando MS com injeção direta, indicaram a presença de um fragmento em m/z 221, que se interpretado em combinação com outros fragmentos de massa de m/z 177, 164, 121 e 57, poderia ser atribuído ao pico molecular (M^+) do aduto PBN-CO_2^- . O Esquema 8 apresenta um possível padrão de fragmentação para o aduto, que justificaria a atribuição.

Esquema 8

Apesar dos fortes indícios a favor da formação do aduto, experimentos de HPLC-MS serão realizados na tentativa de obter o espectro de massa do aduto isolado, já que o pico em m/z 221 não pode ser associado a uma única espécie considerando um experimento que envolve um sistema tão complexo.

Desta forma, foram obtidas evidências diretas, apesar de ainda não completamente confirmados, da ocorrência de dióxido de carbono radical ânion como intermediário do sistema peróxi-oxalato, o que é um forte argumento a favor do mecanismo CIEEL para este sistema.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Purificação de reagentes e solventes

5.3.1.1 Solventes orgânicos

Os solventes orgânicos foram tratados de forma convencional, como relatado por Perrin e Armarego.²⁵ *Acetonitrila (ACN)* foram destilada à pressão reduzida na presença de CaH_2 (25 g/L) e armazenados sobre peneira molecular de 4 Å. *Acetato de Etila (AcOEt)* foi destilada na presença de CaCl_2 (25 g/L) e armazenada sobre peneira molecular de 4 Å.

5.3.1.2 Reagentes

Os reagentes comerciais foram obtidos em alto grau de pureza (>96%) e foram utilizados sem purificação prévia, exceto quando indicado.

5.3.2 Equipamentos

5.3.2.1 Espectroscopia ressonância paramagnética de elétron (EPR)

Os espectros de ressonância paramagnética de elétron foram obtidos em um espectrômetro Bruker ER 200 D-SRC. Condições Experimentais EPR: centro de campo 3455 G, frequência: 9,721 GHz, potência: 19.922 mW, ganho: 1,105, fase 0 °, harmônico:1; frequência modulada: 100 KHz, amplitude modulada: 1 G, constante de tempo: 327,680 ms; conversão: 327,680 ms, sweep time: 335.544 s, sweep width: 100 G; amplitude de modulação, 0,53 G; potência de microonda, 20 mW; tempo de varredura: 40 min; constante de tempo: 8 s.

5.3.2.2 Espectrometria de massa

Os espectros de massa de baixa resolução (LRMS) foram registrados em um espectrômetro de massa Shimadzu modelo GC/MS-QP5000 conectado a um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC-17A equipado com uma coluna SPB-5 de 30 m.

5.3.3 Procedimentos e soluções-estoque

5.3.3.1 Preparação da solução de peróxido de hidrogênio em éter etílico

Extraem-se 20 mL de uma solução aquosa 60 % de peróxido de hidrogênio com éter etílico (2 × 20 mL). A fase etérea e seca sobre MgSO_4 na geladeira por cerca de 10

horas. Em seguida, a solução é filtrada e a concentração de peróxido é determinada espectrofotometricamente.

5.3.3.3 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

As concentrações das soluções peroxídicas foram determinadas através do seguinte procedimento: a uma cubeta de 3mL (caminho ótico de 1 cm) contendo 2 mL de solução 0,05 M de iodeto de potássio em tampão acetato ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ pH = 3,8; $\mu = 0,01$) adiciona-se 6 μL de uma solução 10^{-5} M de peroxidase de raiz forte (HRP). Em seguida mede-se a variação da absorbância após a adição de 10 μL da solução de H_2O_2 em éter etílico previamente diluída em água (1:100). A concentração peroxídica é calculada a partir do valor da absorbância a 353 nm, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de $2,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.4 Referências Bibliográficas

1. Chandross, E. A. (1963). "A new chemiluminescent system". *Tetrahedron Lett.*: 761.
2. Rauhut, M. M., Sheehan, D., Clarke, R. A., Roberts, B. G., Semsel, A. M. (1965). "Chemiluminescence from reaction of 9-chlorocarbonyl-10-methylacridinium chloride with aqueous hydrogen peroxide". *J. Org. Chem.* **30**: 3587.
3. Rauhut, M. M., Semsel, A. M., Roberts, B. G. (1966). "Reaction rates quantum yields and partial mechanism for chemiluminescent reaction of 3-aminophthalhydrazide with aqueous alkaline hydrogen peroxide and persulfate". *J. Org. Chem.* **31**: 2431.
4. Rauhut, M. M., Roberts, B. G., Semsel, A. M. (1966). "A study of chemiluminescence from reactions of oxalyl chloride hydrogen peroxide and fluorescent compounds". *J. Am. Chem. Soc.* **88**: 3604.
5. Capomacchia, A. C., Jennings, R. N., Hemingway, S. M., Dsouza, P., Prapaitrakul, W., Gingle, A. (1987). "Native peroxyoxalate chemiluminescence from the reaction of bis(2,4-dinitrophenyl) oxalate and hydrogen peroxide perturbed by nonfluorophores". *Anal. Chim. Acta* **196**: 305.
6. Devasto, J. K., Grayeski, M. L. (1991). "Investigation of the quenching of peroxyoxalate chemiluminescence by amine substituted compounds". *Analyst* **116**: 443.
7. Gooijer, C., Vanzoonen, P., Velthorst, N. H., Frei, R. W. (1988). "On the mechanism of peroxyoxalate Cl - Quenched Cl as a detection method in HPLC". *J. Biolumin. Chemilumin.* **2**: 207.
8. Gooijer, C., Vanzoonen, P., Velthorst, N. H., Frei, R. W. (1989). "On the mechanism of peroxyoxalate chemiluminescence - Quenched chemiluminescence as a detection method in HPLC". *J. Biolumin. Chemilumin.* **4**: 479.
9. Hanaoka, N., Tanaka, H., Nakamoto, A., Takada, M. (1991). "Kinetic study of background emission from peroxyoxalate chemiluminescence reaction and application to the improvement of detection limits in liquid chromatography". *Anal. Chem.* **63**: 2680.
10. Kang, S. C., Lee, S. K., Song, H. S., Kim, K. J. (1989). "Nature of intermediates in the peroxyoxalate chemiluminescent reactions". *Bull. Korean Chem. Soc.* **10**: 408.
11. Kang, S. C., Kim, K. J. (1990). "Excitation mechanism of fluorescent polycyclic aromatic amines and polycyclic aromatic-hydrocarbons in peroxyoxalate chemiluminescence reactions". *Bull. Korean Chem. Soc.* **11**: 224.
12. Kwakman, P. J. M., Dejong, G. J., Brinkman, U. A. T. (1992). "Mechanism of the peroxyoxalate chemiluminescence reaction". *TrAC, Trends Anal. Chem.* **11**: 232.

13. Nakamura, M. M., Saraiva, S. A., Coichev, N. (1999). "Parameters affecting the peroxyoxalate chemiluminescence". *Anal. Lett.* **32**: 2471.
14. Stevani, C. V., Silva, S. M., Baader, W. J. (2000). "Studies on the mechanism of the excitation step in peroxyoxalate chemiluminescence". *Eur. J. Org. Chem.* : 4037.
15. Stigbrand, M., Jonsson, T., Ponten, E., Irgum, K., Bos, R. (2001). *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*. Marcel Dekker, New York.
16. Bos, R., Barnett, N. W., Dyson, G. A., Lim, K. F., Russell, R. A., Watson, S. P. (2003). "Studies on the mechanism of the peroxyoxalate chemiluminescence reaction: Part I. Confirmation of 1,2-dioxetanedione as an intermediate using ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Anal. Chim. Acta* **502**: 141.
17. Schuster, G. B., Dixon, B., Koo, J. Y., Schmidt, S. P., Smith, J. P. (1979). "Chemical mechanisms of chemiluminescence and bioluminescence - Reactions of high-energy content organic compounds". *Photochem. Photobiol.* **30**: 17.
18. Schuster, G. B. (1979). "Chemiluminescence of organic peroxides - Conversion of ground state reactants to excited state products by the chemically-initiated electron exchange luminescence mechanism". *Acc. Chem. Res.* **12**: 366.
19. Schuster, G. B., Horn, K. A. (1982). Chemically-initiated electron exchange luminescence. *Em "Chemical and Biological Generation of Excited States"* (Adam, W., Cilento, G., eds.), p. 229. Academic Press, New York.
20. Lechtken, P., Turro, N. J. (1974). "Peroxyoxalate chemiluminescence - Chemiexcitation of high-energy excited states in acceptor molecules". *Mol. Photochem.* **6**: 95.
21. Catalani, L. H., Wilson, T. (1989). "Electron transfer and chemiluminescence - Two inefficient systems: 1,4-dimethoxy-9,10-diphenylanthracene peroxide and diphenoyl peroxide". *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 2633.
22. Rehorek, D., Benedix, M., Thomas, P. (1977). "Photocatalytic systems .13. Detection of oxalate free-radicals by EPR spin trapping in the photolysis of tris(oxalato)iron(III)". *Inorg. Chim. Acta* **25**: L100.
23. Vasquez-Vivar, J., Denicola, A., Radi, R., Augusto, O. (1997). "Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion". *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 786.
24. Connor, H. D., Thurman, R. G., Galizi, M. D., Mason, R. P. (1986). "The formation of a novel free-radical metabolite from CCl_4 in the perfused-rat-liver and *in vivo*". *J. Biol. Chem.* **261**: 4542.
25. Armarego, W. L. F., Perrin, D. D. (1998). *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth-Heinemann, Oxford.

Reação de luminol com peróxido de hidrogênio na presença de hemina: Novas perspectivas para uma antiga reação

Tanto o estudo mecanístico quanto aplicações analíticas que envolvem *bio* e *quimiluminescência* demandam medidas de emissão de luz. Para este fim, utilizam-se luminômetros, que compreendem uma fotomultiplicadora – dispositivo de medida de corrente ou contador de fótons – e um compartimento de amostra, que mantém uma cubeta ou outro recipiente.¹

A necessidade de realização de um grande número de experimentos simultâneos de forma semi-automática resultou na popularização, na última década, de luminômetros de placas.² Estes equipamentos possuem como compartimento de amostra uma cavidade que permite a inserção de uma placa contendo de 96 a 384 poços de reação. A característica mais importante deste tipo de equipamento é o chamado "*cross-talk*", que determina que a emissão em poços vizinhos é medida independentemente, sem "vazamento" de luz. Além disso, a presença de injetores automáticos de alta pressão garante uma boa mistura entre os reagentes, eliminando a necessidade de agitação. Estas características garantem o uso *sob demanda* deste tipo de equipamento o que promove, além de seu potencial para a pesquisa, sua viabilidade comercial.²

Medidas de intensidade de luz obtidas através do uso de fotomultiplicadoras são relatadas em unidades relativas de luz (RLU), que constituem unidades arbitrárias que dependem da configuração particular de um dado equipamento.^{1,2} Isso se deve às dificuldades técnicas envolvidas na calibração de sensibilidade absoluta a fótons do sistema de detecção, da qual depende o cálculo de rendimentos quânticos absolutos, permitindo a conversão de RLU para E mol^{-1} .¹

O fluxo de fótons padrão é uma fonte de radiação aferida em relação à radiação do corpo negro. Entretanto, a emissão obtida por estas *lâmpadas calibradas* é muitas

ordens de magnitude superior àquelas observadas em reações quimiluminescentes típicas; além disso, fatores geométricos intrínsecos à fonte – em relação à posição do sistema de detecção – e fatores relacionados à diferenças entre o índice de refração do ar em relação aos apresentados por soluções em fase condensada, tornam difícil a utilização deste sistema de *calibração primária*.^{1,3}

Apesar disso, *padrões secundários* de luz podem ser empregados na calibração de fotodetectores. Para este propósito utilizam-se reações quimiluminescentes em condições padrão, o que garante uma precisão de cerca de 25% em relação à calibração primária. A vantagem deste método é que, apesar de seu erro intrínseco, os rendimentos quânticos calculados podem ser relacionados diretamente à radiação do corpo negro.^{1,3-5}

Lee e Seliger descrevem um procedimento experimental para a calibração de fotomultiplicadoras usando um padrão secundário que evita o uso de radioisótopos. O método é baseado na emissão de quimiluminescência resultante da oxidação de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinodiona ou 3-aminoftalidrazida) por peróxido de hidrogênio, na presença de hemina ou heme-proteínas em meio aquoso alcalino pH~11,5, e apresenta $\phi = 0,0124$.³⁻⁶

Em condições de excesso de peróxido, o número de fótons emitidos na reação depende somente da concentração de luminol. Desta forma, o tipo e a atividade do catalisador não alteram o rendimento quântico da reação afetando somente a cinética de decaimento.⁷⁻¹¹ O uso de hemina, protoferriporfirina de ferro (III), como catalisador desta reação não é recente.^{12,13} Entretanto, sua utilização resulta em baixa reprodutibilidade das cinéticas de emissão, fato que é muitas vezes associado à formação de dímeros ligados por pontes μ -oxo com atividade catalítica diferente da espécie monomérica. Apesar disso, foi obtido recentemente por nosso Grupo de Pesquisa um protocolo para a preparação de soluções de hemina que garante uma proporção constante entre monômeros e dímeros e, com isso, viabiliza o uso deste catalisador também em estudos cinéticos.¹⁴

Inicialmente concebido para a utilização em luminômetros de cubetas, este método depende de reagentes com baixa durabilidade em solução, o que exige que a solução estoque de luminol seja preparada a cada dez dias, e as soluções de peróxido de hidrogênio e hemina imediatamente antes do experimento.¹⁴ Apesar de adequado também para a calibração de luminômetros de placa, optou-se por desenvolver um novo método que proporcionasse um aumento na durabilidade dos reagentes.

