UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE DIOXETANOS
E DE SEU ENVOLVIMENTO EM
FOTOBIOQUÍMICA NO ESCURO

LUIZ HENRIQUE CATALANI
TESE DE DOUTORAMENTO

Orientador:
Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA

SÃO PAULO
1984

"A lanterna tombou no lago. Nessa noite os peixes principiaram a cur."

Paulo Bonfim

Dedico esta tese à todas as
pessoas que, independente do
sentido formal das palavras ditas
por mim, compreenderam o seu
significado real.

Agradecimentos especiais:

ao amigo Etelvino, por ter acreditado em mim e pela orientação saudável, no sentido em que sempre se preocupou mais com a minha formação como cientista e indivíduo do que com produção de "papers".

aos meus pais Onildo e Nair e aos meus irmãos Lelo, Liza e Luíza, pelos beijos, afagos e coques.

Agradecimentos

à FAPESP, FINEP, CNPq e Fundação Volkswagen pela ajuda financeira.

aos Profs. G. Cilento, F. Quina, T. Wilson e D. B. Dunford pelas sugestões e críticas.

ao pessoal de Atlanta e, principalmente, ao Prof. A. L. Baumstark pela co-orientação no trabalho lá desenvolvido.

à Mãe e Aninha pelo carinho mágico dos últimos 5 anos e por não me perdoarem.

ao povo do laboratório: Adelaide, Ana Lúcia, Karin, Hilóia, Lidia² (Butturini e Grillo), Cornélia, Meirinha, Iguatemi (Ninni), Roberto (Memé), Piro (Boca), Huguinho, Willi, Miguel (???) , Miguel (No Más), Nelson, Luci, Felipe, mamãe Jaira, Nazira, Alberto e Ivone, pela amizade e por aguentarem a minha enchecão de saco.

à todas as pessoas que eu gosto e que não cabem aqui e a todas as que, se não ajudaram também não atrapalharam.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Importância do estudo da bioluminescência e da fotobioquímica no escuro	1
1.2 - Participação de dioxetanos e dioxetanonas em processos bioquímicos	5
1.3 - Aspectos químicos de dioxetanos	11
1.3.1 - Formação de estados excitados ...	13
1.3.2 - Mecanismos de clivagem	15
1.3.3 - Estabilidade de dioxetanos	20
1.3.4 - Rendimentos quânticos de quimi-excitação	22
1.3.5 - Reatividade de dioxetanos	26
1.3.5.1 - Reações de inserção	26
1.3.5.2 - Decomposição catalítica	20
1.3.6 - Métodos sintéticos de dioxetanos.	30
1.3.6.1 - Método de Kopecky	30
1.3.6.2 - Fotoxigenação de olefinas....	31
1.4 - Transferência de energia triplete de carbonilas excitadas geradas química e enzimaticamente para aceptores artificiais e biológicos	33
1.4.1 - Mecanismos de transferência de energia	33
1.4.1.1 - Mecanismo trivial de transferência de energia	33
1.4.1.2 - Transferência de energia por interações Coulômbicas	34

	Pág.
1.4.1.3 - Transferência de energia por troca de elétrons	36
1.4.1.4 - Determinação das constantes de velocidade de transferência de energia	38
1.4.2 - Dioxetanos como fonte de carbonilos triplete	41
1.4.3 - Carbonilos triplete gerados espontaneamente	44
2. OBJETIVOS	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 - Símbolos e Abreviações	52
3.2 - Drogas	53
3.3 - Aparelhagem	56
3.4 - Métodos sintéticos	58
3.4.1 - Síntese do tetrametil-1,2-dioxetano	58
3.4.2 - Síntese de uma série de 3-metil-3-alkil-1,2-dioxetanos	61
3.4.3 - Síntese de dioxetanos bicíclicos..	63
3.4.4 - Síntese de derivados sulfonados de antraceno	63
3.5 - Métodos Analíticos	65
3.5.1 - Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos	65
3.5.1.1 - Determinação da energia de ativação da termólise dos dioxetanos	65
3.5.1.2 - Supressão da energia de excitação eletrônica por aceptores não-emissivos. Determinação do K_{SV}	67

	Pág.
3.5.1.3 - Determinação de energia de excitação eletrônica por aceptores fluorescentes. Determinação de $^3\Phi$, $^1\Phi$ e $k_{ET}\tau^O$	69
3.5.1.4 - Determinação de rendimentos quânticos de fluorescência de aceptores emissivos e a variação com a temperatura	73
3.5.1.5 - Determinação de Φ_{TS} de acetona triplete para DBAS singlete e do Φ_F de DBAS e DPAS	74
3.5.1.6 - Cinética de oxidação de clorpromazina	77
3.5.2 - Análise de estruturas, dosagem e purificação	78
3.5.2.1 - Purificação de dioxetanos.....	78
3.5.2.2 - Dosagem dos dioxetanos e peróxido de hidrogênio	80
3.5.2.3 - Determinação dos produtos e da estequiometria da reação entre CPZ e TMD	81
3.5.2.4 - Purificação do DBAS e DPAS ...	83
4. UTILIZAÇÃO DE TMD COMO MODELO QUÍMICO DE PRODUÇÃO DE ACETONA TRIPLETE EM ÁGUA	85
4.1 - Resultados	85
4.1.1 - Parâmetros de ativação de termólise em água e em outros solventes	85
4.1.2 - Rendimento de produção de acetona triplete e singlete na termólise de TMD	90

	Pág.
4.1.3 - Dependência dos parâmetros de trans <u>fer</u> ência de energia e vida média com o tipo de solvente utilizado...	96
4.1.4 - Propriedades fotofísicas de DBAS e DPAS em água	102
4.2 - Discussão e Conclusões	111
4.2.1 - Efeito do Solvente na estabilidade do TMD	111
4.2.2 - Efeito do solvente nos valores dos parâmetros Φ_{TS} , $^3\Phi$ e $^1\Phi$ e vida média	112
4.2.3 - Utilização do DBAS e DPAS como "pro <u>bes</u> " de espécies excitadas em água.	115
5. TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA DE EXCITAÇÃO ELETRÔNICA GERADA NA TERMÓLISE DO TMD EM ÁGUA PARA ACCEPTORES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA	119
5.1 - Resultados	119
5.1.1 - Supressão por dienos	110
5.1.2 - Supressão de tirosina e 3,5-diha <u>lo</u> geno derivados	122
5.1.3 - Supressão por indol e derivados ..	125
5.1.4 - Supressão por quinonas	128
5.1.5 - Transferência de energia para ri <u>bo</u> flavina	132
5.1.6 - Transferência de energia para pigmentos xantênicos	134
5.1.7 - Oxidação de clorpromazina pela ação do TMD	137
5.1.7.1 - Alteração espectral de CPZ pela ação de TMD	138
5.1.7.2 - Verificação da formação de epóxido na reação entre TMD e CPZ por RMN ¹ H	143

	Pág.
5.1.7.3 - Supressão da quimiluminescência de TMD por CPZ	143
5.1.7.4 - Estudo cinético da reação entre CPZ e TMD	145
5.1.7.5 - Determinação da estequiometria da reação entre CPZ e TMD	148
5.1.7.6 - Fotoxidação de CPZ por irradiação	150
5.1.7.7 - Interação entre CPZ e o Sistema enzimático IBAL/HRP/O ₂ . Estudos complementares	152
5.2 - Discussão e Conclusões	163
5.2.1 - Supressão de acetona triplete gerada quimicamente	165
5.2.2 - Comparação entre sistemas químico e enzimático	171
5.2.3 - Mecanismo de oxidação de CPZ pelo sistema químico e sistema enzimático	176
6. CONTRIBUIÇÃO À QUÍMICA DE DIOXETANOS. EFEITO DE ESTRUTURA NA ESTABILIDADE TÉRMICA	180
6.1 - Resultados	180
6.1.1 - Estudo de uma série de 3-metil-3- -alquil-1,2-dioxetanos. Síntese de determinação de parâmetros termodinâmicos	180
6.1.2 - Estudos das propriedades cinéticas e termodinâmicas de dioxetanos bicíclicos	189
6.2 - Discussão e Conclusões	195
7. SUMÁRIO	201
SUMMARY	206

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	210
APÊNDICE I: Normas de Segurança para o Trabalho com Peróxidos em Geral	227
APÊNDICE II: Supressão da Quimiluminescência de Dioxetanos na Presença de um Sensi- tizador	229
APÊNDICE III: Termólise de Dioxenatos na Presença de Aceptores Fluorescentes. Equação do Duplo Recíproco	233
APÊNDICE IV: Análise Cinética da Reação do Siste- ma CPZ/HRP/H ₂ O ₂ . Dedução da Equação 5.1	238

1. INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA BIOLUMINESCÊNCIA E DA FOTOBIOQUÍMICA NO ESCURO

A bioluminescência é o fenômeno de quimiluminescência que ocorre no corpo ou, algumas vezes, na secreção de certos tipos de organismos vivos. Até o ano de 1957, os conhecimentos sobre a química da bioluminescência limitavam-se a observações puramente fenomenológicas da ocorrência "in vivo" de sistemas substrato/enzima (denominado por DUBOIS, em 1887, de "luciferina/luciferase") responsáveis pela produção de luz, além de sua distribuição filogenética (HARVEY, 1952). Foi neste ano que SHIMOMURA, GOTO e HIRATA, primeiro isolaram e purificaram a luciferina de Cypridina, enquanto que BITLER e McELROY fizeram o mesmo para a luciferina do vagalume. A partir daí, e do fim da chamada era "Dubois-Harvey", até os dias atuais, através da nova era chamada "McElroy-Shimomura", os avanços nesta área foram significativos.

Hoje, já se tem um substancial conhecimento químico destes sistemas com relação a: (i) co-fatores essenciais (íons metálicos, nucleotídeos), (ii) estrutura completa de algumas luciferinas (seis ao todo) e (iii) métodos de purificação de luciferases (CHASE, 1960; SHIMOMURA, 1982). Mais relevante ainda é o aspecto referente a sua aplicabilidade: sistemas bioluminescentes luciferina/luciferase, p.ex., de vagalume, são normalmente

comercializados e utilizados na determinação de baixos níveis de ATP (adenosina trifosfato), através de técnicas de medidas de intensidade de luz (SHIMOMURA, 1983). Este método já é bastante difundido nas áreas clínica, industrial, controle de qualidade de águas, etc, e apresenta alta sensibilidade (da ordem de nanomolar).

SELIGER e McELROY (1965) propuseram uma interessante teoria sobre as razões evolucionárias que levaram ao aparecimento da bioluminescência. Nos primórdios da vida em nosso planeta, sistemas bioquímicos consumidores de O_2 (como é o caso de reações bioluminescentes) teriam se desenvolvido de forma a proteger os seres vivos contra a atmosfera altamente oxidante. Esta teoria foi posteriormente refutada por vários pesquisadores. Atualmente, a bioluminescência é visualizada como sendo apenas um dos aspectos de um amplo fenômeno que seria a produção de espécies eletronicamente excitadas em processos bioquímicos. A hipótese da formação de estados excitados não emissivos em processos biológicos, por outro lado, tem sido levantada por inúmeros autores (SZENT-GYÖRGYI, 1941; ANDERSON, 1947; STEELE, 1963; WHITE e colabs., 1970; 1974; GUTHANS e colabs., 1979; CILENTO, 1965, 1973, 1974, 1975, 1982).

Vários fenômenos observados em organismos vivos, de natureza tipicamente fotoquímica, mas de ocorrência na ausência de luz, poderiam ser explicados através da participação de estados eletronicamente excitados. Por exemplo, (i) a enzima de fotorreativação, responsável pelo reparo de dímeros de pirimidina em DNA, é dependente

de luz (SUTHERLAND, 1981). Sua presença foi detectada em tecidos não expostos à luz e em animais noturnos (COOK, 1967); (ii) foi observada, também a presença de enzimas do ciclo de Calvin em vermes marítimos que vivem a 2500 metros de profundidade (MORGAN, 1981); (iii) a ocorrência de transformação do alcalóide colchicina em seus lumiderivados, β - e γ -lumicolchicinas, durante a fase escura do desenvolvimento da planta Colchicum autumnale (BRUNETTI e colabs., 1982; (iv) a transformação das pré-vitaminas ergosterol e 7-deidrocolesterol em vitaminas D₂ e D₃, respectivamente, é dependente de luz (JACOBS e HAVINGA, 1979). BILLS (1927) observou que a quantidade de vitamina D encontrada em certos peixes era muito superior àquela esperada por ingestão de alimentos ou pela intensidade da luz acessível. Em vista disso, diversos pesquisadores partiram à procura de provas concretas da participação de estados excitados em sistemas bioquímicos "escuros".

CILENTO e colaboradores observaram a formação de espécies eletronicamente excitadas na oxidação de diversos substratos contendo grupos metino ativados por carbonila, catalizada por uma enzima, a peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase", HRP). Dentre os substratos estudados incluem-se: aldeídos alifáticos (FARIA-OLIVEIRA e colabs., 1978; HAUN e colabs., 1980; CAMPA e colabs., 1984), malonaldeído (VIDIGAL-MARTINELLI e colabs., 1979), ácidos indolacético e indolpirúvico (VIDIGAL e colabs., 1979; ZINNER e colabs., 1980), hidrazida do ácido nicotínico (ZINNER e colabs., 1977), acetaldeídos aromáticos (DURÁN e colabs., 1977), β -dicetonas (SOA-

RES e BECHARA, 1982) e diversas bases de Schiff (BECHARA e MEDEIROS, 1984; MEDEIROS e BECHARA, comunicação pessoal). Além disso, observou-se a transferência desta energia de excitação para aceptores específicos, de ocorrência biológica ou não, como: pigmentos xantênicos (DURÁN e CILENTO, 1980), flavinas (HAUN e colabs., 1978; RIVAS-SUÁREZ e colabs., 1979), clorofila (AUGUSTO e CILENTO, 1979), quinonas (RIVAS-SUÁREZ e colabs., 1981), tirosina e dihalogenoderivados (RIVAS-SUÁREZ e colabs., 1983), compostos indólicos (RIVAS-SUÁREZ e CILENTO, 1981), e para estruturas mais complexas como cloroplastos (NASSI e CILENTO, 1982, 1983; CAMPA e colabs., 1984) e microsomas (CAMPA e CILENTO, comunicação pessoal). Em muitos casos, constatou-se que estes sistemas são capazes de induzir fototransformações na ausência de luz como a interconversão do fitocromo $P_r \xrightarrow{h\nu} P_{fr}$ (AUGUSTO e colabs., 1978), a oxidação de clorpromazina (DURÁN e colabs., 1978), a transformação de colchicina em lumicolchicinas (BRUNETTI e colabs., 1982) e danos em fitas de DNA (MENECHINI e colabs., 1978; FALJONI e colabs., 1978).

O estudo de tais reações faz parte de uma ampla linha de pesquisa denominada "fotobioquímica no escuro". Devido às conexões muito próximas entre os resultados obtidos nesta linha com os apresentados nesta tese, decidiu-se abordá-los com maiores detalhes durante a apresentação de RESULTADOS E DISCUSSÃO.

1.2 PARTICIPAÇÃO DE DIOXETANOS E DIOXETANONAS EM PROCESSOS BIOQUÍMICOS

Os dioxetanos e dioxetanonas (ou α -peroxilactonas), peróxidos cíclicos de anel tetratômico, constituem uma classe notável de compostos orgânicos: sua termólise, unimolecular e unidirecional, é quimiluminescente. Sob aquecimento, a molécula de dioxetano (ou dioxetanona) sofre clivagem produzindo duas moléculas carbonílicas, uma delas num estado eletronicamente excitado (*) (Esquema 1.1).

Esquema 1.1

Dioxetano

Dioxetanona

Cálculos termoquímicos, baseados em valores tabelados de energias de ligação (WILSON e SCHAAP, 1971) ou em valores de entalpias de formação de grupos atômicos (BENSON e colabs., 1969; RICHARDSON e colabs.,

1974), mostram que a clivagem térmica de compostos dioxetânicos é suficientemente exotérmica para excitação eletrônica de uma das moléculas-produto. Assim, enquanto a exotermicidade da reação (ΔH_R^0) é da ordem de 80 a 100 kcal/mol, a excitação de aldeídos e cetonas aos respectivos estados singlete ou tripletes requer em geral menos de 85 kcal/mol (TURRO, 1978). Durante a reação ocorre, portanto, conversão de energia química em energia de excitação eletrônica.

Em tempos remotos, muitos autores reportaram a síntese e isolamento de 1,2-dioxetanos e análogos (BLITZ, 1897; BUSH e DIETZ, 1914; STEPHENS, 1928; KOHLER e THOMPSON, 1937). Posteriormente, entretanto, foi demonstrado que estas estruturas eram, na sua maioria, hidroperóxidos ou endoperóxidos (CRIEGEE, 1936; BERGMANN e colabs., 1939; RIGAUDY, 1948; FUSON e JACKSON, 1950; CRIEGEE e LOHAUS, 1951).

Somente em 1969 foi publicada a síntese e caracterização do primeiro dioxetano autêntico, o trimetildioxetano, por KOPECKY e MUMFORD. Em 1972, foi isolada e caracterizada a primeira dioxetanona por ADAM e LIU.

A grande importância destes compostos provém do fato de serem propostos como os intermediários "ricos em energia" de reações bioluminescentes (THOMAS e colabs., 1967; McCAPRA e colabs., 1968; McCAPRA, 1976), de reações responsáveis por "fotobioquímica no escuro" (WHITE e colabs., 1974; CILENTO, 1974, 1975, 1980B), e de algumas

reações quimiluminescentes (p. ex., acridinas; McCAPRA e RICHARDSON, 1964; peroxioxalatos, RAUHUT, 1969; aminoetilenos, URRY e SHEETO, 1965).

Nas reações bioluminescentes e naquelas que promovem "fotobioquímica no escuro", um substrato contendo um grupo metilênico ou metínico ativado por α -carbonila seria oxidado a um dioxetano ou dioxetanona intermediário através da ação de uma enzima, luciferase ou peroxidase, que atua como dioxigenase interna. Imediatamente, este intermediário dioxetânico seria clivado produzindo dois fragmentos carbonílicos, um deles excitado ao estado singlete (luminescente) ou triplete (em geral, sistemas não emissivos). O mecanismo geral de reação proposto para estes sistemas está representado no Esquema 1.2.

A via (b) representa genericamente as reações bioluminescentes que ocorrem em vagalumes, crustáceos, medusas, anemonas, etc. (HASTINGS e WILSON, 1976; McCAPRA, 1976). Nestes casos, o produto excitado é gerado com alta eficiência no estado singlete (fluorescente), o qual, em seguida, emite um fóton e cai para o estado fundamental.

Ambas as vias (a) e (b), podem representar certos processos bioquímicos aeróbicos, catalisados por peroxidases, lipopoxigenases, etc., onde o produto é gerado, principalmente, no estado singlete. Segundo CILENTO (1974, 1975) e WHITE e colaboradores (1974), em virtude da vida média relativamente longa de estados triple-

Esquema 1.2

tes e de sua alta reatividade química, tais estados, se produzidos "in vivo", poderiam promover uma série de conversões tipicamente fotoquímicas em biomoléculas, com consequências normais ou lesivas à célula.

A participação de um intermediário dio-xetânico na reação bioluminescente do vagalume foi comprovada através de marcação isotópica. SHIMOMURA e colaboradores (1977) observaram a formação do CO_2 da reação contendo até 75% de $\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ quando a reação é feita com H_2^{16}O

contendo $^{18}\text{O}_2$ (C^{16}O_2 e $^{16}\text{O}_2$ são previamente retirados por vácuo). Além disso, WANNLUND e colaboradores (1978) obtiveram os mesmos resultados utilizando $[^{14}\text{C}]$ -luciferina em H_2^{18}O contendo $^{17}\text{O}_2$, evitando, assim, o efeito de C^{16}O_2 contaminante, oriundo principalmente de troca isotópica com o oxigênio da água.

Esquema 1.3

A proposta da participação de um intermediário dioxetânico em reações que promovem "fotobioquímica no escuro" parece ser igualmente válida. Por exemplo, a oxidação de isobutanal (Esquema 1.4) a acetona e ácido fórmico, catalisada por peroxidase, foi demonstrada por KENTEN (1953).

Essa reação produz uma intensa fosforescência de acetona, podendo ser observada a olho nu em sala escura com a vista adaptada (FARIA-OLIVEIRA e co-

Esquema 1.4

labs., 1978). O espectro de emissão deste sistema mostrou ser o mesmo de acetona fotoexcitada e o da emissão proveniente da termólise de tetrametildioxetano (que produz acetona triplete), ambos em meio deaerado (BECHARA e colabs., 1979). O caráter triplete da espécie excitada formada foi comprovado, também, por transferência de energia de excitação para aceptores específicos de espécies tripletes, como o íon sorbato e o 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato (FARIA-OLIVEIRA e colabs., 1978; BECHARA e colabs., 1979).

1.3 ASPECTOS QUÍMICOS DE DIOXETANOS

A partir da síntese e caracterização do primeiro dioxetano e da primeira dioxetanona, houve um considerável avanço da química destes compostos. Hoje são conhecidos pelo menos cem dioxetanos "estáveis" e várias dioxetanonas. Todos eles produzem durante a termólise espécies eletronicamente excitadas.

Através da (i) determinação experimental dos parâmetros de ativação de termólise dos dioxetanos (E_a , $\log A$ e $\Delta S^\ddagger$), e (ii) dos rendimentos quânticos de produção de espécies singletes e tripletes ($^1\phi$ e $^3\phi$, respectivamente), (iii) de cálculos teóricos ou semi-empíricos e (iv) do estudo da reatividade química de dioxetanos apropriadamente substituídos (alquílicos, aromáticos, heteroaromáticos, etc. e (v) investigando-se como os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da termólise e $^1\phi$ e $^3\phi$ são afetados por:

- (a) efeitos estéricos e eletrônicos de substituintes (BECHARA e colabs., 1976; WILSON e colabs., 1976; HORN e colabs., 1978-79);
- (b) efeito isotópico no anel dioxetânico (KOO e SCHUSTER, 1977);
- (c) efeito de solventes (hidrofílicos e não-hidrofílicos; WILSON e colabs., 1973; RICHARDSON e colabs. 1978);

- (d) efeito do contacto com superfícies adsorventes (McCAPRA e colabs., 1977);
- (e) efeito da concentração e natureza de agentes aceptores adicionados (McCAPRA, 1977; SCHMIDT e SCHUSTER, 1978);
- (f) irradiação com luz U.V. (SCHUSTER e colabs., 1975); etc.

tem-se procurado nos últimos anos explicar quais os fatores estruturais que determinam estabilidade do dioxetano, o seu mecanismo de clivagem e a distribuição de energia de excitação disponível na termólise em energia singlete e triplete dos produtos. Apesar do grande esforço experimental e teórico dispendido neste sentido, até hoje nenhum destes aspectos foi esclarecido de forma clara e definitiva. Citamos aqui revisões recentes de WILSON (1976), HORN e colabs., 1978-79), BECHARA (1979), ADAM (1982) ADAM e ZINNER (1982) como fontes para eventual consulta.

Deve-se mencionar aqui, que sem a caracterização simultânea da quimiluminescência, da natureza das moléculas-produto e das propriedades espectrais dos dioxetanos, os resultados descritos não podem ser confiáveis de maneira absoluta. Assim, (i) outros compostos que não são dioxetanos, tais como trioxanos (GOTO e NAKAMURA, 1976), peranidridos (SCHUSTER, 1977), peróxido de difenoila (KOO e SCHUSTER, 1977), etc., também quimiluminescem durante

aquecimento, (ii) a decomposição térmica, catalisada por ácidos de Lewis, de hidroperóxidos alílicos fornece os mesmos produtos esperados da termólise de dioxetanos (FRIMER, 1974) e (iii) a análise incorreta de espectros de RMN de "dioxetanos" (AKUTAGAWA e colabs., 1976) ou mesmo a ausência frequente de dados espectrais de dioxetanos estudados (DARLING e FOOTE, 1974; McCAPRA e colabs., 1977) lançam dúvidas sobre as propriedades cinéticas e quânticas ($^1\phi$ e $^3\phi$) descritas. Uma análise crítica dos dados da literatura foi feita por BECHARA (1979) cobrindo estes aspectos.

A seguir, será apresentado sucintamente as principais conclusões ou generalizações baseadas nos dados hoje disponíveis sobre as relações entre estrutura e estabilidade térmica dos dioxetanos, os rendimentos quânticos $^1\phi$ e $^3\phi$ e mecanismos propostos para sua clivagem.

1.3.1 - Formação de Estados Excitados

Como já foi dito anteriormente, a clivagem térmica de dioxetanos, produzindo dois compostos carbonílicos, deveria ser bastante exotérmica. O calor de termólise (ΔH^0) de dioxetanos pode ser estimado, a título de ilustração, por cálculos simples baseados em tabelas de energias de dissociação de ligações e de tensão de anéis:

Energia "gasta":

quebra da ligação C-C: + 83 kcal/mol

quebra da ligação O-O: + 32 kcal/mol

Energia "ganha":

formação de duas ligações C=O: -180 kcal/mol

(considerando a diferença entre a formação de C=O: 176 kcal/mol e a dissociação de C-O: 86 kcal/mol)

tensão do anel (ciclobutano): - 26 kcal/mol

$$\Delta H^{\circ} \approx - 90 \text{ kcal/mol}$$

Considerando-se que a energia necessária para excitação eletrônica de aldeídos e cetonas ao primeiro estado singlete ou triplete é ≤ 85 kcal/mol (TURRO, 1978), torna-se evidente que a exotermicidade da termólise de dioxetanos é suficiente para popular níveis excitados de um de seus produtos. Além disso, na estrutura do dioxetano, a ligação C-O está fora do plano formado pelas ligações R_1-C-R_2 , tal como acontece com moléculas carbonílicas excitadas (HERZBERG, 1966; TURRO, 1978); no estado fundamental o grupo C=O é planar. Assim, durante a clivagem do dioxetano dando os produtos carbonílicos, não ocorreria a dissipação de energia de excitação na forma vibracional.

No caso de aldeídos e cetonas alifáticas, a configuração do estado excitado é principalmente $n\pi^*$, isto é, a excitação resulta da promoção de um elé-

tron do orbital não-ligante do oxigênio (elêtron n) ao or bital anti-ligante π^* ; a energia de excitação fica, assim, localizada na carbonila. Se na excitação não ocorrer inversão de spin, a multiplicidade do estado continua sen do singlete, caso contrário, triplete. No caso de compostos carbonílicos aromáticos polinucleares, especialmente aqueles contendo substituintes que aumentam a densidade eletrônica do sistema aromático (-OR, -NR₂, etc), aumenta o caráter $\pi\pi^*$ do estado excitado (singlete ou tri plete), isto é, a excitação resulta na promoção de elétron ligante π a π^* , conseqüentemente, a energia de exci tação fica delocalizada no sistema extensamente conjugado. No Esquema 1.5 encontram-se esquematizadas as transi ções eletrônicas de mais baixa energia que podem ocor rer em uma carbonila. (Esquema 1.5)

1.3.2 - Mecanismos de clivagem

Mesmo antes do isolamento do primeiro dioxetano por KOPECKY e MUMFORD (1969), McCAPRA (1968) já havia postulado que a clivagem "concerted" de um dioxetano deveria ser quimiluminescente. Segundo este mecanismo, durante a clivagem do dioxetano, a quebra das ligações O-O e C-C ocorrem simultaneamente à formação das carbonilas. (Esquema 1.6)

Este mecanismo foi proposto com base a diagramas de correlação de simetria de orbitais e de estado, os quais mostraram que a configuração eletrônica

Esquema 1.5 Esquema 1.6

do dioxetano no estado fundamental somente poderia ser cor relacionado com um estado eletronicamente excitado do produto carbonílico. Os cálculos de KEARNS (1969) previam ainda que deveria ocorrer formação preferencial de espécies triplete na termólise.

Hoje, entretanto, o mecanismo de clivagem que mais satisfaz os valores experimentais de E_a determinados para dioxetanos substituídos por grupos alquil, alcoil, acil e homoaril é o mecanismo via diradical (em etapas), proposto originalmente por RICHARDSON e O'NEAL (1972). Este mecanismo explica os efeitos de substituição isotópica no anel (H por D), da presença de anéis ali fáticos condensados e da natureza do solvente nos valores de E_a dos dioxetanos correspondentes e ainda satisfaz a cálculos teóricos e semi-empíricos posteriores (ADAM, 1977) aos de KEARNS e McCAPRA (HORN e colabs., 1978-79). Este mecanismo foi ampliado, posteriormente, por RICHARDSON e colabs. (1978) para incluir efeitos de substituintes e de solventes na partição da energia de excitação disponível em singletes e tripletes (Esquema 1.7).

Esquema 1.7

S_r e T_r representam, respectivamente, estados singlete e triplete do diradical transiente.

S_0 estado fundamental do produto

S_1 e T_1 primeiro estado singlete e triplete excitados do produto, respectivamente.

Para o caso de dioxetanonas ou dioxetanos contendo grupos de baixo potencial de oxidação (hetero aromáticos policondensados) ou que reajam com compostos de baixo potencial de oxidação adicionados ao sistema (hidrocarbonetos aromáticos policondensados), McCAPRA e SCHUSTER propuseram, independentemente, um mecanismo de clivagem iniciado por transferência de elétrons ("Chemically initiated electron exchange luminescence", CIEEL) (McCAPRA, 1977; SCHMIDT e SCHUSTER, 1977; SCHUSTER e HORN, 1982). Nestes casos, aqueles autores verificaram que a velocidade e eficiência de emissão de luz aumenta linearmente com o decréscimo do potencial de oxidação do hidrocarboneto (sensitizador) adicionado.

Esquema 1.8

1.3.3 - Estabilidade de Dioxetanos

Algumas relações empíricas de estrutura vs estabilidade podem ser observadas na inspeção dos parâmetros de ativação da termólise de dioxetanos já isolados, tabelados nos artigos de revisão de WILSON (1976), HORN e colaboradores (1978-79) e ADAM e ZINNER (1982). Entre elas, as mais importantes são:

- (a) o aumento do grau de substituição no anel leva a uma estabilização térmica. Esta tendência foi observada para substituições alquílicas (Esquema 1.9), alcofílicas, aromáticas e outras.

Esquema 1.9

$$E_a = 23,0 \text{ kcal/mol (RICHARDSON e colabs., 1974)}$$

$$E_a = 23,5 \text{ kcal/mol (KOPECKY e colabs., 1975)}$$

$$E_a = 27,6 \text{ kcal/mol (WILSON e colabs., 1976)}$$

- (b) os dioxetanos mais estáveis são aqueles que contêm grupos volumosos, especialmente quando rígidos.

Esquema 1.10

$$E_a = 27,6 \text{ kcal/mol (WILSON e colabs., 1976)}$$

$E_a = 30,8 \text{ kcal/mol}$ (BECHARA
e WILSON
1980)

$E_a = 34,6 \text{ kcal/mol}$ (SCHUSTER
e colabs.,
1975)

(c) a substituição de grupo alquil de um determinado dioxetano por aril não altera significativamente a energia de ativação, quando em ambos os casos a natureza da excitação eletrônica do produto é predominantemente $n\pi^*$.

Esquema 1.11

$E_a = 23,0 \text{ kcal/mol}$ (RICHARDSON e
colabs., 1974)

$E_a = 22,9 \text{ kcal/mol}$ (idem)

$E_a = 22,7 \text{ kcal/mol}$ (idem)

(d) os dioxetanos menos estáveis são as dioxetanonas, dioxetaniminas e dioxetanos contendo substituintes hetero aromáticos (derivados de acridina, p.ex.) ou outros anéis que confirmam caráter $\pi\pi^*$ predominante ao estado excitado do produto de termólise, ou seja, substituintes aromáticos policondensados de baixo potencial de oxidação.

Esquema 1.12

$E_a = 17,6 \text{ kcal/mol}$ (ITO e colabs., 1979)

$E_a = 19,8 \text{ kcal/mol}$ (ADAM e CUETO, 1979)

$E_a = 19,4 \text{ kcal/mol}$ (ADAM e STEINMETZER, 1972)

$E_a = 17,2 \text{ kcal/mol}$ (LEE e colabs., 1976)

$E_a = 21,0 \text{ kcal/mol}$ (BAUMSTARK e colabs., 1976)

1.3.4 - Rendimentos quânticos de quimilexcitação

Os rendimentos quânticos de produção de espécies singlete ($^1\Phi$) e triplete ($^3\Phi$) podem ser determinados (ADAM, 1982) por (i) medidas de quimiluminescência direta ($^1\Phi$, em solução aerada e $^3\Phi$, em solução deaerada), (ii) medidas de emissão fluorescente de agentes sen

sitizadores adequados adicionados à solução, os quais funcionam como aceptores específicos da energia singlete ou triplete das moléculas-produto excitadas (ver tratamento matemático deste método no Apêndice III); o 9,10-difenilantraceno, DPA, e o 9,10-dibromoantraceno, DBA, são usados tradicionalmente na química de dioxetanos como "contadores" de singletes e tripletes, respectivamente, e (ii) "contagem química", baseada na dosagem de fotoprodutos originados de conversões fotoquímicas no produto excitado ou em aceptores convenientes adicionados à solução.

Também aqui, algumas generalizações podem ser feitas tendo em vista os dados da literatura:

(a) verificou-se que, em geral, a termólise de dioxetanos e dioxetanonas, cujo produto tem caráter predominante $n\pi^*$, gera preferencialmente produto excitado no estado triplete (estado não emissivo em solução aerada), daí a quimiluminescência direta ser relativamente fraca (WILSON, 1976; BECHARA e colabs., 1976). A razão $^3\Phi/{}^1\Phi$ varia na faixa de 10 a 10^3 , com $^3\Phi$ variando de 3% no caso do 3,3-difenil-1,2-dioxetano (RICHARDSON e colabs., 1974), a cerca de 60% para o tetraetildioxetano (BECHARA e colabs., 1976).

RICHARDSON e colaboradores (1978), comparando os valores de E_a e $^3\Phi$ para diversos dioxetanos, observaram a existência de uma correlação empírica entre estes parâmetros, expressa pela Equação 1.1. De fato, a eficiência de produção de tripletes para a maioria dos dioxetanos aumenta com o aumento de efeitos estéricos (maior

E_a) e diminui com grupos que diminuem a densidade eletrônica do anel (menor E_a).