A reação quimiluminescente de luminol na presença de peróxidos foi explorada em diversas condições, inclusive em sistemas organizados micelares.^{7,15,16} Contudo,

estudos envolvendo matrizes poliméricas são inéditos. O desenvolvimento de um método que permita o armazenamento de luminol e de um catalisador dentro de uma matriz polimérica favoreceria a conservação dos reagentes, permitindo tanto o desenvolvimento de um método de calibração de luminômetros de placa de uso comercial, como também a automatização de inúmeros protocolos utilizados atualmente para determinação de oxidantes e redutores de relevância biológica. Para este fim, foi selecionada a polivinilpirrolidona (PVP) como polímero base, já que o intumescimento deste polímero se dá em meio aquoso e o processo de reticulação pode ser realizado através de irradiação na região UV, como descrito por Lopérgolo e colaboradores.¹⁷

Neste capítulo são descritos os resultados obtidos no desenvolvimento e padronização de um sistema quimiluminescente composto por luminol, hemina e peróxido de hidrogênio na presença de PVP, para ser utilizado na calibração de fotomultiplicadoras de luminômetros de placa, na medida de concentrações de peróxido de hidrogênio e na medida de compostos redutores com possível atividade antioxidante.

6.1 Resultados

Uma fotomultiplicadora de um *luminômetro Berthold EG&G Lumimat 96V* foi calibrada utilizando o método convencional descrito por Lee e Seliger, que emprega a reação quimiluminescente de luminol com peróxido de hidrogênio na presença de hemina como catalisador, em meio alcalino de pH 11,6. Neste procedimento, a um poço de microplaca adicionou-se uma solução contendo 1 μM de luminol e 0,1 mM de peróxido de hidrogênio. Em seguida, a reação foi iniciada através da adição – com o auxílio de um injetor automático – de uma solução de hemina em concentração final 77 nM. A emissão de quimiluminescência resultante decai durante cerca de 150 s, findos os quais uma nova solução de hemina, 7,7 μM é adicionada. A emissão resultante desta nova adição é menos intensa do que a inicial e novas adições de solução 7,7 μM de hemina devem ser feitas até que todo o luminol tenha sido consumido (Figura 1). Através deste procedimento foi possível calibrar a fotomultiplicadora do equipamento de forma a estabelecer um controle sobre os experimentos em matriz polimérica reticulada.

Figura 1. Curva de decaimento obtida pela adição sucessiva de hemina a uma solução de luminol e peróxido de hidrogênio em solução alcalina. As setas indicam a adição de hemina. [Luminol]: 1 μM ; [H_2O_2]: 0,1 mM; [Hemina]: solução 1: 77 nM; solução 2: 7,7 μM , em tampão fosfato pH 11,6. Intervalo entre leituras de intensidade de emissão: 0,5 s.

Como controle adicional, foram realizados experimentos de comparação entre o sistema luminol/hemina/ H_2O_2 em meio aquoso e em matriz polimérica reticulada. Para isso, foram utilizadas microplacas de cor branca, nas quais adicionaram-se aos poços, (i) 200 μL de uma solução contendo 1 mM de luminol, 7,7 μM de hemina em tampão fosfato pH 11,6 ou (ii) 200 μL da mesma solução acrescida de 84 nM (100 mg/mL) de PVP-K90. Esta condição foi extensivamente utilizada em experimentos de rotina em nosso laboratório e resulta em alta intensidade de emissão, viabilizando a melhor

comparação entre os sistemas. A placa contendo a solução com PVP foi irradiada sob atmosfera de argônio por 2 horas, utilizando uma lâmpada Heraeus de baixa pressão de Hg tipo caneta (20 W, $\lambda_{\text{em}} = 254 \text{ nm}$; 200 mm de comprimento), que produz $11,5 \text{ MW/cm}^2$ de fluxo radiante sobre a placa ou $1,16 \text{ cal/s}$ sobre uma superfície plana.¹⁷ Em seguida, a placa contendo o gel resultante da irradiação foi mantida sob refrigeração dentro de um recipiente plástico saturado de argônio durante a noite, o que resultou na obtenção de um filme de cerca de meio milímetro de espessura. As placas foram individualmente depositadas na cavidade do luminômetro e a reação foi iniciada através da injeção, com o auxílio de um injetor automático, de $200 \mu\text{L}$ de uma solução de peróxido de hidrogênio $10 \mu\text{M}$ em água. O aspecto típico da cinética de decaimento, acompanhada durante 5 horas, é apresentado na Figura 2.

Figura 2. Aspecto da cinética de decaimento obtida para o sistema luminol/hemina/peróxido de hidrogênio na presença de PVP e em meio aquoso (padrão). [Luminol]: 1 mM ; [Hemina]: $7,7 \mu\text{M}$; [H_2O_2]: $10 \mu\text{M}$; 84 nM (100 mg/mL) de PVP-K90 em tampão fosfato pH 11,6. Volume final $200 \mu\text{L}$.

Observou-se que, nestas condições, a irradiação resulta em uma diminuição de cerca de 10% na intensidade máxima de emissão de quimiluminescência, o que – a princípio – não compromete sua utilização como sistema de calibração já que o número de fótons gerados pelo sistema é definido em função do sistema de calibração em meio aquoso. Desta forma, foi realizado um experimento de calibração, análogo ao realizado em meio aquoso, empregando a matriz de PVP reticulado. Para isso foram preparadas placas contendo $1 \mu\text{M}$ de luminol em tampão fosfato pH 11,6 em matriz de PVP reticulado. A ausência de hemina se justifica pela necessidade de se reproduzirem fidedignamente as condições de calibração utilizadas no sistema aquoso, no qual sucessivas aplicações de hemina garantem o consumo total do luminol. Nestes termos, o experimento foi realizado através da adição de peróxido de hidrogênio ($0,1 \text{ mM}$) seguida de sucessivas aplicações de hemina ($7,7 \mu\text{M}$), e resultou em emissão com aspecto semelhante ao obtido no sistema aquoso na ausência de PVP (Figura 3).

Figura 3. Curva de decaimento obtida pela adição sucessiva de hemina a uma solução de luminol e peróxido de hidrogênio em solução alcalina. As setas indicam a adição de hemina. [Luminol]: 1 μM ; [H_2O_2]: 0,1 mM; [Hemina]: 7,7 μM , em tampão fosfato pH 11,6. Intervalo entre leituras de intensidade de emissão: 5 s.

Observou-se uma redução na área sob a curva de emissão de 4% em relação aos valores obtidos com o sistema sem PVP. Entretanto, se apenas a primeira adição de hemina é considerada – simulando a presença de hemina na matriz polimérica – a emissão de quimiluminescência é reduzida, em média, de 14% em relação ao sistema aquoso sem PVP. Com a viabilidade do uso de matriz de PVP reticulado para armazenar uma solução de luminol e hemina garantida, garantindo seu uso na calibração de luminômetros de placa, o passo seguinte consistiu na verificação da durabilidade dos reagentes nestas condições. Para isso, foram preparadas 3 placas nas quais 10 poços foram preenchidos com 200 μL de uma solução de luminol (1 μM), hemina (7,7 μM) e PVP (84 nM) em meio aquoso alcalino, e irradiadas. Determinou-se, em um período de 3 meses, a área de emissão obtida após adição de 200 μL de H_2O_2 0,1 mM (Figura 4).

Figura 4. Média das áreas de emissão do sistema luminol/hemina/ H_2O_2 em matriz de PVP. Número final de mols: $2,0 \cdot 10^{-10}$ mol de luminol, $1,5 \cdot 10^{-9}$ mol de hemina, $2,0 \cdot 10^{-8}$ mol de hemina e $1,7 \cdot 10^{-11}$ mol de PVP. As barras de erro indicam o desvio padrão de três medidas.

Observou-se que durante o primeiro mês o ϕ_{CL} se manteve praticamente constante. Entretanto, após este período – mesmo mantendo-se a placa sob atmosfera de argônio – observa-se uma diminuição contínua dos rendimentos que, entretanto, no período de três meses foi inferior a 20%.

Em seguida, foram realizados experimentos onde as concentrações de todos os reagentes foram variadas simultaneamente. O estudo da dependência das constantes cinéticas, das áreas e das intensidades máximas de emissão sobre a concentração de peróxido de hidrogênio, hemina e luminol, em meio aquoso alcalino já havia sido realizado por nosso grupo como parte do estudo mecanístico desta reação.¹⁴ Na matriz polimérica, entretanto, o objetivo era verificar se a presença de PVP aliado ao processo de irradiação modificariam as características do sistema. Para acelerar e aprimorar o processo, foi utilizado o planejamento fatorial de experimentos de dois níveis (2^3). Foi traçado um cubo cujos vértices correspondiam a diferentes concentrações dos reagentes (Figura 5). O eixo X descreve a variação da concentração de hemina de 0,08 a 7,70 μ M, o eixo Z descreve a variação de luminol entre 1,0 e 10 mM, enquanto no eixo Y estão definidas as variações na concentração de peróxido de hidrogênio entre 0,01 e 1,00 mM. Foram feitas seis séries de 8 experimentos independentes com a concentração de hemina, luminol e peróxido correspondentes aos vértices do cubo. A concentração de PVP foi mantida constante, já que as condições ótimas para sua reticulação (tempo e potência de irradiação e concentração de polímero) são descritas na literatura.¹⁷

Figura 5. Cubo de variáveis do sistema luminol/hemina/peróxido de hidrogênio.

A partir dos valores de área e intensidade máxima de emissão e constante cinética de decaimento obtidos nas oito posições do cubo, as chamadas *variáveis dependentes*, é possível com o auxílio do programa *Statistica* obter equações capazes de descrever o comportamento de cada reagente (*variáveis independentes*) e sua integração com os

outros componentes, em relação ao sistema todo. Quando graficadas, estas equações resultam em planos de ajuste que, para o sistema em estudo, apresentam o efeito da concentração de dois reagentes sobre uma determinada variável dependente enquanto a concentração do terceiro reagente é mantida constante. Desta forma, alterando o valor de uma das variáveis da equação de ajuste, é possível – dependendo do conjunto de dados e dentro de certos limites estatísticos – prever o comportamento do sistema sem a necessidade da realização de experimentos adicionais.

Em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (0,01 mM, Figura 6A), tanto o aumento da concentração de luminol, quanto de hemina têm apenas um pequeno efeito sobre a área de emissão. O mesmo acontece em baixas concentrações de hemina 0,077 μ M, condição na qual o aumento da concentração de luminol ou peróxido não altera significativamente a área de emissão (Figura 6C). Quando uma alta concentrações de peróxido (1 mM) é utilizada, a área sobre emissão atinge seu valor máximo em altas concentrações de luminol (10 mM) e hemina (7,7 μ M, Figura 6B). Analogamente, em altas concentrações de hemina (7,7 mM), observa-se um aumento significativo da área de emissão em altas concentrações de peróxido de hidrogênio (1 mM) e luminol (10 mM, Figura 6D). Nas duas concentrações de luminol utilizadas (1 e 10 mM), entretanto, apesar do aumento independente da concentração de peróxido ou da concentração de hemina não resultar em aumento significativo da área de emissão, o efeito combinado entre os dois reagentes é bastante expressivo, principalmente em altas concentrações de luminol (Figura 6E e Figura 6F).

Figura 6. Gráficos de variáveis em função da área de emissão. As regiões mais escuras da superfície de ajuste indicam valores mais altos. Os pontos abertos indicam os valores experimentais obtidos para os oito vértices do cubo de planejamento. (A) $[H_2O_2]$: 0,01 mM; (B) $[H_2O_2]$: 1 mM; (C) [Hemina]: 0,077 μ M; (D) [Hemina]: 7,7 μ M; (E) [Luminol]: 1 mM; (F) [Luminol]: 10 mM.

Adicionalmente, foi avaliado o efeito da variação das concentrações dos reagentes sobre as constantes cinéticas de decaimento. Em baixas concentrações de H_2O_2 (0,1 mM), o valor da constante observada aumenta conforme o aumento da concentração de hemina, em qualquer concentração de luminol (Figura 7A). Quando a concentração de peróxido é aumentada (1 mM) todavia, não se observa um efeito significativo do aumento da concentração de nenhum dos outros reagentes sobre o valor das constantes (Figura 7B). Um comportamento semelhante é observado para hemina. Em baixas concentrações (0,077 μ M), o aumento da concentração de peróxido aumenta o valor da constante de decaimento, enquanto o luminol não produz nenhum efeito expressivo (Figura 7C). Quando a concentração de hemina é aumentada para 7,7 μ M tanto o aumento da concentração de peróxido quanto de luminol não alteram significativamente os valores das constantes, sendo que esta apresenta seu valor máximo quando a concentração dos outros dois reagentes é mais baixa (Figura 7D). Como esperado, em qualquer concentração de luminol (1 ou 10 mM) observa-se um grande efeito de H_2O_2 e de hemina

sobre os valores das constantes de decaimento (Figura 7E e Figura 7F). Em baixas concentrações de luminol, o aumento da concentração de hemina acarreta em um aumento no valor da constante cinética mais pronunciado do que o observado ao variar-se a concentração de H_2O_2 . Em altas concentrações de luminol, o mesmo tipo de efeito ainda é observado, entretanto, o efeito combinado entre hemina e peróxido de hidrogênio é mais acentuado.

Figura 7. Gráficos de variáveis em função da constante de decaimento observada (k_{obs}). Os valores relatados representam $k_{obs} \times 10^2$. As regiões mais escuras da superfície de ajuste indicam valores mais altos. Os pontos abertos indicam os valores experimentais obtidos para os oito vértices do cubo de planejamento. (A) $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 0,01 mM; (B) $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 1 mM; (C) $[\text{Hemina}]$: 0,077 μM ; (D) $[\text{Hemina}]$: 7,7 μM ; (E) $[\text{Luminol}]$: 1 mM; (F) $[\text{Luminol}]$: 10 mM

O efeito das variáveis independentes sobre a intensidade máxima de emissão também foi investigado. Em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (10 μM) e de hemina (0,08 μM), não se verifica efeito significativo da concentração dos reagentes sobre a intensidade máxima de emissão (Figura 8A e Figura 8C). Todavia, em concentrações altas destes reagentes (H_2O_2 1 mM e hemina 7,7 μM), um efeito combinado entre as a concentração de luminol e a outra variável independente se torna evidente (Figura 8B e Figura 8D). Além disso, é possível constatar um efeito combinado entre peróxido de hidrogênio e hemina em qualquer concentração de luminol, levemente mais pronunciado em concentrações de luminol 10 mM (Figura 8E e Figura 8F)

Figura 8. Gráficos de variáveis em função da intensidade máxima de emissão (I_{max}). As regiões mais escuras da superfície de ajuste indicam valores mais altos. Os pontos abertos indicam os valores experimentais obtidos para os oito vértices do cubo de planejamento. (A) [H_2O_2]: 0,01 mM; (B) [H_2O_2]: 1 mM; (C) [Hemina]: 0,077 μM ; (D) [Hemina]: 7,7 μM ; (E) [Luminol]: 1 mM; (F) [Luminol]: 10 mM

Com o comportamento do sistema bem estabelecido em diversas condições vislumbrou-se a possibilidade de utilização do método não somente como sistema de calibração de luminômetros de placas, mas também como método analítico. O uso do sistema luminol/hemina em métodos de detecção de peróxido de hidrogênio é bastante antigo, seja em amostras de relevância ambiental, como em água de chuva, ou na detecção indireta de biomoléculas, como no sistema glicose/glicose oxidase, cuja oxidação enzimática resulta na formação de peróxido de hidrogênio.⁷ Entretanto, a perspectiva de um método quimiluminescente automatizado e de longa durabilidade para a detecção de peróxido de hidrogênio é inédita.

Apesar dos planos de ajuste, obtidos com o planejamento fatorial, permitirem a previsão do efeito da alteração da concentração dos reagentes sobre diferentes propriedades do sistema, conforme o valor da concentração se distancia daquele utilizado para o cálculo do ajuste observa-se um aumento do erro do valor calculado. Desta forma, cálculos de limite de detecção devem ser realizados da forma convencional, e valores obtidos através de planejamento fatorial não devem ser adotados sem uma análise criteriosa. Nestes termos, soluções de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações foram adicionadas, através de injeção automática, aos poços contendo o filme de PVP, luminol e hemina. Os experimentos foram realizados em triplicata em uma mesma placa, em séries de três concentrações de peróxido – correspondendo ao número de injetores automáticos do equipamento. A concentração mínima de peróxido na qual se observa dependência linear com a área de emissão, foi $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 9).

Figura 9. Dependência entre a concentração de peróxido de hidrogênio e a área de emissão de quimiluminescência. [Luminol]: 1 mM; [Hemina]: 7,7 μM ; 84 nM (100 mg/mL) de PVP-K90 em tampão fosfato pH 11,6. São apresentados os valores médios de três medidas $\pm$ desvio padrão de três medidas.

O uso de luminol na determinação de oxidantes resultou no desenvolvimento de métodos que possibilitam quantificar espécies ativas de oxigênio e nitrogênio de

relevância biológica. Pode-se inferir, a partir de estudos mecanísticos, que a quimiluminescência de luminol depende diretamente da presença de espécies radiculares no meio de reação. Por analogia, espécies químicas redutoras em um sistema químico contendo luminol concorrem com o substrato quimiluminescente pelo(s) oxidante(s) presente(s), o que resulta em diminuição da intensidade de emissão. Este princípio foi exaustivamente empregado no desenvolvimento de métodos para a detecção de antioxidantes e outras substâncias antiradicares com provável potencial biológico.^{7,18-28} Entretanto, até o momento não existe um método quimiluminescente automatizado para a realização de ensaios para a determinação da atividade antiradicalar de substâncias químicas isoladas e de misturas complexas.

O sistema luminol/hemina/H₂O₂ foi a base para o recente desenvolvimento de um ensaio para determinação de atividade antiradicalar por nosso Grupo de Pesquisa.²⁹ A automatização deste ensaio poderia vir da imobilização de luminol e hemina em uma matriz de PVP reticulado, já que esta abordagem permite o uso de luminômetro de placas, o que proporciona a realização de – pelo menos – 96 experimentos simultâneos. Além disso, a presença do polímero elimina a necessidade de preparação de soluções de luminol e hemina por um mês, reduzindo os custos de análise – graças à menor demanda de reagentes, e permitindo o seu uso continuado durante este período.

Este estudo se encontra em fase preliminar, e apenas um composto sintético com atividade antiradicalar foi investigado: o Trolox (ácido 2-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil) cromanóico). Inicialmente desenvolvido como um análogo hidrosolúvel da vitamina E (α -tocoferol) sua atividade foi – arbitrariamente – determinada como 2, ou seja, por definição uma molécula de trolox é capaz de seqüestrar duas espécies radiculares.³⁰⁻³² Desta forma, trolox é o padrão de grande parte dos métodos de determinação de atividade antioxidante.

O efeito da adição de diversas concentrações de trolox antes da adição de peróxido de hidrogênio ao sistema foi estudado. Ao poço da microplaca foram adicionadas, sob atmosfera inerte, quatro soluções de trolox em meio alcalino em diferentes concentrações: 1, 5, 10 e 30 μ M. A Figura 10 apresenta o efeito da adição de trolox sob a cinética do sistema luminol/hemina/H₂O₂ em matriz de PVP reticulado.

Figura 10. Efeito da adição de trolox sob a cinética de emissão do sistema luminol/hemina/peróxido de hidrogênio em presença de PVP. [Luminol]: 1 mM; [Hemina]: 7,7 μM ; [H_2O_2]: 10 μM ; 84 nM (100 mg/mL) de PVP-K90 em tampão fosfato pH 11,6.

Observou-se supressão de emissão em todos os casos, indicando uma dependência entre a concentração deste antioxidante e a emissão de quimiluminescência do sistema contendo PVP reticulado.

6.2 Discussão

Não existe consenso a respeito do mecanismo que leva à quimiluminescência do luminol em meio aquoso, especialmente no que se refere à etapa de quimiexcitação. O ponto de convergência entre as diversas propostas é a sugestão de que a reação entre luminol e oxidantes, em meio alcalino, resultaria na formação de um ânion radical que é rapidamente oxidado a uma diazaquinona. Ao reagir com peróxido de hidrogênio, esta diazaquinona sofreria eliminação de nitrogênio, com abertura de anel, o que poderia levar à formação de um 3-aminofalato no estado eletronicamente excitado singlete, que ao decair para o estado fundamental emite luz (Esquema 1).^{13,33-38}

Esquema 1

A reação quimiluminescente de luminol com peróxido de hidrogênio catalisada por hemina pode ser representada, de maneira simplificada, em três passos que resultam na formação de um intermediário reativo que leva à quimiexcitação e conseqüente emissão de luz. A reação entre hemina e peróxido de hidrogênio gera, em uma reação

lenta, um cátion radical da porfirina, conhecido como hemina-Fe(V), análogo ao composto I da peroxidase de raiz forte (HRP). Em seguida, em uma reação rápida, esta hemina-Fe(V) reage com a hemina-Fe(III), originando duas moléculas de hemina-Fe(IV), uma espécie análoga ao composto II. O ânion luminol reagindo com esta espécie produz luminol ânion-radical, que é oxidado tanto por peróxido de hidrogênio quanto por espécies ativas derivadas, resultando no aminoftalato excitado com rendimentos quânticos de quimiluminescência (ϕ_{CL}) em torno de $1,24 \cdot 10^{-2,3-5}$.

Além da formação de um complexo entre peróxido de hidrogênio e PVP, não se espera nenhum tipo de interação entre nenhum dos reagentes do sistema com o polímero, o que se confirmou através dos experimentos comparativos entre o sistema aquoso e o contendo PVP reticulado (Figura 2). Entretanto, o processo de irradiação é acompanhado pela produção de gás ozônio originado do efeito da radiação UV sobre oxigênio. Este oxidante poderia reagir com a mistura de luminol e hemina de forma a consumir o substrato quimiluminescente, o que explicaria a redução da área de emissão após irradiação. Em um experimento controle, irradiou-se uma solução contendo luminol e hemina sem a presença de PVP em um poço vizinho à mistura contendo o polímero. Os valores de rendimento observados foram inferiores, em ambos os casos, àqueles obtidos para uma mistura não irradiada, o que permite inferir a respeito do efeito negativo do ozônio sobre o sistema.

O estudo da dependência entre o rendimento quântico da reação em função do tempo de armazenamento, em matriz polimérica, permitiu concluir que o sistema se mantém estável durante cerca de 30 dias, um valor superior aos observados na ausência de polímero, mas ainda insatisfatórios para a aplicação comercial do método. Neste ponto, optou-se por adaptar o sistema de forma a oferecer padrões secundários de luz em diversas intensidades. Para isso, foi necessário investigar as propriedades do sistema, através do estudo do efeito de seus componentes sobre a emissão de luz. Além do interesse aplicado, este tipo de estudo – que pode ser considerado como mecanístico – contribui para a investigação do efeito de PVP através da comparação com os resultados obtidos anteriormente pelo Grupo de Pesquisa, na ausência de polímero.¹⁴

De nossa experiência anterior, a natureza deste tipo de estudo é bastante sistemática e consome uma grande quantidade de recursos e tempo. A abordagem para a realização do estudo foi o planejamento fatorial que, considerando certos limites experimentais, explora os efeitos de variáveis sobre um sistema. Estes limites já haviam sido estabelecidos anteriormente em estudos do sistema em meio aquoso e foram os pontos de partida para o estudo.¹⁴ O cubo de experimento variou as concentrações de

luminol (1 e 10 mM), hemina (0,08 e 7,7 μM) e peróxido de hidrogênio (0,01 e 1 mM). Os valores obtidos para a área de emissão, constante cinética observada (k_{obs}) e intensidade máxima de emissão (I_{MAX}), em função da condição experimental, são apresentados na Figura 11.

Figura 11. Média dos resultados obtidos para os valores de área de emissão (esquerda) e constante cinética de decaimento (k_{obs} , direita superior) e intensidade máxima de emissão (I_{MAX} , direita inferior) dentro do cubo de variáveis do sistema luminol/hemina/peróxido de hidrogênio em meio alcalino contendo PVP.

De forma geral, a velocidade de uma reação quimiluminescente (v) está relacionada à intensidade máxima de emissão (I_{max}) e depende da concentração de todos os reagentes do sistema. Por outro lado, a constante de decaimento de *pseudo-primeira* ordem observada (k_{obs}) depende da concentração do(s) reagente(s) em excesso e está relacionada com a destruição do reagente limitante.