Equação 1.1

$$\% \text{ } ^3\phi = 7,24 E_a - 156$$

(b) Dioxetanos com substituintes heteroaromáticos, policondensados, cujo produto de termólise tem caráter predominante $\pi\pi^*$ no estado excitado de mais baixa energia, produzem na termólise preferencialmente estados singletes (HORN e colabs., 1978-79; HASTINGS e WILSON, 1976). Tais dioxetanos são geralmente instáveis e têm sido propostos como modelos intermediários de sistemas quimi e bioluminescentes (HASTINGS e WILSON, 1976; McCAPRA, 1976), onde a eficiência quântica de emissão luminosa (fluorescência) é relativamente alta. Esta eficiência atinge praticamente 100% no caso do sistema bioluminescente do vagalume.

Esquema 1.13

$$^1\phi = 25\% \quad (\text{McCAPRA e colaboradores, 1977})$$

$$^1\phi = 50\% \quad (\text{NAKAMURA e GOTO, 1979})$$

$$^1\phi = 22\% \quad (\text{ZAKLIKA e colaboradores, 1978})$$

Apesar de os valores de $^3\phi$ não serem normalmente reportados para estes sistemas (rendimentos de tripletes são metodologicamente difíceis de se obter quando os rendimentos de singletes são altos), parece claro que estes valores devem ser relativamente baixos e a relação $^3\phi/^1\phi \leq 1$. Este fato foi confirmado por McCAPRA e colaboradores (1977) ao estudarem o sistema mostrado no Esquema 1.14.

Esquema 1.14

1.3.5 - Reatividade de Dioxetanos

Estudos da decomposição térmica de dioxetanos levaram a descoberta de reações catalíticas não-térmicas destes compostos. Assim, reações de inserção, redução, decomposição catalisada por íons metálicos e outros compostos foram observados sem o acompanhamento de produção de estados excitados.

1.3.5.1 - Reações de Inserção

A inserção de compostos de fósforo trivalente na ligação peroxídica é a mais estudada das reações não-térmicas. Em 1973, BARTLETT e colaboradores observaram a formação de uma fosforana na reação entre trifenilfosfina e o tetrametildioxetano em C_6D_6 com alto

rendimento. Sob aquecimento, a fosforana se decompõe em trifenilfosfinóxido e o epóxido correspondente.

Esquema 1.15

Posteriormente, verificou-se que a reação de tetrametildioxetano com metildifenilfosfinito, trifenilfosfito e trietilfosfito em C_6D_6 também produzem fosforanas com razoáveis rendimentos (BARTLETT e colabs., 1974B). Alguns pesquisadores já utilizaram estas reações como métodos de preparação de fosforanas (CAMPBELL e colabs., 1976).

As reações entre tetrametildioxetano e trifenilarsênio, trifenilantimônio e trifenilbismuto também foram testadas (BAUMSTARK e colabs., 1979). As reações com derivados de arsênio e antimônio mostraram a formação do aduto de inserção, do mesmo tipo das fosforanas. A reação com derivado de bismuto apresentou, apenas, a decomposição catalítica do dioxetano a acetona.

Esquema 1.16

Reações de dioxetanos com compostos di-
valentes de enxofre também foram investigados (CAMPBELL e
colabs., 1975; WASSERMAN e SAITO, 1975). A reação de tri-
metildioxetano com difenilsulfeto produziu, à temperatura
ambiente, difenilsulfóxido e o óxido de trimetiletileno,
provavelmente via formação de uma sulfurana como interme-
diário (CAMPBELL e colabs., 1975).

Esquema 1.17

A reação do tetrametildioxetano com com-
postos de estanho II (BARTLETT e LANDIS, 1979) em solventes

próticos produziu uma mistura de pinacol (redução via mecanismo de inserção) e acetona (decomposição catalítica).

Esquema 1.18

1.3.5.2- Decomposição Catalítica

A sensibilidade de dioxetanos à presença de íons metálicos foi notada durante estudos cinéticos de sua decomposição. Os "efeitos de solvente" (TURRO e LECKTKEN, 1973A, 1973B) observados na termólise de dioxetanos em metanol e acetonitrila eram na verdade, resultado da decomposição "escura" de dioxetanos catalisada por traços de íons metálicos contaminantes (WILSON e colabs., 1973). A presença de agentes quelantes como EDTA resultou na diminuição do efeito de catálise "escura". Para metais divalentes, como o Cu^{2+} , os resultados são consistentes com um mecanismo onde o íon atua como ácido de Lewis.

Esquema 1.19

LEE e WILSON (1973) mostraram que cis-dietoxi-1,2-dioxetano sofre decomposição "escura" catalisada por aminas. Foi demonstrado, também, que a eficiência catalítica das aminas correlacionam com seus potenciais de ionização.

Dioxetanos podem, também, sofrer decomposição induzida por espécies excitadas (WILSON, 1976; HORN e colabs., 1978-79). Transferência de energia de uma espécie excitada qualquer ou mesmo dos produtos excitados da sua termólise catalisam a decomposição do dioxetano (LECKTEN e colabs., 1973; ADAM e colabs., 1975). Assim sendo, este efeito é especialmente favorecido em altas concentrações do dioxetano e baixas concentrações de oxigênio.

Esquema 1.20

1.3.6 - Métodos sintéticos de dioxetanos

1.3.6.1 - Método de Kopeccky

1,2-dioxetanos podem ser sintetizados por ciclização de β -halogenohidroperóxidos com solução metanólica de NaOH (no caso de haleto secundário) ou com suspensão de acetato de prata em éter anidro ou CH_2Cl_2 (no caso de haleto terciário (KOPECKY e MUMFORD, 1969; KOPECKY e colabs., 1975)).

Esquema 1.21

Os β -halogenohidroperóxidos, por sua vez, podem ser preparados a partir das olefinas correspondentes pelo tratamento com 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína ou seu análogo iodado, em solução concentrada de H_2O_2 em éter anidro a $-40^\circ C$.

Esquema 1.22 1.3.6.2 - Fotoxigenação de olefinas

Neste caso, dioxetanos e dioxetanonas podem ser preparados por cicloadição-1,2 de oxigênio singlete a certas olefinas "ricas em elétrons" (com substituintes

-OR, -NH₂, etc) (BARTLETT e SCHAAP, 1970) e que não possuam hidrogênios alílicos que possam ser abstraídos (SCHUS e colabs., 1975). Oxigênio singlete é produzido durante irradiação de solução diluída de um sensibilizador (azul de metileno, MB; tetrafenilporfina, TPP; etc) sob contínuo borbulhamento de oxigênio.

Esquema 1.23

A reatividade de ¹O₂ em relação a outras olefinas inclui cicloadição 1,3 com formação de um hidroperóxido alílico e cicloadição-1,4 produzindo 1,4-endoperoxídeo.

Esquema 1.24

1.4 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA TRIPLETE DE CARBONILAS EXCITADAS GERADAS QUÍMICA E ENZIMATICAMENTE PARA ACEPTORES ARTIFICIAIS E BIOLÓGICOS

1.4.1 - Mecanismos de Transferência de Energia

Uma molécula eletronicamente excitada pode transferir sua energia de excitação para um aceptor através de três mecanismos básicos: (i) mecanismo radiativo ou trivial, (ii) mecanismo por interação Coulômbica ou dipolo-dipolo e (iii) mecanismo por troca de elétrons ou colisional. A seguir serão apresentados os conceitos básicos de cada um destes mecanismos.

1.4.1.1 - Mecanismo trivial de transferência de energia

O mecanismo trivial, assim chamado pela sua simplicidade, consiste na emissão de fóton da espécie doadora (D) seguida de absorção deste fóton pela espécie aceptora (A).

Esquema 1.25

A eficiência deste processo dependerá do (i) rendimento quântico de emissão do doador, (ii) inte

gral de recobrimento entre o espectro de emissão de D e de absorção de A, (iii) da absorptividade molar de A e (iv) da concentração de A. Este mecanismo pode ser caracterizado pela (i) invariabilidade da vida média (τ) do doador na presença do acceptor, (ii) sua eficiência independe da viscosidade do solvente, porém (iii) depende da geometria do sistema de medida (FÖRSTER, 1959).

1.4.1.2 - Transferência de energia por interações Coulômbicas

O mecanismo de transferência de energia por interação Coulômbica ou dipolo-dipolo ou, ainda, do tipo Förster é o mecanismo onde o momento de dipolo oscilante da molécula excitada doadora induz um momento de dipolo na molécula acceptora transferindo, assim, a energia de excitação com consequente desativação.

Esquema 1.26

É interessante observar que este mecanismo ocorre por interação de campos magnéticos, não haven-

do troca de elétrons nem contato físico das moléculas interatuantes. Os elétrons mantêm-se em suas moléculas de origem e a transferência se dá a longa distância ($>20 \text{ \AA}$).

A formulação matemática deste processo, relacionando a velocidade do processo com suas variáveis, foi proposta por FÖRSTER (1959).

Equação 1.2

$$k_{ET} = k K^2 k_D^0 R_{DA}^{-6} J(\epsilon_A)$$

Na Equação 1.2, k_{ET} é a constante de velocidade de transferência de energia, k é uma constante dependente de condições experimentais, K^2 é o termo referente à orientação espacial, k_D^0 é a constante de desativação radiativa do doador, R_{DA} é a distância entre o doador e o acceptor em angstroms e $J(\epsilon_A)$ é a integral de recobrimento entre o espectro de emissão do doador excitado e o espectro de absorção do acceptor, incluindo os valores de absorptividade molar do último.

Assim sendo, as condições necessárias para que este processo ocorra são: (i) bom rendimento quântico de emissão do doador, (ii) alto grau de recobrimento espectral e (iii) alta absorptividade molar do acceptor na região de recobrimento. Estas são, também, as condições para uma eficiente transferência de energia trivial, o que leva a dificuldades na discriminação dos dois processos e, não raro, a interpretações errôneas.

Pela regra de seleção de spin (spin $D^* = \text{spin } D$ e spin $A = \text{spin } A^*$) o único processo que satisfaz

as condições de Förster é a transferência singlete (D)→singlete (A), já que a transferência triplete (D)→triplete (A) não satisfaz as condições (i) e (iii). A transferência triplete (D) → singlete (A), apesar de proibida pela regra de conservação de spin, estaria favorecida pela vida média mais longa do estado triplete de D (BENNET e colabs., 1964).

1.4.1.3 - Transferência de energia por troca de elétrons

Neste mecanismo há uma troca real de elétrons entre o doador e o aceptor, ou seja, um elétron pertencente a D^* passa para A enquanto outro elétron pertencente a A passa a D^* .

Esquema 1.27

Portanto, há interpenetração de nuvens eletrônicas através de colisão entre as moléculas e a distância entre D e A necessária para haja transferência de energia tem que ser menor ou igual a soma dos raios moleculares.

No processo de troca de elétrons, as passagens (a) e (b) do Esquema 1.27 poderão ocorrer simultaneamente - "concerted" - ou então através da formação de

um complexo de transferência de carga onde (a) (ou (b), dependendo do caso) ocorre em um primeiro passo, formando um par íon-radical intermediário, seguido da segunda passagem de elétrons. Outra possibilidade, ainda, seria a formação de uma ligação covalente formando um intermediário diradicalar ou Zwitteriônico (TURRO, 1978).

No casos limite, onde o processo de troca de elétrons é mais rápido que a difusão do par aceptor/doador na solução, o processo será controlado por difusão e $k_{ET} \approx k_{\text{difusional}}$ e, portanto, dependente da viscosidade do solvente, caso contrário $k_{ET} < k_{\text{difusional}}$.

DEXTER (1953) derivou uma expressão para a constante de velocidade de transferência por troca de elétrons.

Equação 1.3

$$k_{ET} = K J \exp(-2 R_{DA} L^{-1})$$

Na Equação 1.3, k_{ET} é a constante de velocidade de transferência de energia, K é uma constante relacionada à interação orbital específica, J é a integral de recobrimento espectral normalizada para o coeficiente de extinção de A (portanto, k_{ET} independe de ϵ_A), R_{DA} é a distância entre o doador e o aceptor em angstroms e L é o raio de van der Waals.

Por este mecanismo as transições aptas a ocorrerem seriam singlete (D) $\rightarrow$ singlete (A) e triplete (D) $\rightarrow$ triplete (A). Novamente, a transição triplete (D) $\rightarrow$ singlete (A) poderia ocorrer devido a longa vida média do

triplete (D), apesar da proibição pela regra do spin.

Algumas diferenças entre os mecanismos dipolo-dipolo e por troca de elétrons podem ser observadas como: (i) no mecanismo dipolo-dipolo a velocidade de transferência de energia é proporcional a R_{DA}^{-6} enquanto que no mecanismo por troca de elétrons a velocidade cai exponencialmente com o aumento de R_{DA} , o que significa que a velocidade é quase nula para distâncias maiores que uma ou duas vezes o diâmetro molecular e (ii) a velocidade de transferência de energia pelo mecanismo dipolo-dipolo depende das eficiências dos processos radiativos $D^* \rightarrow D$ e $A \rightarrow A^*$ (k_D^0 e ϵ_A), enquanto que o mecanismo por troca de elétrons não pode ser relacionado a nenhuma grandeza mensurável experimentalmente.

1.4.1.4 - Determinação das constantes de velocidade de transferência de energia

Nos casos onde o acceptor de energia de excitação não emite (supressão), a constante de velocidade de transferência de energia pode ser relacionada com a intensidade de emissão de D^* através da Equação de Stern-Volmer (WAGNER, 1967; TURRO, 1978).

Equação 1.4

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_D^0 |A|$$

Na equação 1.4, I^0 é a intensidade de emissão de D^* na ausência de A, I é a intensidade de luz na presença de uma determinada concentração de A, k_q é a constante de velocidade bimolecular do processo de supressão e τ_D^0 é a vida média de D^* na ausência do acceptor. O valor de $k_q \tau_D^0$ (também chamado de constante de Stern-Volmer, K_{SV}) pode, em alguns casos (p.ex., supressão "estática") conter uma constante de associação entre o doador e o acceptor.

Muito frequentemente, p.ex. carbonilas tripletes em solução aerada, o doador também não emite. Nestes casos, torna-se necessário a utilização de sensibilizadores de emissão em concentrações tal que não afetem significativamente a vida média do doador. A equação de Stern-Volmer pode ser utilizada desde que se faça uma correção para o efeito de supressão do acceptor sobre a espécie excitada secundária (sensitizador).

Equação 1.5

$$\frac{I_0}{I} = (1 + k_q \tau_D^0 |A|) (1 + k'_q \tau_S^0 |A|)$$

A constante de velocidade de supressão de S^* por A (k'_q) e a vida média de S^* na ausência de A (τ_S^0) podem ser calculados independentemente em outro experimento onde S é fotoexcitado. Na Equação 1.5 τ_D^0 é igual a $1/(k_d + k_{ET}|S|)$, daí a necessidade de se usar baixa concentração de S. O tratamento matemático do qual a Equação 1.5 foi derivada encontra-se detalhadamente descrito

no Apêndice II e a sua utilização experimental no item 3.5.1.2.

WILSON (1976) derivou uma equação para transferência de energia de carbonilos triplete formados na termólise de dioxetanos para aceptores fluorescentes (S):

Equação 1.6

$$I_S = \frac{k_1 |\text{diox}| {}^3\phi_F^S k_{TS} |S|}{k_d + k_{ET} |S|}$$

Na Equação 1.6 I_S é a intensidade de emissão de S^* , k_1 é a constante de velocidade de termólise do dioxetano, ${}^3\phi$ é o rendimento quântico de produção de tripletes, ϕ_F^S é o rendimento de fluorescência de S, k_{TS} é a constante de velocidade de transferência triplete-singlete, k_d é a constante de desativação das carbonilas triplete formadas na ausência de S e k_{ET} é a soma das constantes de velocidade de todos os processos de transferência dos carbonilos triplete para S.

Da projeção de I_S por $|S|$ obtém-se uma curva de saturação do tipo Michaeliana. A projeção de seus inversos fornece uma reta de cujos coeficientes angulares e lineares pode-se calcular $k_{ET} \tau_D^0$ e ${}^3\phi$.

Equação 1.7

$$\frac{\text{Coef. linear}}{\text{Coef. angular}} = k_{ET} \tau_D^0$$

$$\text{Coef. linear} = 1/k_1 |D|^3 \phi_F^S \phi_{TS}$$

$$\text{onde } \phi_{TS} = \frac{k_{TS}}{k_{ET}}$$

O tratamento matemático do qual se extraíram as Equações 1.6 e 1.7 encontra-se no Apêndice II. e a sua utilização experimental descrita no ítem 3.5.1.3. Pelo mesmo tratamento chega-se a equação semelhante para o caso de sensitização de espécies singlete.

1.4.2 - Dioxetanos como fonte de carbonilos triplete

A viabilidade da utilização de energia triplete gerada quimicamente em trabalho fotoquímico no escuro, realizado em aceptores adicionados, foi demonstrado pela primeira vez por WHITE e colaboradores (1974). Várias reações classicamente promovidas por irradiação foram então sensitizadas por acetona triplete gerada na termólise de trimetildioxetano (TrMD), entre elas: isomerização cis-trans de estilbeno, dimerização de acenaftileno e cicloisomerização de 4,4-difenilciclohexadienona (Esquema 1.28).

Esquema 1.28

TURRO e LECHTKEN (1972) verificaram a isomerização cis-trans de 1,2-dietoxietileno e 1,2-diciano-etileno acopladas a termólise do tetrametildioxetano. Outros substratos de ocorrência biológica foram também utilizados como aceptores de energia triplete dos produtos de termólise de dioxetanos.

Esquema 1.29

STEINMETZER e colaboradores (1973) e WILSON e colaboradores (1976) demonstraram que dienos conjugados (p.ex., pentadieno e 2,5-dimetil-2,4-hexadieno) e acrilonitrila interceptam espécies triplete geradas na termólise de dioxetanos, desativando-as.

Dienos conjugados tem energia triplete ($S_0 \rightarrow T_1$) igual ou abaixo de 60 kcal/mol (PORTER e colabs., 1971; WAGNER, 1976) o que os torna compostos extremamente úteis como supressores de carbonilos triplete ($E_T \sim 60$ a 80 kcal/mol ; TURRO, 1978). O processo de supressão tem natureza colisional (WAGNER, 1976).

MIRBACH e colaboradores (1980) testaram uma série de compostos carbonílicos como supressores da fosforescência de acetona triplete gerada na termólise do TMD em acetonitrila. Os autores observaram que as constantes de supressão para fenilalquilcetonas são consideravelmente inferiores às aquelas controladas por difusão ($k_q = 10^8$ a 10^9 M⁻¹s⁻¹) enquanto aquelas de supressores com alta eletroafinidade, as constantes aproximaram-se da constante difusional ($k_q \sim 10^{10}$ M⁻¹s⁻¹).

Foi verificado, também, que diversos aceptores fluorescentes são capazes de sensibilizar a formação de espécies excitadas geradas na termólise de dioxetanos, entre eles, os mais comuns são: rubreno, perileno, quelatos de európio e derivados de antraceno (BECHARA, 1979). Em particular, o 9,10-dibromoantraceno (DBA) e o 9,10-difenilantraceno (DPA) destacaram-se devido a facilidades quanto a sua obtenção e purificação. (Esquema 1.30)

WILSON e SCHAAP (1971) introduziram o seu uso na determinação de rendimentos de quimiexcitação de dioxetanos e desde então tornaram-se parte essencial desta metodologia, utilizada por praticamente todos os pesquisadores da área (WILSON, 1976; ADAM, 1982). Devido ao

efeito de acoplamento spin-orbital proporcionado pelos átomos de bromo, o DBA sensibiliza eficientemente carbonilos triplete (WILSON e SCHAAP, 1971), enquanto que o DPA é utilizado apenas para estados singlete. Trata-se de um processo exotérmico, uma vez que seus estados S_1 têm energia igual a 70 kcal/mol (ENGEL e MONROE, 1971), enquanto que aquelas dos doadores (aldeídos e cetonas) é superior a 75 kcal/mol.

1.4.3 - Carbonilos triplete gerados enzimaticamente

Como já foi dito anteriormente, Cilento e colaboradores (CILENTO, 1982) observaram a formação de carbonilos triplete durante a oxidação aeróbica de certos substratos, catalisada por peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase", HRP). Dentre estes substratos, o que mais se estudou foi o isobutiraldeído (IBAL), o qual gera acetona triplete ($^3Ac^*$) como produto excitado (FARIA-OLIVEIRA e colabs., 1978).

O mecanismo proposto para esta reação (BECHARA e colabs., 1979) tem por base o comportamento espectral da enzima, que oscila entre dois estados de oxidação (HRP-I, FeO^{3+} e HRP-II, Fe^{4+}) durante o ciclo catalítico. A dependência de tampão fosfato indica ser a forma enólica do IBAL o substrato preferencial da enzima (GALLARDO e colabs., 1984).

Esquema 1.30

DBA

DPA

Esquema 1.31

A acetona triplete formada fosforesce mesmo em meio aerado (início da reação), com intensificação desta emissão próximo ao ponto de esgotamento de O_2 . Devido principalmente a este fato, propôs-se que a espécie excitada estaria "protegida" pela apoproteína de desativações colisionais com O_2 . A constante de supressão por O_2 foi medida por BECHARA e colaboradores (1979) como sendo $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, a 35°C .

A seguir, serão apresentados alguns resultados obtidos com o sistema IBAL/HRP/ O_2 , principalmente no que diz respeito a este trabalho.

1. A emissão fosforescente do sistema IBAL/HRP/ O_2 é intensificada na presença de 9,10-dibromantraceno-2-sulfonato (DBAS; BECHARA e colabs., 1979). Projeções dos inversos de intensidade de emissão vs concentração de DBAS permitiram calcular $^3\phi$ e o produto da constante de velocidade de transferência de energia pela vida média de $^3\text{Ac}^*$ no sítio enzimático ($k_{\text{ET}} \tau$). Neste caso $^3\phi$ foi calculado em $\sim 10^{-6}$ e $k_{\text{ET}} \tau$ igual a $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, sugerindo um mecanismo de transferência de energia à longa distância (tipo Förster).

Esquema 1.32

BRUNETTI e colaboradores (1983) verificaram, também, a transferência de energia de $^3\text{Ac}^*$ gerada enzimaticamente para DBA solubilizado em micelas de Brij-35, CTAB e SDS. Em determinados condições observou-se a fosforescência do DBA.

2. DURÁN e CILENTO (1980) estudaram a transferência de energia de $^3\text{Ac}^*$ gerada no sistema IBAL/HRP/ O_2 para fluoresceína eosina e Rosa Bengala que atuam como aceptores fluorescentes. Os valores determinados de k_{ET} e ϕ_{TS} relativos levaram os autores a proporem um mecanismo de transferência triplete-triplete superior. Tais aceptores, tendo natureza fenólica, são, entretanto, substratos potenciais de peroxidase e a possibilidade de que o estado singlete do pigmento tenha sido formado quimicamente, a partir de uma semiquinona derivada do pigmento, não pode ser definitivamente excluída.

Esquema 1.33

3. A clorpromazina (sulfeto aromático), droga fototóxica e com vários efeitos farmacológicos,

foi utilizada como aceptor de energia triplete durante a oxidação aeróbica do IBAL, catalisada por peroxidase (DURÁN e colabs., 1978). A formação dos fotoprodutos de clorpromazina ocorre concomitante à supressão da quimiluminescência. Este foi o primeiro caso de transformação fotoquímica produzida pela ação do sistema IBAL/HRP/O₂.

4. Foi verificada a transferência de energia de $^3\text{Ac}^*$ gerada enzimaticamente para flavinas (riboflavinas, FMN e FAD) e com base nos valores de k_{ET} observados, propôs-se um mecanismo de transferência a longa distância (HAUN e colabs., 1978). As velocidades de transferências de energia aumentaram de três ordens de grandeza quando as flavinas eram complexadas com 3,5-dihalogenotirosinas ou tiroxina (RIVAS-SUÁREZ e colabs., 1979). Para explicar estes resultados, os autores propuseram os seguintes processos subsequentes, onde os átomos de halogênio no complexo singlete tornam mais eficiente o cruzamento inter-sistema para o estado triplete correspondente.

Esquema 1.34

5. Recentemente, Rivas-Suárez e colaboradores (1981; RIVAS, 1982) observaram que quinonas suprimem muito eficientemente a fosforescência da $^3\text{Ac}^*$ gerada no sistema IBAL/HRP/O₂. O efeito de benzoquinona foi dramático, com $k_{ET} \sim 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. A maioria das quinonas sofreram alterações espectrais pela ação do sistema enzimático. Estes dados foram interpretados em termos de mecanismo de transferência dipolo-dipolo.

6. Rivas-Suárez e Cilento (1981; RIVAS, 1982), observaram também a transferência de energia para uma série de compostos indólicos, entre eles o D- e L-triptofano. Estes estudos mostraram uma discriminação quiral entre os estereoisômeros por parte da enzima. Foi proposto a atuação de uma componente estática no mecanismo de transferência.

2. OBJETIVOS

Devido a total ausência de informações sobre o comportamento de dioxetanos em água e, tendo em vista a potencialidade do seu uso como modelo químico de produção de espécies excitadas, geradas diretamente em solução, e em estudos comparativos com sistemas responsáveis por "fotobioquímica no escuro", sintetizou-se o tetrametildioxetano (TMD) e realizaram-se diversos estudos deste dioxetano em meio aquoso.

Estes estudos incluíram a determinação de (i) parâmetros de ativação de termólise do TMD, (ii) rendimentos quânticos de produção de espécies singlete ($^1\emptyset$) e triplete ($^3\emptyset$), (iii) constantes de supressão por dienos, (iv) constantes de transferências de energia para aceptores fluorescentes solúveis em água, (v) vida média da acetona triplete gerada na termólise de TMD, em água deionizada aerada e deaerada, (vi) verificação da influência de diversos tipos de solventes na estabilidade térmica do TMD, nos rendimentos quânticos e na velocidade de transferência de energia de excitação da acetona triplete para o 9,10-dibromoantraceno.

Procedeu-se, também, à determinação de parâmetros fotoquímicos e fotofísicos de 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato (DBAS) e 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato (DPAS), assim como a investigação dos caminhos sintéticos para estas sondas, uma vez que as informações sobre estes importantes aceptores fluorescentes, solúveis em água, eram escassas.

Estudou-se transferência de energia da acetona triplete gerada na termólise de TMD para pigmentos xantênicos, clorpromazina, quinonas, flavinas, compostos indólicos, tirosina e seus dihalogenoderivados, em tampões aquosos aerados e deaerados. Pretendeu-se com esta proposta de trabalho comparar os parâmetros de transferência de energia triplete de acetona gerada quimicamente, e portanto exposta à ação supressora de O_2 , com aqueles obtidos via enzimática (IBAL/HRP/ O_2), onde a espécie excitada gerada se encontra supostamente "protegida" pela apoproteína (BECHARA e colab., 1979; CILENTO, 1975, 1980 e 1982). Tais estudos são atualmente muito desejáveis, se não imprescindíveis, para interpretação de mecanismos de transferência de energia com sistemas enzimáticos e para eliminar possíveis efeitos triviais, resultantes principalmente de reações químicas envolvendo os aceptores no estado fundamental.

Investigou-se as propriedades cinéticas e luminescentes de dioxetanos contendo hidrogênio em posição gama, tendo em vista possível interação destes átomos com aqueles de oxigênio do anel dioxetânico, afetando sua estabilidade térmica e os rendimentos quânticos $^1\phi$ e $^3\phi$ de produtos excitados gerados na termólise. Esta interação intramolecular pode ser muito importante em conexão com estudos anteriores sobre catálise de decomposição por ácidos de Lewis (WILSON, 1976), e com a menor estabilidade, inesperada, de dioxetanos substituídos por n-butila (BECHARA e colab., 1976; HORN e colab., 1978, 1979).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

TMD	-	tetrametil-1,2-dioxetano
MPD	-	3-metil-3-n-propil-1,2-dioxetano
MBD	-	3-metil-3-n-butil-1,2-dioxetano
MNPD	-	3-metil-3-neo-pentil-1,2-dioxetano
DBA	-	9,10-dibromoantraceno
DPA	-	9,10-difenilantraceno
DBAS	-	9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio
DPAS	-	9,10-difenilantraceno-2-sulfonato de sódio
CPZ	-	clorpromazina
CPZO	-	clorpromazina-5-óxido (sulfóxido)
TME	-	tetrametiletileno
IBAL	-	isobutiraldeído
HRP	-	peroxidase de raiz forte "horseradish peroxidase"
E_a	-	energia de ativação
k_1	-	constante de velocidade de termólise
K_{SV}	-	constante de Stern-Volmer ($k_q \tau^0$)
k_q	-	constante de velocidade de supressão de acetona excitada
k'_q	-	constante de velocidade de supressão de DBAS excitado
k_F	-	constante de velocidade de fluorescência
k_{ET}	-	constante de velocidade de transferência de energia eletrônica

k_{TS}	- constante de velocidade de transferência de energia da acetona triplete para DBA (S_0) produzindo DBA (S_1)
k_d	- constante de velocidade de desativação não radiativa
E_F	- 'energia de ativação' de fluorescência
ϕ_F	- rendimento quântico de fluorescência
ϕ^3	- rendimento de produção química de espécies triplete
ϕ^1	- rendimento de produção química de espécies singlete
ϕ_{TE}	- rendimento de transferência de energia eletrônica
τ^0	- tempo de vida da espécie excitada
ϕ_{TS}	- rendimento de transferência de energia de acetona triplete para DBA(S_0) produzindo DBA (S_1)

3.2 DROGAS

Todos os reagentes aqui relatados foram usados sem purificação prévia quando não especificado.

- acetato de prata - J.T.Baker
- 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína - Aldrich
- 2,3-dimetil-2-butenos - Aldrich
- 2-metil-1-penteno - Aldrich

- 2-metil-1-hexeno - Aldrich
- 2,4,4-trimetil-1-penteno - Aldrich
- peróxido de hidrogênio 90% - F.M.C. Corporation
- peróxido de hidrogênio 30% - Carlo Erba
- biciclo (2,2,1)-2-hepteno - Aldrich
- biciclo (2,2,2)-2-octeno - Aldrich
- 9,10-dibromoantraceno - Eastman
- 9,10-difenilantraceno - Eastman
- H_2SO_4 fumegante (60% exc.) - Merck
- acetonitrila - Aldrich
- ciclohexano - Aldrich
- tetracloreto de carbono - Aldrich
- benzeno - Merck (seco sobre CaCl_2 e destilado)
- tolueno - Merck (destilado)
- xilenos - Fisher
- decalina - Merck (agitada com várias porções de H_2SO_4 conc. e destilada)
- éter etílico - Aldrich (destilado sobre NaOH e Zn^0 e seco sobre Na^0)
- pentano - Aldrich (destilado)
- acetona - Merck (destilada sobre KMnO_4)
- metanol - Merck
- nitrobenzeno - Carlo Erba (destilado de P_2O_5)
- isobutiraldeído - Fluka (recém destilado fracionalmente sob N_2)
- "horseradish peroxidase" (HRP) - tipo VI - Sigma
- t-butilhidroperóxido - Sigma
- indol - Baker

- N-metilindol - R.I.C. - R.O.C.
- D-triptofano - Sigma
- L-triptofano - Sigma
- lisosima de clara de ovo - Boehringer
- tripeptídeo lisinil-triptofanil-lisina - Research Plus Lab.
- 3,5-diiodotirosina - B.D.H.
- 3,5-dibromotirosina - Aldrich
- 3,5-diclorotirosina (sintetizado em nosso laboratório a partir de tirosina, pelo método de BOUCHILLOUX, 1955)
- tirosina - Sigma
- ácido sórbico - Sigma
- p-benzoquinona - Aldrich (ressublimada)
- 1,4-naftoquinona - Eastman (ressublimada)
- 2-metil-1,4-naftoquinona (sintetizada pela oxidação de 2-metil-naftaleno, pelo método de FIESER, 1940)
- tetracloro-p-benzoquinona - Eastman
- tetrabromo-o-benzoquinona - Aldrich
- 2,6-dimetil-p-benzoquinona - Aldrich
- antraquinona-2-sulfonato de sódio - Fisher
- fluoresceína - B.D.H.
- eosina - Merck
- rose bengal - B.D.H.
- riboflavina - Merck
- clorpromazina - Rhodia
- EDTA (sal sódico) - Merck

3.3 APARELHAGEM

As medidas de emissão de luz foram feitas em (i) fotômetro tipo Mitchell-Hastings (1971), construído em nosso laboratório, acoplado a um amplificador de corrente que permite medidas da ordem de nanoampêres; (ii) "photocounter" marca Hamamatsu, modelo C-767, dotado de um disco rotatório com 25 filtros, que permite medidas de espectros de emissão muito fraca na faixa de 400-670 nm.

As medidas espectrofotométricas foram feitas em espectrofotômetros Zeiss, modelos DMR-10 e DMR-21.

Os espectros de ressonância magnética de prótons foram obtidos num aparelho Varian, modelos T-60, EM-360 e EM-360L.

Utilizou-se um espectrofluorímetro marca Hitachi-Perkin-Elmer, modelo MPF-4, para os espectros de fluorescência.

As cromatografias de partição líquido-gás foram feitas em cromatógrafo de gás marca 'CG', modelo 20D, com detector de condutividade térmica, ou em cromatógrafo de gás marca Hewlett-Packard, modelo 5750, com detector de ionização de chama.

As medidas de consumo de oxigênio foram feitas em oxígrafo marca Yellow Springs Instruments, modelo 53 (método polarográfico).

Os tempos de vida de fluorescência foram determinados utilizando-se Fluorômetro de Tempo de Decaimento, modelo 75-A, com Computador de Tempo de Decaimento, modelo 32-A, ambos marca TRW-Systems, acoplados a um osciloscópio Tektronix, modelo 7704. Os feixes de excitação (lâmpada de D_2) e de emissão foram isolados por filtros Corning Glass (ex.: CS-7-54 e CS-7-60; em.: CS-7-32).