Para introduzir a interpretação dos resultados, deve-se destacar o papel catalítico da hemina. Apesar de luminol se encontrar em excesso em praticamente todas as posições do cubo de experimento, em certas condições, hemina pode se tornar o reagente em “excesso” mesmo estando presente em menor quantidade molar, já que atua como catalisador do sistema. Entretanto, hemina pode vir a ser “limitante” quando sua concentração é várias ordens de grandeza menor que a concentração de peróxido de hidrogênio, fato que pode levar à sua destruição oxidativa.³⁹ Desta forma, a interpretação

do efeito significativo de hemina e H_2O_2 sobre os parâmetros da reação introduz elementos fundamentais para o esclarecimento de seu mecanismo.

Em baixas concentrações de H_2O_2 (10 μM), tanto a intensidade máxima quanto a área de emissão sofrem uma pequena redução com o aumento da concentração de luminol. Por outro lado, o aumento da concentração de hemina (0,077 para 7,7 μM) é acompanhado de um leve aumento dos valores destas variáveis e do valor de k_{obs} , o que permite inferir que o peróxido é o reagente limitante nestas condições. Em contrapartida, com concentrações de H_2O_2 1 mM, observa-se uma dependência da área e da intensidade de emissão e de k_{obs} com um efeito combinado entre luminol e hemina. O fato de k_{obs} não se correlacionar com a concentração de hemina indica que este reagente não é o limitante nestas condições, ou seja, a constante de decaimento não se refere à destruição deste reagente. Porém quando se analisam os resultados com altas concentrações de hemina e peróxido, o aumento da concentração de luminol resulta no aumento de todas as variáveis. Este efeito poderia ser atribuído a uma maior formação de espécies oxidantes capazes de promover a formação de radicais ânion de luminol, que constitui um intermediário fundamental da reação levando à formação de estados excitados, desta forma tornando luminol o reagente limitante e o k_{obs} corresponde à destruição de luminol.

Em concentração de hemina 0,08 mM – em analogia aos resultados obtidos com peróxido 0,01 mM – não se observam efeitos significativos nem de luminol nem tampouco de peróxido de hidrogênio sobre a área e intensidade de emissão. Entretanto o aumento da concentração de peróxido (10 mM a 1 mM) provoca um aumento significativo do valor da constante de decaimento, provavelmente indicando uma reação entre hemina e peróxido que resulta em sua decomposição com a formação de espécies com atividade catalítica reduzida, que acabam por se tornar marginais à reação quimiluminescente. Além disso, a redução da área e da intensidade máxima de emissão em baixas concentrações de hemina e de H_2O_2 quando se aumenta a concentração de luminol poderia ser justificada pela formação de uma alta concentração de ânions radicais de luminol, esgotando o peróxido de hidrogênio que é fundamental na etapa seguinte da reação, onde ocorre a formação do endoperóxido que resultará no aminofalato excitado. Quando a concentração de hemina é aumentada (7,7 mM) observa-se um aumento significativo da intensidade e área de emissão com o aumento combinado entre luminol e peróxido; o valor da constante de decaimento por outro lado diminui conforme se aumentam ambos os reagentes, indicando que, nestas condições, ambos os reagentes podem ser limitantes.

Em concentrações de luminol 1 mM, com baixas concentrações de peróxido (10 μM), observa-se somente um leve aumento da intensidade e área de emissão e um amplo aumento no valor de k_{obs} , conforme o aumento da concentração de hemina. O aumento de k_{obs} e a pequena variação na área e I_{MAX} indicam que, nestas condições, o H_2O_2 é o reagente limitante e sua destruição é acelerada pelo aumento da concentração de hemina. Entretanto, em altas concentrações de peróxido o efeito da hemina sobre a constante é menos pronunciado e seu efeito sobre a área e intensidade de emissão significativo. Nestas condições, o H_2O_2 não é mais limitante e a concentração de hemina é o fator limitante. Esta hipótese é confirmada pelo aumento do valor de k_{obs} , da área e da intensidade de emissão conforme o aumento combinado da concentração de peróxido e hemina quando a concentração de luminol é 10 mM. Nestas condições observa-se, novamente, hemina como reagente limitante, haja visto que em altas concentrações deste catalisador o aumento da concentração de peróxido não afeta o valor de k_{obs} .

Através dos resultados obtidos dos experimentos de planejamento fatorial foi possível racionalizar os efeitos isolados dos reagentes e seus efeitos combinados sobre os valores das constantes cinéticas obtidas em diversas condições experimentais. Pôde-se constatar que, nas condições de contorno utilizadas, luminol não é o reagente limitante e as concentrações de H_2O_2 e hemina determinam a área de emissão e com isso a quantidade de fótons originada da reação. As Figura 12, Figura 13 e Figura 14 apresentam os gráficos de Pareto, que indicam o efeito de uma variável independente isolada e seu efeito associado a outras variáveis, para os efeitos dos componentes sobre as constantes cinéticas observadas do sistema.

Figura 12. Gráfico de Pareto de efeitos dos reagentes e suas combinações sobre a intensidade máxima de emissão de quimiluminescência.

Figura 13. Gráfico de Pareto de efeitos dos reagentes e suas combinações sobre a área de emissão de quimiluminescência.

Figura 14. Gráfico de Pareto de efeitos dos reagentes e suas combinações sobre os valores das constantes cinéticas de decaimento observadas (k_{obs}).

Os resultados obtidos com a utilização do sistema na detecção de peróxido de hidrogênio são bastante interessantes em termos analíticos. Na matriz polimérica podem ser imobilizadas diversas oxidases juntamente a luminol e hemina, de forma e permitir a detecção automatizada de substratos específicos, como a glicose e a lactose, em concentrações micromolares. A concentração mínima de peróxido foi cerca de 4 μ M. A Tabela 1 apresenta uma compilação dos limites de detecção de peróxido de hidrogênio para diversos métodos quimiluminescentes.

Tabela 1. Limites de detecção de peróxido de hidrogênio para diversos métodos quimiluminescentes.

sistema	catalisador	limite de detecção (mol L ⁻¹)	características	referência
Luminol-KIO ₄ -H ₂ O ₂	KIO ₄ age como um reagente catalítico-cooxidativo	3 x 10 ⁻⁸	Íons metálicos interferem	40
Luminol-hexaciano ferrato (III) de potássio-H ₂ O ₂	Hexacianoferrato(III) de potássio	6x 10 ⁻⁶	Diálise é necessária para a remoção de compostos orgânicos interferentes	41
Luminol-hemina-H ₂ O ₂	Hemina	3 x 10 ⁻⁹	Fe(II) e Mn(II)	42
Luminol-HRP-H ₂ O ₂	HRP	8 x 10 ⁻⁶	Não foi discutida a interferência	43
Luminol-peroxidase-H ₂ O ₂	Peroxidase	1 x 10 ⁻⁸	Co(II)	44
Luminol-Co(II)-H ₂ O ₂	Co(II)	5 x 10 ⁻⁹	A adição de padrão é necessária para eliminar efeitos da matriz	45
Luminol-calixareno ligado a Cu(II)-H ₂ O ₂	Cu(II)	3 x 10 ⁻⁶	Cr(III), Co(II), Fe(II), Mn(II), Ni(II), Zn(II)	46
DTMC-H ₂ O ₂	nenhum	4 x 10 ⁻⁸	A maioria dos íons de metais de transição não interferem	47

Os estudos preliminares empregando trolox como composto redutor padrão indicam a viabilidade do uso de filmes de PVP contendo luminol e hemina como método automatizado para a determinação de atividade antiradicalar. Na medida em que a reação de luminol com peróxido de hidrogênio, na presença de hemina, depende da formação de diversas espécies radicalares, substâncias antiradicalares devem concorrer com as vias que levam à emissão de luz, resultando em diminuição da intensidade de emissão. Esse efeito deve ser proporcional à concentração de redutor. O potencial de aplicação deste sistema é a determinação de antioxidantes potenciais em amostras de produtos naturais em ensaios de varredura. Até o momento, não existe uma metodologia para a detecção automática de atividade antiradicalar em extratos de plantas. Dois pontos críticos devem ser aprimorados para que a técnica possa ser utilizada como procedimento de rotina: o desenvolvimento de um método que permita quantificar esta atividade e reduzir os tempos de análise em função do tipo de substância investigada.

Segundo van den Berg, a adição de antiradicais antes do início de reações radicalares interfere na cinética de formação destas espécies, fornecendo dados de seqüestro menos confiáveis do que a adição durante a reação.⁴⁸ Esta observação pode ser

confirmada pelos resultados obtidos empregando-se trolox. A intensidade de emissão após o consumo de antiradical não atinge o valor de referência do sistema padrão, sem aditivo. Desta forma, o cruzamento das curvas cinéticas acontece em um período de tempo infinito ($> 10^6$ s) tornando impossível o cálculo da área de supressão, base da quantificação da atividade antiradical dos principais métodos disponíveis atualmente.

O tempo de análise pode ser controlado através da modulação da quantidade de radicais gerados no sistema, proporcional à área de emissão e que pode ser avaliada tendo-se em vista o estudo do sistema feito por planejamento fatorial. Entretanto o problema intrínseco desta abordagem consiste no fato que antioxidantes potentes tendem a suprimir todos os radicais gerados em um sistema com menor concentração de hemina e peróxido, resultando na depleção total da luz. A solução para este problema seria a preparação de placas em diversas condições de oxidantes para uma mesma amostra. Esta abordagem permitiria a determinação da atividade antiradicalar de uma série de amostras simultaneamente, permitindo que sejam obtidos resultados independentemente da atividade dos componentes da amostra.

Desta forma foi desenvolvido um método baseado na utilização de um filme de PVP contendo luminol e hemina que permite a calibração secundária de luminômetros de placa, a determinação de peróxido de hidrogênio até o limite de 40 μM e determinação da atividade antiradicalar de substâncias redutoras.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Reagentes

Todos os reagentes foram obtidos no mais alto grau de pureza disponível e foram usados sem etapa de purificação adicional. Luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazino-1,4-diona) foi obtida da Merck (Alemanha) e uma solução estoque 10 mM foi preparada em NaOH 1M e mantida a 4 °C por até dez dias. A solução de trabalho é uma diluição apropriada em tampão fosfato (0,1 M, $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 11,6. A concentração final de luminol foi determinada espectrofotometricamente em 347 nm ($\epsilon = 7600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Peróxido de hidrogênio (Peróxidos do Brasil – São Paulo, Brasil) foi obtido na forma de uma solução não estabilizada a 60%. A concentração final após diluição com água desmineralizada (18 M Ω , Milli-Q, Millipore) foi determinada espectrofotometricamente como descrito por Cotton e Dunford. Hemina (cloreto de ferriprotoporfirina IX) foi adquirida da Sigma (St. Louis, EUA). Uma solução estoque (8 μM) foi preparada dissolvendo-se 2,5 mg de hemina em 5 mL de NaOH 1,0M. A solução de trabalho é uma diluição 1:100 com NaOH 1,0 M. A concentração foi determinada espectrofotometricamente utilizando $\epsilon = 58400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 385 nm. Poli(N-vinilpirrolidona), conhecida como Plasdona K-90 ou PVP K-90 ($M_w=1,2 \times 10^6$; $M_n=3,6 \times 10^5$) foi obtida da GAF Chem. Co. (EUA).

6.3.2 Instrumentos

Os experimentos foram realizados em um luminômetro de microplacas Berthold EG&G 96V Lumimat. Espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu Multispec 1505 UV-Visível.

6.3.3 Calibração da fotomultiplicadora

A um poço de uma microplaca de 96 poços, adicionam-se 170 μL de uma solução de luminol 1 μM em tampão fosfato (pH=11,6, $\mu=0,1 \text{ M}$). A seguir, 30 μL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio (10 mM) são adicionados utilizando-se o sistema de injeção automático, como fornecido pelo luminômetro Berthold. Três injeções de uma solução de hemina 0,8 μM são feitas com um intervalo de 100 s através do injetor automático. A curva de emissão, após subtração da linha base, é integrada e o valor é utilizado na calibração como descrito por Lee e Selinger.

6.3.4 Irradiação de PVP contendo luminol and hemina

A irradiação foi feita utilizando uma lâmpada de Hg de baixa pressão tipo caneta Heraeus (Hanau, Alemanha) de potência 20 W ($\lambda_{\text{em}} = 254 \text{ nm}$; 200 mm de comprimento). Esta montagem produz $11,5 \text{ mW/cm}^2$ de fluxo radiante sobre a placa ou $4,89 \text{ J/s}$ sobre uma superfície plana. Um volume de $200 \mu\text{L}$ de uma solução contendo PVP (100 mg/mL), luminol e hemina – em concentrações adequadas – em tampão fosfato pH 11,6 foi colocado dentro de um poço da microplaca, que foi posicionada a 20 mm de distância da fonte de irradiação. O procedimento de preparação e manutenção da placa é apresentado na Esquema 2.

Esquema 2

6.3.5 Análise Estatística

Todos os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão (σ) de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi obtida através de uma análise de variância por 2 e 3 vias do tipo ANOVA. O nível de significância estatística foi tido como $p < .05$. Todos os cálculos foram feitos utilizando o programa Origin 7.0 (OriginLab Corp., 2002) e Statistica 5.0 (Statsoft Inc., 1995).

6.4 Referências Bibliográficas

1. Rabek, J. F. (1982). *Experimental Methods in Photochemistry and Photophysics*. Wiley, Bath.
2. Stanley, P. E. (2000). "Commercially available luminometers and low-level light imaging devices". *Methods Enzymol.* **305**: 97.
3. Lee, J., Seliger, H. H. (1970). "Spectral characteristics of excited states of product of chemiluminescence of luminol". *Photochem. Photobiol.* **11**: 247.
4. Lee, J. (1971). "Spectroscopic characterizations of luminol chemiluminescence". *Appl. Spectrosc.* **25**: 142.
5. Lee, J., Seliger, H. H. (1972). "Quantum yields of luminol chemiluminescence reaction in aqueous and aprotic solvents". *Photochem. Photobiol.* **15**: 227.
6. O'Kane, D. J., Lee, J. (2000). "Absolute calibration of luminometers with low-level light standards". *Methods Enzymol.* **305**: 87.
7. Dodeigne, C., Thunus, L., Lejeune, R. (2000). "Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review". *Talanta* **51**: 415.
8. Arakawa, H., Kanemitsu, M., Maeda, M. (1999). "Chemiluminescent assay for catecholamines by the generation of hydrogen peroxide in basic solution and the use of isoluminol- microperoxidase". *Anal. Sci.* **15**: 1269.
9. Hodgson, M., Jones, P. (1989). "Enhanced Chemiluminescence in the peroxidase luminol H₂O₂ system - Anomalous reactivity of enhancer phenols with enzyme intermediates". *J. Biolumin. Chemilumin.* **3**: 21.
10. Puchkaev, A. V., Metelitsa, D. I. (1993). "Luminol oxidation in detergent-free microemulsions (hexane-isopropanol-water) catalyzed by horseradish peroxidase or hemin". *Biochem.-Moscow* **58**: 1125.
11. Candy, T. E. G., Hodgson, M., Jones, P. (1990). "Kinetics and mechanism of a chemiluminescent clock reaction based on the horseradish peroxidase catalyzed oxidation of luminol by hydrogen peroxide". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*: 1385.
12. Ewetz, L., Thore, A. (1976). "Factors affecting specificity of luminol reaction with hematin compounds". *Anal. Biochem.* **71**: 564.
13. Jones, P., Scowen, N. R. (1987). "Kinetics and mechanism of catalysis by ferrihemes in the chemiluminogenic oxidation of luminol by hydrogen peroxide". *Photochem. Photobiol.* **45**: 283.
14. Bastos, E. L. (2000). Determinação de um Ensaio para a Determinação da Capacidade Antioxidante de Produtos Naturais Através da Quimiluminescência de Luminol. Em "Dissertação de Mestrado", Universidade de São Paulo, São Paulo.

15. Wilson, R., Akhavan-Tafti, H., DeSilva, R., Schaap, A. P. (2001). "Comparison between acridan ester, luminol, and ruthenium chelate electrochemiluminescence". *Electroanalysis* **13**: 1083.
16. Paleologos, E. K., Vlessidis, A. G., Karayannis, M. I., Evmiridis, N. P. (2003). "Online sorption preconcentration of metals based on mixed micelle cloud point extraction prior to their determination with micellar chemiluminescence - Application to the determination of chromium at ng l(-1) levels". *Anal. Chim. Acta* **477**: 223.
17. Lopérgolo, L. C., Lugão, A. B., Catalani, L. H. (2003). "Direct UV photocrosslinking of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to produce hydrogels". *Polymer* **44**: 6217.
18. Abuja, P. M., Albertini, R. (2001). "Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins". *Clin. Chim. Acta* **306**: 1.
19. Alho, H., Leinonen, J. (1999). "Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods". *Methods Enzymol.* **299**: 3.
20. Ghiselli, A., Serafini, M., Ferro-Luzzi, A. (1994). "New approaches for measuring plasma or serum antioxidant capacity: A methodological note". *Free Radical Biol. Med.* **16**: 135.
21. Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Ferreres, F. (2002). "Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds". *J. Agric. Food Chem.* **50**: 5107.
22. Girotti, S., Ferri, E., Maccagnani, L., Budini, R., Bianchi, G. (2002). "Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays". *Talanta* **56**: 407.
23. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems". *Free Radical Biol. Med.* **18**: 125.
24. Lissi, E. A., Faure, M., Clavero, N. (1991). "Effect of additives on the inactivation of lysozyme mediated by free radicals produced in the thermolysis of 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)". *Free Radic. Res. Commun.* **14**: 373.
25. Lissi, E., Pascual, C., Delcastillo, M. D. (1992). "Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis". *Free Radic. Res. Commun.* **17**: 299.
26. Lissi, E., Pascual, C., Delcastillo, M. D. (1994). "On the use of the quenching of luminol luminescence to evaluate SOD activity". *Free Radical Biol. Med.* **16**: 833.
27. Pascual, C., Reinhart, K. (1999). "Effect of antioxidants on induction time of luminol luminescence elicited by 3-morpholinocydonimine (SIN-1)". *Luminescence* **14**: 83.
28. Prior, R. L., Cao, G. (1999). "In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods". *Free Radical Biol. Med.* **27**: 1173.

29. Bastos, E. L., Romoff, P., Eckert, C. R., Baader, W. J. (2003). "Evaluation of antiradical capacity by H₂O₂-hemin-induced luminol chemiluminescence". *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7481.
30. Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U. (1983). "Antioxidant activity of phenols related to vitamin E. Are there chain-breaking antioxidants better than α -tocopherol?" *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 5950.
31. Burton, G. W., Joyce, A., Ingold, K. U. (1983). "Is Vitamin-E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte-membranes". *Arch. Biochem. Biophys.* **221**: 281.
32. Burton, G. W., Doba, T., Gabe, E. J., Hughes, L., Lee, F. L., Prasad, L., Ingold, K. U. (1985). "Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols". *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 7053.
33. Merényi, G., Lind, J. S. (1980). "Role of a peroxide intermediate in the chemiluminescence of luminol - A mechanistic study". *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 5830.
34. Merényi, G., Lind, J., Eriksen, T. E. (1984). "The equilibrium reaction of the luminol radical with oxygen and the one-electron reduction potential of 5-aminophthalazine-1,4-dione". *J. Phys. Chem.* **88**: 2320.
35. Merényi, G., Lind, J., Eriksen, T. E. (1985). "The reactivity of superoxide and its ability to induced chemiluminescence with luminol". *Photochem. Photobiol.* **41**: 203.
36. Merényi, G., Lind, J., Eriksen, T. E. (1986). "Nucleophilic addition to diazaquinones - Formation and breakdown of tetrahedral intermediates in relation to luminol chemiluminescence". *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 7716.
37. Merényi, G., Lind, J., Eriksen, T. E. (1990). "Luminol Chemiluminescence - Chemistry, excitation, emitter". *J. Biolumin. Chemilumin.* **5**: 53.
38. Merényi, G., Lind, J., Shen, X., Eriksen, T. E. (1990). "Oxidation potential of luminol - Is the autoxidation of singlet organic molecules an outer-sphere electron-transfer". *J. Phys. Chem.* **94**: 748.
39. Brown, S. B., Jones, P. (1968). "Reactions between haemin and hydrogen peroxide .3. Catalytic decomposition of hydrogen peroxide". *Trans. Faraday Soc.* **64**: 999.
40. Zhou, Y., Nagaoka, T., Li, F., Zhu, G. (1999). "Evaluation of luminol-H₂O₂-KIO₄ chemiluminescence system and its application to hydrogen peroxide, glucose and ascorbic acid assays". *Talanta* **48**: 461.
41. Shaw, F. (1980). "Development and construction of an analyzer for the determination of the hydrogen peroxide content of natural water using a chemiluminescent reaction". *Analyst* **105**: 11.

42. Yoshizumi, K., Aoki, K., Nouchi, I., Okita, T., Kobayashi, T., Kamakura, S., Tajima, M. (1984). "Measurements of the concentration in rainwater and of the Henry law constant of hydrogen peroxide". *Atmos. Environ.* **18**: 395.
43. Li, J., Wang, K., Yang, X., Xiao, D. (1999). "Sol-gel horseradish peroxidase biosensor for the chemiluminescent flow determination of hydrogen peroxide". *Anal. Commun.* **36**: 195.
44. Preuschoff, F., Spohn, U., Blankenstein, G., Mohr, G., Kula, M. R. (1993). "Chemiluminometric hydrogen peroxide sensor for flow injection analysis". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **346**: 924.
45. Price, D., Worsfold, P. J., Mantoura, R. F. C. (1994). "Determination of hydrogen peroxide in sea water by flow injection analysis with chemiluminescence detection". *Anal. Chim. Acta* **298**: 121.
46. Ma, H., Jarzak, U., Thiemann, W. (1998). "Synthesis and spectroscopic properties of new luminol-linked calixarene derivatives". *Anal. Chim. Acta* **362**: 121.
47. Ma, Q., Ma, H., Wang, Z., Su, M., Xiao, H., Liang, S. (2001). "Synthesis of a novel chemiluminescent reagent for the determination of hydrogen peroxide in snow waters". *Talanta* **53**: 983.
48. van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H., Bast, A. (1999). "Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures". *Food Chemistry* **66**: 511.

Discussão Geral e Conclusões

A quimiluminescência se apresenta hoje como uma ferramenta importante no desenvolvimento de aplicações analíticas, assim como a fluorescência e outros métodos luminescentes. Todavia, o aumento da utilização de métodos que empregam quimiluminescência não se traduz no desenvolvimento de novos substratos e baseiam-se muitas vezes em reações cujos mecanismos não são completamente compreendidos.

Anéis de quatro membros contendo uma função peroxídica, os chamados 1,2-dioxetanos, constituem o principal grupo de substâncias capazes de participar de reações quimiluminescentes. A decomposição térmica deste tipo de composto resulta na formação – em rendimentos entre 6 e 40% - de compostos carbonílicos no estado eletronicamente excitado. Uma possível explicação para este fenômeno pode ser obtida através de cálculos semiempíricos e *ab initio* que sugerem que a superfície de energia potencial de 1,2-dioxetanos no estado fundamental e aquela no estado triplete são próximas na região que corresponde a um estado de transição com características dirradicalares, onde a ligação peroxídica se encontra bastante alongada. Desta forma, quando aquecida, a molécula de 1,2-dioxetano possui grande probabilidade de realizar um cruzamento para a superfície triplete resultando na formação de um composto carbonílico no estado eletronicamente excitado triplete. São também formados compostos no estado singlete, entretanto isso se dá em rendimentos bastante baixos por razões energéticas.

A decomposição térmica de 1,2-dioxetanos ilustra a distinção entre quimiexcitação e quimiluminescência. Apesar do alto rendimento quântico de formação de estados eletronicamente excitados, o rendimento quântico de quimiluminescência deste processo é bastante baixo. O uso de aceptores de energia, resulta na emissão de fluorescência deste sensibilizador na chamada quimiluminescência indireta. Deste modo,

a termólise de 1,2-dioxetano não é um modelo adequado para justificar os altos rendimentos quânticos de bioluminescência, como na emissão do vaga-lume.

Os estudos acerca do padrão de substituição de 1,2-dioxetanos envolvem 1,2-dioxetanonas. Esta classe de compostos caracteriza-se pela presença de uma carbonila na posição 3 do anel peroxídico e é tida como precursora das espécies emissoras em reações bioluminescentes. O efeito de compostos fluorescentes adequados sobre 1,2-dioxetanonas reflete, diferentemente do que ocorre com 1,2-dioxetanos, dependência entre a constante de velocidade de decaimento de quimiluminescência com a concentração de fluoróforo. A velocidade da reação depende do potencial de oxidação do composto fluorescente, e a escolha de substâncias com baixos potenciais de oxidação – chamadas ativadores (ACT) – resulta no aumento da velocidade da reação. Com base nestes resultados, foi postulado um mecanismo conhecido como CIEEL (“Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence”, ou Luminescência Induzida Quimicamente por Troca de Elétrons), baseado na química de transferência de elétrons.

A transferência de um elétron do ativador para a ligação peroxídica é um processo endergônico. À medida que a 1,2-dioxetanona é ativada termicamente, a ligação peroxídica se torna distorcida e alongada, o que resulta na diminuição da energia de seu orbital antiligante. Como resultado, observa-se o aumento da eletroafinidade do peróxido até que seja atingido o ponto, dentro da curva potencial, em que a probabilidade de transferência de elétron é bastante grande. Este processo resulta em uma cascata de eventos, que envolvem a quebra da ligação O-O, da ligação C-C e a formação de um par de íons radicais ainda em contato com a gaiola de solvente. Neste ponto, o radical cátion do ativador e o radical ânion do CO₂ ou de outro fragmento carbonílico podem se aniquilar, ou seja, realizar uma retrotransferência de elétron. Este processo, amplamente descrito em reações eletroquimiluminescentes, libera energia suficiente para promover uma certa população de moléculas do ativador ao estado eletronicamente excitado.