O rendimento de transferência de energia de acetona triplete para DBAS singlete (Φ_{TS}) foi determinado, também, por um fluorímetro de tempo de decaimento, com as seguintes características (HALPERN, 1974): pulsos de lâmpada de D_2 de ca. 2,8 nseg, focalizados por monocromador Jarrell-Ash 0.25 m Ebert em fotomultiplicadora Amperex 56 DUVP/03 e pulsos de leitura processados por um discriminador de fração de tempo constante marca Ortec, modelo 453, acoplado a um conversor-amplificador Ortec (modelos 437A e 444), e acumulados por um analisador multicanal Nuclear Data, modelo 1100. Finalmente, o conteúdo de memória era mostrado em osciloscópio e/ou analisado por um computador Univac 1108.

3.4 MÉTODOS SINTÉTICOS

3.4.1 - Síntese do Tetrametil-1,2-dioxetano

A síntese do TMD foi feita a partir de tetrametiletileno (TME) de acordo com o método de Kopecky (KOPECKY e MUNFORD, 1969; KOPECKY e colabs., 1975) em três fases consecutivas: preparação de solução concentrada de peróxido de hidrogênio em éter etílico anidro, síntese do β -bromohidroperóxido correspondente ao TME e sua cicli-zação com acetato de prata produzindo o dioxetano.

Esquema 3.1

- Preparo de solução concentrada de pe-róxido de hidrogênio

Devido a não disponibilidade do reagen-te apropriado ($\text{H}_2\text{O}_2 > 90\%$), houve necessidade de preparar a solução concentrada deste peróxido em éter anidro (CUIDA-DO! ver APÊNDICE I). A preparação consistiu na extração do peróxido com éter etílico 20 ml de "perhydrol" - solu-ção de H_2O_2 30% - com 20 ml de éter sob agitação magnêti-ca durante 20 minutos), por várias vezes, com posterior secagem em MgSO_4 e evaporação do solvente pela passagem de

N₂ seco, até que a concentração de H₂O₂ chegasse a 5 M (concentração determinada por espectrofotometria: ver Item 3.5.2.2).

- Síntese do β-bromohidroperóxido e do dioxetano

Adicionou-se 2,1 g (25 mmoles) de TME sobre 30 ml de solução etérea 5 M de H₂O₂ (150 mmoles) a -40°C (banho de gelo seco/acetona e, em seguida, 3,7g de 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína (DBDMH) (13 mmoles), lentamente (durante 15 minutos), sob agitação magnética, e deixou-se a solução atingir a temperatura de 0°C. Lavou-se a mistura de reação duas vezes com solução saturada de NaHCO₃, três vezes com água bidestilada e uma vez com solução saturada de NaCl. A camada etérea foi seca em MgSO₄ anidro e o solvente removido no rotavapor. O resíduo de β-bromohidroperóxido foi recristalizado em pentano fornecendo 3,0 g (15 mmoles; 60% de rendimento).

Três gramas de β-bromohidroperóxido foram dissolvidos em 50 ml de CH₂Cl₂ e sobre esta solução adicionou-se 8,0 g de acetato de prata anidro (48mmoles) a 0°C. Deixou-se esta solução sob agitação magnética vigorosa por 20 minutos. Em seguida filtrou-se e o filtrado foi lavado duas vezes com solução NaOH 1 N, duas vezes com água bidestilada e uma vez com solução saturada de NaCl. A camada orgânica foi seca sobre MgSO₄ e o solvente substituído por pentano no rotavapor (ca. 2 ml). O resfriamento desta solução a -78°C forneceu 170 mg de

agulhas amarelas de TMD (1,5 mmoles; 9,5% de rendimento). Todas as operações, desde a produção de solução etérea até a cristalização do TMD, foram feitas no escuro e em banho de gelo/água, quando não especificado.

A caracterização do produto foi feita por RMN¹H, espectroscopia UV e cromatografia de gás. O espectro de RMN¹H em CCl₄ revelou um único pico $\delta = 1,43$ ppm (s, CH₃) que desapareceu após aquecimento, dando lugar ao pico referente ao produto de sua termólise – acetona. A espectroscopia de luz UV apresentou uma banda de absorção em ca. 280 nm, característica de dioxetanos. A cromatografia gasosa de TMD forneceu um único pico com o mesmo tempo de retenção da acetona (produto de termólise), pico este que desaparece (90%) com pré-adição de trifenilfosfina (BARTLETT e colabs., 1973).

Esquema 3.2

3.4.2 - Síntese de uma Série de 3-metil-3-alkil-1,2-dioxetanos

As sínteses dos 3-metil-3-n-propil-1,2-dioxetano (MPD), 3-metil-3-n-butil-1,2-dioxetano (MBD) e do 3-metil-3-neo-pentil-1,2-dioxetano (MNPD) foram feitas a partir do 3-metil-1-penteno, 2-metil-1-hexeno e do 2,4,4-trimetil-1-penteno, pelo método de Kopecky (KOPECKY e colabs., 1975) para olefinas di- e tri-substituídas, que utiliza uma solução aquosa de KOH na etapa de ciclização.

Esquema 3.3

R= n-propil, n-butil e neo-pentil.

A uma solução de 50 mmoles de olefina correspondente em 50 ml de éter etílico anidro, resfriada a -40°C em banho de gelo seco-acetona, adicionou-se 7,0 g (200 mmoles) de H_2O_2 a 98% diluída em 10 ml de éter etílico. Agitou-se por 1 hora à -40°C . Em seguida, acrescentou-se lentamente 6,8 g (25 mmoles) de DBDMH no escuro total e agitou-se por mais 1 hora, elevando-se lentamente a temperatura até a ambiente. Lavou-se duas vezes com solução saturada de NaHCO_3 gelada e uma vez com água gelada. Secou-se sobre MgSO_4 e trocou-se o solvente por CCl_4 no rotavapor (ca. 15 ml). Adicionou-se, em seguida, 3,4 g (60 mmoles) de KOH dissolvidos em 10 ml de H_2O (0,5% EDTA) agitando-se vigorosamente por 30 minutos em banho de gelo-

água. A parte aquosa foi separada e a solução resultante foi seca sobre MgSO_4 e o CCl_4 foi evaporado no rotavapor. O óleo amarelo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica ou por destilação fracionada (Ítem 3.5.2.1), ou foi usado diluindo-se ca 200 vezes com o solvente desejado. A caracterização foi feita por RMN^1H e observou-se picos com os deslocamentos químicos relacionados abaixo, os quais desapareceram após aquecimento, com o aparecimento dos picos relativos às respectivas cetonas (produtos de termólise).

Esquema 3.4

3.4.3 - Síntese de dioxetanos bicíclicos

As sínteses dos dioxetanos derivados de biciclo [2,2,1]-2-hepteno (norborneno) e biciclo [2,2,2]-2-octeno também foram feitas pelo método de Kopecky (KOPECKY e colabs., 1975) sem se isolar, contudo, o β -bromohidropéroxido intermediário nem o dioxetano correspondente, devido a dificuldades experimentais. Apesar disso, obteve-se algumas pistas de sua presença na solução resultante da reação: leve coloração amarela e produção de espécies excitadas quando aquecidos, podendo transferir essa energia de excitação para o DBA e DPA.

Esquema 3.5

3.4.4 - Síntese dos derivados sulfonados de antraceno

O 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) e o 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato de sódio (DPAS) foram sintetizados a partir de 9,10-dibromoan -

traceno (DBA) e 9,10-difenilantraceno (DPA), respectivamente, pelo método de BATTEGAY e BRANDT (1923) modificado.

A 30 ml de nitrobenzeno (destilado de P_2O_5) foram adicionadas 4,5 g (13,5 mmoles) de DBA. A seguir, 1 ml de H_2SO_4 fumegante com 65% de excesso de SO_3 (23 mmoles de SO_3) foi adicionado gota a gota, a $10^\circ C$, sob agitação mecânica. A temperatura da reação foi elevada a $50^\circ C$ e deixada sob agitação por 4 horas. A mistura de reação ficou ainda sob agitação à temperatura ambiente até o dia seguinte. A seguir, a mistura foi neutralizada com solução de NaOH concentrado, mantida em banho de gelo-água e o nitrobenzeno removido por destilação por arraste com vapor d'água. O resíduo contendo os produtos monosulfonados e dissulfonados foi ressuspenso em água fervente 5 vezes (1 litro de cada vez). O DBAS precipitou após o resfriamento. Recristalizou-se então, uma vez mais de água e uma vez mais de MeOH. Obteve-se 4,0 g (9,1 mmoles) de DBAS correspondente a 68% de rendimento.

Os resíduos de produtos dissulfonados foram totalmente removidos por cromatografia de troca iônica usando-se coluna aniônica Dowex 1X1, eluindo-se com gradiente de solução metanólica de HCl (0 a 0,5 molar).

Para a síntese do DPAS seguiu-se o mesmo procedimento obtendo-se 43% de rendimento (uma única tentativa).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 - Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos

3.5.1.1 - Determinação da energia de ativação da termólise dos dioxetanos

A energia de ativação da termólise dos dioxetanos (E_a) foi determinada por projeção de Arrhenius ($\log k_1$ versus temperatura⁻¹) e pelo "método da queda brusca de temperatura" (WILSON e SCHAAP, 1971).

As constantes de velocidade de termólise (k_1) foram calculadas através das tangentes das projeções $\ln I$ versus tempo (segundos), onde I é o valor arbitrário da intensidade de luz gerada diretamente na termólise dos dioxetanos ou sensibilizada por um acceptor fluorescente.

A inclinação da projeção $\log k_1$ vs temperatura⁻¹ (Arrhenius) fornece valores de E_a , enquanto que o coeficiente linear ($Y_{intersecção}$) fornece valores de $\log A$ do qual pode-se calcular valores de $\Delta S^\ddagger$ (Equação 3.1).

$$E_a = \frac{-4,576 \log k_{T_1} / k_{T_2}}{1/T_1 - 1/T_2} \quad (\text{Eq. 3.1a})$$

$$\frac{\Delta S^\ddagger}{4,576} = \log A - 10,753 - \log T \quad (\text{Eq. 3.1b})$$

O "método da queda brusca de temperatura" consiste em medir-se a queda de intensidade de quimiluminescência quando a temperatura da solução é diminuída bruscamente, dentro de um tempo tal que não haja perda considerável de dióxetano. Nestas condições, pode-se calcular a E_a através da Equação 3.2b. Se a termólise for monitorada por sensitizadores fluorescentes, a energia de ativação observada (E_{obs}) deve ser corrigida pela variação do rendimento de fluorescência (Φ_F) do acceptor com a temperatura (para o cálculo de E_F ver Item 3.5.1.4).

Equação 3.2

$$I_1 = K k_1 |D| \quad (\text{temperatura 1})$$

$$I_2 = K k_2 |D| \quad (\text{temperatura 2})$$

$$E_{obs} = \frac{-4,576 \log I_1/I_2}{1/T_1 - 1/T_2} \quad (\text{Eq. 3.2a})$$

$$E_a = E_{obs} - E_F \quad (\text{Eq. 3.2b})$$

O esquema de aparelhagem usada consistiu de dois banhos termostatizados mantidos a temperaturas diferentes (diferença de ca 15°C) e constantes, ligados por um sistema de válvulas à jaqueta de vidro que contém a cela de reação. A intensidade de luz da cela foi lida por um fotômetro tipo Mitchell-Hastings (1971; ver Aparelhagem, Item 3.3). A cela, matida a uma temperatura T_1 (maior), foi submetida a um resfriamento rápido (0,5 - 2,0 min) até a temperatura T_2 .

3.5.1.2 - Supressão da energia de excitação eletrônica por aceptores não-emissivos. Determinação do K_{SV}

Nos estudos de supressão por aceptores de energia não-emissivos, as projeções de I_0/I versus $|Q|$ (I_0 e I são, respectivamente, intensidades de emissão na ausência e na presença de concentrações crescentes de supressor e $|Q|$ é a concentração do supressor ou "quencher") fornece uma reta, definida pela equação de Stern-Volmer (WAGNER, 1967).

Equação 3.3

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau^0 |Q|$$

A tangente desta reta dá o valor do produto $k_q \tau^0$ (também chamado constante de Stern-Volmer, K_{SV}) onde k_q é a constante de velocidade de supressão e τ^0 é a vida média da espécie excitada na ausência do supressor.

A termólise de dioxetanos alquílicos produz principalmente carbonilos triplete (ADAM, 1982). Devido a não emissão destes em solução aerada, houve a necessidade de uso de sensitizadores (aceptores fluorescentes) para monitorar a sua formação, como por exemplo, o DBAS. Neste caso, deve-se considerar a possibilidade de supressão do DBAS excitado (Esquema 3.6) pelo supressor adicionado.

Esquema 3.6

Assim para obter-se o valor real de $k_q \tau_q^0$ sobre a acetona triplete foi necessário uma correção nas projeções I_o/I versus $|Q|$. Por tratamento de estado estacionário, pode-se provar que (ver APÊNDICE II):

Equação 3.4

$$\frac{I_o}{I} = (1 + k_q \tau_{Ac}^0 |Q|) (1 + k'_q \tau_{DBAS}^0 |Q|)$$

Deste modo, a tangente da projeção de $I_o/I (1 + k'_q \tau_{DBAS}^0 |Q|)$ versus $|Q|$ dá o valor real de $k_q \tau_{Ac}^0$, que é independente da presença do DBAS. Por sua vez, o valor de $k'_q \tau_{DBAS}^0$ pôde ser calculado em outro experimento, onde o DBAS foi fotoexcitado, projetando-se I_o/I versus $|Q|$

Estes experimentos foram feitos com concentrações constantes de TMD e DBAS (tipicamente 200 e 2 μM , respectivamente) e a uma temperatura tal que a velo-

cidade de termólise do TMD fosse baixa o suficiente (35 - 40°C) para que a variação da sua concentração durante o tempo de medida fosse desprezível. A concentração dos aceptores foi variada dentro de pelo menos uma ordem de grandeza (entre 10^{-3} - 10^{-6} M), dependendo da eficiência de supressão do acceptor usado.

3.5.1.3 - Transferência de energia de excitação eletrônica para aceptores fluorescentes. Determinação de $^3\Phi$, $^1\Phi$ e $k_{ET} \tau^0$

O tratamento utilizado em estudos com aceptores fluorescentes baseou-se, principalmente, em projeções do tipo "duplo recíproco". Um duplo recíproco consiste na projeção do inverso da intensidade de emissão sensibilizada por um acceptor fluorescente, versus o inverso da concentração deste acceptor, com determinada concentração de dioxetano e certa temperatura. Pode-se demonstrar, por tratamento de estado estacionário (WILSON, 1976; ver APÊNDICE III) que:

Equação 3.5

$$\frac{1}{I_S} = \frac{k_d}{k_1 |D| \Phi^* \Phi_F^S k_{TS} \text{ (ou } k_{SS})} \cdot \frac{1}{|S|} + \frac{1}{k_1 |D| \Phi^* \Phi_F^S \Phi_{TE}}$$

onde I_S é a intensidade de emissão fluorescente do sensibilizador S, k_1 é a constante de velocidade de termólise do dioxetano D, k_{TS} (ou k_{SS}) é a constante de velocidade de

transferência de energia de uma espécie triplete (ou single te) para S produzindo S no estado single te, k_d é a cons - tante de velocidade de desativação não radiativa da espécie excitada na ausência de S, $^*\phi$ é o rendimento das espécies excitadas triplete ($^3\phi$) ou single te ($^1\phi$), ϕ_F^S é o rendi - mento de fluorescência de S e ϕ_{TE} é o rendimento de trans - ferência de energia.

Do coeficiente linear e tangente da proje - ção de $1/I_S$ versus $1/|S|$, pode-se calcular valores de $^3\phi$ e $^1\phi$, dependendo do tipo de acceptor utilizado, e de $k_{ET}\tau^O$, que é o produto da constante de velocidade de energia da espécie excitada para S pela vida média desta espécie na ausência de S.

Equação 3.6

$$^*\phi = \frac{1}{k_1 |D| Y_{int} \phi_F^S \phi_{TE}} \quad (\text{Eq. 3.6a})$$

$$k_{ET}\tau^O (M^{-1}) = \frac{Y_{int}}{\text{tangente}} \quad (\text{Eq. 3.6b})$$

Um grande problema na utilização deste mé todo é o da reabsorção da luz emitida pelo acceptor fluores cente, por ele mesmo ou outros componentes do sistema, devi do ao recobrimento parcial dos espectros de emissão e absorção.

Com a utilização de um fotômetro provido de filtros de luz (ver item 3.3), os quais selecionam efi cientemente faixas de comprimento de onda que chega a fo-

tomultiplicadora, pôde-se escolher uma faixa do espectro de emissão do acceptor fluorescente em que não existisse reabsorção de luz.

Um fator de correção do filtro (F_c) foi, então, calculado de forma a conhecer a quantidade total de luz emitida, sem o corte do filtro. Isto foi feito calculando-se o valor da relação entre a intensidade de luz sem filtro e com filtro para cada concentração de acceptor usada. A projeção desta relação versus concentração indicou um comportamento exponencial aparente (Esquema 3.7). Desta forma, o fator de correção do filtro foi o valor da relação para concentração de acceptor tendendo a zero. F_c pôde ser calculado por regressão linear de $\ln(R - R_\infty)$ versus |acceptor|, para R_∞ desconhecido, que pode ser feito facilmente por computador.

Esquema 3.7

$$R = \frac{\text{intensidade de luz sem filtro}}{\text{intensidade de luz com filtro}}$$

$$R_\infty = R \text{ para concentração infinita de acceptor}$$

$$F_c = \text{fator de correção do filtro}$$

Outro grande problema que este método apresenta é o da determinação de valores absolutos de $^1\phi$ e $^3\phi$ devido, principalmente, às dificuldades na calibração da emissão de luz. A calibração da resposta da fotomultiplicadora através do uso de padrões de luz confiáveis e a correção desta resposta nos casos em que a emissão do processo quimiluminescente e do padrão de luz ocorrem a diferentes comprimentos de onda, tornam-se, aqui, pontos críticos do método. Os padrões de luz mais utilizados tem sido o luminol (LEE e SELIGER, 1965) e o "coquetel de cintilação" |mistura hexano- ^{14}C -PPO-POPOP (2,5-difeniloxazol-2,2-p-fenilbis(5-feniloxazol); HASTINGS e WEBER, 1963)|. Porém, são grandes as dificuldades no uso destes padrões, com erros frequentemente da ordem de 50%. Uma revisão recente desta problemática foi feita por SELIGER (1978).

Uma outra abordagem adotada possibilitou uma melhor idéia do comportamento de tais parâmetros ($^1\phi$ e $^3\phi$) do TMD, utilizando-se água como solvente. Tal abordagem foi a comparação entre o valor da relação $^3\phi/^1\phi$ com valores obtidos para diferentes solventes. Isto foi feito através da utilização de aceptores específicos de espécies triplete e singlete (DBAS e DPAS, respectivamente). Relacionando diretamente os valores de $Y_{\text{intercepção}}$ obtidos nos duplos recíprocos, pode-se calcular a relação $^3\phi/^1\phi$ (Equação 3.7), dispensando, assim, o uso de padrões de luz.

Equação 3.7

$$\frac{\Phi^3}{\Phi^1} = \frac{(|TMD| \cdot k_1 \cdot Y_{int} \cdot \Phi_{ET} \cdot \Phi_F)_{DPAS}}{(|TMD| \cdot k_1 \cdot Y_{int} \cdot \Phi_{ET} \cdot \Phi_F)_{DBAS}}$$

os índices (DBAS) e (DPAS) indicam dados referentes ao duplo recíproco usando-se DBAS e DPAS, respectivamente como aceptores fluorescentes.

3.5.1.4 - Determinação de rendimentos quânticos de fluorescência de aceptores emissivos e a variação com a temperatura

Os valores de rendimentos quânticos de fluorescência de aceptores emissivos (Φ_F), quando desconhecidos, foram determinados segundo método de DEMAS e CROSBY (1971). Este consiste na comparação das áreas de emissão fluorescente do acceptor em análise contra de um acceptor de referência cujo Φ_F seja conhecido, excitando-se ambos em um mesmo comprimento de onda. Deve-se, ainda, corrigir o valor pelas diferentes absorções neste comprimento de onda e pelo índice de refração do solvente, quando comparado em dois solventes diferentes. O experimento é feito mantendo-se a mesma geometria de excitação e leitura e a uma mesma temperatura.

Equação 3.8

$$\Phi_F^x = \Phi_F^y \cdot \frac{I^x}{I^y} \cdot \frac{B^y}{B^x} \cdot \left[\frac{n^x}{n^y} \right]^2$$

onde,

(Demas e Crosby, 1971)

I é a intensidade de emissão fluorescente integrada,

B, é a absorção da solução no comprimento de onda de excitação,

n é o índice de refração do solvente,

x, refere-se ao acceptor de análise e

y, refere-se ao acceptor de referência.

A variação dos valores de ϕ_F com a temperatura foi calculada e expressa em termos de "energia de ativação de fluorescência" (E_F). Um gráfico do tipo Arrhenius foi feito projetando-se o log da intensidade de emissão fluorescente integrada versus 1/temperatura (Equação 3.9).

Equação 3.9

$$E_F = -4,576 \frac{\log I_1/I_2}{1/T_1 - 1/T_2}$$

3.5.1.5 - Determinação de ϕ_{TS} de acetona triplete para DBAS singlete e do ϕ_F de DBAS e DPAS

O rendimento de transferência de energia triplete para DBAS, produzindo o estado singlete (ϕ_{TS}), foi determinado através do método descrito por WILSON e HALPERN (1980A e 1980B). Uma mistura de acetona e DBAS em água deaerada foi excitada por pulsos de luz monocromática:

Esquema 3.8

O decaimento da fluorescência do DBAS mostrou a existência de duas componentes cinéticas exponenciais: em decaimento rápido devido a fluorescência do DBAS fotoexcitado diretamente pela lâmpada e outro lento, devido à fluorescência do DBAS excitado por transferência de energia da acetona triplete fotoexcitada. A intensidade de emissão obedece a Equação 3.10. (WILSON e HALPERN, 1980A).

Equação 3.10

$$\begin{aligned}
 I_t &= (k_F |{}^1\text{DBAS}^*| - c) \phi_F e^{-k_F t} + c e^{-k_{OBS} t} \\
 \text{para } c &= \frac{k_F \phi_{TS} k_{ET} |{}^3\text{Ac}^*|_0}{k_F - k_{OBS}}
 \end{aligned}$$

onde I_t é a intensidade de emissão no tempo t .

Esta equação refere-se à soma da componente rápida (1º termo) e lenta (2º termo) do decaimento. A tangente da projeção logarítmica da componente lenta é k_{OBS} . Para uma série de experimentos à diferentes concentrações de DBAS, mantendo-se a concentração de acetona, pode-se calcular ϕ_{TS} e k_{ET} através da Equação 3.11 derivada da Equação 3.10.

Equação 3.11

$$k_{OBS} = k_d + k_{ET} |DBAS|$$

$$\phi_{TS} = \frac{N_\ell}{N_r} \frac{k_{OBS}}{k_{ET} |DBAS|} \frac{\epsilon_{DBAS} |DBAS|}{\epsilon_{Ac} |Ac|}$$

onde,

N_ℓ/N_r é a razão entre a emissão integrada do ${}^1DBAS^*$ durante a componente lenta pela emissão da componente rápida do seu decaimento;

ϵ_{DBAS} e ϵ_{Ac} são os coeficientes de absortividade molar do DBAS e da acetona, respectivamente, no comprimento de onda de excitação

O tempo de vida de fluorescência (τ_F) do DBAS pôde ser calculado nestes experimentos, analisando-se a curva de decaimento rápido do DBAS excitado (1º termo da Equação 3.10).

As amostras foram preparadas em cela de quartzo (~3,0 ml) e a deaeração foi feita por borbulhamento de N_2 por 15 a 30 minutos. As concentrações foram

tais que a absorção da acetona fosse da ordem de 5 vezes maior que a do DBAS no comprimento de onda de excitação (300 nm). O efeito de "self-quenching" da acetona foi checado realizando-se os experimentos com duas concentrações de acetona: 0,27 e 0,54 M. As concentrações de DBAS foram na faixa de 3 a $30 \cdot 10^{-5}$ M. A excitação foi feita por uma lâmpada de D_2 e a leitura através de um contador de fótons acoplado a um analisador de tempo de decaimento provido de um sistema de multicanais. Tempos de aquisição (leituras acumuladas) foram da ordem de uma hora. A temperatura de solução foi controlada por banho termostatizado em 20°C . O decaimento logarítmico foi analisado por comparação de curvas simuladas por computador (HALPERN, 1974; ver Aparelhagem).

Os τ_F de DBAS e DPAS foram, também determinados em água aerada (22°C) utilizando-se um fluorômetro de Tempo de Decaimento, com lâmpada de D_2 e computador de Tempo de Decaimento acoplado a um osciloscópio (ver Aparelhagem). A aparelhagem foi calibrada usando-se "fluorescers" de τ_F conhecidos (antraceno em EtOH, τ_F 4,5ns; quinino em solução aquosa HCl 0,1 N, τ_F 19,2 ns). As concentrações usadas foram da ordem de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

3.5.1.6 - Cinética de oxidação de clorpromazina

A cinética de oxidação de clorpromazina (CPZ) e clorpromazina-5-óxido (CPZO) foi monitorada espectrofotometricamente seguindo-se o aparecimento da banda característica a 341 nm, usando-se um dispositivo automático.

co que lê a absorvância de 30 em 30 segundos, sem que a amostra seja iluminada nos intervalos, evitando que a CPZ seja oxidada por iluminação. As constantes de velocidade foram calculadas por um programa de regressão logarítmica de "ajuste" do tipo $(A_{\infty} - A_n)$ versus tempo t_n onde A_{∞} é desconhecido, ou através do produto das velocidades iniciais pelas concentrações de CPZ iniciais.

Para o caso do TMD como oxidante, foi feito um estudo de competição onde o k_{OBS} foi calculado para a reação entre TMD e CPZ (concentrações fixas) usando-se quantidades variáveis de supressores de acetona triplete, tais como indol e benzoquinona.

A dedução das expressões cinéticas usadas no caso do sistema enzimático HRP/H₂O₂/CPZ encontra-se no Apêndice IV.

3.5.2 - Análise de estrutura, dosagem e purificação

3.5.2.1 - Purificação dos dioxetanos

A purificação do TMD foi feita pela cristalização deste em n-pentano, a -76°C, seguida por rápida filtração.

No caso dos dioxetanos BMD, PMD e NMD a purificação foi feita por destilação fracionada a baixa pressão e temperatura, por cromatografia em coluna de sílica a baixa temperatura ou por ambos os métodos.

Destilação fracionada a baixa pressão e temperatura: a mistura contendo o dioxetano foi congelada com N_2 líquido, dentro de um sistema de destilação equipado com coluna de Vigreux de 20 cm. Fez-se vácuo (0,01 mmHg) e descongelou-se lentamente recolhendo as frações no frasco coletor por resfriamento com N_2 líquido. Repetiu-se o procedimento até que todo o dioxetano tivesse sido destilado. As frações foram analisadas por intensidade de luz emitida e por ressonância magnética de prótons.

Cromatografia em coluna de sílica-gel: aqui, o problema de perda de dioxetano por decomposição térmica é agravada pela decomposição catalisada pela sílica. Utilizou-se, então, a cromatografia a baixa temperatura (capa de acetona/gelo seco) aumentando-se a velocidade de eluição para um tempo mínimo (5 a 10 minutos) por pressurização da coluna com o auxílio de nitrogênio.

A eluição foi feita com gradiente fracionado de mistura pentano e diclorometano (frações de 30 ml a partir de 100% de pentano, 90% pentano/10% CH_2Cl_2 , etc... até 100% CH_2Cl_2). A coluna continha 20 g de sílica gel misturada a 1% de EDTA. Foi adicionado ao topo da coluna, 2 ml de amostra concentrada de dioxetano em CCl_4 .

As frações de 20 ml foram analisadas pela intensidade de luz emitida e então, após evaporação do solvente, por ressonância magnética de prótons.

3.5.2.2 - Dosagem dos dioxetanos e peróxido de hidrogênio

O método clássico usado para dosagem de H_2O_2 foi o de titulação iodométrica descrito por KOLTHOFF e SANDELL (1952): 1 ml de H_2SO_4 concentrado é diluído em 30ml de água; 1 g de KI, alguns cristais de molibdato de amônio (catalisador) e amido (indicador) são adicionados: uma alíquota de solução de H_2O_2 é então adicionada; espera-se 15 minutos (em banho de gelo/água e no escuro) e titula-se com solução 0,1 N de $Na_2S_2O_3$.

Além deste método usou-se o método descrito por COTTON e DUNFORD (1973) que consiste na medida espectrofotométrica de I_2 formado ($\lambda_{max} = 353 \text{ nm}$, $\epsilon = 25500$) pela reação com H_2O_2 catalisado por HRP: a 3,0 ml de tampão acetato 0,1 M pH 3,8 adiciona-se 0,017 g de KI sólido (0,05M) e HRP com concentração final 2 a $4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$; adiciona-se 0,1 ml de alíquota de H_2O_2 e mede-se a absorção a 353 nm. Este método também foi empregado na dosagem de solução etérea de H_2O_2 sendo que a alíquota adicionada passou a ser 10 μl de forma que o éter solubiliza-se no tampão.

Para dosagem titulométrica de dioxetanos usou-se o método descrito por WILSON e SCHAAP (1971): a 5ml de solução 10% de NaI em anidrido acético, em banho de gelo/água no escuro, adiciona-se uma alíquota de 0,1 ml de solução estoque de dioxetano e deixou-se em repouso por 15 minutos; adiciona-se, então, 2 ml de água e titula-se, contra branco, com solução 0,01N de $Na_2S_2O_3$ até a viragem de cor amarela clara para incolor.

Devido à grande incerteza na titulação iodométrica de dioxetanos, usou-se, com mais frequência o método de dosagem por cromatografia gasosa descrito por BECHARA e colabs. (1976): uma alíquota de solução estoque do dioxetano é injetada no cromatógrafo e a quantidade de cetona formada na sua termólise dentro da coluna é analisada contra uma curva de calibração obtida nas mesmas condições. A contaminação da solução estoque pela cetona correspondente é determinada (e subtraída) pela injeção de solução estoque tratada previamente com PPh_3 (BARTLETT e colabs., 1973; Esquema 3.2). A trifenilfosfina transforma o dioxetano num epóxido permitindo que a cetona contaminante seja diferenciada da cetona provinda da termólise do dioxetano. Um exemplo de condições para dosagem de TMD em acetonitrila (solução estoque típica no estudo de TMD em água) seria: coluna de FFAP ("free fat acid phase") sobre Chromosorb W (3m x 3/16"); temperatura da coluna = 120°C ; temperatura do vaporizador e detector (de condutividade térmica) = 200°C ; corrente do detector = 160 mA; fluxo de hélio = 35 ml/min; tempo de retenção da acetona = 79 segundos e da acetonitrila = 95 segundos.

3.5.2.3 - Determinação dos produtos e da estequiometria da reação entre CPZ e TMD

Os espectros de ressonância magnética de prótons, antes, durante e depois da termólise do TMD em presença de CPZ mostraram a formação do epóxido correspondente ao TMD como produto da reação (Esquema 3.9).

Esquema 3.9

Adicionou-se ca de 146 moles de CPZ e 76 moles de TMD a ca 0,5 ml CDCl_3 contendo TMS. Esta mistura foi incubada a 60°C e os espectros de ressonância magnética de prótons registrados a cada 15 minutos. Neste tempo a mistura era mantida a 4°C de modo a parar a termólise do TMD. Controles contendo só TMD, só CPZ e acetona mais CPZ, também foram incubados e os espectros registrados. A posição do sinal do epóxido foi checada sintetizando-se o mesmo pela reação de 3,4-dimetil-2-butenos com ácido m-cloroperbenzóico no próprio tubo de reação. Os deslocamentos químicos dos principais prótons foram: CPZ |2,40 ppm(s); 2,67 ppm(d); 3,10ppm (m); 4,05 ppm(t) e 7,0 ppm(m)|; TMD |1,50 ppm(s)| e epóxido |1,32 ppm(s)|.

A formação de CPZO (Esquema 3.9) foi verificada espectrofotometricamente pelo aparecimento de suas bandas características ($\lambda = 239, 273, 299$ e 341 ; WARREN e co labs., 1966) e o desaparecimento das bandas de CPZ ($\lambda = 253$ e 305 ; WARREN e colabs., 1966), na região do UV. Quantidades crescentes de TMD (80 a $240 \mu\text{M}$) foram adicionadas a tubos contendo soluções de CPZ de mesma concentração ($50 \mu\text{M}$), em tampão fosfato pH = 6,8 ($|\text{pi}| = 50 \text{ mM}$; $|\text{ppi}| = 5 \text{ mM}$). Estes tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos. Estas soluções

foram devidamente diluídas e os espectros de UV comparados. Este mesmo experimento foi feito em meio aerado e deaerado.

Em outro experimento, adicionou-se à mistura de reação descrita anteriormente, quantidades crescentes de conhecidos supressores de acetona triplete (indol, benzoquinona e sorbato), a fim de se verificar a possibilidade de competição do supressor com a clorpromazina. Neste experimento, os tubos também foram aquecidos a 65°C por 30 minutos e os espectros foram tirados contra um branco contendo a mesma quantidade de supressor.

Uma vez determinados os produtos, tentou-se chegar a uma conclusão quanto a estequiometria da reação. Para isso acompanhou-se a proporção de acetona que deixava de ser formada na termólise a medida que uma quantidade de CPZ adicionada. Incubou-se soluções de concentrações variáveis de CPZ contra uma concentração fixa de TMD, durante 90 minutos a 60°C. A concentração de acetona foi determinada por cromatografia gasosa a partir de uma curva de calibração (condições de análise: detector de ionização de chama: coluna de FFAP sobre Chromosob W 3m x 3/16"; temperatura da coluna = 120°C; temperatura do vaporizador e detector = 200°C; fluxo de hélio = 40 ml/min; tempo de retenção de acetona = 45 segundos).