A quimiexcitação resultante da aniquilação de íons radicais nas reações de quimiluminescência induzida resulta na formação quase exclusiva de espécies singlete. Uma justificativa para este fato atenta para a velocidade dos processos de transferência e retrotransferência de elétron. Os elétrons envolvidos nestes processos estariam correlacionados, não sendo possível a inversão do spin. Como resultado observa-se a emissão de fluorescência do ativador.

O mecanismo CIEEL foi postulado no caso da quimiluminescência induzida do difenilperóxido e de 1,2-dioxetanonas. Entretanto, apesar de 1,2-dioxetanonas estarem supostamente envolvidas com processos bioluminescentes, os rendimentos quânticos

deste tipo de reação – na ordem de 90% - não são compatíveis com aqueles obtidos utilizando-se difenilperóxido, calculados na ordem de 10^{-4} a 10^{-5} quanta por molécula de peróxido decomposto.

De forma intrigante, 1,2-dioxetanos com substituintes fenoxila protegidos se apresentam estáveis até que um agente químico adequado seja utilizado para sua desproteção e, após a formação do fenolato se decompõem, supostamente, através do mecanismo CIEEL com rendimentos de formação de espécies singlete de até 100%. Quando o grupo protetor é um substrato para uma enzima, tornam-se evidentes as possibilidades de aplicação deste tipo de composto em análises clínicas.

O trabalho do Laboratório de Fotoquímica e Quimiluminescência estuda, dentro do universo de reações quimiluminescentes, dois sistemas distintos: o sistema peróxi-oxalato e a decomposição unimolecular e induzida de 1,2-dioxetanos. Os objetivos destas duas linhas de pesquisa se fundem no estudo do mecanismo CIEEL, tentando compreender a dinâmica de transferência de elétron e seu papel na formação de estados eletronicamente excitados. Neste contexto, esta Tese de Doutorado se apresenta com a função de associar os resultados anteriormente obtidos por diversos alunos de pós-graduação em diversos níveis, tentando associá-los com novas técnicas e perspectivas para que, no futuro, seja possível o desenvolvimento de compostos com altos rendimentos quânticos de quimiluminescência.

A Figura 1 apresenta um esquema de associações para a química de 1,2-dioxetanos, o principal ponto de trabalho até o momento. O objetivo principal, como já foi dito anteriormente é a síntese e aplicação de 1,2-dioxetanos com altos rendimentos quânticos de quimiluminescência em diversos meios. Adotou-se como abordagem uma metodologia que converge a este objetivo. São quatro pontos principais: (i) a otimização da síntese de 1,2-dioxetanos descritos na literatura por nosso grupo e outros grupos de pesquisa; (ii) o estudo da quimiluminescência de luminol em matriz polimérica; (iii) o efeito da gaiola de solvente sobre os rendimentos quânticos singlete na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos e (iv) a introdução de ferramentas de cálculo químico no Grupo de Pesquisa.

Figura 1. São apresentados os pontos destacados na Tese de Doutorado em relação ao contexto de trabalho do Grupo de Pesquisa. Os losangos pretos indicam trabalhos feitos por outros estudantes, círculos pretos são trabalhos realizados pelo aluno, nesta tese ou em outro período, círculos brancos indicam trabalhos realizados pelo aluno e que terão continuidade dentro das linhas de pesquisa do laboratório e quadrados brancos são trabalhos realizados pelo aluno durante seu doutoramento que não são descritos na Tese. Os números indicam os capítulos a que se referem os tópicos

A síntese de 1,2-dioxetanos é de amplo domínio de nosso grupo. Entretanto, após a realização deste trabalho a preparação deste tipo de composto foi aprimorada, colocada em primeiro plano e permite hoje a preparação de diversos 1,2-dioxetanos, incluindo compostos tetrasubstituídos, com grande facilidade. Durante o processo foi utilizada síntese assistida por microondas, que contribuiu para uma redução considerável no tempo de preparação de precursores de dioxetanos.

Os cálculos químicos não aparecem claramente expostos no conceito inicial do projeto. Entretanto, eles se tornam uma ferramenta cada vez mais utilizada em química orgânica. Nosso laboratório, assim como em síntese orgânica, não possuía tradição neste tipo de metodologia. Apesar das dificuldades, nos propusemos a implantar, de forma independente, o uso de cálculos químicos em nosso grupo. Os estudos realizados inicialmente tinham por objetivo reproduzir resultados da literatura em cálculos de geometrias de equilíbrio e energias de orbitais. No momento em que nos tornamos aptos a realizar estudos originais com o auxílio da técnica passamos a estudar mais profundamente as características de compostos envolvidos em reações quimiluminescentes. Os cálculos realizados atualmente seguem os objetivos das linhas de pesquisa do grupo em relação ao estudo de dioxetanos. São perseguidas correlações que possam justificar os efeitos observados quando se estuda o padrão de substituição, o efeito de espaçadores e a influência do meio sobre a decomposição induzida de 1,2-dioxetanos.

A familiarização do Grupo de Pesquisa com o cálculo teórico contribuiu na racionalização dos resultados obtidos no estudo da dependência da viscosidade com os rendimentos quânticos de quimiexcitação da decomposição induzida de 1,2-dioxetanos. Neste sentido, foi proposto um mecanismo de transferência e retro-transferência *intramolecular* de elétrons, o qual está de acordo com resultados experimentais obtidos no estudo da dependência da viscosidade do meio com o ϕ_S na decomposição induzida de 1,2-dioxetanos. Nesta proposta, que leva em consideração o ajuste dos resultados experimentais a um modelo friccional, supõe-se a formação de um dirradical ânion cuja carga se encontra na porção carbonílica afastada do anel aromático. Esta espécie, sujeita a rotação em torno da ligação C–C, sofre uma retro-transferência de elétron concomitantemente à clivagem da ligação C–C. Dependendo da conformação da espécie antes desta retro-transferência (*syn/anti*), postula-se a formação de estados eletronicamente excitados ou a formação de espécies no estado fundamental. A transferência de elétron para a porção carbonílica radicalar a partir da conformação *syn* resulta na formação do estado excitado singlete do emissor, enquanto, no caso de

mudança conformacional para a conformação *anti*, a ocorrência de uma transferência para o radical oxifenil leva à formação de produtos no estado fundamental. Durante este trabalho, o estudo da viscosidade envolveu - e ainda envolverá, no futuro - diversos estudantes de diversos níveis. Esta interação é indicada aqui pela utilização de resultados obtidos por outro pós-graduando para a racionalização do ajuste friccional para o sistema peróxi-oxalato.

O estudo do sistema peróxi-oxalato em nosso Grupo envolve a síntese de possíveis intermediários e o estudo cinético sistemático do sistema. A tentativa de sequestro de dióxido de carbono radical ânion por um spin trap e a caracterização do aduto por EPR e espectroscopia de massas foi uma tentativa de comprovação direta do mecanismo CIEEL para este sistema. Os dados, apesar da difícil análise em decorrência da complexidade do sistema, permitem inferir a formação do aduto. Entretanto, experimentos de cromatografia líquida associada à espectroscopia de massas serão realizados em breve com o objetivo de identificar o aduto diretamente.

Em uma outra vertente, muito menos mecanística, foram realizados experimentos para imobilizar luminol em uma matriz de PVP com o objetivo de aumentar sua vida útil e evitar a preparação frequente de soluções estoque. Entretanto, este estudo evoluiu para um método de calibração de luminômetros de placas, com a vantagem adicional de permitir a medida de peróxido de hidrogênio em concentrações micromolares e abrir perspectivas para a automação da determinação da atividade antiradicalar de produtos naturais, objeto de estudo do aluno durante seu mestrado e hoje procedimento de rotina em nosso laboratório. A realização do trabalho contou com a utilização de métodos de planejamento experimental, cujos resultados foram utilizados - de maneira não ortodoxa - na interpretação de resultados experimentais em bases mecanísticas. Apesar de não fornecer dados que permitam elaborar um mecanismo completo para a reação entre luminol e peróxido de hidrogênio na presença de hemina como catalisador, os resultados são bastante similares aos obtidos em um estudo cinético completo do sistema em meio aquoso realizado anteriormente pelo aluno. Assim, através do desenvolvimento de um sistema aplicado - que não depende de nenhum conhecimento de seu mecanismo para sua utilização - foi possível investigar alguns aspectos dos mecanismos envolvidos.

Visão Geral sobre Cálculos Químicos

Mecânica Molecular

A mecânica molecular descreve moléculas em termos de “átomos conectados”, e a geometria molecular em termos de distorções das distâncias de ligação, dos ângulos de ligação e dos ângulos de diedro em relação aos valores ideais, levando em conta *interações não-ligantes* de van der Waals e Coulomb.

A premissa básica da mecânica molecular é o alto grau de transferência de parâmetros geométricos de uma molécula para outra, assim como a dependência deste parâmetro com a hibridização. Por exemplo, ligações simples carbono-carbono geralmente possuem comprimentos de 1,45 a 1,55 Å, aumentado em distância conforme aumenta o caráter *p* dos carbonos híbridos. Desta forma, é possível supor uma geometria bastante precisa em termos dos comprimentos de ligação, dos ângulos de ligação e dos ângulos de diedro, considerando que a molécula já está sendo representada em termos de sua estrutura de valência. A maioria das moléculas orgânicas e – eventualmente – moléculas organometálicas encontram-se em condições de ter sua geometria calculada desta forma.

Modelos práticos de mecânica molecular diferem tanto no número quanto na natureza dos termos que incorporam, além dos detalhes de sua parametrização. Juntas, forma funcional e parametrização, constituem o que é chamado *force field* (“campo de força”). Campos de força bastante simples como o SYBYL, desenvolvido pela Tripos, Inc. podem ser estendidos a vários sistemas, não devendo, entretanto, ser esperados valores quantitativos precisos. Por outro lado, modelos como o MMFF94 desenvolvido pela Merck Pharmaceuticals, mesmo limitado a moléculas orgânicas comuns e

biopolímeros, é mais adequado ao cálculo quantitativo de geometria molecular e conformação.

Mecânica Quântica

A mecânica quântica descreve moléculas em termos de interações entre núcleos e elétrons, e a geometria molecular em termos de arranjos nucleares de menor energia. Todos os métodos de mecânica quântica se remetem à *Equação de Schrödinger*, que para o caso do átomo de hidrogênio (uma partícula simples em três dimensões) pode ser resolvida de forma exata (Eq. 2).

$$\left[\frac{-h^2}{8\pi^2 m} \nabla^2 - \frac{Ze^2}{r} \right] \psi(x, y, z) = E \psi(x, y, z) \quad \text{Eq. 1}$$

O termo entre colchetes representa as energias cinética e potencial de um elétron de massa m a uma distância r de uma carga nuclear Z (1 no hidrogênio). A constante de Planck, h , e e é a carga do elétron e E sua energia. A função de onda ψ descreve os movimentos dos elétrons através de coordenadas atômicas. O quadrado da função de onda vezes um pequeno volume resulta na probabilidade de encontrar o elétron dentro do volume. Isto é chamado de *densidade eletrônica total*, ou simplesmente densidade eletrônica, e corresponde aos valores medidos em um experimento de difração de raios-X.

Generalizando a equação de Schrödinger a um sistema multinuclear e multielétron temos:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad \text{Eq. 2}$$

onde, Ψ é uma função de onda de muitos elétrons e $\hat{H}$ é chamado de operador Hamiltoniano (Eq. 3).

$$\begin{aligned} \hat{H} = & \frac{-h^2}{8\pi^2} \sum_A^{n\text{úcleo}} \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \frac{h^2}{8\pi^2 m} \sum_a^{e\text{létrons}} \nabla_a^2 - e^2 \sum_A^{n\text{úcleo}} \sum_a^{e\text{létrons}} \frac{Z_A}{r_{Aa}} \\ & + e^2 \sum_{A>B}^{n\text{úcleo}} \sum \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + e^2 \sum_{a>b}^{e\text{létrons}} \sum \frac{1}{r_{ab}} \end{aligned} \quad \text{Eq. 3}$$

Os primeiros dois termos da equação 3 descrevem a energia cinética do núcleo, A , e dos elétrons, a , respectivamente, e os três outros termos descrevem as *interações coulômbicas* entre as partículas. M é a massa nuclear e R_{AB} , r_{ab} e r_{Aa} são as distâncias separando núcleos, elétrons e elétrons e núcleos, respectivamente.

Infelizmente, a equação de Schrödinger para muitos elétrons não pôde ser ainda resolvida de forma exata, mesmo para o sistema mais simples. Devem ser introduzidas aproximações para viabilizar métodos práticos de cálculo.

Aproximação de Born-Oppenheimer

Uma forma de simplificar a equação de Schrödinger para sistemas moleculares é assumir que os núcleos não se movem. Esta é chamada de *Aproximação de Born-Oppenheimer*, e leva a uma equação “eletrônica” de Schrödinger (Eq. 4, Eq. 5).

$$\hat{H}^{el} \Psi^{el} = E^{el} \Psi^{el} \quad \text{Eq. 4}$$

$$\hat{H}^{el} = \frac{-\hbar^2}{8\pi^2 m} \sum_a^{elétrons} \nabla_a^2 - e^2 \sum_A^{núcleo} \sum_a \frac{Z_A}{r_{Aa}} + e^2 \sum_{a>b}^{elétrons} \sum \frac{1}{r_{ab}} \quad \text{Eq. 5}$$

O termo na Eq. 3 descrevendo a energia cinética do núcleo não aparece na Eq. 5, e o termo coulômbico nuclear-nuclear é uma constante. Ele precisa ser adicionado à energia eletrônica, E^{el} , o que resulta na energia total do sistema E (Eq. 6).

$$E = E^{el} + e^2 \sum_{A>B}^{núcleo} \sum \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad \text{Eq. 6}$$

Mesmo com a aproximação de Born-Oppenheimer, a equação de Schrödinger não pode ser solucionada para mais de um elétron e aproximações adicionais devem ser realizadas.

Aproximação de Hartree-Fock

A simplificação mais óbvia para a equação de Schrödinger envolve a separação de variáveis, que é a substituição da função de onda de muitos elétrons por um produto de funções de onda de um elétron. A substituição mais simples aceitável, chamada de *Hartree-Fock* ou funções de onda de uma determinante, envolve uma determinante de produtos de funções de um elétron, chamados de *spin orbital*. Cada spin orbital é escrito como um produto de uma parte do espaço, y – uma função das coordenadas de um único elétron, e é chamada de *orbital molecular* – e um dos dois possíveis componentes de spin, a e b . Apenas dois elétrons podem ocupar um orbital molecular e eles devem possuir spins opostos.

A aproximação de Hartree-Fock leva a uma série de equações diferenciais acopladas, cada uma envolvendo um único elétron. Apesar de poder ser resolvida numericamente, é vantajoso introduzir uma aproximação adicional.

Aproximação CLOA

Esta aproximação se origina da noção que as soluções encontradas para um elétron em moléculas de muitos elétrons irão se parecer com a solução para o átomo de hidrogênio. Isto parece razoável, considerando que moléculas são compostas de átomos e, desta forma, soluções moleculares devem se parecer com o conjunto de soluções atômicas correspondentes. Na prática, os orbitais moleculares são expressos como uma combinação linear de um conjunto finito de funções predefinidas, conhecidas como funções básicas, ϕ , onde c são os coeficientes de orbital molecular. (Eq. 7).

$$\psi_i = \sum_{\mu}^{funções\ básicas} c_{\mu i} \phi_{\mu} \quad \text{Eq. 7}$$

Porque as funções básicas são geralmente centradas na posição nuclear, são chamados de orbitais atômicos e sua expansão (Eq. 7) é denominada *Combinação Linear de Orbitais Atômicos* ou Aproximação CLOA.

Equações de Roothaan-Hall

As aproximações Hartree-Fock e CLOA, somadas e aplicadas à equação eletrônica de Schrödinger levam às *equações de Roothaan-Hall* (Eq. 8).

$$\sum_{\nu}^{funções\ básicas} (F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) c_{\nu i} = 0 \quad \text{Eq. 8}$$

Onde, ε são energias de orbital, S é a matriz de sobreposição (uma medida da extensão em que funções básicas se encontram), e F é a matriz de Fock, que é análoga à Hamiltoniana na equação de Schrödinger e, em unidades atômicas, é dada por:

$$F_{\mu\nu} = (\phi_{\mu} | -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_A} | \phi_{\nu}) + \sum_{\lambda} \sum_{\sigma}^{funções\ básicas} P_{\lambda\sigma} \left[(\phi_{\mu} \phi_{\nu} | \phi_{\lambda} \phi_{\sigma}) - \frac{1}{2} (\phi_{\mu} \phi_{\lambda} | \phi_{\nu} \phi_{\sigma}) \right] \quad \text{Eq. 9}$$

O primeiro termo na Eq. 9 refere-se às energias cinética e potencial de elétrons individuais, enquanto o segundo termo indica as interações entre elétrons. P é a chamada matriz de densidade, elementos que envolvem o quadrado dos coeficientes de orbital molecular em todos os orbitais moleculares ocupados.

Métodos que resultam da solução das equações de Roothaan-Hall são chamados Hartree-Fock ou *modelos ab initio*. A energia correspondente para um parâmetro de base infinito é chamada de energia Hartree-Fock. Esta energia não é igual à energia experimental, e dessa forma devem ser relacionados a o valor experimental permitindo apenas o cálculo de energias relativas.

Modelos Correlacionados

Modelos Hartree-Fock lidam com os movimentos de elétrons individuais de forma independente uns dos outros. Por isso, elétrons tendem a sobrepor coordenadas em uma extensão maior do que a desejada. Este fato leva a valores de energia de repulsão elétron-elétron superestimados, e a uma energia total muito alta. A correlação de elétron, leva em conta o acoplamento do movimento dos elétrons, reduzindo a energia total do sistema. A energia de correlação é definida como a diferença entre a energia Hartree-Fock e a energia experimental.

Modelos Møller-Plesset

Diversos métodos foram desenvolvidos para levar em conta a correlação de elétrons. Com exceção do chamado método de densidade funcional, eles geralmente envolvem misturas entre funções de onda do estado fundamental (Hartree-Fock) com funções de onda do estado excitado. Operacionalmente, esta abordagem assume como existente a promoção de elétrons de orbitais moleculares ocupados nas funções de onda Hartree-Fock até orbitais que estão desocupados.

Entre os sistemas práticos mais simples estão os modelos Møller-Plesset, que são formulados em termos de uma Hamiltoniana eletrônica genérica, $\hat{H}_\lambda$ (Eq. 10).

$$\hat{H}_\lambda = \hat{H}_0 + \lambda \hat{V} \quad \text{Eq. 10}$$

$\hat{H}_0$ é definido de forma a que diferentes estágios não interajam e $\lambda \hat{V}$ é um termo de perturbação.

A energia Møller-Plesset de primeira ordem é a energia Hartree-Fock. A segunda ordem de energia $E^{(2)}$ é dada por (Eq. 11):

$$E^{(2)} = \sum_{i < j} \sum_{\substack{\text{orbitais preenchidos} \\ \text{orbitais vazios}}} \sum_{a < b} (\epsilon_a + \epsilon_b - \epsilon_i - \epsilon_j)^{-1} [(ij || ab)]^2 \quad \text{Eq. 11}$$

ϵ_i , ϵ_j são as energias dos orbitais preenchidos, ϵ_a , ϵ_b são energias dos orbitais moleculares vazios e as integrais $(ij || ab)$ se referem a mudanças nas interações elétron-elétron como resultado da promoção.

A teoria de Møller-Plesset quando em segunda ordem, ou *MP2*, é talvez o modelo mais simples baseado em promoção de elétrons que oferece melhorias sobre a teoria Hartree-Fock. Modelos de maior ordem (*MP3*, *MP4*) foram formulados, mas limitam-se a apenas alguns poucos sistemas devido ao seu custo computacional em relação à precisão do cálculo.

Modelos de Densidade Funcional

Estes modelos fornecem uma abordagem alternativa ao tratamento de correlação em sistemas de muitos elétrons. Eles seguem um teorema que define que a energia mínima de um sistema de elétrons sob a influência de um campo externo (coulômbico) é uma funcional (função de uma função) da densidade de elétron. Para um melhor entendimento da utilização deste modelo, inicialmente vamos considerar a energia de um sistema de muitos elétrons como postulado na teoria de Hartree-Fock (Eq. 12).

$$E^{HF} = E^{nuclear} + E^{nucleo} + E^{Coulomb} + E^{troca} \quad \text{Eq. 12}$$

onde, $E^{nuclear}$ refere-se à repulsão coulômbica do núcleo, E^{nucleo} refere-se tanto à energia cinética do elétron, quanto a atração coulômbica entre os elétrons e o núcleo, e $E^{coulomb}$ indica a repulsão coulômbica de elétrons. E^{troca} também envolve interações elétron-elétron, e tem o efeito de reduzir a dimensão do termo Coulômbico.

A energia de acordo com a *teoria de densidade funcional* inclui os mesmos termos da energia Hartree-Fock, entretanto substitui a energia de troca por uma funcional de troca $E^X(P)$, e adiciona uma funcional de correlação, $E^C(P)$, ambos função da densidade de elétron, P . (Eq. 13).

$$E^{DFT} = E^{nuclear} + E^{nucleo} + E^{Coulomb} + E^X(P) + E^C(P) \quad \text{Eq. 13}$$

Os modelos mais simples são chamados *densidade local de spin* ou modelos de densidade local, e se referem ao modelo SVWN (Slater, Vosko, Wilk, Nussair). Aqui, a forma de troca e as funcionais de correlação seguem a solução numérica de um gás com muitos elétrons e de densidade uniforme.

O modelo SVWN não deve ser considerado satisfatório para sistema moleculares onde a densidade de elétrons não é uniforme. O modelo pode ser melhorado através da introdução de uma dependência explícita com o gradiente da densidade de elétron. Este método é chamado de modelo de gradiente corrigido ou de *densidade não local*. Infelizmente, este procedimento leva a um comportamento divergente em sistemas de gradientes de alta densidade. Uma alternativa é a chamada *aproximação de Becke-Perdew*.

No *modelo Becke-Perdew* (BP ou BP86), um novo potencial é usado em lugar do potencial local no campo auto-consistente (self-consistent field, SCF). Este artifício na verdade restringe uma área junto a sua correção de gradiente, que deve ser recalculada a cada interação SCF. Uma alternativa, e ao mesmo tempo abordagem computacional mais simples, é introduzir uma correção de gradiente apenas quando o potencial local já foi

convergiu. Este método, chamado de *modelo perturbativo Becke-Perdew* (pBP), muitas vezes oferece vantagens computacionais significativas sobre o procedimento de campo auto-consistente.

Modelos Semi-Empíricos

Modelos semi-empíricos se originam diretamente de modelos Hartree-Fock. Inicialmente, o problema é reduzido restringindo o tratamento aos elétrons de valência (elétrons das camadas inferiores são considerados parte de um núcleo fixo). Em seguida, os parâmetros de base são restritos a uma representação mínima. Por exemplo, para os elementos principais, são incluídas uma única função tipo *s* e um conjunto de funções tipo *p*, enquanto que para os metais de transição estão incluídas um conjunto de funções tipo *d*. O hidrogênio é representado por uma única função *1s*.

A aproximação principal, em termos da redução de trabalho computacional, é definir que orbitais atômicos residindo em centros atômicos diferentes não se sobrepõem quando ϕ_ν e ϕ_μ não estão no mesmo átomo (Eq. 14).

$$\int \phi_\mu \phi_\nu d\tau = 0 \quad \text{Eq. 14}$$

Este método chamado de aproximação MNDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap), reduz o número de termos de interações elétron-elétron de $O(N^4)$ nas equações de Roothaan-Hall para $O(N^2)$, onde *N* é o número total de funções de base. Aproximações adicionais são introduzidas com o objetivo de simplificar o cálculo geral e, mais importante: proporcionar o esqueleto para a *introdução de parâmetros empíricos*. Parametrização semi-empírica é baseada na reprodução de uma grande variedade de dados experimentais, incluindo geometrias de equilíbrio, calor de formação, momentos de dipolo e potenciais de ionização, exceto quando se avaliam metais de transição. Parâmetros PM3 para metais de transição são baseados apenas em geometrias de equilíbrio reproduzidas. Os modelos AM1 e PM3 incorporam essencialmente a mesma aproximação, porém com diferentes parametrizações.

A única exceção é o método MNDO/d para o segundo período de elementos principais, usado em conjunto com o método MNDO para hidrogênio e elementos do primeiro período. Este método incorpora um conjunto de funções tipo *d*, em analogia direta ao método HF 3-21G(*) usado em conjunto com 3-21G.

Transferência de elétron – Teoria de Marcus

A teoria proposta por Marcus para reações de transferência de elétron considera uma barreira de ativação constituída de uma parcela termodinâmica, derivada da mudança na energia livre da reação, e outra, cinética, definida como a barreira energética intrínseca que existiria na reação se ambos, reagente e produtos, tivessem a mesma energia livre.