3.5.2.4 - Purificação do DBAS e DPAS

Os derivados monosulfonados da síntese de DBAS e DPAS foram purificados por cromatografia de troca

iônica, utilizando-se uma resina aniônica Dowex 1X1 . 3g de resina (capacidade de 3 meq/g) foram ativados com solução 2 N de HCl, lavada até a neutralização e o solvente trocado por MeOH. Então, aplicou-se a coluna 1 meq de DBAS ou DPAS dissolvido em ca 50 ml de MeOH. A cromatografia foi eluída com um gradiente linear de HCl em MeOH ($[HCl]$ = de zero a 0,5 molar; total de 200 ml). As amostras, de 20 ml cada, foram analisadas por cromatografia de camada delgada (sílica gel corrida com n-butanol). As porções contendo os monosulfonados purificados foram adicionados em água (3 vezes o volume inicial) de forma a reprecipitar o DBAS ou DPAS e, então, filtrados.

4. UTILIZAÇÃO DE TMD COMO MODELO QUÍMICO DE PRODUÇÃO DE ACETONA TRIPLETE EM ÁGUA

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Parâmetros de ativação de termólise em água e em outros solventes

A determinação da energia de ativação de termólise do TMD em água foi dificultada, como esperado, pela presença de traços de íons metálicos contaminantes, os quais catalisam a decomposição "escura" de dioxetanos (WILSON, 1976; HORN e colabs., 1978-9). A figura 4.1 mostra a projeção de Arrhenius obtida em água como solvente, A reta traçada no gráfico foi reproduzida de WILSON e colabs. (1976), usando-se xilenos como solvente. As constantes de velocidade de termólise (processo de primeira ordem) foram calculadas monitorando-se a queda de intensidade de luz, sensibilizada ou não, provinda da termólise por ca 4-5 meias vidas. A concentração de TMD usada foi na faixa de 10^{-3} - 10^{-4} M, enquanto que a de DBAS foi de ca 10^{-5} M. Não foram observadas mudanças significativas nos valores de k_1 (dentro de uma faixa erro 5-10%) devido a presença de DBAS e/ou EDTA.

Pode-se notar que o desvio de k_1 da reta "teórica" torna-se mais acentuado quanto menor for a temperatura da reação. Isto deve-se ao fato da energia de ativação da componente catalítica ($k_{cat}|M^{n+}|$) ser

Figura 4.1. - Projeção de Arrhenius para a termólise de TMD em água: bidestilada com EDTA ($\square$); bidestilada com EDTA e DBAS ($\bullet$); deionizada com EDTA ($\circ$); deionizada com EDTA e DBAS ($\bullet$).

menor que aquela da termólise do dioxetano. Este desvio surge quando se usa água bidestilada-vidro comum. Porém, quando a água é tratada por resina de troca iônica de alta afinidade (no caso; Quelex), e ainda adicionando-se EDTA ca 10^{-5} M, consegue-se medidas de k_1 próximas às encontradas em solventes orgânicos.

A despeito do fato de não se conseguir uma projeção de Arrhenius totalmente linear para termólise de TMD em água, conseguiu-se calcular sua E_a pelo método de "queda brusca de temperatura" (ver MÉTODOS, item 3.5.1.1). A figura 4.2 mostra um exemplo do efeito do resfriamento rápido na intensidade de luz lida. A tabela 4.1 mostra a média de valores encontrados em 9 determinações diferentes, na faixa de 37-76°C, com resfriamentos da ordem de 15°C, usando-se água deionizada com Quelex contendo 1×10^{-5} M EDTA ($|TMD| = 3 \times 10^{-4}$ M; $|DBAS| = 1 \times 10^{-4}$ M).

Para comparação, redeterminou-se os valores de E_a da termólise de TMD em alguns solventes orgânicos. A tabela 4.1 mostra valores de E_a encontrados para acetonitrila e decalina como solventes, através do método da "queda brusca de temperatura". Na tabela 4.2 encontram-se os valores de E_a calculados por regressão linear de apenas 7 pontos, da projeção de Arrhenius para benzeno, ciclohexano, acetonitrila, CCl_4 e decalina como solventes.

Tanto o valor de E_a determinado em água pelo método da "queda brusca" quanto o valores encontrados para os solventes orgânicos pelos dois métodos,

Figura 4.2. - Exemplo genérico de um experimento de "Queda Brusca de Temperatura".

TABELA 4.1 - Energias de ativação pelo método de "queda brusca de temperatura"

Solvente	Nº de determi nações	Faixa de temperatura	E_a (kcal.mol ⁻¹)
Água ^(a)	9	36,6±75,6°C	27,8±0,5
Acetonitrila ^(a)	6	31,2±79,8°C	27,2±0,5
Decalina	3	31,2±50,0°C	26,9±0,5

(a) contém EDTA ~ 10⁻⁵M

TABELA 4.2 - Energias de ativação pelo método de projeção de Arrhenius

Solvente ^(a)	E_a (kcal.mol ⁻¹)	log A	r (fator de correlação)
Benzeno	27,0±1	13,6	0,999
Ciclohexano	26,0±1	13,2	0,996
Acetonitrila	27,0±1	13,6	0,996
CCl ₄	26,0±1	13,1	0,998
Decalina	26,0±1	13,0	0,997

(a) exceto para CCl₄, todos os solventes foram saturados com EDTA.

concordaram perfeitamente com os valores descritos na literatura para benzeno e xilenos (ADAM e ZINNER, 1982), demonstrando não haver efeito de solvente na energia de ativação de termólise do TMD.

4.1.2 Rendimento de produção de acetona triplete e singlete na termólise de TMD

Um dos pontos mais críticos no estudo de TMD em água foi com relação à determinação do rendimento de acetona triplete ($^3\Phi$) e singlete ($^1\Phi$) produzida na sua termólise. Na literatura encontram-se uma abundância de valores determinados pelos mais diversos métodos. Uma recente compilação foi feita por ADAM (1982), a qual está reproduzida nas tabelas 4.3A e 4.3B.

Nota-se, pelas tabelas, que existe grande dispersão dos dados de $^1\Phi$ e $^3\Phi$, dependendo do método de determinação adotado. Devido ao fato de usar-se água como solvente, o método adotado foi o de medida de quimiluminescência sensitizada por DBAS.

O valor de $^3\Phi$ de TMD relatados na literatura variam em torno de 30%, como se pode perceber na Tabela 4.3A. Na verdade este é o valor aceito pela grande maioria dos químicos da área, sendo que o TMD já é bastante usado como padrão de luz na calibração de aparelhagens. Apesar desta reprodutibilidade, existem diversas dificuldades na obtenção de valores absolutos de $^3\Phi$ e $^1\Phi$.

TABELA 4.3A - $^3\phi$ de acetona produzida na termólise de TMD

Método (a) (padrão)	Solvente	$^3\phi$ (%)	Referência
QS por DBA (coquetel cintilação ^b)	Benzeno	31±2	Cheng (1979)
QS por DBA (luminol ^c)	Tolueno	31±8	Kopecky e Filby (1979)
QS por DBA (dimetildioxetano ^d)	Benzeno	36	Richardson e colabs., (1978)
QS por DBA (coquetel cintilação ^b)	Benzeno	30±15	Wilson e colabs. (1976)
QS por biacetilo	Benzeno	50±25	Turro e Lechtken (1972)
TQ com 2,5-diazobiciclo[2,2,1]hepteno	Benzeno	30±1	Adam e Mazenod (1980)
TQ com benzonorbornadieno	Benzeno	30±1	Adam e colabs. (1979)
TQ com 1,4-ciclohexadieno	Puro	29±7	Bartlett e colabs. (1979)
TQ com tetrametiletileno	CCl ₄	39,6±1,2	Richardson e colabs. (1979)
TQ com fumaronitrila	Benzeno	48±24	Turro e Lechtken (1972)
TQ com cis-dietoxietileno	Acetonitrila	30±15	Turro e Lechtken (1972)

a. QS, quimiluminescência sensibilizada; TQ, titulação por reação química; DBA, 9,10-dibromo

b. Hastings e Weber(1963); c. Lee e Seliger (1965);

d. quimiluminescência deste dioxetano usado como padrão.

TABELA 4.3B - $I\phi$ de acetona produzida na termólise de TMD

Método (a)	(padrão)	Solvente	$I\phi$ (%)	Referência
QD (coquetel de cintilação ^b)		Benzeno	0,41±0,08	Cheng (1979)
QD (coquetel de cintilação ^b)		Benzeno	0,091±0,033	Adam e colabs. (1975)
QD (ferrioxalato)		Benzeno	0,16±0,08	Turro e Lechtken (1972)
QS por DPA (coquetel de cintilação ^b)		Benzeno	0,041±0,003	Cheng (1979)
QS por DPA (luminol ^c)		Tolueno	0,044±0,011	Kopecky e Filby (1979)
QS por DPA (coquetel de cintilação ^b)		Benzeno	0,15±0,08	Wilson e colabs. (1976)
QS por DPA		Benzeno	0,43	Richardson e colabs. (1978)
QS por biacetilo		Benzeno	0,8 ±0,4	Turro e Lechtken (1972)
TQ com fumaronitrila		Benzeno	0,28±0,14	Turro e Lechtken (1972)
TQ com cis-dietoxietileno		Acetonitrila	0,1	Turro e Lechtken (1972)

a. QD, quimiluminescência direta; QS, quimiluminescência sensibilizada; TQ, titulação por reação química; DPA, 9,10-difenilantraceno;

b. Hastings e Weber (1963);

c. Lee e Seliger (1965).

Em particular, em nossas determinações esbarramos nos seguintes problemas: (i) o padrão de luz utilizado, do tipo Hastings-Weber (1963; padrão terciário, também chamado coquetel de cintilação), foi calibrado na Universidade de Harvard com aparelhagem de geometria diferente daquela utilizada em nossas medidas; (ii) o valor do rendimento de transferência de energia da acetona triplete para o DBAS (ϕ_{TS}) em água, nunca havia sido determinado e (iii) também não haviam sido descritos valores de ϕ_F de DBAS em água.

Tentou-se calibrar o aparelho com o próprio TMD em solventes orgânicos e em uma série de três experimentos, obtiveram-se três diferentes valores de $^3\phi$ (ao usar-se o coquetel de cintilação como padrão) como mostra a tabela 4.4.

TABELA 4.4 ϕ^3 de acetona produzida na termólise de TMD em solventes orgânicos (a)

Solvente	Temperatura (°C)	ϕ_{TS}	$\phi_F^{DBA(b)}$	$^3\phi$
Benzeno	56	0,3	0,086	0,004
Benzeno	20	0,3	0,20	0,24
Acetonitrila	20	0,1	0,16	0,15

(a) os experimentos foram feitos com o uso de filtros, para evitar problemas de reabsorção do DBA; $[TMD] = 2 \times 10^{-4}$ M;

(b) valores calculados em relação ao valor de ϕ_F^{DPA} em benzeno a 20°C=0,90 (HAMAI e HIRAYAMA, 1983).

Após determinar-se os valores de ϕ_{TS} de acetona triplete para o DBAS e o valor de ϕ_F de DBAS e DPAS em água (ver Ítem 4.1.4), calculou-se os valores absolutos de $^3\phi$ e $^1\phi$ de TMD em água. A tabela 4.5 mostra os valores obtidos. A figura 4.3 mostra os duplos recíprocos obtidos em água usando-se DBAS e DPAS como aceptores fluorescentes.

TABELA 4.5 $^*\phi$ de acetona produzida na termólise de TMD em água (a)

Aceptor Fluorescente	$\phi_F^{(b)}$	ϕ_{ET}	$^*\phi$
DBAS	0,25	0,10	0,004 ($^3\phi$)
DPAS	0,74	1,0	4×10^{-6} ($^1\phi$)

(a) experimentos feitos a 42°C, em água bidestilada com EDTA; $[TMD] = 8 \times 10^{-5}$ M; uso de filtros para evitar efeitos de reabsorção; padrão de luz utilizado: coquetel de cintilação;

(b) valores determinados por comparação de áreas de fluorescência em relação ao valor de ϕ_F^{DPA} em benzeno a 20°C = 0,90 (HAMAI e HIRAYAMA, 1983).

O valor de $^3\phi$ obtido em água a 42°C concordou com o valor de $^3\phi$ obtido em benzeno a 56°C, não ocorrendo o mesmo com os valores obtidos em temperaturas baixas nem com os valores relatados na literatura.

Utilizando-se uma abordagem em que os erros sistemáticos se anulam (comparar valores relativos

Figura 4.3. - Duplo recíproco de TMD/DBAS e TMD/DPAS em água.

de $^3\phi$ e $^1\phi$) conseguiu-se, finalmente, ter uma idéia do comportamento destes parâmetros em água. A tabela 4.6 mostra os valores obtidos para a relação $^3\phi/^1\phi$, determinados para água, benzeno e tolueno como solventes.

TABELA 4.6 Valores para a relação $^3\phi/^1\phi$ obtidos para diferentes solventes

Solvente	Padrão	Temperatura	$^3\phi/^1\phi$	Referência
Tolueno	luminol	45°C	$7,0 \times 10^2$	Kopecky e Filby (1979)
Benzeno	coquetel cintil.	71°C	$8,0 \times 10^2$	Cheng (1979)
Água	coquetel cintil.	42°C	$1,0 \times 10^3$	este trabalho

Obs. todas as determinações foram feitas pelo método de quimiluminescência sensibilizada por DBA/DPA (benzeno e tolueno) ou por DBAS/DPAS (água).

4.1.3 Dependência dos parâmetros de transferência de energia e vida média com o tipo de solvente utilizado

Em 1970, BELYAKOV e VASSIL'EV observaram um valor de ϕ_{TS} para o par ciclohexanona/DBA em benzeno menor (ca 0,13) que o ϕ_{TS} determinado para o par acetofenona/DBA (0,20). Em 1976, BECHARA e colaboradores determinaram um valor de $^3\phi$ de 2-hexanona triplete produzida na termólise de 2,3-dimetil-2,3-dibutil-1,2-dioxetano

(DMDBD) em decalina cerca de 3,5 vezes inferior ao determinado em xilenos. Esta diferença não poderia, entretanto, explicar os diferentes valores de $^3\phi$ porque afetaria igualmente k_{TS} e k_{ET} (ver Apêndice III). Recentemente, WILSON e HALPERN (1980A e B), verificaram, através de estudos pela técnica de medidas de tempo de decaimento (Item 3.5.1.5) que o ϕ_{TS} dos pares acetona/DBA e acetofenona/DBA variam com o solvente.

Com base nestes dados e devido às dificuldades em determinar valores absolutos de $^3\phi$ nos diversos solventes (ver Tabela 4.4), julgou-se pertinente determinar valores relativos de ϕ_{TS} do par acetona/DBA em diversos solventes, partindo das seguintes premissas: (i) o $^3\phi$ de TMD não varia com o solvente (Item anterior) e tem o valor médio igual a 0,30 e (ii) o ϕ_{TS} de acetona/DBA em benzeno a 20°C é igual a 0,27 (WILSON e HALPERN, 1980B).

Na tabela 4.7 encontram-se relacionados os valores de ϕ_{TS} obtidos pelo método dos duplos recíprocos. Estes experimentos foram feitos com o uso de um filtro transparente somente acima de 480 nm (Kodak Wratten, nº 3), que corta a região do espectro de emissão do DBA e do DBAS em que há reabsorção de luz. Para comparação, são apresentados os valores de ϕ_{TS} obtidos diretamente pelo método de medidas de tempo de decaimento. A figura 4.4 mostra as projeções obtidas de duplos recíprocos.

Figura 4.4. - Duplo recíproco de TMD/DBA(S) em diversos solventes.

TABELA 4.7 Valores de ϕ_{TS} para o par Acetona/DBA(S).
Efeito de solventes.

Solvente	ϕ_{TS}	
	método A ^(a)	método B ^(b)
Benzeno	0,27	0,27 (c)
Ciclohexano	0,08	0,05 (c)
Acetonitrila	0,10	0,08 (c)
Água	0,01	0,10 (d)
Decalina	0,10	-
Tetracloreto de carbono	0,08	-

(a) valores relativos de ϕ_{TS} calculados por regressão linear das projeções de duplos recíprocos a 20°C, considerando ϕ_{TS} em benzeno = 0,27 (WILSON e HALPERN, 1980B) e $^3\phi = 0,30$ (ADAM, 1982);

(b) valores absolutos de ϕ_{TS} obtidos, pelo método de medidas de tempo de decaimento;

(c) WILSON e HALPERN, 1980B;

(d) ver Item 4.1.4

Verificou-se também, o efeito de solventes no valor da constante de velocidade de transferência de energia (k_{ET}) e/ou vida média do acetona triplete (τ) através da avaliação dos valores do produto $k_{ET} \tau$ calculados dos duplos recíprocos (Equação 3.6(b)).

O objetivo de comparar valores de $k_{ET} \tau$ para diferentes solventes foi o de tentar visualizar, de alguma forma, a variação de cada um destes parâmetros individualmente. Os valores de vida média da acetona triplete, mostrados na tabela 4.8, foram calculados e apresentados com o intuito de mostrar uma tendência da variação deste parâmetro com a natureza do solvente, e não de serem valores exatos.

Partindo da premissa de que $k_{ET} \approx k_{dif}$ fusional, ou seja, de que o processo seja apenas controlado pela velocidade de difusão das duas espécies, aceptora e doadora, calculou-se os valores de τ^0 de acetona triplete em seis diferentes solventes que são mostrados na tabela 4.8 (a validade desta premissa será discutida mais detalhadamente na seção de DISCUSSÃO).

Com relação à determinação da vida média de acetona triplete em água, pode-se fazer uma abordagem mais quantitativa deste parâmetro. Através da técnica de medida de tempo de decaimento ("pulse excitation"), obtiveram-se valores absolutos de k_d e k_{ET} para a transferência de energia de acetona triplete para o DBAS singlete em água deaerada (por passagem de N_2 ; ver Item 4.1.4).

Os valores obtidos por este método foram $k_d = 1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ e $k_{ET} = 3,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Sendo $k_d = 1/\tau^0$, a vida média de acetona triplete em água deaerada é igual a 10 μs . O valor de $k_{ET} \tau^0$ calculado por duplo recíproco para água normalmente aerada foi de $7,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabela

TABELA 4.8 - Efeito do Solvente no Valor de $k_{ET} \tau^0$

Solvente (a)	$k_{ET} \tau^0 (M^{-1})$ (b)	$\eta (cP)$ (c)	$k_{difusional} (M^{-1})$ (d)	$\tau_{3Ac}^0 (s)$
Acetonitrila	$4,1 \times 10^2$	0,360	$1,6 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{-8}$
Benzeno	$2,6 \times 10^2$	0,652	$9,0 \times 10^9$	$2,9 \times 10^{-8}$
CCl_4	$4,1 \times 10^2$	0,969	$6,0 \times 10^9$	$6,8 \times 10^{-8}$
Ciclohexano	$4,7 \times 10^2$	1,000	$5,9 \times 10^9$	$7,9 \times 10^{-8}$
Água	$7,4 \times 10^3$	1,005	$5,8 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{-6}$
Decalina	$1,7 \times 10^2$	2,750	$2,1 \times 10^9$	$7,8 \times 10^{-8}$

(a) Solventes normalmente aerados;

(b) Valores calculados a partir de duplos recíprocos feitos a $20^\circ C$, $|TMD| = 7,4 \times 10^{-4} M$, utilizando-se DBA ou DBAS como acceptor fluorescente, variando-se a concentração na faixa de 10^{-5} a 10^{-3} molar (mínimo de 6 pontos).

(c) Handbook of Chemistry and Physics, The Chemical Rubber Co., R.C. Weads ed., 1972.

(d) Valores calculados a partir pela fórmula simplificada de Debye: $k_{dif} = 2,0 \times 10^5 T/\eta$ (Turro, 1978), onde η é a viscosidade do solvente em poise.

4.8), logo, a vida média é de 2 μ s. O valor da relação $\tau_{N_2}^0/\tau_{ar}^0$ será então, igual a 5.

Além disso, fez-se um estudo de supressão da acetona triplete por ácido sórbico (ácido 2,4-hexadienóico) em água aerada e deaerada, onde, através de projeções do tipo Stern-Volmer, calculou-se os valores de $k_q\tau^0$ (produto da constante de velocidade de supressão pela vida média da espécie excitada). Comparando-se os resultados ($k_q\tau^0$ água aerada = $4,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; $k_q\tau^0$ água deaerada = $3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) chegou-se a uma relação $\tau_{N_2}^0/\tau_{ar}^0 = 7,2$, o que concorda razoavelmente com a relação entre os valores de τ^0 mostrados acima (igual a 5).

PORTER e colabs. (1973) determinaram um valor de τ^0 de acetona triplete em água deaerada, por excitação fotofísica, igual a 20 μ s. Se conjuntamente com o valor determinado em água deaerada, (10 μ s), adotar-se como valor médio de τ^0 de acetona triplete em água deaerada $15 \pm 5 \mu$ s, ter-se-á um valor de τ^0 de acetona triplete em água aerada oscilando entre $2 \pm 1 \mu$ s.

4.1.4 Propriedades fotofísicas de DBAS e DPAS em água

O 9,10-difenilantraceno (DPA) e o 9,10-dibromoantraceno (DBA) têm sido largamente utilizados como sensitizadores de carbonilas singlete e triplete, respectivamente (WILSON e SCHAAP, 1971; TURRO e colabs. 1974; ADAM 1982). Naturalmente, seu uso restringe-se aos solventes orgânicos, uma vez que sua solubilidade em água é muito baixa ($< 10^{-7} \text{ M}$).

Uma vez que o nosso objetivo era o de introduzir o uso de TMD como modelo de sistema químico de produção de acetona excitada, foi necessário a determinação de todos os parâmetros fotoquímicos e fotofísicos do DBAS e DPAS, assim como um caminho sintético prático e confiável.

Através da técnica de medida de tempo de decaimento da intensidade de luz, produzida por pulsos de excitação de uma mistura de acetona e DBAS em água deaerada (ver MÉTODOS, ítem 3.5.1.5), obteve-se valores de k_d de acetona triplete, k_{ET} e ϕ_{TS} .

Um exemplo típico de projeção $\log I$ versus tempo, do qual k_{OBS} é calculada, é mostrado na Figura 4.5. O primeiro decaimento (rápido) refere-se à fluorescência da porção do DBAS excitada pela luz do "flash", enquanto que o segundo (lento) refere-se a fluorescência do DBAS excitado por transferência de energia da acetona fotoexcitada. Do primeiro decaimento pôde-se calcular $k_F(1/\tau_F)$, enquanto do segundo decaimento calculou-se k_{OBS} , que quando projetado contra diferentes concentrações de DBAS fornece valores de k_d de acetona triplete, k_{ET} e ϕ_{TS} , segundo a Equação 3.11. A figura 4.6, mostra a projeção de k_{OBS} versus $|DBAS|$. A tabela 4.9 mostra os valores dos parâmetros obtidos por este método.

Os valores de τ_F foram também, obtidos por medida de tempo de decaimento em água aerada em uma aparelhagem mais simples, usando "fluorescers" de τ_F conhecidos (antraceno em etanol e quinino em solução aquosa 0,1 N

Figura 4.5. - Exemplo genérico de Projeção log I vs tempo, obtida em experimentos de fotoexcitação por pulsos.

Figura 4.6. - Projeção de k_{obs} obtidas em experimentos de fo toexcitação por pulsos vs concentração de DBAS.

TABELA 4.9 Parâmetros de transferência de energia de acetona fotoexcitada para DBAS em água deaerada a 20°C

Parâmetro	Valor
τ_F^{DBAS} (ns)	7,8
$k_{ET} (M^{-1}s^{-1})$	$3,5 \times 10^9$
ϕ_{TS}	0,10
$k_d^{acetona\ triplet} (s^{-1})$	$1,0 \times 10^5$

HCl, ver MÉTODOS, ítem 3.5.1.5). Os valores obtidos foram 7 ± 1 ns para DBAS e 10 ± 1 ns para DPAS.

A figura 4.7 mostra os espectros de emissão e excitação do DBAS e DPAS em água. A tabela 4.10 mostra os valores de absortividade molar (ϵ) de DBAS e DPAS em água, determinados por projeção de absorbância versus concentração, com pelo menos três pontos.

Os valores de ϕ_F foram determinados, segundo método descrito no ítem 3.5.1.4, por comparação de áreas de fluorescência com DPA em benzeno ($\phi_F^{20^\circ} = 0,90$; HAMAI e HIRAYAMA, 1983). Estes experimentos foram feitos a 20°C, com concentração da ordem de 5×10^{-7} M, $\lambda_{exc} = 310\text{nm}$.

Figura 4.7. - Espectro de emissão e excitação de DBAS e DPAS em água.

TABELA 4.10 Absortividade Molar de DBAS e DPAS em água

	λ_{max}	$\epsilon (\text{molar}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$
DBAS	405	7750
	384	7950
	364	5000
DPAS	397	8050
	377	8400
	361	6100

Foi observado uma discrepância entre o valor determinado de ϕ_F de DBA em benzeno e o valor da literatura (WILSON e SCHAAP, 1971; ENGEL e MONROE, 1971). Este fato será explorado detalhadamente na DISCUSSÃO. A tabela 4.11 mostra os valores de ϕ_F obtidos.

TABELA 4.11 Valores de ϕ_F de DBAS, DPAS, DBA, DPA a 20°C

Fluorescer/Solvente	ϕ_F
DPA/Benzeno	0,90 (a)
DBA/Benzeno	0,20
DPAS/água	0,87
DBAS/água	0,42

(a) Valor usado como referência (HAMAI e HIRAYAMA, 1983).

Os valores de energia de ativação de fluorescência (E_F) foram determinados como sendo - 4,5 kcal.mol⁻¹ para DBAS e - 1,6 kcal.mol⁻¹ para DPAS, ambos em água (Figura 4.8).

Houve também, a necessidade de determinar valores de ϕ_F de DBA em alguns solventes orgânicos, que foi feito por comparação de áreas de fluorescência em relação à do DBA em benzeno (ver Tabela 4.11). Estes experimentos foram feitos a 20°C, com concentrações da ordem de 10⁻⁶ M, λ_{exc} = 383 nm. A tabela 4.12 mostra os valores obtidos.

TABELA 4.12 Valores de ϕ_F de DBA em vários solventes orgânicos a 20°C

Solvente	ϕ_F
Benzeno	0,20 (a)
Ciclohexano	0,16
Decalina	0,20
CCl ₄	0,27
Acetonitrila	0,16

(a) Valor usado como referência (MELHUISE, 1961 e este trabalho).

Figura 4.8. - Variação de ϕ_F de DBAS e DPAS em água com a temperatura. Determinação de E_F .

4.2 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.2.1 Efeito do solvente na estabilidade do TMD

TURRO e LECHTKEN (1973A,B) notaram um comportamento diferente de TMD em acetonitrila onde apresentava uma $E_a = 30 \text{ kcal.mol}^{-1}$ contra 25 kcal.mol^{-1} em benzeno. Nestes mesmos artigos, estes autores discutem um efeito de metanol versus benzeno e ciclohexano (diferença de 10 kcal.mol^{-1}) como sendo devido a um efeito de catálise escura por íons metálicos contaminantes. Posteriormente, o mesmo autor (TURRO) encontrou um valor de $E_a = 27 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para TMD em acetonitrila sem, contudo, comentar a discrepância com o resultado anterior (STEINMETZER e colabs., 1974).

Analisando-se os valores de E_a de TMD da literatura, de dez diferentes determinações, realizadas em solventes aromáticos alifáticos e hidroxílicos, cinco encontram-se na faixa de $27,0$ a $27,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$, sendo que para o total dos dez valores, a incerteza aumentaria para $26,5 \pm 1,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (ADAM e ZINNER, 1982), demonstrando uma notável concordância destes valores.

Apesar da grande incerteza nos valores de E_a obtidos para diferentes solventes orgânicos, devido à pequena amostragem de pontos para a projeção de Arrhenius, nota-se na Tabela 4.2 que não há dependência deste parâmetro com a natureza do solvente utilizado. Os valores de E_a obtidos pelo método da "queda brusca de tem-

peratura" também confirmam este fato (Tabela 4.1) demonstrando que a E_a de TMD em água é a mesma que em solventes orgânicos.

É interessante notar que os valores de E_a determinados pelo método da "queda brusca de temperatura" para água, são insensíveis à presença de íons metálicos contaminantes, enquanto que o gráfico de Arrhenius mostra um desvio positivo só evitado após exaustiva purificação da água utilizada. Este fato também foi observado por LEE e WILSON (1973) na decomposição do cis-dietoxidioxetano, a qual sofria catálise escura por aminas, só afetando o valor de E_a obtida pelo gráfico de Arrhenius e não pelo método da "queda brusca de temperatura".

Ressaltamos ainda a confirmação da E_a da termólise do TMD em acetonitrila ao redor de 27 kcal/mol.

4.2.2 Efeito do solvente nos valores dos parâmetros

ϕ_{TS} , $^3\phi$ e $^1\phi$ e vida média

Mais uma vez, o desafio era obter a ordem de grandeza destes parâmetros em água, relativa a solventes orgânicos. Nos itens 4.1.2 e 4.1.3, mostrou-se quão difícil é tal tarefa.

Com relação à determinação de valores de $^3\phi$ e $^1\phi$ para a termólise de TMD, os problemas de cali

bração da aparelhagem e da contaminação por íons metálicos nos levou a desistir da obtenção de valores absolutos de $^3\phi$ e $^1\phi$. Por meio de uma abordagem em que os erros sistemáticos se anulam conseguiu-se, finalmente, obter um valor para a relação $^3\phi/^1\phi$ que é comparável aos valores da literatura (Tabela 4.6) determinados em solventes orgânicos. Sem perder a noção de que estes valores poderiam mascarar um efeito simultâneo de solvente em $^3\phi$ e $^1\phi$, acreditamos que esta é uma indicação de que o solvente não exerce influência sobre estes parâmetros.

Os rendimentos de transferência de energia da $^3\text{Ac}^*$ para DBA ou DBAS (ϕ_{TS}) em diversos solventes apresentaram-se similares, a não ser no caso de benzeno. Tanto os valores obtidos por medidas de tempo de decaimento, quanto aqueles determinados pelo método dos duplos recíprocos mostram que, para benzeno, este valor é cerca de três vezes maior que em outros solventes não aromáticos. Este fato pode ser atribuído à formação de um "exciplex" entre a $^3\text{Ac}^*$ e a molécula do solvente aromático, modificando a natureza da espécie doadora (WILSON e HALPERN, 1980B).

Esquema 4.1

Outro fato que pode ser observado na tabela 4.7 é o de uma relativa concordância entre os valores de Φ_{TS} obtidos pelos dois métodos utilizados, a não ser para o caso da água como solvente. Pelos mesmos motivos apresentados anteriormente, quando se discutiu a dificuldade de determinação de $^3\Phi$ e $^1\Phi$, o valor de Φ_{TS} em água foge do esperado quando determinado pelo método dos duplos recíprocos. De uma maneira geral, poderíamos dizer que o valor Φ_{TS} de $^3Ac^*$ para DBA(S) em solvente não aromático é em torno de 10% enquanto que para solventes aromáticos é cerca de 30%.

Acredita-se que o mecanismo de transferência de carbonilos triplete para DBA singlete em meio fluido ocorra por transferência de elétrons via triplete (T_1 da acetona) $\rightarrow$ triplete (T_2 do DBA), seguido por um rápido cruzamento intersistema facilitado pela presença dos átomos de bromo. Sendo um processo exotérmico e permitido pela regra do spin, ocorreria com alta velocidade, apenas limitado pela difusão do par doador/aceptor no seio da solução (SCHMIDT e colabs., 1978; ADAM e colabs., 1980).

Assim sendo, a premissa de que $k_{ET} \approx k_{dif}$ e que, portanto, pode-se calcular τ^0 através da determinação de $k_{ET}\tau^0$, parece válida. Considerando-se que a solubilidade de O_2 em água é ca de 10 vezes menor que nos demais solventes (Handbook of Photochemistry, 1973; CLARK e STEEL, 1971), os valores de τ^0 apresentados na tabela 4.8, parecem concordar entre si. Além disso, o valor de τ^0 em água concorda com o valor posteriormente estimado por

outros métodos ($2 \pm 1 \mu s$).

4.2.3 Utilização do DBAS e DPAS como "probes" de espécies excitadas em água

O 9,10-dibromoantraceno apresenta uma propriedade interessante: ele pode ser utilizado como aceptor de energia de excitação triplete, seguindo-se a emissão de sua fluorescência. Esta transição triplete-singlete, que é proibida pela regra do spin, é devida a um efeito de acoplamento spin-orbital proporcionado pela presença dos átomos de bromo (EL-SAYED e BHAUMIK, 1963; ADAM e colabs., 1980). Em meio fluído acredita-se que este processo se dê através de uma transferência $T_1(\text{doador}) \rightarrow T_2(\text{DBA})$, seguido de rápido cruzamento intersistema, populando assim, o estado S_1 do DBA (CAMPBELL e LIU, 1973; SCHMIDT e colabs. 1978; ADAM e colabs., 1980).

VASSIL'EV utilizou, pela primeira vez, o DBA e o DPA como sensitizador de espécies excitadas produzidas na oxidação aeróbica de metiletilcetona (VASSIL'EV, 1962). Desde então o DBA e o DPA tem sido amplamente utilizados como sensitizadores de espécies excitadas formadas nos mais diversos processos. Dentre eles destacam-se: (i) detecção e dosagem de espécies triplete e singlete, assim como medir os parâmetros de ativação da termólise de dioxetanos, dioxetanonas e dioxetaniminas (WILSON e SCHAAP, 1971; ADAM e LIU, 1972; SAWAKI e OGATA, 1977; ADAM, 1982;

ADAM e ZINNER, 1982); (ii) estudo da formação de exciplexes entre cetonas e compostos aromáticos (WILSON e HALPERN, 1980A e 1980B); (iii) acompanhamento de processos de autooxidação de óleos (GOL'DENBERG e SCHMULOVICH, 1979; NICOLAEVSKII e colabs., 1982) e a oxidação de lipídeos (NIKI e colabs., 1982) por quimiluminescência; (iv) realização de ensaios de reações antígeno-anticorpo por técnica quimiluminescente (MORRISON e HELLER, 1981); e muitos outros.