O processo de transferência de elétron é um processo mais rápido (10^{-16} s) que movimentos nucleares (10^{-13} s). Reações que envolvem transferência de elétron ocorrem quando os níveis de energia do doador e do acceptor no estado fundamental são coincidentes. Esta condição é fundamental para a ocorrência da transferência de elétron, entretanto ela pode ser atingida através da energia de reorganização interna (λ_i) e da energia de reorganização do solvente em torno do doador e do acceptor (λ_s), anteriormente à transferência de elétron. Desta forma, a energia de reorganização, λ , é a barreira de ativação para a transferência de elétron.

A força motriz termodinâmica: ΔG_{et}

Considerando uma mudança na energia livre de uma reação de transferência de elétron entre reagentes no estado fundamental e em fase gasosa temos:

$$\Delta G_{et} = I_D - E_A - \frac{e^2}{r_{AD}} \quad \text{Eq. 1}$$

onde I_D é o potencial de ionização do doador, E_A é a afinidade eletrônica do acceptor e e é a carga do elétron. O termo r_{AD} se refere à distância quando o doador e o acceptor são inicialmente neutros e formam, posteriormente, um par iônico. Este termo relativo à energia coulômbica pode ser facilmente calculado quando em fase gasosa baseado nos raios de van der Waals das espécies.

Quando uma reação de transferência de elétron ocorre em solução, o efeito da transferência do doador e do aceptor, dos íons D^{*+} e A^{*-} , e do par $\{D^{*+} A^{*-}\}$, do vácuo para um meio com uma constante dielétrica ϵ_S , refletem-se na substituição dos termos I_D e E_A da Eq. 1 pelos valores de E_{ox} e E_{red} medidos eletroquimicamente do acordo com:

$$(I_D - E_A) = [(E_{ox} - E_{red}) + (E_+ + E_-)] \quad \text{Eq. 2}$$

onde E_+ e E_- são as diferenças na energia de solvatação entre moléculas neutras e seus íons.

Existem, entretanto, alguns fatores que devem ser considerados na aplicação da Eq. 2. Eventualmente, os potenciais de oxidação e redução não podem ser obtidos diretamente, especialmente quando a oxidação ou redução é seguida por uma rápida quebra de ligação. Além disso, as estimativas dos valores de E_+ e E_- são feitas pela aplicação da equação de Born:

$$(E_+ + E_-) = \frac{-e^2}{2} \cdot \left(\frac{1}{r_D} + \frac{1}{r_A} \right) \cdot \left(1 - \frac{1}{\epsilon} \right) \quad \text{Eq. 3}$$

onde r_D e r_A são os raios de íons presumivelmente esféricos e ϵ é a constante dielétrica do solvente. Esta aplicação da equação de Born é muitas vezes criticada baseada em sua origem na eletrostática clássica e na consideração de íons esféricos (Figura 1).

Figura 1. Modelo de reagentes: r_D e r_A são os raios das esferas D e A, r_{DA} é a distância entre os centros dos reagentes (distância de transferência de carga), ϵ_S e n_S são as constantes dielétricas do solvente, ϵ_D e n_D são as constantes dielétricas da esfera D e ϵ_A e n_A são as constantes dielétricas da esfera A.

Interação de orbitais na estrutura de transição: Transferência de elétrons adiabáticas e diabáticas

Em grande parte das reações de transferência de elétron, o doador e o aceptor estão próximos em solução quando a transferência de elétron ocorre. Existe, todavia, uma outra categoria, transferências de elétron a longa distância, que geralmente envolve um

doador e um aceptor na mesma molécula, separados por um grupo espaçador rígido, de forma que seus orbitais não possam se sobrepor. A força da interação entre os orbitais do doador com aqueles do aceptor durante a transferência de elétron divide esta reação em duas categorias-limite: diabática (não adiabática) e adiabática.

No limite diabático, não existe nenhuma interação entre os orbitais do doador e do aceptor (Figura 2A). Em uma superfície potencial bidimensional, a curva representando o estado inicial (D, A) irá interceptar a curva representando o produto (D^+ , A^-). A intersecção representa o ponto onde os reagentes e os produtos têm a mesma geometria e a mesma energia, porém com configurações eletrônicas diferentes. Desta forma, não existe interação no ponto de intersecção e a transferência de elétron de D para A não pode ocorrer.

Figura 2. (A) Representação esquemática de uma intersecção entre duas superfícies potenciais, representando os reagentes (D, A) e os produtos (D^+ e A^-). (B) Representação esquemática de uma reação de transferência de elétron fracamente adiabática. A intersecção é fraca se a mudança na região de intersecção é pequena em relação às energias térmicas normais.

O limite adiabático é atingido conforme aumenta a interação no ponto de intersecção. Neste ponto existem duas categorias que devem ser consideradas: reações de transferência de elétron fracamente adiabáticas e fortemente adiabáticas. No caso de reações fracamente adiabáticas, (Figura 2B) existe um acoplamento eletrônico finito entre os estados D, A e D^+ , A^- na intersecção, porém o acoplamento é dito “pequeno”. A dimensão do acoplamento é medida em relação à diferença de energia entre o estado inicial e a estrutura de transição no limite diabático. A importância do caso fracamente adiabático é que a transferência de elétron ocorre e sua energia de ativação (velocidade), pode ser, em princípio, estimada corretamente através de cálculos para o caso diabático. As teorias que relacionam ΔG_{et} à velocidade de transferência de elétron são representativas para o eventos fracamente adiabáticos.

A transferência de elétron é mais comum entre um composto no estado fundamental e outro no estado excitado, do que entre duas moléculas no estado fundamental – *transferência de elétron fotoinduzida* (Figura 3). Na Figura 3(a) o LUMO semi-preenchido da molécula excitada tem uma energia maior do que o LUMO vazio da molécula no estado fundamental. Uma transferência de elétron de D^* para A é, portanto, exotérmica. Na Figura 3(b) o HOMO semi-preenchido da molécula excitada é de energia mais baixa do que o HOMO completamente preenchido de D no estado fundamental. A transferência de elétron de D no estado fundamental para A^* é exotérmica. Neste caso, a transferência de elétron de A^* para D seria endotérmica apenas na situação apresentada na Figura 3(c), onde a molécula excitada tem maior energia no HOMO porém uma menor energia no LUMO, em relação à molécula no estado fundamental, a transferência de elétron entre a molécula no estado excitado e aquela no estado fundamental seria endotérmica, em ambos os sentidos de transferência. Se, entretanto, ambas as moléculas estão no estado fundamental, a transferência de elétron pode ser exotérmica apenas se o HOMO do doador for mais energético do que o LUMO do aceptor (Figura 3(d)). Neste caso, a transferência de elétron pode acontecer isoenergeticamente, resultando em um estado vibracional excitado que pode rapidamente relaxar para o estado indicado.

Figura 3. Aspectos termodinâmicos da transferência de elétron entre duas moléculas D e A.

Desta forma temos que quando da transferência de elétron entre duas moléculas no estado fundamental a mudança na energia livre é dada pela Eq. 4, na qual $E(D/D^+)$ é o

potencial de oxidação do doador e $E(A^-/A)$ é o potencial de redução do aceptor. ΔG_{et} é negativo apenas quando o potencial de redução do aceptor é maior do que o potencial de oxidação do doador.

$$\Delta G_{et} = E(D/D^+) - E(A^-/A) \quad \text{Eq. 4}$$

Entretanto, quando uma das moléculas encontra-se no estado excitado, aplica-se a equação de Weller, apresentada em sua forma para solventes polares.

$$\Delta G^* = E(D/D^+) - E(A^-/A) - E_{00} \quad \text{Eq. 5}$$

O termo adicional, E_{00} , é a energia de excitação da molécula excitada (D^* ou A^*). Na medida em que E_{00} é positiva, ΔG^* será muitas vezes negativa, mesmo quando o ΔG_{et} para a reação correspondente no estado fundamental é positiva.

Na realidade, muitas reações de transferência de elétron, particularmente aquelas que envolvem estados eletronicamente excitados, podem envolver forte acoplamento eletrônico em sua estrutura de transição. A magnitude desta interação depende dos detalhes da estrutura do doador e do aceptor. Neste caso, ocorrência fortemente adiabática, a barreira de ativação para a transferência de elétron é controlada principalmente pela força do acoplamento eletrônico entre D, A e D^{++} , A^{--} na estrutura de transição. As teorias clássicas que relacionam ΔG_{et} à velocidade de transferência de elétron não podem ser facilmente aplicadas no limite fortemente adiabático.

A coordenada de reação para reações de transferência de elétrons: Barreira cinética

As coordenadas vibracionais internas de D, A e D^{++} , A^{--} controlam em parte a posição do ponto de intersecção onde a reação de transferência de elétron ocorre. Isso pode ser ilustrado considerando a Figura 4, onde as energias são representadas de forma que os valores inicial e final sejam iguais ($\Delta G_{et} = 0$). Além disso, como simplificação, a curva representando D, A é mantida constante, entretanto a largura da curva D^{++} , A^{--} é aumentada (Figura 4).

Neste contexto, o alargamento da parábola pode ser interpretado como um enfraquecimento das constantes de força vibracional no estado D^{++} , A^{--} . Conforme a parábola se alarga, o ponto de intersecção entre as duas curvas se move para energias mais baixas. Isto corresponde a uma barreira de ativação mais baixa e uma reação de transferência de elétron mais rápida.

Figura 4. Representação esquemática do efeito da mudança na energia de reorganização interna (λ) sobre a barreira de ativação ($\Delta G^\ddagger$) para uma reação de transferência de elétron.

Na realidade, é impossível modificar significativamente as constantes de força dos reagentes ou produtos sem afetar simultaneamente o ΔG_{et} . Apesar disso, fica claro que um importante componente para a descrição da coordenada de reação é a posição dos átomos do doador e do aceptor no espaço. Esta contribuição à barreira de ativação é chamada energia de reorganização interna (λ_i). Em teoria, a magnitude de λ_i pode ser calculada a partir de princípios simples:

$$\lambda_i = \sum_i \frac{k_i^r \cdot k_i^p}{k_i^r + k_i^p} \cdot (q_i^r - q_i^p) \quad \text{Eq. 6}$$

onde k^r e k^p representam as constantes vibracionais, em modo normal, do estado de reagente (D, A) e do estado de produto (D^+ , A^-); a diferença ($q^r - q^p$) representa as mudanças no comprimento e nos ângulos das ligações na transição de reagentes a produtos. Esta generalização compreende todos os graus de liberdade.

O segundo componente da coordenada de reação para as reações de transferência de elétron é a energia de reorganização de solvente. Este parâmetro (λ_s), é em alguns casos o fator dominante do controle de velocidade de reação de transferência de elétron. O estado inicial deste tipo de reação é não iônico, e a organização dos dipolos dos solventes em torno dos reagentes não afeta significativamente a energia deste estado. Por outro lado, o estado final D^+ , A^- é iônico, e sua energia vai ser bastante sensível à orientação dos dipolos do solvente. Além disso, é importante considerar a polarizabilidade dos solventes na avaliação de sua resposta à separação de cargas. Tanto a

polarizabilidade quanto a polaridade do solvente estão incluídas em λ_s (Eq. 7), que assume o modelo de esferas de Born.

$$\lambda_s = e^2 \cdot \left(\frac{1}{2r_D} + \frac{1}{2r_A} - \frac{1}{r_{AD}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\epsilon} - \frac{1}{n^2} \right) \quad \text{Eq. 7}$$

onde n é a constante dielétrica óptica do solvente.

A energia de reorganização total (λ) para a reação de transferência de elétron é simplesmente a somatória do componente interno e do solvente (Eq. 8). Nas teorias clássicas de transferência de elétrons, para o caso fracamente adiabático, a velocidade da reação pode ser predita apenas com o conhecimento de ΔG_{et} e λ .

$$\lambda = \lambda_i + \lambda_s \quad \text{Eq. 8}$$

A Figura 5 apresenta a barreira intrínseca representada pela energia de reorganização em uma reação exotérmica genérica, em uma região chamada “normal” de Marcus.

Figura 5. Transferência de elétron originada de um doador D para um aceptor A. A reação ocorre na região de intersecção, quando os estados inicial e final têm a mesma geometria.

Nas deduções apresentadas, todas as vibrações são tratadas como osciladores clássicos. Na aproximação semiclássica de Marcus, as vibrações internas do doador e do aceptor são tratadas através de mecânica quântica, mas os modos vibracionais do solvente são encarados como osciladores clássicos. A teoria de Marcus totalmente quantizada baseia-se no modelo fornecido pela mecânica quântica para todas as vibrações do sistema, internas e de solvente. Desta forma, a *Teoria de transferência de elétron de Marcus*, em seus diversos níveis, oferece elementos para o estudo de inúmeras reações, incluindo

aquelas que ocorrem em sistemas biológicos, e especialmente aquelas que envolvem mecanismos complexos, como as reações de luminescência induzida por troca de elétron.