Porém, uma das dificuldades na utilização destes aceptores de espécies excitadas era o de seu uso restrito a solventes orgânicos. Já nos primeiros estudos com os sistemas enzimáticos de produção de carbonilas excitadas, efetuados por CILENTO e colaboradores (1978), sentiu-se a necessidade de aceptores fluorescentes solúveis em água. Foi a partir destes estudos que surgiram as primeiras tentativas de síntese e os primeiros parâmetros fotofísicos e fotoquímicos dos derivados monossulfonados de DBA e DPA. Desde então, estes derivados mostraram que podem sensibilizar a oxidação aeróbica de diversos substratos, catalizada por peroxidase de rabanete, dentre eles: isobutiraldeído (FARIA OLIVEIRA e colabs., 1978) e propanaldeído (HAUN e colabs., 1980); acetaldeídos aromáticos (DURÁN e colabs., 1977B); diversas bases de Schiff alifáticas (BECHARA e MEDEIROS, comunicação pessoal), além de diversas β -dicetonas (SOARES e BECHARA, 1982).

Com a determinação dos parâmetros fotoquímicos e fotofísicos destes aceptores fluorescentes, assim como a elucidação de um caminho sintético confiável, a sua

utilização, até agora restrita aos sistemas enzimáticos descritos, dever-se-á estender não só ao estudo da termólise de dioxetanos em meio aquoso mas a uma ampla gama de processos capazes de produzir espécies eletronicamente excitadas em meio aquoso.

Alguns comentários podem, ainda, serem feitos com relação aos dados obtidos. Medidas da dependência de temperatura dos valores de DBA em diversos solventes têm sido relatadas na literatura. A energia de ativação resultante é explicada como sendo a diferença de energia entre o nível vibracional $v=0$ e níveis vibracionais mais altos $v > 0$ do estado S_1 do qual transições para o estado T_1 (cruzamento intersistema) podem ocorrer (KEARVELL e WILKINSON, 1970; HAMMERICK e colabs., 1979). Os valores obtidos de E_F de DBAS em H_2O concordam razoavelmente com os valores da literatura para solventes como benzeno ($E_F = -4,5$ kcal/mol; WILSON e colabs., 1976); n-hexano e n-heptano ($E_F = -4,2$ kcal/mol; HAMMERICK e colabs., 1979). O mesmo ocorre para os valores de τ_F (τ_F^{DPA} em etanol = 8,2 ns e em benzeno = 7,3 ns; MORRIS e colabs., 1976).

Um fato interessante ocorre em relação ao valor de ϕ_F de DBA em benzeno. Vários investigadores da área de dioxetanos têm assumido, durante anos, um valor de ϕ_F de DBA em benzeno a 20°C igual a 0,10, tomando como referência o valor publicado por ENGEL e MONROE (1971). Nos experimentos realizados para determinação dos valores de ϕ_F de DBAS e DBAS em água, tomou-se como referência o valor de ϕ_F de DPA em benzeno devido ao grande número de

trabalhos relatados (MELHUIISH, 1961; MORRIS e colabs., 1976; HAMAI e HIRAYAMA, 1983). Paralelamente, determinou-se o valor de ϕ_F de DBA em benzeno e notou-se uma discrepância de um fator de dois com relação ao valor publicado por ENGEL e MONROE. Estes autores citam como fonte, o trabalho publicado por LIU e EDMAN (1969), que por sua vez cita o trabalho de MELHUIISH (1961), verdadeiro autor de tal resultado. Em seu trabalho, MELHUIISH determinou valores de ϕ_F em etanol, éter de petróleo e benzeno como sendo 0,10, 0,09 e 0,20, respectivamente. Isto explica e confirma o valor de 0,20 por nós determinado para ϕ_F de DBA em benzeno e, por outro lado, indica que todos os trabalhos da literatura de determinação de $^3\phi$ para dioxetanos e que se usou ϕ_F de DBA = 0,10 em solventes aromáticos estão superestimados por um fator de dois (p.ex., WILSON e SCHAAP, 1971; WILSON e colabs., 1976; KOPECKY e FILBY, 1979; BECHARA e WILSON, 1980; ADAM, 1982; e muitos outros).

5. TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA DE EXCITAÇÃO ELETRÔNICA GERADA NA TERMÓLISE DO TMD EM ÁGUA PARA ACCEPTORES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

5.1 RESULTADOS

5.1.1 - Supressão por Dienos

A supressão de carbonilos triplete por dienos conjugados é frequentemente usada como padrão na determinação de constantes de velocidade de supressão destas espécies excitadas (KOCHEVAR e WAGNER, 1972). O processo de transferência de energia é exotérmico, uma vez que a energia triplete (E_T) da acetona é 78 kcal/mol (WILSON e colabs., 1976) e a E_T de dienos encontra-se por volta de 56-60 kcal/mol (WAGNER, 1976; PORTER e colabs., 1971). O mecanismo de supressão é assumido ser o mesmo que para olefinas de alta densidade eletrônica ("electron rich") ou seja parcialmente controlado por difusão, quase sempre envolvendo um complexo de transferência de carga (LOUFTY e colabs., 1977).

O íon sorbato, conjugado ao ácido 2,4-hexadienóico, assim como a acrilonitrila, foram utilizados como modelos de processo de supressão controlado por difusão no caso do sistema IBAL/HRP/ O_2 (FARIA OLIVEIRA, 1978).

Em vista disso, determinou-se os valores de K_{SV} da supressão de acetona triplete gerada na ter-

mólise de TMD por acrilonitrila em água e sorbato (ácido sórbico) em três solventes: água, n-hexano e decalina. Além disso, procurou-se obter informações sobre a vida média da acetona triplete na presença e na ausência de O_2 dissolvido. A tabela 5.1 mostra os valores obtidos. A figura 5.1 mostra os gráficos de Stern Volmer obtidos para supressão de sorbato em água aerada e deaerada.

TABELA 5.1 - Supressão de $^3Ac^*$ Gerada Quimicamente por Dienos (a)

Dieno	Solvente	$k_q \tau^0 (M^{-1})$	
		Aerado	Deaerado
Acrilonitrila	água	$5,1 \times 10^2$	-
Sorbato	água	$4,7 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4$
Ácido sórbico	n-hexano	$3,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
Ácido sórbico	decalina	$1,8 \times 10^2$	$5,2 \times 10^3$

(a): Todas as medidas foram feitas a $35^\circ C$. A supressão da $^3Ac^*$ foi monitorada por DBAS ou DBA, e a supressão destas espécies (DBAS e DBA) excitadas foram corrigidas, segundo método descrito no item 3.5.1.2; $[TMD] = 2 \times 10^{-4} M$; $[DBAS] = 1 \times 10^{-5} M$.

Figura 5.1. - Projeção de Stern-Volmer da supressão da acetona na triplete gerada na termólise de TMD por sorbato em água normalmente aerada (●) e água deaerada por passagem de N_2 (O). A formação de acetona triplete foi monitorada por DBAS.

5.1.2 - Supressão de Tirosina e 3,5-dihalogeno-derivados

Cilento e colaboradores (CILENTO e BERENHOLC, 1964; CILENTO, 1965; CILENTO e colabs., 1965) investigaram intensivamente a funcionalidade dos compostos tiroxina, tirosina e 3,5-dihalogenotirosinas como possíveis aceptores de energia eletrônica. RIVAS-SUAREZ e colaboradores (1979) demonstraram que estes compostos suprimem a fosforescência oriunda do sistema IBAL/HRP/O₂.

A supressão da $^3\text{Ac}^*$ produzida na termólise do TMD pela 3,5-diclorotirosina (DCT), 3,5-dibromotirosina (DBT) e 3,5-diiodotirosina (DIT) e tirosina foi, então, investigada.

Esquema 5.1

Tirosina

3,5-dihalogenotirosina

Estes estudos foram feitos nos pHs 6,4 e 7,4 de forma a diferenciar as eficiências de supressão das formas fenólica e fenóxido (pK_a das dihalogenotirosinas = 6,4 e da tirosina = 10,0; GEMMILL, 1955). Além disso,

a supressão de $^3\text{Ac}^*$ pelos íons Cl^- , Br^- e I^- também foi estudada de maneira a verificar a possibilidade de transferência de elétrons no processo. A Figura 5.2 mostra a projeção de Stern-Volmer obtida a pH 7,4, enquanto que a Tabela 5.2 mostra os valores de $k_q\tau^0$ calculados.

TABELA 5.2 - Supressão de Acetona Triplete Gerada na Termólise do TMD por Tirosina e 3,5-dihalogenoderivados (a)

Supressor	$k_q\tau^0 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	
	pH 6,4	pH 7,4
Tirosina	$1,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
DCT	$1,1 \times 10^3$	$6,2 \times 10^2$
DBT	$1,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
DIT	$2,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$
Cl^-	-	zero
Br^-	-	5,4
Cl^-	-	$7,4 \times 10^3$

(a) Estudos feitos a 35°C , em tampão fosfato aerado $5 \times 10^{-3}\text{M}$ /pirofosfato $5 \times 10^{-3}\text{M}$, monitorando-se a formação de $^3\text{Ac}^*$ pela fluorescência de DBAS (valores de $k_q\tau^0$ corrigidos); $|\text{TMD}| = 2,0 \times 10^{-4}\text{M}$; $|\text{DBAS}| = 2,5 \times 10^{-6}\text{M}$.

Recentemente, um estudo detalhado da supressão de $^3\text{Ac}^*$ gerada enzimaticamente para estes compostos foi apresentado por RIVAS(1982). A análise dos resultatos

Figura 5.2. - Projeção de Stern-Volmer da supressão de acetona na triplete gerada na termólise de TMD por tirosina (----), 3,5-diclorotirosina (●), 3,5-dibromotirosina (○), 3,5-diiodotirosina (◐), pH 7,4. A formação de acetona triplete foi monitorada por DBAS. Os pontos referentes a tirosina foram determinados em concentrações acima de $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

dos apresentados, à luz dos resultados obtidos por Rivas, será apresentada no ítem 5.2 (DISCUSSÃO).

5.1.3 - Supressão por Indol e Derivados

RIVAS-SUÁREZ e CILENTO (1981) observaram que diversos compostos indólicos suprimem a $^3\text{Ac}^*$ gerada pelo sistema IBAL/HRP/ O_2 . Utilizamos, então, alguns destes compostos como supressores da $^3\text{Ac}^*$ gerada quimicamente com o intuito de comparar os dois sistemas.

A Tabela 5.3 contém os valores de $k_q \tau^0$ obtidos usando-se indol, N-metilindol, D-triptofano (D-Trp), L-triptofano (L-Trp) e o tripetídeo L-lisil-L-triptofanil-L-lisina (Lys-Trp-Lys) como supressores de $^3\text{Ac}^*$ gerada na termólise do TMD.

Esquema 5.2

Indol

N-metilindol

Triptofano

TABELA 5.3 - Supressão de $^3\text{Ac}^*$ Gerada Quimicamente por Compostos Indólicos (a)

Supressor	$k_q\tau^0 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
Indol	$4,4 \times 10^3$
N-metilindol	$4,7 \times 10^3$
D-Trp	$2,3 \times 10^3$
L-Trp	$2,2 \times 10^3$
Lys-Trp-Lys	$2,3 \times 10^3$

(a) Estudos feitos a 35°C , em água bi-destilada normalmente aerada monitorando-se a formação de $^3\text{Ac}^*$ pela fluorescência do DBAS (valores de $k_q\tau^0$ corrigidos); $|\text{TMD}| = 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $|\text{DBAS}| = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$.

As projeções tipo Stern-Volmer continuam pelo menos seis pontos, com a faixa de variação de concentração do supressor entre $1-30 \times 10^{-5} \text{ M}$. Todas se apresentaram com linearidade considerável. A Figura 5.3 mostra, como exemplo, a projeção obtida utilizando-se o D-Trp como supressor.

Não foram observadas alterações espectrais significativas do indol após aquecimento de solução contendo $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ de TMD e $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de indol (30 minutos a 60°C).

Figura 5.3. - Projeção de Stern-Volmer da supressão de acetona na triplete gerada na termólise de TMD por D-triptofano em água. A formação da acetona triplete foi monitorada por DBAS.

5.1.4 - Supressão por Quinonas

Diversos autores têm relacionado altas velocidades de supressão de acetona triplete com altos potenciais de ionização dos supressores usados (LOUTFY e colabs., 1977; MIRBACH e colabs., 1980). A vitamina K₃ (2-metil-1,4-naftoquinona), devido a sua importância biológica, e mais uma série de quinonas, foram estudadas como interceptadoras de acetona triplete gerada pelo sistema IBAL/HRP/O₂ (RIVAS-SUÁREZ e colabs., 1981). Estes autores observaram uma velocidade de supressão muito acima do esperado para um processo controlado por difusão.

Estudou-se a supressão de acetona triplete gerada quimicamente por uma série de quinonas (Esquema 5.3). Os valores de $k_q\tau^0$ observados demonstram que o processo de supressão é extremamente rápido, o que concorda com as suposições já que o potencial de ionização destes compostos é da ordem de 10 eV. Ao estudar-se o controle de supressão da espécie $^1\text{DBAS}^*$ (fotoexcitado) observou-se que estes compostos também atuam eficientemente sobre espécies singlete.

A Tabela 5.4 mostra os valores de $k_q\tau^0$ obtidos das projeções de Stern-Volmer para a supressão de $^3\text{Ac}^*$, já corrigidas pelo "quenching" sobre $^1\text{DBAS}^*$, além de relacionar os valores obtidos nestes controles, ou seja, a supressão do DBAS fotoexcitado.

Esquema 5.3

p-benzoquinona

2,6-dimetil-p-benzoquinona

tetracoloro-p-benzoqui-
nona (Cloranil)

tetrabromo-o-benzoquinona

1,4-naftoquinona

2-metil-1,4-naftoquinona

antraquinona-2-sulfonato de sódio

As projeções de Stern-Volmer continham pelo menos seis pontos com variação da concentração do supressor dentro de uma ordem de grandeza, e apresentaram boa linearidade. A Figura 5.4 mostra, como exemplo, a projeção obtida para a 2,6-dimetil-p-benzoquinona como supressor.

TABELA 5.4 - Supressão de $^1\text{DBAS}^*$ produzido por Fotoexcitação e de $^3\text{Ac}^*$ Gerada na Termólise do TMD por Quinonas

Supressor	$k_q \tau (M^{-1})$ (a)	
	$(^1\text{DBAS}^*)$ (b)	$(^3\text{Ac}^*)$ (c)
p-benzoquinona (água)	$4,8 \times 10^2$	$1,9 \times 10^4$
(n-hexano)	$7,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^3$
(decalina)	$7,0 \times 10^1$	$4,5 \times 10^2$
2,6-dimetil-p-benzoquinona	$4,3 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3$
tetracloro-p-benzoquinona	$7,1 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4$
tetrabromo-o-benzoquinona	$3,8 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$
1,4-naftoquinona	$1,3 \times 10^3$	$3,6 \times 10^4$
2-metil-1,4-naftoquinona	$1,3 \times 10^3$	$6,5 \times 10^3$
antraquinona-2-sulfonato	$3,1 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$

(a) Todos os experimentos foram feitos em água bidestilada normalmente aerada, quando não indicado; temperatura 35°C ; $[\text{TMD}] = 2,0 \times 10^{-4}\text{M}$; $[\text{DBAS}] = 2,5 \times 10^{-6}\text{M}$.

(b) Valores obtidos para supressão de DBAS fotoexcitado a 383 nm.

(c) A supressão de $^3\text{Ac}^*$ foi monitorada por DBAS ou DBA e os valores de $k_q \tau$ foram corrigidos pela supressão sobre $^1\text{DBAS}^*$ de acordo com o método descrito em 3.5.1.2.

Figura 5.4. - Projeção de Stern-Volmer da supressão de acetona na triplete gerada na termólise de TMD por 2,6-dimetil-p-benzoquinona. A formação de acetona triplete foi monitorada por DBAS. A projeção menor refere-se a supressão de DBAS fotoexcitada pela 2,6-dimetil-p-benzoquinona.

5.1.5 - Transferência de Energia para Riboflavina

Flavinas são postuladas como cromóforos responsáveis pela emissão dos sistemas bioluminescentes de dinoflagelados e bactérias (HASTINGS, 1978). Diversos autores tem estudado suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas (HEMMERICH, 1976; HEELIS, 1982). Particularmente, verificou-se que sistemas enzimáticos geradores de carbonilos triplete podem excitar flavinas (HAUN e colabs., 1978; RIVAS-SUÁREZ e colabs., 1979).

Na presença de $3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ riboflavina, (Esquema 5.4), a emissão de soluções deaeradas de TMD ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) é amplificada por um fator 1,5 apenas. O duplo recíproco da intensidade de emissão versus concentração de riboflavina em solução aerada é mostrado na Figura 5.5. As intensidades foram medidas com o uso de um filtro que absorve totalmente a fluorescência da acetona provinda do TMD (rendimento de acetona singlete na termólise do TMD em benzeno $\sim 0,15\%$ (WILSON e colabs., 1976); λ_{max} da fluorescência de acetona $\sim 395 \text{ nm}$). O valor de $k_{\text{ET}} \tau^0$ calculado do duplo recíproco ($Y_{\text{intercepto/tangente}}$) é $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Um estudo da supressão de $^3\text{Ac}^*$ por sorbato, sensibilizada por riboflavina (com uso de filtro) fornece um valor de K_{SV} (constante de Stern-Volmer; $k_q \tau^0$) igual a $1,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Em um mesmo estudo usando-se o DBAS como sensibilizador, foi obtido um valor de K_{SV} igual a $4,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (ver Ítem 5.1.1).

Figura 5.5. - Duplo recíproco de TMD/riboflavina em água normalmente aerada a 40°C.

Esquema 5.4

5.1.6 - Transferência de Energia Para Pigmentos

Xantênicos

DURÁN e CILENTO (1980) observaram um intenso efeito de átomos pesados no processo de transferência de energia de acetona triplete gerada enzimaticamente para os estados singlete de pigmentos xantênicos.

Em vista disso, estudamos a transferência de energia de acetona triplete gerada na termólise de TMD para fluoresceína (Fl), eosina (FlBr₄) e Rose Bengala (FlCl₄I₄).

Esquema 5.5

Fluoresceína

Eosina

Rose Bengala

A adição de fluoresceína, eosina e Rose Bengala intensifica a luminescência da termólise do TMD, demonstrando que ocorre transferência de energia. Não se observou alteração espectral do pigmento nem da velocidade de termólise do TMD. A Figura 5.6 mostra as projeções de duplo recíproco do efeito da concentração do pigmento versus intensidade de emissão. Filtros apropriados foram usados durante as medidas com o intuito de evitar efeitos de reabsorção.

As eficiências de transferência de energia da $^3\text{Ac}^*$ para o estado singlete dos pigmentos (ϕ_{TS}) foram calculadas a partir da intensidade de emissão (corrigida para os filtros) extrapolada para concentração infinita do pigmento e do rendimento quântico de fluorescência dos mesmos (ϕ_{F} fluoresceína = 0,92; ϕ_{F} eosina = 0,19; ϕ_{F} Rose-Bengala = 0,02; WADE e SPIKES, 1971). Os valores de $k_{\text{ET}} \tau^0$ (obtidos da relação $y_{\text{intercepto}}/\text{tangente}$ dos duplos recíprocos) assim como, os valores normalizados de ϕ_{TS} encontram-se na Tabela 5.5.

Figura 5.6. - Duplo recíproco de TMD/pigmentos xantênicos em tampão fosfato pH, 7,4; 40°C; fluoresceína (●), eosina (○) e Rosa Bengala (◐).

TABELA 5.5 - Transferência de Energia da $^3\text{Ac}^*$ Gerada Quimicamente para Pigmentos Xantânicos. Valores de k_{ET} , τ^0 e ϕ_{TS} (a)

Pigmento	$k_{\text{ET}} \tau^0 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	ϕ_{TS} (relativo)
Fluoresceína	$5,7 \times 10^3$	1
Eosina	$7,8 \times 10^3$	13
Rose Bengala	$1,8 \times 10^4$	320

(a) Todos os experimentos foram feitos em tampão fosfato aerado $5,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ /pirofosfato $5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, pH 7,4 a 41°C ; $|\text{TMD}| = 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; filtros usados; Toshiba 0-53 (corta emissão abaixo de 520 nm), 0-57 (ídem 560 nm), 0-56 (ídem 550 nm), para fluoresceína, eosina e Rose Bengala, respectivamente.

5.1.7 - Oxidação de Clorpromazina pela Ação do TMD

Dentre os efeitos farmacológicos da clorpromazina (CPZ) mais importantes destaca-se sua ação tranquilizante e sedativa (CRISMON, 1967). Em tratamentos prolongados de psicoses com CPZ, diversos casos de fotossensibilidade ou fotoalergia tem sido associados a efeitos colaterais desta droga (HUANG e SANDS, 1967). Sintomas, tais como alergia e descoloração da pele em partes expostas a luz e alterações oculares, têm sido explicados por vários autores como possível produto de reação de CPZ com melanina catalisada por luz (HUANG e SANDS, 1967; DAVIES e colabs., 1976; MENON e colabs., 1982). Por sua vez,

é sabido que o principal produto metabólico de CPZ excretado por cães e também por humanos é a clorpromazina-5-óxido (sulfóxido; CPZO; SALZMAN e colabs., 1955).

Esquema 5.6

A partir do fato de que CPZO pode ser produzida por irradiação de solução aerada de CPZ com luz UV (IWAOKA e KONDO, 1974), DURÂN e colaboradores (1978), sugeriram que esta fotooxidação poderia ser dirigida por moléculas eletronicamente excitadas geradas por sistemas bioquímicos e o demonstraram através do uso dos sistemas propenal/HRP/O₂ e IBAL/HRP/O₂, os quais produzem etanal e acetona no estado triplete, respectivamente.

Tendo em vista estes resultados de Durân e colaboradores e preocupados em elucidar o mecanismo de fotooxidação enzimática de CPZ "no escuro", propusemos a estudar o comportamento desta droga diante do TMD.

5.1.7.1 - Alteração Espectral de CPZ pela Ação de TMD

A Figura 5.7 mostra os espectros de soluções de CPZ expostas a concentrações crescentes de TMD,

Figura 5.7. - Alteração espectral de CPZ por reação com TMD em água aerada. Formação de CPZO. (—) 20 μ M CPZ; (----) ídem + 60 μ M TMD; (-O-) ídem + 120 μ M TMD; (-.-) ídem + 300 μ M TMD; (- -) ídem + 600 μ M.

incubadas a 60°C por 90 minutos. A localização das bandas de absorção de CPZO, que é o produto da reação, coincide com os dados da literatura (WARREN e colabs., 1966; IWAOKA e KONDO, 1974), inclusive os pontos isosbéticos.

O mecanismo de oxidação de CPZ pelo sistema IBAL/HRP/O₂, proposto por Durán e colaboradores (1978), assume a participação de um complexo entre CPZ e oxigênio molecular dissolvido, como acceptor de energia triplete da acetona gerada enzimaticamente. Para testar a possível participação deste complexo no sistema químico (TMD), repetiu-se o mesmo experimento anterior, saturando a solução com N₂ antes da termólise. Verificou-se que, a formação independe da presença de O₂ na solução (Figura 5.8).

O estudo de competição com supressores de acetona triplete mostrou que quando se adiciona quantidades de indol ou sorbato, suficientes para suprimir 50% de acetona triplete (calculado a partir da constante de Stern-Volmer), a eficiência de formação de CPZO não é modificada. A Figura 5.9 mostra os espectros de absorção resultantes da reação de CPZ com TMD contendo quantidades crescentes de indol, contra branco contendo a mesma concentração de supressor. Quando se usa sorbato como supressor de acetona triplete aparecem alguns problemas, devido a alta absorptividade deste na região acima de 300 nm. Porém, na Figura 5.9, fica claro que o indol não compete no processo de oxidação da CPZ e que, portanto, independe da produção de espécies excitadas.

Figura 5.8. - Comparação entre a alteração de CPZ por reação com TMD em meio deaerado (A) e meio aerado (B).
 $|\text{CPZ}| = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $|\text{TMD}| = 8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Figura 5.9. - Alteração espectral de CPZ por reação com TMD na presença de Indol. (—) 20 μ M CPZ + 200 μ M Indol; (----) ídem + 120 μ M TMD; (-.-) ídem + 300 μ M TMD; (-o-) ídem + 600 μ M de TMD.

5.1.7.2 - Verificação da Formação do Epóxido na Reação entre TMD E CPZ por RMN¹H

Com vistas aos resultados obtidos, pensou-se na possibilidade de uma reação de oxidação direta de CPZ pelo dioxetano a CPZO, com conseqüente redução do TMD ao seu epóxido correspondente. Seguindo-se, então, a reação entre CPZ e TMD por ressonância magnética de prótons percebe-se claramente a formação de epóxido, com concomitante desaparecimento dos sinais de TMD. As Figuras 5.10.A e C mostram os espectros de RMN¹H de uma mistura de CPZ e TMD em CDCl₃ antes e depois de aquecidos. A Figura 5.10.B mostra o espectro parcial da mistura durante o aquecimento, em intervalos de 15 minutos (ver em Métodos, Ítem 3.5.2.3).

Os deslocamentos encontrados para os principais prótons foram: CPZ (2,68 ppm, s; 4,08 ppm, t; 7,00 ppm,b), TMD (1,50 ppm, s), epóxido (1,30 ppm,s).

5.1.7.3 - Supressão da Quimiluminescência de TMD por CPZ

Foram feitos estudos de supressão, do tipo Stern-Volmer da acetona triplete gerada na termólise do TMD sensibilizada por DBAS, usando-se clorpromazina como supressor. Estes estudos feitos a 50°C, mostraram valores de $k_q\tau^0$ iguais a $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para solução aerada normalmente e $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para solução saturada com N₂. A supressão da fluorescência de DBAS foi descontada destes cálcu-

Figura 5.10. - Espectros de RMN^1H de uma mistura CPZ/TMD em CDCl_3 aquecida a 60°C ; (A) espectro inicial, (B) espectros parciais durante o aquecimento ; (C) espectro final.

los ($k_q \tau^0$ do DBAS fotoexcitado = $1,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). O solvente usado foi tampão fosfato 0,05M/pirofosfato 0,005 M pH = 7,4. As projeções foram feitas usando-se valores de intensidade máxima de luz, o qual ocorre num tempo em que não há reação apreciável entre o TMD e CPZ.

Estes dados indicam que efetivamente a clorpromazina suprime a acetona triplete gerada no processo. A diferença entre os valores de $k_q \tau^0$ em meio aerado e deaerado (10 vezes) confirma o fato de que a espécie que está sendo suprimida está num estado triplete pois o τ^0 (vida média) aumenta de quase uma ordem de grandeza quando o O_2 não está presente.

5.1.7.4 - Estudo Cinético da Reação entre CPZ e TMD

As constantes de velocidade (pseudo 1ª ordem) de formação de CPZO foram calculadas, monitorando-se o aparecimento de uma de suas bandas de absorção características (ver Métodos, Ítem 3.5.1.6). Procurou-se observar efeitos de temperatura, concentração de TMD e supressores de $^3\text{Ac}^*$ sobre o valor desta constante a uma concentração fixa de CPZ inicial. A Figura 5.11 mostra um resumo dos resultados obtidos. Os valores de k_{obs} foram calculados por um programa de regressão linear por ajuste e os pontos onde a relação $|\text{TMD}|_0/|\text{CPZ}|_0 > 10$ mostraram valores de r (fator de correlação) $> 0,999$.

Devido a dispersão dos resultados, não

Figura 5.11. - Variação das constantes de velocidade de formação de CPZO vs concentração de TMD em tampão fosfato 0.05M/pirofosfato 0.005M, pH 7,4. $|\text{CPZ}| = 30\mu\text{M}$ a 52°C (○), a 62°C (●) e a 62°C na presença de $200\mu\text{M}$ de sorbato (●).

foi possível calcular o valor da constante bimolecular do sistema (k_2), porém, percebe-se claramente a dependência de k_{obs} com a concentração de TMD. Da mesma forma, não foi possível discriminar diferenças nos valores de k_{obs} para temperaturas de 62°C e 52°C. A adição de 2×10^{-4} M de sorbato parece não modificar o valor de k_{obs} , indicando mais uma vez que a transferência de energia de excitação não é o principal fator responsável pela oxidação da CPZ.

Estudou-se, também, o efeito da concentração de CPZ e de temperatura na velocidade de aparecimento de quimiluminescência do TMD sensitizada por DBAS. Verificou-se que a presença de CPZ não altera significativamente o valor de k_1 obtido na ausência de CPZ. Variou-se a temperatura na faixa de 50°C - 80°C e encontrou-se que as constantes de velocidade calculadas se mostraram bem próximas às aquelas verificadas para a termólise do TMD em água bidestilada ou tampão, ou seja, dentro do desvio esperado devido a presença de contaminação por íons metálicos que provocam a catálise escura da decomposição de TMD. A Tabela 5.6 mostra os resultados obtidos.

TABELA 5.6 - Efeito de CPZ na Velocidade de Aparecimento de Quimiluminescência na Termólise do TMD (a)

Temperatura (°C)	CPZ (M)	k_{obs} (s ⁻¹)	k_l esperado (s ⁻¹) (a)
50	-	$1,1 \times 10^{-4}$	$1-4 \times 10^{-4}$
50	5×10^{-5}	$8,0 \times 10^{-5}$	$1-4 \times 10^{-4}$
50	5×10^{-4}	$8,0 \times 10^{-5}$	$1-4 \times 10^{-4}$
60	5×10^{-4}	$1,1 \times 10^{-3}$	$7,5 \times 10^{-4}$
68	5×10^{-4}	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$
81	5×10^{-4}	$2,7 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$

(a) |TMD| = 6×10^{-4} M; |DBAS| = 1×10^{-5} M; tampão fosfato 0,05 M/pirofosfato 0,005 M pH 7,4;

(b) valor esperado para constante de termólise de TMD em água bidestilada não purificada pela contaminação por íons metálicos (ver Figura 4.1).

5.1.7.5 - Determinação da Estequiometria da Reação entre CPZ e TMD

A estequiometria da reação entre TMD e CPZ foi determinada segundo o método descrito no item 3.5.2.3. A Figura 5.12 mostra a projeção da quantidade de acetona "não produzida" (a reação entre TMD e CPZ produz epóxido) pela quantidade de CPZ adicionada, contida em 7,5 µl de solução incubada. A reta apresenta a curva esperada caso a estequiometria fosse 1:1 (cada molécula de TMD,

Figura 5.12. - Estequiometria da reação entre CPZ e TMD em tampão fosfato. Quantidades contidas em 7,5 μ l de solução injetada no cromatografo; quantidade inicial de TMD = 7,5nmoles referente a 15nmoles de acetona - se totalmente termolisado. Os pontos cheios indicam a presença de 400 μ M de sorbato.

produz 2 moléculas de acetona, se termolisada). Nota-se que em baixas concentrações de CPZ ($|TMD|/|CPZ|$ da ordem de 10 a 3) a estequiometria de 1:1 parece ser obedecida. Porém, quando aumenta-se a concentração de CPZ até a proporção $|TMD|/|CPZ|$ igual a 1, os pontos afastam-se da curva esperada. Isto pode apenas indicar uma competição entre reação do TMD com CPZ versus a termólise unimolecular do dioxetano.

Foram feitas, ainda, três medidas contendo $4 \times 10^{-4} M$ de sorbato (supressor de acetona triplete). Observou-se que a sua presença em nada afeta o rendimento de acetona.

5.1.7.6 - Fotooxidação de CPZ por Irradiação

Segundo IWAOKA e KONDO (1974), a irradiação de solução aquosa aerada de CPZ leva ao aparecimento de bandas relativas ao sulfóxido e o desaparecimento de bandas de CPZ. Os autores observaram, ainda, que a irradiação por longo período pode levar à decomposição fotoquímica do fotoproduto (CPZO). Com o intuito de se investigar a oxidação de CPZ também por irradiação, afim de se comparar com o sistema do TMD, repetiu-se o experimento daqueles autores em nosso laboratório e os resultados foram reproduzidos com relativo sucesso (Figura 5.13). É interessante notar que quando a oxidação de CPZ a CPZO é promovida por TMD, não se observam bandas de decomposição fotoquímica secundária de CPZO, sob irradiação prolongada.

Figura 5.13. - Alteração espectral de CPZ por irradiação com luz U.V. 366nm. $[\text{CPZ}] = 50\mu\text{M}$ (—) tempo zero; (— —) 40 seg; (.....) 100 seg; (-o-) 200 seg; (----) 500 seg.

5.1.7.7 - Interação entre CPZ e o Sistema
Enzimático IBAL/HRP/O₂. Estudos
Complementares

Baseado nos resultados obtidos para a reação entre TMD e CPZ, dos quais conclui-se que a formação de CPZO independe da acetona triplete e que é produto de uma reação de oxidação dirigida pelo dioxetano, resolveu-se reestudar a oxidação de CPZ pelo sistema IBAL/HRP/O₂ a partir de novas abordagens, estudo este feito originalmente por Durán e colaboradores (1978).

Estes autores comprovaram a formação de CPZO neste sistema identificando o mesmo por cromatografia de papel e por fluorescência. Agora, o CPZO foi identificado por alteração espectral da CPZ, aos moldes dos experimentos feitos anteriormente com TMD (Ítem 5.1.7.1). A Figura 5.14. mostra a alteração espectral de CPZ provocada pelo sistema enzimático. O espectro resultante é o mesmo encontrado para o sistema químico (que é o espectro de CPZO). Porém, ao se adicionar indol em quantidade capaz de suprimir 80% da acetona triplete presente, ainda assim observou-se quantidade razoável de CPZO formada, como mostra a Figura 5.15.

A Figura 5.16 mostra a alteração da velocidade de consumo de O₂ pelo sistema IBAL/HRP/O₂, quando em presença de clorpromazina. Percebe-se, claramente, que em uma primeira etapa, a velocidade de consumo de O₂ diminui a um valor aparentemente constante e em seguida

Figura 5.14. - Alteração espectral de CPZ pela ação do sistema IBAL/HRP/O₂ por 10 minutos.

Figura 5.15. - Alteração espectral da CPZ pela ação do sistema IBAL/HRP/O₂ por 10 minutos na presença de 200 μ M de Indol.

Figura 5.16. - Alteração da velocidade de consumo de O_2 do sistema IBAL/HRP/ O_2 pela CPZ. (—) tampão fosfato 0,1 M, pH 6,4; EDTA, 33 μ M; HRP, 2 μ M; IBAL, 80mM; (-o-) ídem + 17 μ M de CPZ; (- -) ídem + 25 μ M CPZ; (---) ídem + 33 μ M CPZ.

reestabelece seu valor normal sem CPZ. Mais ainda, com o aumento da concentração de CPZ a velocidade da primeira etapa cai para um valor ainda menor e o tempo de ocorrência desta etapa aumenta.

Este resultado levou a suspeitar de que a CPZ estaria agindo sobre o ciclo catalítico da peroxidase (ver Esquema 1.31). Para elucidar esta dúvida seguiu-se, espectrofotometricamente, a formação dos compostos intermediários da HRP durante o seu ciclo catalítico a 420 nm (formação de HRP II), a 400 nm (desaparecimento de HRP forma nativa) e a 411 nm (ponto isosbético entre os espectros de absorção de HRP I e nativa) (DUNFORD e STILLMAN, 1976).

A Figura 5.17A mostra que, usando-se concentrações de CPZ da ordem de 8-32 μ M, observa-se uma queda da absorção a 420 nm indicando reação entre CPZ e HRP II. Após algum tempo, a absorção inicial é retomada até que o O_2 seja completamente consumido. Este comportamento está de acordo com o observado no experimento anterior, quando numa primeira etapa a velocidade de consumo cai e posteriormente retorna ao seu valor normal.

As Figuras 5.17B e 5.17C mostram o que ocorre a 411 nm e 400 nm. Houve um aumento da absorção a 400 nm e que indica aumento do nível de HRP nativa. A 411 nm não se observou mudanças, o que significa que o nível de HRP nativa + HRP II não se alterou, ou seja, não houve acúmulo de HRP-I. Estes dados indicam que as formas oxidadas de HRP (HRP-I e HRP-II), têm no ciclo enzimático

Figura 5.17. - Alteração do ciclo da peroxidase seguida espectrofotometricamente a 420(A), 411(B) e 400(C) nm. Tampão fosfato 0,25 M pirofosfato 0,025 M, pH 7,4; HRP. 2μM; IBAL, 80mM(—); ídem + 8μM de CPZ, (—); ídem + 16μM de CPZ, (—○—); ídem + 24μM de CPZ, (---); ídem + 28μM CPZ, (— —); ídem + 32μM de CPZ (.....).

do sistema IBAL/HRP/O₂, vida média mais curta que sua forma mais reduzida (HRP nativa), quando em presença de CPZ. É impossível neste experimento, saber se é HRP-I, HRP-II ou ambas as formas que reagem com a promazina.

Para tentar discriminar qual é a forma (ou formas) reativas, preparou-se HRP-I a partir da reação de HRP com H₂O₂. O composto I foi produzido, num estado transiente, pela reação entre HRP e H₂O₂ na proporção de 1:1 (tampão acetato 0,1 M pH 3,8). Monitorando-se a velocidade de aniquilamento de HRP-I a 400 nm fixos, verificou-se que esta aumenta rapidamente quando em presença de CPZ, em concentrações da ordem de 0,5 a 2,5 vezes a de HRP (Figura 5.18). A reação direta entre H₂O₂ e CPZ foi descartada, uma vez que a velocidade desta reação é muito menor.

Seguindo-se a modificação espectral ocorrida na faixa de 390 a 425 nm, verificou-se que o pico máximo (400 nm HRP nativa) deslocava-se a 405 nm e lentamente voltava a 400 nm. Concomitante a isto, a intensidade de absorção diminuía e lentamente voltava ao valor inicial (Figura 5.19).

No Esquema 5.7 estão mostradas as possibilidades de interação do sistema H₂O₂/HRP/CPZ.

Figura 5.18. - Conversão de composto I de HRP (produzido por reação com H_2O_2) à forma nativa na presença de CPZ, monitorada a 400nm fixos. (—) $2\mu M$ e HRP + $2\mu M$ de H_2O_2 ; (-o-) ídem + $0,8\mu M$ de CPZ; (-.-) ídem + $1,7\mu M$ de CPZ; (----) ídem + $2,5\mu M$ de CPZ; (---) ídem + $5,0\mu M$ de CPZ.

Figura 5.19. - Alteração espectral de HRP na presença de CPZ (—) 2 μ M de CPZ + 2 μ M de HRP; (-o-) ídem + 2 μ M de H₂O₂, tempo zero; (----) após 1 min; (—) após 2 min; (.....) após 5 min; (-.-) após 20 min. Não há formação de composto II que absorve a 420nm.

Esquema 5.7

onde

P — HRP nativa (Fe^{3+})

I — HRP composto I (FeO^{3+})

II — HRP composto II (Fe^{4+})

Deste modo, três hipóteses podem ser levantadas, a saber: (1) no Esquema 5.7.A, k_2 é o passo limitante da reação; (2) ídem, onde k_3 é o passo limitante e (3) no Esquema 5.7.B, k_5 é o passo limitante. A hipótese (2) é sustentada pelo fato de se saber que o composto I é muito mais reativo que o composto II, portanto, $k_2 \gg k_3$. Por outro lado, os dados mostrados na Figura 5.18 e 5.19 revelam que não há acúmulo de HRP II e que, portanto, ou $k_3 \gg k_2$ (hipótese (1)) ou não há formação de HRP II (hipótese (3)).

Trabalhando-se com condições tais que $|\text{H}_2\text{O}_2| \gg |\text{CPZ}|$, pode-se provar por tratamento cinético de estado estacionário (Apêndice VI) que:

Equação 5.1

$$\frac{-d|\text{CPZ}|}{dt} = k_{\text{obs}} |\text{CPZ}| |E_0|$$

onde

$$|E_0| = |\text{HRP}| \text{ total (nativa + I + II)}$$

$$k_{\text{obs}} = 2k_2 \text{ (hipótese (1))}$$

$$k_{\text{obs}} = 2k_3 \text{ (hipótese (2))}$$

$$k_{\text{obs}} = k_5 \text{ (hipótese (3))}$$

O valor de k_{obs} foi calculado a partir das velocidades iniciais obtidas da curva de decaimento de CPZ. O desaparecimento de CPZ foi monitorado espectrofotometricamente a 255 nm (Soret) onde $\epsilon_{\text{CPZ}} = 3,40 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ contra $\epsilon_{\text{CPZO}} = 1,44 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A Tabela 5.7 mos

tra os valores obtidos variando-se $|\text{CPZ}|$ e $|\text{HRP}|$.

TABELA 5.7 - Constantes de Velocidade de Reação entre Compostos de HRP e CPZ

$ \text{HRP} $ mM $\backslash$ $ \text{CPZ} $ μM	$k_{\text{obs}} \times 10^{-4} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$		
	20	40	60
50	7,6	7,6	8,0
33	7,0	-	-
17	7,6	-	-

OBS.: Temperatura 40°C ; $\text{H}_2\text{O}_2 = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$; tampão fosfato 0,25 M/pirofosfato 0,25 M/pirofosfato 0,01 M pH 7,4.

5.2 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O principal objetivo deste estudo de supressão de acetona triplete produzida quimicamente foi correlacionar os resultados com aqueles obtidos quando o sistema enzimático IBAL/HRP/ O_2 foi usado como fonte de acetona triplete. Assim sendo, a discussão será iniciada apresentando-se na Tabela 5.8, um resumo dos resultados obtidos para ambos os sistemas, químico e enzimático, além de listar os potenciais de ionização dos aceptores, obtidos da literatura.

TABELA 5.8 - Supressão de $^3\text{Ac}^*$ por Compostos de Importância
Biológica: Comparação entre o Sistema Químico
e Enzimático de Produção de Espécies Excitadas

Aceptor	$k_q \tau^0 (\text{M}^{-1})$		PI ^(a) (eV)
	Sistema Químico	Sistema Enzimático	
Sorbato	5×10^3	6×10^3 (b)	(8) (c,d)
Indóis	$2-5 \times 10^3$	$0,8-4 \times 10^4$ (e)	8 (f,g)
Tirosina e derivados	$0,2-2 \times 10^3$	$0,1-1 \times 10^4$ (h)	(8,5) (i,j)
Quinonas	$1-4 \times 10^4$	$0,1-3 \times 10^6$ (k)	$10-11$ (i,j,l)
Riboflavina ^(m)	2×10^4	$4,5 \times 10^4$ (n)	-
Pigmentos Xan- tênicos	$0,6-2 \times 10^4$	$0,3-1 \times 10^5$ (o)	$7-7,5$ (p)

(a) Os valores de PI indicados entre parênteses referem-se a compostos análogos;

(b) Faria-Oliveira, 1978;

(c) Yang e colabs., 1977;

(d) Taylor, 1971;

(e) Rivas-Suárez e Cilento, 1981;

(f) Fischer-Hjalmans e Sundbon, 1968;

(g) Moan, 1973;

(h) Rivas-Suárez e colabs., 1983;

(i) Gayoso e colabs., 1973;

(j) Dougherty e McGlynn, 1977;

(k) Rivas-Suárez e colabs., 1981;

(l) Hojer e colabs., 1973;

(m) valores de $k_{ET} \tau^0$;

(n) Haun e colabs., 1981

(o) Durán e Cilento, 1980;

(p) Gouverneur e colabs., 1974.

5.2.1 - Supressão da Acetona Triplete Gerada Quimicamente

Praticamente todas as classes de compostos apresentados na Tabela 5.8 parecem suprimir a $^3\text{Ac}^*$ gerada na termólise do TMD por um processo de transferência parcial ou total de carga. Apesar desta generalização, nota-se algumas diferenças entre os diversos tipos de supressores usados.

O íon sorbato parece suprimir a $^3\text{Ac}^*$ por um processo parcialmente controlado por difusão ($k_q < k_{\text{dif}}$) via complexo de transferência de carga. O fato de que a E_T da acetona ser em média ca 20 kcal/mol > que a E_{T_1} de dienos (WAGNER e KOICHEVAR, 1968) e ca 20 kcal/mol abaixo de E_{S_1} concorda com a hipótese de um processo de transferência exotérmico. Considerando-se que o τ^0 de $^3\text{Ac}^*$ em água seja $\sim 2 \mu\text{s}$, o valor de k_q para sorbato seria $2,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, comparado a um $k_{\text{dif}} \sim 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para água. TURRO e TANIMOTO (1980) determinaram um valor de k_q para $^3\text{Ac}^*$ por dienos conjugados em acetonitrila na faixa de $3-5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ contra um k_{dif} esperado para acetonitrila da ordem de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Muito antes, WAGNER e KOICHEVAR (1980) haviam verificado que em solvente não-viscosos, o 2,5-dimetil-2,4-hexadieno suprime a reação de fotoeliminação de valerofenona com velocidade menor que a velocidade de difusão.

Os dados para os compostos indólicos, os quais apresentam baixo potencial de ionização, sugerem que o processo de transferência de energia também é dominado

por uma interação de transferência de carga, onde o k_q en-
contra-se na faixa de 1 a $2,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Como esperado,
a supressão de acetona triplete gerada livre em solução
por D- e L-triptofano não apresentou diferenças (Tabela
5.3). Esta discriminação quiral havia sido observada na
supressão de $^3\text{Ac}^*$ gerada pelo sistema IBAL/HRP/ O_2 , onde
a projeção de Stern-Volmer para o L-Trp apresentou satura-
ção (patamar) contra uma projeção com desvio positivo para
o D-Trp (RIVAS-SUÁREZ e CILENTO, 1981).

Recentemente, Kazama e colaboradores
(1982) observaram que dentre as espécies transientes na
supressão por indol de $^3\text{Ac}^*$ fotoexcitada encontraram-se,
além de indol triplete (excitado), produtos de fotoxida-
ção com acetona e também o radical indol. Estes autores
sugeriram que o processo de supressão (k_q observado de
 $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) consiste em transferência de energia triple-
te-triplete, promovido por transferência de elétrons, se-
guido de desativação com ou sem modificação química. De fa-
to, Rivas-Suárez e Cilento (1981) observaram uma acentua-
da modificação espectral de L-Trp quando em presença do
sistema IBAL/HRP/ O_2 , gerador de $^3\text{Ac}^*$. Estas alterações
não puderam ser observadas com o sistema químico, prova -
velmente devido a diferentes concentrações de $^3\text{Ac}^*$ a nível
estacionário. Em tempo, o processo seria moderadamente exo-
térnico, uma vez que a E_T de indol é ca 76 kcal/mol (SAN-
TUS e GROSSWEINER, 1972; BENT e HAYON, 1975).

Novamente, para o caso de tirosina e
seus diagenoderivados, o mecanismo de supressão que me-

lhor explica os resultados é o de transferência de energia triplete-triplete via complexo de transferência de carga, parcialmente controlado por difusão. O fato de não se observar diferenças significativas entre as velocidades de supressão das formas fenólica e fenóxido (pK tirosina 10,0 e pK de dihalogenotirosinas 6,4; GEMMILL, 1955) nos leva a crer que a transferência de elétrons ou transferência de prótons não é o mecanismo predominante de desativação da $^3\text{Ac}^*$. Porém, em contrapartida, o íon iodeto suprime a $^3\text{Ac}^*$ com alta eficiência, relativamente a brometo e iodeto. Associado a este fenômeno, estaria a leve tendência ao aumento nos valores de $k_q\tau^0$ observado entre as dihalogenotirosinas (DCT < DBT < DIT) indicando uma correlação entre $k_q\tau^0$ e os seus diferentes potenciais de ionização.

A razão pela qual a tirosina suprime a $^3\text{Ac}^*$ com menor velocidade que seus dihalogenoderivados provém do fato desta ter sua E_T ligeiramente superior a da $^3\text{Ac}^*$ (82 kcal/mol para tirosina e 74 kcal/mol para DIT, formas fenólicas; 52 kcal/mol para DIT, forma fenolato; CILENTO e colabs., 1965), tornando o processo endotérmico.

MIRBACH e colaboradores (1980) testaram uma série de compostos carbonílicos como supressores da fosforescência de acetona triplete gerada na termólise do TMD, em acetonitrila. Os autores observaram que as constantes de supressão para fenilalquilcetonas são consideravelmente inferiores que a controlada por difusão ($k_q = 10^8$ a $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), enquanto aquelas de supressores de alta eletroafinidade (que é o caso das quinonas) as cons-

tantes se aproximaram à constante difusional ($k_q = 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). A diferença foi explicada assumindo-se que no último caso interações π^* (acetona) $\rightarrow \pi^*$ (aceptor) (Esquema 5.8) dominam o primeiro passo da supressão. Os autores consideram que interações deste tipo estariam favorecidas por efeitos estéricos que explicariam a diferença entre os k_q já que o orbital π encontra-se delocalizado entre o carbono e o oxigênio enquanto que o orbital n encontra-se localizado somente no átomo de oxigênio, o qual representa uma parte menor da molécula. Este argumento já havia sido utilizado anteriormente por Yang e colaboradores (1977) em um estudo de supressão de estados singlete de alcanonas por compostos insaturados.

Esquema 5.8

Esta explicação parece encaixar-se perfeitamente com o caso das quinonas. Levando em consideração que o τ^0 de ${}^3\text{Ac}^*$ em água seja $2 \mu\text{s}$, os valores de k_q para a maioria das quinonas aparecem na faixa de 2 a $10 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o que significa que a velocidade do processo

é limitada pela velocidade de difusão do par doador/aceptor em solução. Os valores menores de $k_q\tau^0$ encontrados para a 2,6-dimetil-p-benzoquinona e a antraquinona-2-sulfonato estão de acordo com o suposto, visto que a diminuição do PI do supressor seria desfavorável para interações do tipo π^* (doador) $\rightarrow \pi^*$ (aceptor). Do mesmo modo, substituições por bromo e cloro na benzoquinona não afetaram o valor de $k_q\tau^0$ como era de se esperar (efeito +I, aumento do PI), uma vez que este já se encontra no limite do difusional.

Uma vez que os critérios de Förster de sobreposição espectral não são satisfeitos, a hipótese de um mecanismo de transferência de energia a longa distância é descartada. Os dados de supressão com p-benzoquinona em n-hexano e decalina confirmam que o mecanismo deve ser controlado por difusão. Ao se substituir n-hexano por decalina o valor de $k_q\tau^0$ diminuiu de três vezes. Como o esperado seria uma diminuição de sete vezes (devido a mudança de viscosidade), esta diferença pode ser explicada por um valor mais alto de τ^0 em decalina, uma vez que teremos o mesmo efeito de viscosidade sobre o k_q do O_2 (o experimento foi feito em meio aerado).

No caso da riboflavina como interceptador da $^3Ac^*$ gerada na termólise do TMD, o critério de Förster para transferência do tipo dipolo-dipolo (recobrimento do espectro de emissão do doador com espectro de absorção do aceptor) é alcançado com eficiência. A transferência de energia por um processo trivial (absorção de fóton e emissão) é descartada pelo fato de que a intensida

de de fosforescência do TMD em meio deaerado é amplificada em 1,5 vezes na presença de 30 μM de riboflavina, além do que, seu rendimento de fluorescência em água é de 0,26 (HEELIS, 1982). Supondo que a riboflavina absorvesse 100% dos fótons emitidos pela $^3\text{Ac}^*$, esta reemitiria apenas 26% destes fótons.

A alta velocidade de transferência de energia ($k_{\text{ET}} \sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e a proximidade deste valor com o observado no caso enzimático reforçam o argumento de um mecanismo de transferência de energia do tipo Förster, a longa distância. Porém, não se pode descartar a hipótese de uma transferência de energia triplete-triplete superior, seguida de cruzamento intersistema, produzindo o estado excitado S_1 . Este cruzamento intersistema estaria favorecido pelo intenso caráter n, π^* da riboflavina devido, principalmente, ao grande número de elétrons não-ligantes e à falta de simetria da molécula (HEELIS, 1982).

Os dados relativos de eficiência de transferência triplete-singlete (Φ_{TS}) para pigmentos xan-tênicos demonstram, com precisão, que o mecanismo operativo é o de transferência de energia triplete (T_1 da acetona)-triplete superior (T_n do pigmento) seguido por cruzamento intersistema para o estado fluorescente do pigmento (S_1). Os valores relativos de Φ_{TS} (1:13:320 para fluoresceína, eosina e Rose-Bengala, respectivamente) indicam que há um forte efeito de átomos pesados (QUINA, 1982), que atuam na velocidade de cruzamento intersistema $T_n \rightarrow S_1$, quebrando a regra de conservação de spin. Estes dados estão

de acordo com os dados encontrados no caso do sistema enzimático. Durán e Cilento (1980) observaram valores relativos de Φ_{TS} iguais a 1:15:100 para fluoresceína, eosina e Rose Bengala respectivamente, excitados por transferência de energia de $^3Ac^*$ gerada no sistema IBAL/HRP/O₂. Este argumento foi usado, inicialmente, para explicar a diferença nos valores de Φ_{TS} entre DPA e DBA excitados por $^3Ac^*$ (SCHMIDT e colabs., 1978).

Os valores da k_{ET} são similares e condizem com um processo controlado por difusão (3 a 10×10^9 M⁻¹s⁻¹, para τ^0 de $^3Ac^* \sim 2$ μ s). Aqui também, um mecanismo de transferência do tipo Förster poderia ser invocado, do mesmo modo que para riboflavina, porém, é descartado já que não se espera efeito de átomos pesados num mecanismo do tipo dipolo-dipolo (QUINA, 1982).

5.2.2 - Comparação entre os Sistemas Químico e Enzimático

Estudos anteriores desenvolvidos por Cilento e colaboradores (CILENTO e colabs., 1978; BECHARA e colabs., 1979; CILENTO 1980A; CILENTO, 1980B; CILENTO, 1982) de supressão de $^3Ac^*$ gerada enzimaticamente pelo sistema IBAL/HRP/O₂ sustentam a idéia de que a apoenzima protege a espécie excitada gerada contra supressores externos, incluindo aqueles descritos no presente trabalho. Apesar dos experimentos de supressão e transferência de energia proverem apenas valores de $k_q \tau^0$ e $k_{ET} \tau^0$, vários argumentos foram

apresentados em favor de um processo a longa distância na maioria dos casos.

Em geral, a comparação dos dados químicos e enzimáticos, resumidos na Tabela 5.8 indica que os valores de $k_q\tau^0$ e $k_{ET}\tau^0$ giram em torno de uma ordem de grandeza maior no caso enzimático, independente da natureza do interceptador da $^3\text{Ac}^*$ e, conseqüentemente, no tipo de mecanismo de desativação. Deve-se lembrar que a vida média da $^3\text{Ac}^*$ em água aerada é ca de uma ordem de grandeza maior que em água normalmente aerada (Ítem 4.1.3). Assim as constantes de supressão maiores para o caso enzimático podem apenas refletir, pelo menos parcialmente, uma vida média maior da $^3\text{Ac}^*$ numa cavidade enzimática. Em adição a esta diferença sistemática de uma ordem de grandeza nos valores das constantes para estas classes de supressores, a observação de uma mesma "tendência" nos dados de supressão químicos e enzimáticos dentro de cada classe provavelmente significa que as características essenciais dos mecanismos de supressão são as mesmas para ambos os casos.

Pelo menos três hipóteses simples poderiam, em princípio, explicar a "proteção" da $^3\text{Ac}^*$ pela enzima contra desativação por colisão com O_2 : (i) a apoenzima constitui uma barreira física contra a penetração do O_2 até o sítio de geração de $^3\text{Ac}^*$; (ii) a concentração local de O_2 próxima ao sítio de geração de $^3\text{Ac}^*$ é substancialmente menor devido ao consumo local do O_2 pelo substrato; e (iii) as propriedades físicas e microscópicas da cavidade onde a $^3\text{Ac}^*$ é formada favorece uma vida média intrinsecamente maior e/ou a solubilidade de O_2 neste sítio

é menor devido a um ambiente altamente polar da cavidade enzimática.

Hipótese (i) encontra um paralelo na demonstração de Saviotti e Gallei (1974) de que resíduos de triptofano localizados na parte interna de proteínas podem fosforescer à temperatura ambiente em soluções aeradas, atribuindo a razão deste fenômeno à proteção pela barreira proteica contra supressores típicos, incluindo O_2 (ver também ALPERT e LINDQVIST, 1975; EFTINK e GHIRON, 1977; KISHNER e colabs., 1979; DOMAMUS e colabs., 1980). Turro e colaboradores (1978) reportaram a observação de fraca fosforescência oriunda de 1,4-dibromonaftaleno em soluções micelares aeradas e, mais recentemente (1982), observou uma forte proteção contra supressão de O_2 da emissão de excímeros intramoleculares em soluções aquosas de ciclodextrinas. Além disso, a observação de diferentes cinéticas de supressão de $^3Ac^*$ gerada no sistema IBAL/HRP/ O_2 por D- e L-triptofano (RIVAS-SUÁREZ e CILENTO, 1981) é uma forte evidência da ocorrência de eventos entre a espécie excitada e o supressor em um ambiente quiral. Apesar destas evidências, a hipótese de "proteção por barreira proteica" sofre do paradoxo de que esta barreira limita a penetração de O_2 mas não a penetração de moléculas maiores adicionadas ao sistema e que suprimem a $^3Ac^*$ por processos puramente colisionais (ex. sorbato). Recentemente, Calhoun e colaboradores (1983A) demonstraram que o O_2 suprime a fosforescência de triptofanos mais expostos de duas proteínas (a álcool desidro-

genase de fígado e a fosfatase alcalina) com a mesma eficiência, apenas 1-1,5 ordens de grandeza mais lenta que a velocidade de difusão em solução livre. Assim, a supressão por O_2 parece ser limitada mais pela sua difusão interna na proteína do que por uma barreira propriamente dita. De fato, um número de moléculas consideravelmente maiores que O_2 suprimem a emissão destas proteínas (CALHOUM e colabs., 1983B), incluindo acrilamida, cetonas e cátions e ânions inorgânicos.

A hipótese de "consumo local de oxigênio" pode, provavelmente, ser descartada com base nas velocidades relativas de produção de $^3Ac^*$ pela enzima e da difusão de O_2 do seio da solução até o sítio ativo. A geração de uma molécula de $^3Ac^*$ requer os seguintes passos: (i) difusão de O_2 até complexo IBAL/HRP; (ii) abstração de hidrogênio do substrato pelo composto I de HRP; (iii) adição de O_2 ao substrato-radical produzindo um radical hidroperóxido; (iv) redução do último por HRP-II para dar o ânion hidroperóxido; (v) ciclização a um dioxetano intermediário; e (vi) clivagem para formar a acetona triplete (Esquema 1.31 ; BECHARA e colabs., 1979). Assim sendo, o tempo necessário para tantos passos excede o tempo requerido para reestabelecer a concentração "steady state" de O_2 no sítio ativo.

Finalmente, em adição à menor velocidade de difusão de oxigênio através da proteína e uma menor solubilidade de O_2 no microambiente onde a $^3Ac^*$ é formada, é razoável imaginar que a vida média da $^3Ac^*$, gerada

pela HRP, seja maior dentro da enzima. De fato, a solubilidade de O_2 tende a decrescer em solventes mais polares, sendo 3 mM em isooctano, 2 mM em benzeno, 1,6 mM em 95% de etanol e 0,24 M em água a 25°C (Handbook of Photochemistry, 1973).

Assim sendo, uma vida média de $^3Ac^*$ intrinsecamente maior na cavidade da enzima, conjuntamente com uma baixa concentração local de O_2 , poderiam explicar os valores relativamente altos de $k_q\tau^0$ e $k_{ET}\tau^0$ observados para o sistema IBAL/HRP/ O_2 . Em alguns casos, uma componente estática de supressão pode contribuir para altas constantes de supressão.

Independente do conhecimento ou não do exato mecanismo de supressão e do fenômeno de "proteção", o fato de que a transferência de energia de espécies triplete geradas enzimaticamente podem dirigir processos fotoquímicos no "escuro" é, por si só, potencialmente de grande importância para as células (CILENTO, 1982). A "proteção" de espécies excitadas contra a desativação colisional por O_2 poderia, desta forma, ser outra função biológica da apo-HRP, em adição a solubilização e proteção da hemina — o grupo prostético da HRP — contra a destruição autoxidativa (DUNFORD e STILLMAN, 1976).

5.2.3 - Mecanismo de Oxidação de CPZ pelo Sistema Químico e Sistema Enzimático

Durán e colaboradores (1978) publicaram resultados obtidos com o sistema enzimático IBAL/HRP/O₂ que concordam razoavelmente com os dados oriundos de estudos análogos com TMD. Tanto a supressão da quimiluminescência, com $k_q \tau^O$ da ordem de $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ contra $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para o sistema químico, quanto o aparecimento de CPZO como produto da reação foram também observados por aqueles autores, os quais propuseram o seguinte mecanismo de oxidação de CPZ:

Esquema 5.9

Os nossos resultados parecem descartar a possibilidade deste mecanismo ocorrer para o caso do TMD como fonte geradora de ${}^3\text{Ac}^*$, já que a ausência de O₂ não altera o rendimento de CPZO formado (Figura 5.9). Ou seja, não há necessidade de se recorrer à proposta de um complexo $\text{CPZ} \cdot \text{O}_2$ para explicar a ocorrência de um processo de transferência triplete-singlete, proi-

bido pela regra de conservação de spin.

Vários dos resultados aqui apresentados indicam que a $^3\text{Ac}^*$ gerada na termólise do TMD não é responsável pela oxidação. A presença de supressores como indol e sorbato, em concentrações capazes de suprimir 50% da $^3\text{Ac}^*$ formada, em nada afetaram o rendimento de clorpromazina-5-óxido, nem a cinética de sua formação.

De uma maneira simples, porém geral, podemos discriminar as seguintes possibilidades de interações de CPZ com o sistema:

Esquema 5.10

A reação de sulfeto de difenila com trimetildioxetano produzindo o sulfóxido e epóxido correspondente como produtos já foi descrito na literatura (CAMPBELL e colabs., 1975). Trata-se de um processo bimolecular de "inserção" do átomo de enxofre na ligação peroxídica. A determinação de CPZO e do óxido de tetrametil-etileno como produtos de reação indicam que este mecanismo poderia estar operando também neste caso, através do caminho (a) do Esquema 5.10.

É sabido que o passo limitante da termólise é a ruptura da ligação O-O do dioxetano, formando um radical intermediário (RICHARDSON e colabs., 1974A; RICHARDSON e colabs., 1975; RICHARDSON e colabs., 1978). O caminho (b) do Esquema 5.1 deveria ser, portanto, dependente da $|TMD|$ e do valor de k_1 para o caso em que $k_b \gg k_1$ o que não é observado, já que k_{obs} não varia com a temperatura (Figura 5.15). Para o caso em que $k_b \sim k_1$ ou menor, não haveria formação de CPZO pois a ruptura da ligação C-C é muito mais rápida. Assim, a dependência de k_{obs} com $|TMD|$, a não dependência com a temperatura e uma estequiometria de 1:1 ($|TMD|:|CPZ|$), indicam que o caminho (a) compete com a termólise.

Sabemos com certeza que o caminho (c) ocorre, e não é excludente dos outros caminhos. Os estudos de Stern-Volmer mostram que a CPZ suprime a espécie triplete em jogo com a velocidade similar àquela encontrada para o sistema enzimático, considerando as diferenças nas vidas médias de $^3Ac^*$ geradas nos dois sistemas. Isto indica um mesmo mecanismo operativo de supressão, provavelmente por transferência de elétrons (controlado por difusão). É bom salientar que a velocidade do processo de supressão não é afetada pela reação química, já que as medidas são feitas em um tempo em que não há consumo considerável de TMD e que esta velocidade é várias ordens de grandeza mais rápida que a reação química.

Estudos feitos por Durán e colaboradores (1978) indicavam que a oxidação de CPZ pelo sistema IBAL/HRP/O₂ poderia ocorrer através de um mecanismo

envolvendo a acetona excitada gerada. Uma nova abordagem desta problemática, cujos resultados encontram-se relacionados no item 5.1.7.7 mostraram que ocorre uma reação direta entre os intermediários de HRP (HRP I e HRP II) e CPZ. Isto nos leva a crer que, também no caso enzimático, a acetona triplete gerada não é a espécie responsável pela oxidação da clorpromazina. O argumento usado por Durán e colaboradores, de que o DBAS diminuiria o rendimento de produção de CPZO por ação supressora sobre a acetona excitada, é contrária a esta proposta. Porém, esta ação supressora pode ser simplesmente resultado da interação entre o DBAS e o radical $CPZ^{\cdot+}$.

Apesar de todos os esforços para se tentar ter uma idéia melhor do mecanismo de oxidação de CPZ pelos intermediários de HRP, não se chegou a uma conclusão definitiva. Porém, os resultados obtidos até aqui são de grande importância na análise das reais potencialidades dos sistemas enzimáticos geradores de espécies excitadas, de maneira a se poder discriminar com maior confiança quais os fenômenos promovidos por transferência de energia de excitação eletrônica e quais deles são processos "triviais", isto é, processos que podem ser explicados por reatividade química entre o TMD e o aceptor adicionado.

6. CONTRIBUIÇÃO À QUÍMICA DE DIOXETANOS: EFEITO DE ESTRUTURA NA ESTABILIDADE TÉRMICA

6.1 RESULTADOS

6.1.1 - Estudo de uma série de 3-metil-3-alkil-1,2-dioxetanos. Síntese de determinação de parâmetros termodinâmicos

Tendo em vista a possibilidade de interação entre hidrogênio- γ e o oxigênio do anel tetraatômico, diminuindo a estabilidade do dioxetano (DARLING e FOOTE, 1974; LECHTKEN e colabs., 1977), sintetizou-se e investigou-se as propriedades cinéticas e termodinâmicas dos seguintes dioxetanos:

Esquema 6.1

3-metil-3-n-propil-1,2-dioxetano
(MPD)

3-metil-3-n-butil-1,2-dioxetano
(MBD)

3-metil-3-neo-pentil-1,2-dioxetano
(MNPD)

Os dioxetanos MPD, MBD e MNPD foram sintetizados pelo método geral de Kopecky (KOPECKY e colabs., 1975; ver MÉTODOS, Ítem 3.4.2) e após purificação, (Ítem 3.5.2.1) seus rendimentos foram calculados entre 6 e 10%. A tabela 6.1 mostra os resultados obtidos em estudos cinéticos e termodinâmicos, utilizando-se mistura de xilenos como solvente. As energias de ativação (E_a) e as variações de entropia a 60°C ($\Delta S^\ddagger$) foram calculadas a partir das regressões lineares de projeções de Arrhenius ($\log k_1$ versus $1/\text{temperatura}$), assim como os fatores pré-exponenciais ($\log A$) correspondentes. Os rendimentos quânticos de produção de espécies triplete ($^3\Phi$) e singlete ($^1\Phi$) foram calculados por regressão linear de projeções do tipo "duplo recíproco" ($1/\text{intensidade de luz}$ versus $1/|\text{aceptor}|$) usando-se 9,10-difenilantraceno e 9,10-dibromoantraceno, respectivamente, como aceptores fluorescentes.

As figuras 6.1, 6.2 e 6.3 mostram as projeções de Arrhenius para o MPD, MBD e MNPD, respectivamente. As projeções contêm dados de constantes de velocidade de termólise calculadas a partir da observação de intensidade de luz sensitisada por DBA e DPA.

Os espectros de ressonância magnética de prótons dos três dioxetanos, assim como dos produtos de termólise dos mesmos, são apresentados nas figuras 6.4, 6.5 e 6.6. A tabela 6.2 resume os dados de deslocamento químico observado para os prótons dos três dioxetanos.

TABELA 6.1 - Dados cinéticos e termodinâmicos de MPD, MBD e MNPD

Dioxetano	$E_a \pm \text{erro}^{(a)}$ (kcal/mol)	log A	$r^{(b)}$	$k_l^{60^\circ\text{C}}$ (s ⁻¹)	$\Delta S_{60^\circ\text{C}}^\ddagger$ (u.e.)	3ϕ	1ϕ	$3\phi/l\phi$
MPD	24,6±0,4	13,1	0,9995	$1,0 \times 10^{-3}$	0,11	$1,9 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-6}$	$6,3 \times 10^3$
MBD	24,4±0,3	13,0	0,9991	$9,6 \times 10^{-4}$	-1,54	$2,1 \times 10^{-2}$	$4,7 \times 10^{-6}$	$4,5 \times 10^3$
MNPD	24,5±0,5	13,0	0,9996	$9,8 \times 10^{-4}$	-1,09	$2,6 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^3$

(a) erro calculado pelo computador para a faixa limite de 95% de confiabilidade.

(b) fator de correlação da regressão linear.

Figura 6.1. - Projeção de Arrhenius para a termólise de MPD em xilenos monitorada por DBA e DPA.

Figura 6.2. - Projeção de Arrhenius para a termólise de MBD em xilenos monitorada por DBA e DPA.

Figura 6.3. - Projeção de Arrhenius para a termólise de MNPD em xilenos monitorada por DBA e DPA.

Figura 6.4. - Espectros de RMN^1H de MPD em CCl_4 antes(A) e depois(B) de termólise.

Figura 6.5. - Espectros de RMN^1H de MBD em CCl_4 antes(A) e depois(B) da termólise.

Figura 6.6. - Espectros de RMN^1H de MNPd em CCl_4 antes(A) e depois(B) da termólise.

TABELA 6.2 - Deslocamentos químicos dos prótons de
MPD, MBD e MNPD

Dioxetano	Nº de Prótons	δ (ppm)	Tipo de Sinal
MPD	2	4,83	a,b
	3	1,58	singlete
MBD	2	4,82	a,b
	3	1,53	singlete
MNPD	2	4,83	a,b
	3	1,75	singlete
	2	1,92	singlete
	9	1,02	singlete

Obs. Dados referentes a sinais reconhecidos nos espectros mostrados nas figuras 6.4, 6.5 e 6.6 Os demais prótons não foram reconhecidos com exatidão.

6.1.2 - Estudos das propriedades cinéticas e termodinâmicas de dioxetanos bicíclicos

Procurou-se sintetizar os dioxetanos de biciclo [2,2,1]-2-hepteno e de biciclo [2,2,2]-2-octeno.

Esquema 6.2

biciclo $[2,2,2]$ -2-octeno (BCO)

Devido ao baixo rendimento na síntese desses dioxetanos, não foi possível isolar e caracterizar estes compostos de uma maneira bem definida, o que prejudicou sobremaneira os estudos desenvolvidos. Apesar disso, a formação de espécies excitadas foi observada quando usou-se DBA e DPA como aceptores fluorescentes e, com isto, a cinética de termólise pôde ser monitorada. O baixo rendimento da síntese destes compostos provém do facto de que após a bromação da olefina, seis diferentes β -bromohidroperóxidos podem ser formados (MARSHALL e cols., 1971; veja Esquema 6.3), sendo que apenas um deles poderia sofrer ciclização e finalmente formar o dioxetano (normalmente, o rendimento desta última etapa é de 10-30% para dioxetanos alquílicos).

Os resultados obtidos na investigação de propriedades cinéticas e termodinâmicas dos dioxetanos derivados de BCH e BCO encontram-se resumidamente na tabela 6.3 e as projeções de Arrhenius nas figuras 6.7 e 6.8.

Esquema 6.3

TABELA 6.3 - Dados cinéticos e termodinâmicos obtidos para os dioxetanos bicíclicos

Dioxetano	(a) $E_a^{\pm}$ erro	log A	$r^{(b)}$	$k_1^{60^\circ\text{C}}$	$\Delta S_{60}^\ddagger$
	(kcal/mol)			(s ⁻¹)	(u.e.)
	24,7±0,6	12,92	0,9990	5,1x10 ⁻⁴	-1,63
	24,9±0,2	12,98	0,9998	4,6x10 ⁻⁴	-1,35

(a) erro calculado pelo computador para a faixa limite de 95% de confiabilidade;

(b) fator de correlação de regressão linear.

Figura 6.7. - Projeção de Arrhenius para a termólise do dióxetano derivado de biciclo [2,2,1]-2 hepteno em xilenos monitorada por DBA e DPA.

Figura 6.8. - Projeção de Arrhenius para a termólise do dioxetano derivado de biciclo [2,2,2]-2-octeno em xilenos monitorada por DBA e DPA.

6.2 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

BECHARA e colaboradores (1976) observaram uma energia de ativação para o 3,4-dimetil-3,4-di-n-butildioxetano da ordem de 25,2 kcal/mol, enquanto que LECHTKEN e colaboradores (1977) obtiveram o valor de E_a para o trimetil-n-butildioxetano igual a 25,3 kcal/mol. Estes valores, relativamente baixos, sugeriam um possível efeito de interação entre o oxigênio do anel dioxetânico e hidrogênio em posição gama, uma vez que seriam esperados valores mais altos de E_a para dioxetanos tetrasubstituídos (da ordem de 27,6 kcal/mol para o tetrametildioxetano (WILSON e colabs., 1976) e 30,0 kcal/mol para o tetraetildioxetano (BECHARA e colabs., 1976)). Entretanto, os resultados aqui apresentados mostram que, aparentemente, a energia de ativação de um dioxetano não é afetada pela presença de H primário ou secundário, nem pelo número de hidrogênios em posição gama. Pode-se observar, na tabela 6.1, que os valores de E_a para MPD (3H primários), MNPD (9H primários) e MBD (2H secundários) não apresentam diferenças significativas, assim como os valores de log A. Os parâmetros cinéticos e fotoquímicos também são bastante semelhantes.

Em um estudo complementar a este trabalho, desenvolvidos em colaboração com DUNAMS e BAUMSTARK (comunicação pessoal), observou-se que a estabilidade de dioxetanos alquílicos aumenta com o aumento do número de substituintes no carbono. A tabela 6.4 mostra os parâme-

tros termodinâmicos encontrados por estes autores, para o 3,3-dimetil-1,2-dioxetano, 3-metil-3-etil-1,2-dioxetano, 3-metil-3-isopropil-1,2-dioxetano e 3-metil-3-terc-butil-1,2-dioxetano. Pode-se notar que a E_a encontrada para o 3-metil-3-etil-1,2-dioxetano é semelhante àquelas encontradas para os dioxetanos da tabela 6.1, o que sugere que o número de substituintes em posição β não afeta a estabilidade do dioxetano. Estes autores analisaram diferença de estabilidade destes dioxetanos em termos de interações estéricas entre substituintes geminais 3,3, os quais estabilizaram o diradical intermediário e, consequentemente, o dioxetano. O fato de não haver diferença de estabilidade entre dioxetanos com diferentes graus de β -substituição acrescenta a este argumento a importância da substituição na posição α .

TABELA 6.4 - Efeito de substituições no carbono de uma série de 3-metil-3-alkil-1,2-dioxetano

Dioxetano	E_a (kcal/mol)	log A	$\Delta S_{60}^\ddagger$ °C (u.e.)
23,7	12,7	-2,54
24,5	13,1	-0,75
25,0	13,2	-0,30
25,8	13,3	0,93

Obs. Dados obtidos por DUNAMS e BAUMSTARK (comunicação pessoal).

Alguns fatos, previamente observados, poderiam ainda ser somados a este argumento: (i) a E_a do 3,3-dietil-1,2-dioxetano foi achada como sendo 1,5 kcal/mol maior que a do 3,3-dimetil-1,2-dioxetano (não foi observada variação no $\Delta S^\ddagger$) (BAUMSTARK e DUNAMS, 1982); (ii) os resultados do estudo da termólise de uma série de cis/trans-3,4-dialquil-1,2-dioxetano mostraram que interações estéricas 3,4 são de menor importância (BAUMSTARK e colabs., 1983). De fato, o argumento de interações estéricas do tipo 3,3 permite a predição de estabilidade de dioxetano substituídos por grupos alquila. Uma estimativa empírica da magnitude deste efeito pode ser obtida através dos dados apresentados na tabela 6.4. Nota-se um aumento de aproximadamente 0,8 kcal/mol na estabilidade do dioxetano por substituição formal no carbono α . Isto explicaria a alta estabilidade do tetraetildioxetano (30,0 kcal/mol; BECHARA e colabs., 1976) comparada ao tetrametildioxetano (27,6 kcal/mol; WILSON e colabs., 1976), assim como a do 3,4-dietildioxetano (24,5 kcal/mol; BAUMSTARK e WILSON, 1979) comparada ao 3,4-dimetildioxetano (21,6 kcal/mol; ADAM e BAADER, comunicação pessoal). Contudo este argumento não é tão imediato quando se examinam dioxetanos substituídos por fenil ou benzil (RICHARSON e colabs., 1974A).

Outros argumentos poderiam também explicar satisfatoriamente estes resultados. Recentemente, ADAM e colaboradores (1982) referiram-se a um "efeito inercial de massa" para explicar a semelhança de estabili

dade entre o bisadamantilideno-1,2-dioxetano e dioxetanos substituídos por monoadamantano. Outra suposição seria de que, a fim de se alcançar a posição do vale da curva de potencial de energia (diradical), deveria ocorrer uma torsão na ligação C-C do anel que poderia ser parcialmente impedida por interação de grupos α -metil, α -metileno ou α -metino com o oxigênio da posição 1, dificultando a formação do anti-rotâmero com um decréscimo do valor de E_{-1} , resultando num dioxetano mais estável (Esquema 6.4). Esta interação com o oxigênio poderia ser melhor sentida por substituições no carbono α mas não em carbonos β , resultando estabilidades diferentes quando se comparam os dioxetanos da tabela 6.4, porém bastante parecidas entre o MPD, MBD e MNPD.

Esquema 6.4

Com base em considerações qualitativas de simetria de orbitais de TURRO e DEVAQUET (1975), poder-se-ia propor que diferentes padrões de modos vibrationais de grupos vizinhos à carbonila excitada em formação, esperada para os dois conjuntos de dioxetanos (α -substituídos e β -substituídos), deveriam afetar os pontos (ou o número de pontos) de cruzamento entre a superfície o estado fundamental e do estado excitado e, assim, refletir as diferentes estabilidades destes dioxetanos.

As energias de ativação encontradas para os sistemas bicíclicos revelam que não existe diferença de estabilidade térmica entre os dois dioxetanos. Os seus valores são bem mais baixos que aqueles encontrados para dioxetanos ditos "rígidos" (E_a do bisadamantilidenodioxetano = 35,2 kcal/mol; LECHTKEN e colabs., 1977), porém, maiores que o encontrado para sistemas monocíclicos como o ciclohexanodioxetano (E_a = 22,5 kcal/mol; BAUMSTARK e WILSON, 1979).

Isto pode significar que: (i) a rigidez não seria o fator mais importante que determinaria a alta estabilidade do bisadamantilidenodioxetano; (ii) a possibilidade de mudança conformacional, existente somente no ciclohexenodioxetano, possibilitaria a equilibração das conformações barco-cadeira após a quebra da ligação O-O, prevista pelo mecanismo via radicais como o primeiro passo da termólise (Esquema 6.5).

Esquema 6.5

7. SUMÁRIO

Do interesse em espécies eletronicamente excitadas geradas por sistemas luminescentes químicos e biológicos, nasceu o interesse dos químicos pelos dioxetanos, seu comportamento e suas propriedades. Propostos como intermediários de tais reações, estes compostos (peróxidos cíclicos de anel tetraatômico) sofrem clivagem térmica unimolecular com produção de dois fragmentos carbonílicos, um deles no estado eletronicamente excitado. Em geral, dioxetanos substituídos por grupos alquílicos e arílicos levam a altos rendimentos de estados triplete. Propôs-se, então, reinvestigar a termólise do tetrametildioxetano (TMD) em meio aquoso e utilizar esta fonte de acetona triplete como modelo químico, para o sistema enzimático de produção de acetona triplete (oxidação aeróbica do isobutanal (IBAL)/peroxidase (HRP)), em estudos de supressão e transferência de energia.

O TMD tem sido preparado e cristalizado rotineiramente em nosso laboratório, pelo método de Kopecky. Os parâmetros de ativação de termólise (estabilidade térmica e rendimentos de quimiexcitação dos produtos) foram reestudados em solventes aromáticos (benzeno e tolueno), cicloalifáticos (ciclohexano e decalina), próticos (água) e apróticos (acetonitrila e CCl_4). Concluiu-se que: (i) a estabilidade do TMD não é afetada pela natureza do solvente ($E_a \sim 27,0 \text{ kcal mol}^{-1}$); (ii) a eficiência global de transferência de energia triplete (acetona) →

singlete (9,10-dibromoantraceno) nos solventes não aromáticos é praticamente constante ($\Phi_{TS} \sim 10\%$); (iii) em solventes aromáticos onde o doador excitado é na verdade um "exciplex" acetona-solvente, $\Phi_{TS} \sim 30\%$.

A relação entre os rendimentos de quimiexcitação de triplete e singlete ($^3\Phi/^1\Phi$) em água foi determinada como sendo da ordem de 1×10^3 , que concorda com valores determinados em tolueno e benzeno (7×10^2 e 8×10^2 , respectivamente).

Nos estudos em meio aquoso, o DBAS e o DPAS foram utilizados para monitorar a presença de acetona triplete e singlete, formada química, fotofísica ou enzimaticamente. Ambos foram sintetizados em nosso laboratório e suas propriedades fotofísicas, determinadas em água deionizada a 20°C .

Através da medida de fluorescência do DBAS excitado por transferência de energia a partir de acetona triplete, determinou-se a vida média de acetona triplete em meio aquoso aerado e deaerado ($\tau_{\text{aer}} \sim 2 \mu\text{s}$ e $\tau_{\text{N}_2} \sim 10$ a $20 \mu\text{s}$).

Seis classes de interceptadores de acetona triplete, gerada na termólise de TMD, foram investigadas em tampão aquoso a 35°C : dienos (ácido sórbico e acrilonitrila), pigmentos xantênicos, riboflavina, tirosina e derivados 3,5-dihalogenados, indol e derivados indólicos, e uma série de quinonas. Em geral, os valores das constantes de supressão de acetona triplete produzida diretamente no seio da solução, a partir de TMD, estão pelo menos uma or-

dem de grandeza abaixo dos valores correspondentes para acetona triplete produzida enzimaticamente. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que acetona triplete gerada dentro da enzima tem vida média mais longa, pois se encontraria parcialmente "protegida" da ação supressora de O_2 . Outros argumentos podem, entretanto, ser igualmente satisfatórios.

Parece claro que os supressores indólicos (IP ~8 eV) e ácido sórbico exercem sua ação através da formação de complexos de transferência de carga, tirosina e corantes xantênicos (IP ~7 eV) por um mecanismo de transferência de elétrons e riboflavina por mecanismo tipo "Förster". As quinonas, cuja afinidade eletrônica é bastante alta (IP ~ 10-11 eV), suprimem acetona triplete por um mecanismo controlado por difusão; com estes compostos, o limite superior do esperado para um processo puramente colisional seria atingido ($k_q \sim 1$ a $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em água a 35°C). De fato, derivados metilados de p-benzoquinona e naftoquinona suprimem acetona triplete com velocidade mais baixa, enquanto que em solvente mais viscoso (decalina, em relação a n-hexano), k_q também é mais lenta. Por outro lado, observou-se um marcante "efeito de átomo pesado" na eficiência de transferência de energia triplete (acetona) $\rightarrow$ singlete (corante xantênico): Φ_{TS} para fluoresceína, eosina e Rose Bengala na proporção 1:15:320.

A oxidação da clorpromazina (CPZ) por reação com o TMD foi estudada em meio aquoso e meio tamponado e verificou-se que esta independe da formação de es

pêcies excitadas, apesar da CPZ apresentar-se como eficiente supressor de acetona triplete. Espectros de RMN¹H mostraram que a reação entre CPZ e TMD gera a clorpromazina-5-óxido (sulfóxido; CPZO) e o óxido de tetrametileteno (o epóxido correspondente ao TMD). Estudos de espectroscopia U.V. e de cromatografia gasosa indicam que a estequiometria da reação TMD/CPZ é 1:1 e que a presença de competidores de supressão de acetona triplete não altera a velocidade da reação nem a estequiometria da mesma.

Em vista destes resultados, reestudou-se a oxidação de CPZ pelo sistema do IBAL/HRP/O₂, estudo feito inicialmente por DURÁN e colaboradores, no qual os autores propõem que a oxidação de CPZ é resultante de transferência de energia de excitação da acetona triplete gerada enzimaticamente. Usando métodos inexplorados até então, verificamos a possibilidade de esta oxidação ocorrer por reação direta entre CPZ e os radicais de HRP formados durante a oxidação do isobutanol, sem a intervenção da acetona triplete.

Outro estudo paralelo a este, foi feito visando determinar parâmetros cinéticos e termodinâmicos em dioxetanos com diferentes tipos de hidrogênios em posição γ do anel. Este estudo visava determinar de que maneira a interação oxigênio do anel-hidrogênio gama influia em tais parâmetros.

Sintetizou-se uma série de 3-metil-3-alkildioxetanos (alkil = n-propil, n-butil e neopentil) e determinamos os seus parâmetros de ativação de termólise.

se (E_a , $\Delta S^\ddagger$, $^3\phi$ e $^1\phi$). Constatamos que não há diferença significativa entre estes dioxetanos, sendo assim, a interação hidrogênio gama-oxigênio do anel é inexpressiva. Porém, quando comparados com outros dioxetanos da mesma série, onde alquil = etil, isopropil e terc-butil (estudo em conjunto com outros pesquisadores) nota-se uma expressiva mudança na E_a a medida que aumenta o número de grupos metila na posição α , indicando um efeito estérico do tipo 3,3.

S U M M A R Y

The interest in electronically excited species generated by chemical and biological systems give rise to an interest in dioxetanes, their behavior and their properties. These compounds (cyclic four-membered ring), which have been proposed as intermediates in such reactions, undergo unimolecular thermal cleavage yielding two carbonyl fragments, one of which is typically formed electronically excited. In general, alkyl and aryl substituted dioxetanes give high yields of triplet states.

In the present work, the thermolyses of tetramethyldioxetane (TMD) was reinvestigated in aqueous medium. This source of triplet acetone was then employed in quenching and energy transfer studies as a chemical model for the enzymatic systems which produces triplet acetone [aerobic oxidations of isobutanal (IBAL) catalysed by horseradish peroxidase (HRP)].

TMD was prepared and crystallised normally in our laboratory using Kopecky's method. Thermal activation parameters (thermal stability and chemiexcitation quantum yields) have been determined in several types of solvents, including aromatics (benzene and toluene), cycloaliphatics (cyclohexene and decalin), protic (water) and aprotic (acetonitrile and carbon tetrachloride). We conclude that: (i) TMD stability is not affected by the nature of the solvent ($E_a \sim 27,0$ kcal/mol); (ii) the overall energy

transfer efficiency ${}^3\text{Ac}^* \rightarrow {}^1\text{DBAS}^*$ is practically constant ($\phi_{\text{TS}} \sim 10\%$) in non-aromatic solvents; (iii) in aromatic solvents, where the excited donor is an acetone-solvent "exciplex", $\phi_{\text{TS}} \sim 30\%$.

The ratio of triplet and singlet chemiexcitation yields (${}^3\phi/{}^1\phi$) in water was determined to be 1×10^3 . This value is in good agreement with these determined in toluene and benzene (7×10^2 and 8×10^2 , respectively).

In studies in aqueous medium, DBAS and DPAS were used as probes to monitor the production of triplet and singlet acetone formed chemically, photophysically or enzymatically. Both probes were prepared in our laboratory and their photophysical properties determined in deionized water at 20°C .

The lifetime of triplet acetone in aerated and deaerated aqueous media was determined on the basis of the chemiluminescence intensity of DBAS excited by energy transfer ($\tau_{\text{aer}} \sim 2 \mu\text{s}$ and $\tau_{\text{N}_2} \sim 10$ to $20 \mu\text{s}$).

Six classes of quenchers were investigated in aqueous buffer at 35°C : dienes (sorbic acid and acrylonitrile), xanthene dyes, tyrosine and its 3,5-dihalogenoderivatives, indole and indolic derivatives, riboflavin and a serie of quinones. In general, rate constants for quenching of triplet acetone produced free in solution via TMD thermolyses are one order of magnitude lower than those for quenching of enzymatically

generated triplet acetone. These results are in line with the hypothesis of a longer lifetime of the triplet acetone generated within the enzyme due a parcial "protection" for O_2 quenching.

It seems clear that the indolic compounds (IP ~ 8 eV) and sorbic acid quench triplet acetone through the formation of a charge-transfer complex, tyrosine and xanthene dyes (IP ~ 7 eV) by an electron-transfer mechanism and riboflavin by a Förster type mechanism. The quinones, which have high electronic affinities (IP ~ 10-11 eV), quench triplet acetone by a diffusion controlled process ($k_q \sim 1$ to $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in water at 35°C). Methyl derivatives of p-benzoquinone and naphthoquinone quench triplet acetone at a slower rate; k_q is also lower in a more viscous solvent (decalin versus n-hexane). On the other hand, the results indicate a strong "heavy atom effect" on the energy transfer efficiency from triplet acetone to singlet xanthene dye: ϕ_{TS} for fluorescein, eosin and Rose Bengal in the ratio 1:15:320.

The chlorpromazine (CPZ) oxidation by reaction with TMD was studied in aqueous and buffered media. This reaction does not depend on the production of excited species, even though CPZ proved to be an efficient triplet acetone quencher. The NMR¹H spectra showed that chlorpromazine-5-oxide and tetramethylene oxide are the products of the reaction between CPZ and TMD. UV spectroscopic and gas chromatographic studies indicated a 1:1 stoichiometry for the TMD/CPZ reaction and no competition

between this reaction and triplet acetone quenching by indole or sorbate.

In view of these results, we reinvestigated the oxidation of CPZ by the IBAL/HRP/O₂ system, a reaction which has been suggested to occur via energy transfer from triplet acetone to CPZ in an earlier study. Using methods developed since the earlier study, we verified that this reaction in fact occurs via direct reaction between CPZ and HRP radicals produced during IBAL oxidation, without the intervention of triplet acetone.

In another parallel study, we determined kinetic and thermodynamic parameters of a series of dioxetanes with different types of γ hydrogens in order to examine how the interaction between oxygen and the γ hydrogens might influence these parameters. Thus, a series of 3-methyl-3-alkyldioxetanes (alkyl = n-propyl, n-butyl and neopentyl) was synthesized and their thermal activation parameters (E_a , $\Delta S^\ddagger$, $^3\phi$ and $^1\phi$) determined. The results indicated that there are no significant differences among these dioxetanes; consequently the oxygen- γ hydrogen interaction is relatively unimportant. However, when compared with other dioxetanes of similar structure (alkyl = ethyl, isopropyl and tert-butyl; joint study done with other researchers), there is a significant change in E_a upon increasing the number of methyl groups at the α position, pointing to a steric effect of the 3,3 type.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, W. (1977), em Advances in Heterocyclic Chemistry, vol. 21, Academic Press, New York, NY, pg. 437.

ADAM, W. (1982), em Chemical and Biological Generation of Excited States, W. ADAM e G. CILENTO, eds., Academic Press, New York, NY, pg. 115.

ADAM, W. e O. CUETO (1979), J. Am. Chem. Soc., 101, 6511.

ADAM, W. e J.C. LIU (1972), J. Am. Chem. Soc., 94, 2894.

ADAM, W. e F.P. MAZENOD (1980), resultados não publicados (citados em ADAM, 1982).

ADAM, W. e H.-C. STEINMETZER (1972), Angew.Chem.Int.Ed. Engl., 11, 540.

ADAM, W. e K. ZINNER (1982), em Chemical and Biological Generation of Excited States, W. ADAM e G. CILENTO, eds., Academic Press, New York, NY, pg. 153.

ADAM, W., N. DURÁN e G.A. SIMPSON (1975), J.Am.Chem.Soc., 97, 5464.

ADAM, W., C.-C. CHENG, O. CUETO, K. SAKANISHI e K. ZINNER (1979), J.Am.Chem.Soc., 101, 1324.

ADAM, W., G. CILENTO e K. ZINNER (1980), Photochem.Photo-biol., 32, 87.

ADAM, W., L.A. ARIAS e K. ZINNER (1982), Resumos do XV Congresso Latinoamericano de Química, Porto Rico, pg. 270.

AKUTAGAWA, M., H. AOYAMA, Y. OMOTE e H. YAMAMOTO (1976), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 180.

- ALPERT, B. e L. LINDQVIST (1975), Science, 187, 836.
- ANDERSON, W. (1947), Nature (LONDON), 160, 892.
- AUGUSTO, O. e G. CILENTO (1979), Photochem.Photobiol., 30, 191.
- AUGUSTO, O., G. CILENTO, J. JUNG e P.-S. SONG (1978), Biochem.Biophys.Res.Comm., 83, 963.
- BARTLETT, P.D. e M.E. LANDIS (1979), em Singlet Oxygen, H.H. WASSERMAN e R.W. MURRAY, eds., Academic Press, New York, NY, pg. 243.
- BARTLETT, P.D. e A.P. SCHAAP (1970), J.Am.Chem.Soc., 92, 3226.
- BARTLETT, P.D., A.L. BAUMSTARK e M.E. LANDIS (1973), J.Am. Chem. Soc., 95, 6486.
- BARTLETT, P.D., A.L. BAUMSTARK e M.E. LANDIS (1974A), J. Am. Chem. Soc., 96, 5557.
- BARTLETT, P.D., A.L. BAUMSTARK, M.E. LANDIS e C.L. LERMAN (1974B), J. Am. Chem. Soc., 96, 5267.
- BATTEGAY, M. e P. BRANDT (1923), Bull. Soc. Chim. Fr., 33, 1667.
- BAUMSTARK, A.L. (1974), PhD Thesis, Harvard University, Cambridge, Mass., U.S.A.
- BAUMSTARK, A.L. e C.E. WILSON (1979), Tetrahedron Lett., 2569.
- BAUMSTARK, A.L. e T. DUNAMS (1982), J. Org. Chem., 47, 3754.
- BAUMSTARK, A.L., T. WILSON, M.E. LANDIS e P.D. BARTLETT (1976), Tetrahedron Lett., 2397.

- BAUMSTARK, A.L., M.E. LANDIS e P.J. BROOKS (1979), J. Org. Chem., 44, 4251.
- BAUMSTARK, A.L., T. DUNAMS, P.C. ROSKAMP e C.E. WILSON (1983), J. Org. Chem., 48, 261.
- BECHARA, E.J.H. (1979), Tese de Livre Docência, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BECHARA, E.J.H. e M.H.G. MEDEIROS (1984), em Oxygen Radicals in Chemistry and Biology, W. BORS, M. SARAN e D. TAIT, eds., Walter de Gruyter & Co., Berlin, pg. 539.
- BECHARA, E.J.H. e T. WILSON (1980), J. Org. Chem., 45, 5261.
- BECHARA, E.J.H., A.L. BAUMSTARK e T. WILSON (1976). J. Am. Chem. Soc., 98, 4648.
- BECHARA, E.J.H., O.M.M. FARIA OLIVEIRA, N. DURÁN, R.C. DE BAPTISTA e G. CILENTO (1979), Photochem. Photobiol., 30, 101.
- BELIAKOV, V.A. e R.F. VASSIL'EV (1970), Photochem. Photobiol., 11, 179.
- BENNET, R.G., R.P. SCHWEMBER e R. KELLOG (1964), J. Chem. Phys., 41, 3040.
- BENT, D.V. e E. HAYON (1975), J. Am. Chem. Soc., 97, 2612.
- BERGMANN, E., F. HIRSCHMANN e E.L. SHAW (1939), J. Org. Chem., 4, 29.
- BENSON, S.W., F.R. CRUICKSHANK, D.M. TOLDEN, C.R. HANGEN, H.E. O'NEAL, A.S. RODGERS, R. SHAW e R. WALSH (1969), Chem. Rev., 69, 279.
- BILLS, C.E. (1927), J. Biol. Chem., 72, 751.

- BIRKS, J.B. (1970), em Photophysics of Aromatic Molecules, Wiley-Interscience, New York, NY.
- BITLER, B. e W.D. McELROY (1957), Arch. Biochem. Biophys., 72, 358.
- BLITZ, H. (1897), Justus Liebig's Ann. Chem., 296, 238.
- BOUCHILLOUX, S. (1955), Bull. Soc. Chim. Biol., 37, 255.
- BRUNETTI, I.L., E.J.H. BECHARA, G. CILENTO e E.H. WHITE (1982), Photochem. Photobiol., 36, 245.
- BRUNETTI, I.L., G. CILENTO e L. NASSI (1983), Photochem. Photobiol., 38, 511.
- BUCHI, G. e H. WÜEST (1978), J. Am. Chem. Soc., 100, 294.
- BUSCH, M. e W. DIETZ (1914), Chem. Ber., 47, 3277.
- CALHOUN, D.B., J.M. VANDERKOOI, G.V. WOODROW III e S.W. ENGLANDER (1983A), Biochemistry, 22, 1533.
- CALHOUN, D.B., J.M. VANDERKOOI e S.W. ENGLANDER (1983B), Biochemistry, 22, 1533.
- CAMPA, A., L. NASSI e G. CILENTO (1984), Photochem. Photobiol., no prelo.
- CAMPBELL, R.O. e R.S.H. LIU (1973), J. Am. Chem. Soc., 95, 6560.
- CAMPBELL, B.S., D.B. DENNEY, D.Z. DENNEY e L.S. SHIH (1975), J. Am. Chem. Soc., 97, 3850
- CAMPBELL, B.S., N.J. De'ATH, D.B. DENNEY, D.Z. DENNEY, I.S. KIPWIS e T.B. LIN (1976), J. Am. Chem. Soc., 98, 2924.
- CILENTO, G. (1965), Photochem. Photobiol., 4, 1243.
- CILENTO, G. (1973), Q. Rev. Biophys., 6, 485.

- CILENTO, G. (1975), J. Theor. Biol., 55, 471.
- CILENTO, G. (1980A), Photochem. Photobiol. Rev., 5, 199.
- CILENTO, G. (1980B), Acc. Chem. Res., 13, 225.
- CILENTO, G. (1982), em Chemical and Biological Generation of Excited States, W. ADAM e G. CILENTO, eds., Academic Press, New York, NY, pg. 277.
- CILENTO, G. e M. BERENHOLC (1964), Biochim. Biophys. Acta, 79, 625.
- CILENTO, G., L. AZARRAGA e F.J. SMITH (1965), Biochim. Biophys. Acta, 102, 621.
- CILENTO, G., N. DURÁN, K. ZINNER, C.C.C. VIDIGAL, O.M.M. FARIA OLIVEIRA, M. HAUN, A. FALJONI, O. AUGUSTO, R.C. DE BAPTISTA e E.J.H. BECHARA (1978), Photochem. Photobiol., 28, 445.
- CHASE, A.M. (1960), Methods Biochem. Anal., 8, 61.
- CHENG, C.-C. (1979), M.Sc.Thesis, Universidade de Porto Rico, Rio das Pedras, Porto Rico, U.S.A.
- CLARK, W.D.K. e C. STEEL (1971), J. Am. Chem. Soc., 93, 6347.
- COOK, J.S. (1967), Photochem. Photobiol., 6, 97.
- COTTON, M.L. e H.B. DUNFORD (1973), Can. J. Chem., 51, 582.
- CRIEGEE, R. (1936), Justus Liebig's Ann. Chem., 522, 75.
- CRIEGEE, R. e G. LOHAUS (1951), Chem. Ber., 84, 219.
- CRISMON, C. (1967), Psychopharm. Bull., 4, 1.
- DARLING, T.R. e C.S. FOOTE (1974), J. Am. Chem. Soc., 96, 1625.

- DAVIES, A.K., S. NAVARATNAM e G.O. PHILLIPS (1976). J.Chem. Soc. Perkin Trans. II, 25.
- DEMAS, J.N. e G.A. CROSBY (1971), J. Phys. Chem., 75, 991.
- DEXTER, D.L. (1953), J. Chem. Phys., 21, 836.
- DOMANUS, G., G.B. STRAMBINI e W.C. GALLEY (1980), Photochem. Photobiol., 31, 15.
- DOUGHERTY, D. e S.P. McGLYNN (1977), J. Chem. Phys., 67, 1289.
- DUBOIS, R. (1887), C.r.Séanc.Soc.Biol.Fr., 39, 564.
- DUNFORD, H.B. e J.S. STILLMAN (1976), Coord.Chem.Rev., 19, 187.
- DURÁN, N. e G. CILENTO (1980), Photochem. Photobiol., 32, 113.
- DURÁN, N., O.M.M. FARIA OLIVEIRA, M. HAUN e G. CILENTO (1977A), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 442.
- DURÁN, N., K. ZINNER, C.C.C. VIDIGAL e G. CILENTO (1977B), Biochem. Biophys. Res. Commun., 74, 1146.
- DURÁN, N., M. HAUN, A. FALJONI e G. CILENTO (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 785.
- EFTINK, M.R. e C.A. GHIRON (1977), Biochemistry, 16, 5546.
- EL-SAYED, M.A. e M.L. BHAUMIK (1963), J.Chem.Phys., 39, 2391.
- ENGEL, P.S. e B.M. MONROE (1971), Adv. Photochem., 8, 245.
- FALJONI, A., M. HAUN, M.E. HOFFMANN, R. MENEGHINI, N. DURÁN e G. CILENTO (1978), Biochem.Biophys.Res.Commun. 80, 490.
- FARIA OLIVEIRA, O.M.M. (1978), Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

- FARIA OLIVEIRA, O.M.M., M. HAUN, N. DURÁN, P.J. O'BRIEN, C.R. O'BRIEN, E.J.H. BECHARA e G. CILENTO (1978), J. Biol. Chem., 253, 4707.
- FIESER, L.S. (1940), J. Biol. Chem., 133, 391.
- FISCHER-HJALMANS, I. e M. SUNDBON (1968) Acta Chem. Scand., 22, 607.
- FOOTE, C.S., S. WEXLER, W. ANDO e R. HIGGINS (1968), J. Am. Chem. Soc., 90, 975.
- "FORSTER, T. (1959), Discuss. Faraday Soc., 27, 7.
- FRIMER, A.A. (1974), PhD Thesis, Harvard University, Cambridge, Mass., U.S.A.
- FUSON, R.C. e H.L. JACKSON (1950), J. Am. Chem. Soc., 72, 1637.
- GALLARDO, H., L.A. GUILLO, N. DURÁN e G. CILENTO (1984), Biochim. Biophys. Acta, no prelo.
- GAYOSO, J., A. BOUCEKKINE e H. BOUANANI (1973), J. Chim. Phys. Physicochim. Biol., 70, 1643-
- GEMMILL, C.L. (1955), Arch. Biochem. Biophys., 54, 359.
- GOL'DEMBERG, V.I. e V.G. SHMULOVICH (1979), Neftekhimiya, 19, 207 (citação C.A. nº 91:76550d).
- GOTO, T. e H. NAKAMURA (1976), Tetrahedron Lett., 4627.
- GOVERNEUR, L., G. LEROY e I. ZADOR (1974), Electrochim. Acta, 19, 215.
- HALPERN, A.M. (1974), J. Am. Chem. Soc., 96, 7655.
- HAMAI, S. e F. HIRAYAMA (1983), J. Phys. Chem., 87, 83.
- HAMMERICH, B., R. SCHMIDT e H.-D. BRAUER (1979), Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 83, 204.

- HANDBOOK OF PHOTOCHEMISTRY (1973), S.L. Murov, ed., Marcel Dekker, New York, NY, pg. 89.
- HARVEY, E.N. (1952), em Bioluminescence, Academic Press, New York, NY.
- HASTINGS, J.W. (1978), em Bioluminescence in Action, J.P. Herring, ed., Academic Press, London, pg. 129.
- HASTINGS, J.W. e G. WEBER (1963), J.Opt.Soc.Am., 53, 1410.
- HASTINGS, J.W. e T. WILSON (1976), Photochem. Photobiol., 23, 461.
- HASTY, N.M. e D.R. KEARNS (1973), J.Am.Chem.Soc., 95, 3380.
- HAUN, M., N. DURÁN e G. CILENTO (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 779.
- HAUN, M., N. DURÁN, O. AUGUSTO e G. CILENTO (1980), Arch. Biochem. Biophys., 200, 245.
- HEELIS, P.F. (1982), Chem. Soc. Rev., 11, 15.
- HEMMERICH, P. (1976), Fortschr.Chem.Org.Naturst., 33, 451.
- HERZBERG, G. (1966), em Molecular Spectra and Molecular Structure III Electronic Spectra and Electronic Structure of Polyatomic Molecules, van Nostrand, Princeton, N.J., pg. 518.
- HÖJER, G., S. MEZA e M.E. RUIZ (1973), Acta Chem. Scand., 27, 1860.
- HORN, K.A., J.-KOO, S.P. SCHMIDT e G.B. SCHUSTER (1978-9), Mol. Photochem., 9, 1.
- HUANG, C.L. e F.L. SANDS (1967), J.Pharm.Sci., 56, 259.

- ITO, Y., T. MATSUURA e H. KONDO (1979), J.Am.Chem.Soc.,
101, 7105.
- IWAOKA, T. e M. KONDO (1974), Bull.Chem.Soc.Japan, 47, 980.
- JACOBS, H.J.C. e E. HAVINGA (1979), Adv.Photochem., 11,
305.
- KASAMA, K., A. TAKEMATSU e S. ARAI (1982), J.Phys.Chem.,
86, 2420.
- KEARNS, D.R. (1969), J.Am.Chem.Soc., 91, 6554.
- KEARVELL, A. e F. WILKINSON (1970), J.Chim.Phys., 20, 125.
- KENTEN, R.H. (1953), Biochem. J., 55, 350.
- KISHNER, S., E. TREPMAN e W.C. GALLEY (1979), Can. J.
Biochem., 57, 1299.
- KOCHEVAR, I.E. e P.J. WAGNER (1972), J.Am.Chem.Soc., 94, 3859.
- KOHLER, E.P. e R.B. THOMPSON (1937), J.Am.Chem.Soc., 59, 887.
- KOLTHOFF, I.M. e E.B. SANDELL (1952), em Textbook of
Quantitative Inorganic Analysis, 3^a ed., McMillan Co.,
New York, NY, pg. 600.
- KOO, J.-Y. e G.B. SCHUSTER (1977), J.Am.Chem.Soc., 99, 6107.
- KOPECKY, K.R. e C. MUNFORD (1969), Can.J.Chem., 47, 709.
- KOPECKY, K.R., J.E. FILBY, C. MUNFORD, P.A. LOCKWOOD e
J.-Y. DING (1975), Can. J. Chem., 53, 1103.
- LAMOLA, A.A. (1971), Biochem. Biophys. Res. Commun., 43,
1971.
- LECHTKEN, P., A. YEKTA e N.J. TURRO (1973), J.Am.Chem.Soc.,
95, 3027.

- LECHTKEN, P., G. REISSENWEBER e P. GRUBMULLER (1977),
Tetrahedron Lett., 2881.
- LEE, J. e H.H. SELIGER (1965), Photochem. Photobiol., 4,
1015.
- LEE, D.C.-S. e T. WILSON (1973), em Chemiluminescence and
Bioluminescence, M.J. CORNIER, D.M. HERCULES e J. LEE,
eds., Plenum Press, New York, N.Y., pg. 265.
- LEE, K.-W., L.A. SINGER e K.D. LEGG (1976), J. Org. Chem.,
41, 2685.
- LE ROUX, J.P. e C. GOASDOUE (1975), Tetrahedron, 31, 2761.
- LIU, R.S.H. e J.R. EDMAN (1969), J. Am. Chem. Soc., 91, 1492.
- LOUFTY, R.O., R.W. YIP e S.K. DOGRA (1977), Tetrahedron
Lett., 2843.
- MARSHALL, D.R., P. REYNOLDS-WARNHOFF, E.W. WARNHOFF e J.R.
ROBINSON (1971), Can. J. Chem., 49, 885.
- MAZUR, S. e C.S. FOOTE (1970), J. Am. Chem. Soc., 92, 3226.
- MCCAPRA, F. (1968), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 155.
- MCCAPRA, F. (1976), Acc. Chem. Res., 9, 201.
- MCCAPRA, F. (1977), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 946.
- MCCAPRA, R. e D.G. RICHARDSON (1964), Tetrahedron Lett.,
3167.
- MCCAPRA, F., Y.C. CHANG e V.P. FRANÇOIS (1968), J. Chem.
Soc. Chem. Commun., 22.
- MCCAPRA, F., I. BEHESHTI, A. BURFORD, R.A. HANN e K.A.
ZAKLIKA (1977), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 944.

- MELHUISH, W.H. (1961), J.Phys.Chem., 65, 229.
- MENEGHINI, R., M.E. HOFFMANN, N. DURÁN, A. FALJONI e G. CILENTO (1978), Biochim. Biophys. Acta, 518, 177.
- MENON, I.A., S. PERSAD, H.F. HABERMAN, C.J. KURIAN e P.K. BASN (1982), Exp. Eye Res., 34, 531.
- MIRBACH, M.F., V. RAMAMURTHY, M.J. MIRBACH, N.J. TURRO e P.J. WAGNER (1980), Nouv. J. Chim., 4, 471.
- MITCHELL, G.W. e J.W. HASTINGS (1971), Anal. Biochem., 39, 243.
- MOAN, J. (1973), Chem. Phys. Lett., 18, 446.
- MORGAN, P.A. (1981), Sciqwest, 54, 24.
- MORRIS, J.V., M.A. MAHANEY e J.R. HUBER (1976), J. Phys. Chem., 80, 969.
- MORRISON, L.E. e M.J. HELLER (1981), Eur. Pat. Appl., EP 70.686, (citação C.A. nº 89:177419t).
- NAKAMURA, H. e T. GOTO (1979), Photochem. Photobiol., 30, 27.
- NASSI, L. e G. CILENTO (1982), Photochem. Photobiol., 36, 121.
- NASSI, E. e G. CILENTO (1983), Photochem. Photobiol., 37, 233.
- NIKI, E., R. TANIMURA e Y. KAMIYA (1982), Bull. Chem. Soc. Japan, 55, 1551.
- NIKOLAEVSKII, A.N., T.A. FILIPPENKO e T.S. SERGOVSKAYA (1982), Neftekhimiya, 22, 389 (citação C.A. nº 97:74314e).
- PORTER, G., R.W. YIP, J.M. DUNSTON, A.J. CESSNA e S.E. SUGAMORI (1971), Trans. Faraday Soc., 67, 3149.

- PORTER, G., S.K. DOGRA, R.O. LOUTFY, S.E. SUGAMORI e R.W. YIP (1973), J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 69, 1462.
- QUINA, F. (1982), em Chemical and Biological Generation of Excited States, W. ADAM e G. CILENTO, eds., Academic Press New York, NY, pg. 1.
- RAUHUT, M.M. (1969), Acc. Chem. Res., 2, 80.
- RICHARDSON, W.H. e H.E. O'NEAL (1972), J. Am. Chem. Soc., 94, 1619.
- RICHARDSON, W.H., F.C. MONTGOMERY, M.B. YELVINGTON e H.E. O'NEAL (1974A), J. Am. Chem. Soc., 96, 7525.
- RICHARDSON, W.H., F.C. MONTGOMERY, M.B. YELVINGTON e G. RANNEY (1974B), J. Am. Chem. Soc., 96, 4045.
- RICHARDSON, W.H., F.C. MONTGOMERY, P. SLUSSER e M.B. YELVINGTON (1975), J. Am. Chem. Soc., 97, 2819.
- RICHARDSON, W.H., J.H. BURNS, M.E. PRICE, R. CRAWFORD, M. FORSTER, P. SLUSSER e J.H. ANDEREGG (1978), J. Am. Chem. Soc., 100, 7596.
- RICHARDSON, W.H., M.B. LOVETT, M.E. PRICE e J.H. ANDEREGG (1979), J. Am. Chem. Soc., 101, 4683.
- RIGAUDY, J. (1948), C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., 226, 1993.
- RIVAS, E. (1982), Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- RIVAS-SUÁREZ, E. e G. CILENTO (1981), Biochemistry, 20, 7329.
- RIVAS-SUÁREZ, E., N. DURÁN e G. CILENTO (1979), Photochem. Photobiol., 30, 111.
- RIVAS-SUÁREZ, E., O. AUGUSTO e G. CILENTO (1981), Photochem. Photobiol., 33, 279.

- RIVAS-SUÁREZ, E., L.H. CATALANI, E.J.H. BECHARA e G. CILENTO
(1983) Photochem. Photobiol., 37, 93.
- SALZMAN, N.P., N.C. MORAN e B.B. BRODIE (1955), Nature, 176,
1122.
- SANTUS, R. e L.I. GROSSWEINER (1972), Photochem. Photobiol.,
15, 101.
- SAVIOTTI, M.L. e W.C. GALLEY (1974), Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A., 71, 4154.
- SAWAKI, Y. e Y. OGATA (1977), J. Am. Chem. Soc., 99, 6313.
- SCHAAP, A.P., P.A. BURNS e K.A. ZAKLIKA (1977), J. Am. Chem.
Soc., 99, 1270.
- SCHMIDT, R., H.D. BRAUER e H. KELM (1978), J. Photochem.,
8, 217.
- SCHMIDT, S.D. e G.B. SCHUSTER (1978), J. Am. Chem. Soc.,
100, 318.
- SCHUSTER, G.B. e K.A. HORN (1982), em Chemical and
Biological Generation of Excited States, W. ADAM e G.
CILENTO, eds., Academic Press, New York, NY, pg. 229.
- SCHUSTER, G.B., N.J. TURRO, H.-C. STENMETZER, A.P. SCHAAP,
G. FALER, W. ADAM e J.C. LIU (1975), J. Am. Chem. Soc.,
97, 7110.
- SELIGER, H.H. (1978), em Methods in Enzimology, M.A. De
LUCA, ed., Academic Press, New York, NY, vol. 57, pg.560.
- SELIGER, H.H. e W.D. McELROY (1965), em Light: Physical and
Biological Action, Academic Press, London.
- SHANLEY, E.S. e F.P. GREENSPAN (1947), Ind. Eng. Chem., 39,
1536.

- SHIMOMURA, O. (1982), em Chemical and Biological Generation of Excited States, W. ADAM e G. CILENTO, eds., Academic Press, New York, NY, pg. 249.
- SHIMOMURA, O. (1983), Photochem. Photobiol., 38, 773.
- SHIMOMURA, O., T. GOTO e F.H. JOHNSON (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 2799.
- SOARES, C.H.L. e E.J.H. BECHARA (1982), Photochem. Photobiol., 36, 117.
- STEELE, R.H. (1963), Biochemistry, 2, 529.
- STEINMETZER, H.-C., P. LECHTKEN e N.J. TURRO (1973), Justus Liebig's Ann. Chem., 1984.
- STEINMETZER, H.-C., A. YEKTA e N.J. TURRO (1974), J. Am. Chem. Soc., 96, 282.
- STEPHENS, H.N. (1928), J. Am. Chem. Soc., 50, 568.
- STORY, P.R., E.A. WHITED e J.A. ALFORD (1972), J. Am. Chem. Soc., 94, 2143.
- SUTHERLAND, B.M. (1981), Bioscience, 31, 439.
- SZENT-GYÖRGYI, A. (1941), Science, 93, 609.
- TAYLOR, G.N. (1971), Chem. Phys. Lett., 10, 355.
- THOMAS, A.H., H.H. SELIGER, E.H. WHITE e M.W. CASS (1967), J. Am. Chem. Soc., 89, 7148.
- TURRO, N.J. (1978), em Modern Molecular Photochemistry, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, California.
- TURRO, N.J. e A. DEVAQUET (1975), J. Am. Chem. Soc., 97, 3859.
- TURRO, N.J. e P. LECHTKEN (1972), J. Am. Chem. Soc., 94, 2886.
- TURRO, N.J. e P. LECHTKEN (1973A), J. Am. Chem. Soc., 95, 264.

- TURRO, N.J. e P. LECHTKEN (1973B), Pure Appl. Chem., 33, 363.
- TURRO, N.J. e Y. TANIMOTO (1980), J. Photochem., 14, 199.
- TURRO, N.J., P. LECHTKEN, G. SCHUSTER, H.C. STEINMETZER e W. ADAM (1974), J. Am. Chem. Soc., 96, 1627.
- TURRO, N.J., L. KOU-CHANG, M.-F. CHOW e P. LEE (1978), Photochem. Photobiol., 37, 523.
- TURRO, N.J., T. OKUBO e G.C. WEED (1982), Photochem. Photobiol., 35, 325.
- URRY, W.H. e J. SHEETO (1965), Photochem. Photobiol., 4, 1067.
- VIDIGAL-MARTINELLI, C., K. ZINNER, B. KACHAR, N. DURÁN e G. CILENTO (1979), FEBS Lett., 108, 266.
- VIDIGAL, C.C.C., A. FALJONI-ALÁRIO, N. DURÁN, K. ZINNER, Y. SHIMIZU e G. CILENTO (1979), Photochem. Photobiol., 30, 195.
- VIDIGAL, C.C.C., K. ZINNER, N. DURÁN, E.J.H. BECHARA e G. CILENTO (1975), Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 138.
- WADE, M.J. e J.D. SPIKES (1971). Photochem. Photobiol., 14, 221.
- WAGNER, P.J. (1967), J. Am. Chem. Soc., 89, 5715.
- WAGNER, P.J. e I. KOCHVAR (1968), J. Am. Chem. Soc., 90, 2232.
- WANNLUND, J., M. DE LUCA, K. STEMPEL e P.D. BOYER (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 987.

- WARREN, R.J., I.B. EISDORFEN, W.E. THONSON e J.E. ZAREMBO
(1966), J. Pharm. Sci., 55, 144.
- WASSERMAN, H. e I. SAITO (1975), J. Am. Chem. Soc., 97, 905.
- WHITE, E.H. e C.C. WEI (1970), Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 1219.
- WHITE, E.H., J. WIECKO e C.C. WEI (1970), J. Am. Chem. Soc., 92, 2167.
- WHITE, E.H., J.D. MIANO, C.J. WATKINS e E.J. BREAUUX (1974), Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 13, 229.
- WILSON, T. (1976), em Chemical Kinetics, D.R. HERSCHBACK, ed., M.T.P. Int. Rev. Sci. Phys. Chem. Ser. Two, vol. 9, Butterworth, London, pg. 265.
- WILSON, T. e A.M. HALPERN (1980A), J. Am. Chem. Soc., 102, 7272.
- WILSON, T. e A.M. HALPERN (1980B), J. Am. Chem. Soc., 102, 7279.
- WILSON, T. e A.P. SCHAAP (1971), J. Am. Chem. Soc., 93, 4126.
- WILSON, T., M.E. LANDIS, A.L. BAUMSTARK e P.D. BARTLETT
(1973), J. Am. Chem. Soc., 95, 4765.
- WILSON, T., D.E. GOLAN, M.S. HARRIS e A.L. BAUMSTARK (1976), J. Am. Chem. Soc., 98, 1086.
- YANG, N.C., M.H. HUI, D.M. SHOLD, N.J. TURRO, R.R. HAUTALA, K. DAWES e J.C. DALTON (1977), J. Am. Chem. Soc., 99, 3023.
- ZAKLIKA, K.A., A.L. THAYER e A.P. SCHAAP (1978), J. Am. Chem. Soc., 100, 4916.

- ZINNER, K., C.C.C. VIDIGAL, N. DURÁN e G. CILENTO (1977),
Arch. Biochem. Biophys., 180, 452.
- ZINNER, K., C. VIDIGAL-MARTINELLI, N. DURÁN, A.J. MARSALOLI
e G. CILENTO (1980), Biochem. Biophys. Res. Commun., 92,
32.

APÊNDICE I

Normas de Segurança para o Trabalho com Peróxidos em Geral

Todas as operações de manuseio de H_2O_2 concentrada (>80%) devem ser realizadas sob luz difusa, na capela, sob rigorosas medidas de segurança: óculos ou proteção, luvas de amianto e placa de segurança entre o operador e frascos. Nunca pipete H_2O_2 concentrado diretamente da garrafa. Entorne pequenas quantidades da solução num recipiente limpo e liso. Transfira daí com pipeta para outro frasco para ser pesada.

Soluções concentradas de H_2O_2 ou soluções de H_2O_2 em éter etílico (>20%) são altamente sensíveis a choques, ranhuras e faíscas, superfícies esmerilhadas e arestas cortantes - perigo de explosão. Vidraria deve ser rigorosamente lisa e limpa. Todas as operações de extração com éter etílico de H_2O_2 a partir de H_2O_2 30% devem ser feitas em banho de gelo, no escuro, obedecendo às recomendações de segurança indicadas.

Soluções de H_2O_2 concentradas nunca devem ser guardadas no congelador (-20°C) e sim no refrigerador ($0-5^\circ\text{C}$), para evitar cristalização de H_2O_2 . Cristais de H_2O_2 são altamente sensíveis a choques e explosivos. Quando soluções de H_2O_2 em éter (>10%) são resfriadas abaixo de -50°C , também pode ocorrer precipitação de cristais de H_2O_2 .

β -bromohidroperóxidos e dioxetanos, assim como quaisquer peróxidos, devem ser preparados em pequena escala (2 gramas no máximo) e armazenado em frações separadas no congelador. Eventualmente decomposições rápidas ou mesmo explosivas podem ocorrer durante a preparação.

Bibliografia recomendada:

SHANLEY, E.W. e F.P. GREENSPAN (1947), Ind. Eng. Chem., 39, 1536.

SHANLEY, E.W. (1972), em Organic Peroxides. D. SWERN, ed., Wiley-Interscience, New York, p. 341.

Concentrated Hydrogen Peroxide, Inorganic Chemical Division, FMC Corporation, Bulletin nº 46.

APÊNDICE II

Supressão da Quimiluminescência de Dioxetanos na Presença de um Sensitizador

Considere os seguinte processos:

(D = dioxetano; C = cetona; S = sensitizador; Q = supressor)

Onde:

$$k_P + k_d + k_S |\text{solv}| + k_{O_2} |O_2| = k_T$$

$$\frac{k_F}{k_F + k_d^1} = \phi_F^S$$

$$\frac{1}{k_F + k_d^1} = \tau_S \text{ (vida média de } {}^1S^*)$$

$$k_{TS} + k_{TT} = k_{TE}$$

$$\frac{1}{k_T + k_{TE} |S|} = \tau_T \text{ (vida média de } {}^3C^* \text{ na ausência de } Q$$

(despreza-se os processos onde ${}^1C^*$ participa, pois,

$${}^3\phi/{}^1\phi \sim 10^2 \text{ a } 10^3)$$

Na ausência do supressor:

$$I_O = k_F |{}^1S^*| \quad (\text{Eq. 1})$$

Tratamento por estado estacionário:

$$\frac{d|{}^1S^*|}{dt} = 0$$

$$k_{TS} |{}^3C^*| |S| = (k_F + k_d^1) |{}^1S^*|$$

$$|{}^1S^*| + \frac{k_{TS}}{k_F + k_d^1} |S| |{}^3C^*| \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\frac{d|{}^3C^*|}{dt} = 0$$

$$k_1 {}^3\phi |D| = (k_T + k_{TS} |S| + k_{TT} |S|) |{}^3C^*|$$

$$|{}^3C^*| = \frac{k_1 {}^3\phi |D|}{k_T + k_{TS} |S| + k_{TT} |S|} \quad (\text{Eq. 3})$$

Substituindo-se as equações 2 e 3 em 1:

$$I_O = \frac{\phi_F^S k_{TS} |S| k_1 {}^3\phi |D|}{k_T k_{TE} |S|} \quad (\text{Eq. 4})$$

Na presença do supressor:

$$I_Q = k_F |{}^1S^*| \quad (\text{Eq. 5})$$

Tratamento por estado estacionário:

$$\frac{d|{}^1S^*|}{dt} = 0$$

$$k_{TS} |S| |{}^3C^*| = (k_F + k'_d + k'_q |Q|) |{}^1S^*|$$

$$|{}^1S^*| = \frac{k_{TS} |S| |{}^3C^*|}{k_F + k'_d + k'_q |Q|} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\frac{d|{}^3C^*|}{dt} = 0$$

$$k_1 {}^3\phi |D| = (k_T + k_{TS} |S| + k_{TT} |S| + k_q |Q|) |{}^3C^*|$$

$$|{}^3C^*| = \frac{k_1 {}^3\phi |D|}{k_T + k_{TE} |S| + k_q |Q|} \quad (\text{Eq. 7})$$

Substituindo-se as equações 5 e 6 em 7:

$$I_Q = k_F \frac{k_{TS}|S|}{k_F + k'_d + k'_q |Q|} \times \frac{k_1 {}^3\phi |D|}{k_T + k_{TE}|S| + k_q |Q|} \quad (\text{Eq. 8})$$

Dividindo-se a equação 4 pela equação 8:

$$\frac{I_O}{I_Q} = \frac{k_F + k'_d + k'_q |Q|}{k_F + k'_d} \times \frac{k_T + k_{TE}|S| + k_q |Q|}{k_T + k_{TE}|S|}$$

$$\frac{I_O}{I_Q} = \left[1 + \frac{k'_q |Q|}{k_F + k'_d} \right] \left[1 + \frac{k_q |Q|}{k_T + k_{TE}|S|} \right]$$

Ou seja:

$$\frac{I_O}{I_Q} = (1 + k'_q \tau_S |Q|) (1 + k_q \tau_T |Q|)$$

onde o primeiro termo representa a supressão de 1_S^* e o segundo a supressão de 3_C^* .

APÊNDICE III

Termólise de Dioxetanos na Presença de Aceptores Fluores-
tes. Equação do Duplo Recíproco

Considere os seguintes processos:

(D = dioxetano; C = cetona; S = sensitizador ou . acceptor
 fluorescente)

Onde:

$$k_{\text{d}} + k_{\text{p}} + k_{\text{solv}} |\text{solv}| + k_{\text{O}_2} |\text{O}_2| = k_{\text{T}}$$

$$\frac{1}{k_{\text{T}}} = \tau \quad (\text{constante de transferência de energia de } {}^3\text{C}^* \text{ para S})$$

$$\frac{k_{\text{TS}}}{k_{\text{TE}}} = \phi_{\text{TS}}$$

$$k_{\text{SS}} + k_{\text{ST}} + k'_{\text{SS}} = k'_{\text{TE}} \quad (\text{constante de transferência de energia de } {}^1\text{C}^* \text{ para S})$$

$$\frac{k_{\text{SS}}}{k'_{\text{TE}}} = \phi_{\text{SS}}$$

$$\frac{k'_{\text{F}}}{k'_{\text{F}} + k'_{\text{isc}} + k'_{\text{d}}} = \phi_{\text{F}}^{\text{S}} \quad (\text{rendimento quântico de fluorescência de S})$$

Podemos considerar dois tipos de aceptores fluorescentes:

(A) aceptores capazes de sensitizar espécies singletes e tripletes, como por exemplo o 9,10-dibromoantraceno. Neste caso, os átomos de bromo "relaxam" a regra de conservação de spin, através de acoplamento spin-orbital, permitindo transições proibidas (k_{TS} , k'_{TS} e k_{ST}).

$$\phi_{TS} \cong 0,10 \text{ a } 0,30 \quad ({}^3C^* \rightarrow {}^1DBA^*)$$

(B) aceptores capazes de sensitizar somente espécies singletes, como por exemplo o 9,10-difenil-antraceno.

Aqui, vale a regra de conservação de spin, ou seja:

$$k_{SS} \gg k_{TS}$$

$$\phi_{SS} \cong 1 \quad ({}^1C^* \rightarrow {}^1DPA^*)$$

Análise da termólise de dioxetanos sensitizado por (A)

Premissas: despreza-se as etapas nas quais singlete participa, pois ${}^3\phi/{}^1\phi \sim 10^2 \text{ a } 10^3$, despreza-se a fosforência de cetona para os casos onde a amplificação é maior que 20 vezes (p. ex. DBA); despreza-se a catálise induzida ($|D| < 10^{-3}M$).

Intensidade de quimiluminescência observada:

$$I_S = k'_F |{}^1S^*| \quad (1)$$

Tratamento de estado estacionário para ${}^1S^*$.

$$\frac{d|{}^1S^*|}{dt} = k_{TS} |S| |{}^3C^*|$$

$$\frac{d|{}^1S^*|}{dt} = (k'_F + k'_{isc} + k'_d) |{}^1S^*|$$

$$k_{TS} |S| |{}^3C^*| = (k'_F + k'_{isc} + k'_d) |{}^1S^*|$$

$$|{}^1S^*| = \frac{k_{TS} |S| |{}^3C^*|}{k'_F + k'_{isc} + k'_d} \quad (2)$$

Tratamento de estado estacionário para ${}^3C^*$:

$$\begin{aligned}\frac{d|{}^3C^*|}{dt} &= k_1 {}^3\phi |D| \\ -\frac{d|{}^3C^*|}{dt} &= k_T |{}^3C^*| + k_{TE} |{}^3C^*| |S| \\ |{}^3C^*| &= \frac{k_1 {}^3\phi |D|}{k_T + k_{TE} |S|}\end{aligned}\quad (3)$$

Substituindo-se as equações 2 e 3 em 1:

$$\begin{aligned}I_S &= k'_F \times \frac{k_{TS} |S|}{k'_F + k'_{ISC} + k'_d} \times \frac{k_1 {}^3\phi |D|}{k_T + k_{TE} |S|} \\ I_S &= \frac{k_1 |D| {}^3\phi \phi_F^S k_{TS} |S|}{k_T + k_{TE} |S|}\end{aligned}\quad (4)$$

Invertendo-se os termos da equação 4 e substituindo-se:

k_{TS}/k_{TE} por ϕ_{TS} :

$$\frac{1}{I_S} = \frac{k_T}{k_1 |D| {}^3\phi \phi_F^S k_{TS}} \times \frac{1}{|S|} + \frac{1}{k_1 |D| {}^3\phi \phi_F^S \phi_{TS}}$$

A projeção de $1/I_S$ vs $1/|S|$ ($|D|$, ϕ , ϕ_F^S , ϕ_{TS} , k_T , k_1 , ϕ_F^S constantes) fornece:

Do coeficiente linear (y_{int}):

$${}^3\phi = \frac{1}{k_1 |D| y_{int} \phi_F^S \phi_{ts}}$$

Do quociente

$$\frac{\text{coeficiente linear}}{\text{coeficiente angular}}$$

$$\frac{y_{int}}{tg} = k_{TE} \tau_T$$

Análise da termólise dioxetanos sensitizada por (B):

As equações que relacionam as intensidades de emissão com a concentração de (B) podem ser deduzidas seguindo-se a mesma linha de raciocínio indicada para o caso de (A).

$$I_S = \frac{k_1 |D| \cdot \frac{1}{\phi} k_{SS} |S|}{k_S + k_{SS} |S|}$$

$$\frac{1}{I_S} = \frac{k_S}{k_1 |D| \cdot \frac{1}{\phi} k_F^S k_{SS}} \times \frac{1}{|S|} + \frac{1}{k_k |D| \cdot \frac{1}{\phi} \phi_F^S \phi_{SS}}$$

APÊNDICE IV

Análise Cinética da Reação do Sistema CPZ/HRP/H₂O₂

Dedução da Equação 5.1.

Considere os processos do Esquema 5.1.A (item 5.1.7.7)

Velocidade:

$$-\frac{d|\text{CPZ}|}{dt} = k_2 |I| |\text{CPZ}| + k_3 |II| |\text{CPZ}| \quad (\text{Eq. 1})$$

Conservação:

$$E_0 = |P| + |I| + |II| \quad (\text{Eq. 2})$$

Tratamento de estado estacionário

$$\frac{d|P|}{dt} = k_3 |II| |\text{CPZ}| - k_1 |P| |\text{H}_2\text{O}_2| = 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\frac{d|I|}{dt} = k_1 |P| |\text{H}_2\text{O}_2| - k_2 |I| |\text{CPZ}| = 0 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\frac{d|II|}{dt} = k_2 |I| |\text{CPZ}| - k_3 |II| |\text{CPZ}| = 0 \quad (\text{Eq. 5})$$

da equação 3:

$$k_3 |II| |\text{CPZ}| = k_1 |P| |\text{H}_2\text{O}_2| \quad (\text{Eq. 6})$$

$$|II| = \frac{k_1 |P| |\text{H}_2\text{O}_2|}{k_3 |\text{CPZ}|} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$|P| = \frac{k_3 |II| |\text{CPZ}|}{k_1 |\text{H}_2\text{O}_2|} \quad (\text{Eq. 8})$$

da equação 4:

$$k_1 |P| |H_2O_2| = k_2 |I| |CPZ| \quad (\text{Eq. 9})$$

$$|P| = \frac{k_2 |I| |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} \quad (\text{Eq.10})$$

$$|I| = \frac{k_1 |P| |H_2O_2|}{k_2 |CPZ|} \quad (\text{Eq.11})$$

da equação 5:

$$k_2 |I| = k_3 |II| \quad (\text{Eq.12})$$

$$|I| = \frac{k_3 |II|}{k_2} \quad (\text{Eq.13})$$

$$|II| = \frac{k_2 |I|}{k_3} \quad (\text{Eq.14})$$

substituindo-se as equações 7 e 11 em 2:

$$|E_O| = |P| + \frac{k_1 |P| |H_2O_2|}{k_2 |CPZ|} + \frac{k_1 |P| |H_2O_2|}{k_3 |CPZ|} \quad (\text{Eq.15})$$

$$|P| = \frac{|E_O|}{1 + \frac{k_1 |H_2O_2|}{k_2 |CPZ|} + \frac{k_1 |H_2O_2|}{k_3 |CPZ|}} \quad (\text{Eq.16})$$

substituindo-se as equações 10 e 14 em 2:

$$|E_O| = \frac{k_2 |I| |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} + |I| + \frac{k_2 I}{k_3} \quad (\text{Eq.17})$$

$$|I| = \frac{|E_o|}{\frac{k_2 |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} + 1 + \frac{k_2}{k_3}} \quad (\text{Eq.18})$$

substituindo-se as equações 8 e 13 em 2:

$$|E_o| = \frac{k_3 |II| |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} + \frac{k_3 |II|}{k_2} + |II| \quad (\text{Eq.19})$$

$$|II| = \frac{|E_o|}{\frac{k_3 |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} + \frac{k_3}{k_2} + 1} \quad (\text{Eq.20})$$

substituindo-se as equações 18 e 20 em 1:

$$\frac{-d|CPZ|}{dt} = \frac{k_2 |CPZ| |E_o|}{\frac{k_2 |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} + 1 + \frac{k_2}{k_3}} + \frac{k_3 |CPZ| |E_o|}{\frac{k_3 |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} + \frac{k_3}{k_2} + 1} \quad (\text{Eq.21})$$

Análise da hipótese (1):

Multiplicando-se o 2º termo da equação 21 por $\frac{k_2/k_3}{k_2/k_3}$:

$$\frac{-d|CPZ|}{dt} = \frac{2 k_2 |CPZ| |E_o|}{\frac{k_2 |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} + 1 + \frac{k_2}{k_3}}$$

aplicando-se as premissas da hipótese:

$$k_2 \ll k_1 \text{ e } k_3 \text{ e } |H_2O_2| \ll |CPZ|$$

$$\frac{-d|CPZ|}{dt} = 2 k_2 |CPZ| |E_o|$$

Análise da hipótese (2):

Multiplicando-se o 1º termo da equação 21 por $\frac{k_3/k_2}{k_3/k_2}$:

$$\frac{-d|CPZ|}{dt} = \frac{2 k_3 |CPZ| |E_O|}{\frac{k_3 |CPZ|}{k_1 |H_2O_2|} + \frac{k_3}{k_2} + 1}$$

aplicando-se as premissas da hipótese:

$$k_3 \ll k_1 \text{ e } k_2 \text{ e } |H_2O_2| \ll |CPZ|$$

$$\frac{-d|CPZ|}{dt} = 2 k_3 |CPZ| |E_O|$$

Análise da hipótese (3)

Considerando-se os processos do Esquema 5.1.B (item 5.1.7.7)

Velocidade:

$$\frac{-d|CPZ|}{dt} = k_5 |I| |CPZ|$$

conservação:

$$E_O = |P| + |I|$$

aplicando-se as premissas da hipótese:

$$k_5 \ll k_4 \text{ e } |H_2O_2| \ll |CPZ|$$

$$|P| \sim 0 \text{ e } |I| = |E_O|$$

portanto:

$$\frac{-d|CPZ|}{dt} = k_5 |E_O| |CPZ|$$