UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

GLALCI ALVES DE SOUZA

Estudo Mecanístico do Sistema
Peroxioxalato com Diferentes
Catalisadores

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
21/06/2017

GLALCI ALVES DE SOUZA

**Estudo Mecanístico do Sistema
Peroxióxalato com Diferentes
Catalisadores**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de “Doutor em
Ciências”. Programa: Química*

Orientador: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader

São Paulo

2017

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

S719e Souza, Glalci Alves de
Estudo Mecanístico do Sistema Peroxioxalato com
Diferentes Catalisadores / Glalci Alves de Souza. -
São Paulo, 2017.
166 p.

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

1. Química Orgânica. 2. Físico-química Orgânica. 3.
Quimiluminescência. 4. Catálise. 5. Cinética. I. T.
II. Baader, Josef Wilhelm, orientador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais por todo amor, atenção, dedicação e cuidado. Por terem me proporcionado uma boa educação e me ajudado a chegar até aqui.

Muito obrigada ao Willi por todo apoio, pelo conhecimento compartilhado, por todas as discussões de resultados, entre outras coisas que contribuíram para a minha formação. Agradeço também a Paulete, que juntamente ao Willi, sempre abriram as portas de sua casa para nossas confraternizações de grupo anuais.

Agradeço todos os meus colegas de laboratório, com os quais tive o prazer de conviver ao longo de todos esses anos, especialmente a Ana P. Fileno e o Sandro, por terem me orientado durante minha IC com tanta dedicação, me auxiliando nos primeiros passos da minha carreira científica. Aos nossos técnicos, Luiz Carlos e Suzana, por todos os momentos de descontração e risadas com as piadas prontas.

Aos amigos do IQ: Luiza, Vinícius, Thuany, Biff, André, Aninha, Amanda e a Karina. E todas as amizades conquistadas durante esses 10 anos de IQ-USP. Sem vocês tudo teria sido mais difícil.

À Shirley, ao Cezar, ao Paulinho, ao Edgar e à Dani, vocês são incríveis, me diverti infinitamente na companhia de vocês!

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação, em especial a Cibeles, o Milton e o Marcelo, por toda a ajuda com os prazos, documentações, prestação de contas e certificados do PAE.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Souza, G. A. **Estudo Mecanístico do Sistema Peroxioxalato com Diferentes Catalisadores**. 2017. 166p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A reação peroxioxalato é o sistema quimiluminescente não enzimático de maior eficiência, alcançando rendimentos quânticos de até 50%. A quimiluminescência deste sistema vem sendo amplamente utilizada em aplicações analíticas e bioanalíticas visando a detecção de analitos de interesses biológicos e medicinais.

O presente trabalho consistiu em se estudar a reação peroxioxalato com diferentes catalisadores e determinação de seu mecanismo em condições experimentais distintas das que vinham sendo estudadas até o momento, visando sua adaptação a meios aquosos para futuras aplicações. Foi estudada a utilização do salicilato de sódio como catalisador deste sistema em meio puramente orgânico, em substituição ao imidazol, e verificou-se a atuação do salicilato como catalisador básico geral e/ou específico. O rendimento quântico máximo desta transformação foi da ordem de 10^{-3} E mol^{-1} . Ensaios cinéticos de emissão também foram realizados com ésteres oxálicos de diferentes reatividades em um sistema binário composto por 1,2-dimetoxietano/água contendo tampão fosfato como catalisador, em diferentes valores de pH. Nestas condições se observou a ocorrência de catálise ácida geral e catálise básica geral, uma vez que as constantes de velocidade se mostraram dependentes da concentração de tampão no meio reacional. Além disso, também se utilizou salicilato de sódio como catalisador no sistema binário 1,2-dimetoxietano/água, o qual também apresentou um papel catalítico importante no percurso desta transformação com diferentes ésteres oxálicos. Verificou-se nestes estudos a boa reprodutibilidade da reação peroxioxalato com salicilato de sódio como catalisador em meios parcialmente aquosos, que pode ampliar a utilização deste sistema quimiluminescente em aplicações analíticas e bioanalíticas. Quando se realizou os ensaios em um meio majoritariamente aquoso, o salicilato não se mostrou um catalisador eficiente, porém, mesmo sem catalisador, a reação peroxioxalato se mostrou reprodutível nestas condições.

Palavras-chave: Quimiluminescência, sistema peroxioxalato, catálises ácida e básica geral, aplicações analíticas e bioanalíticas.

ABSTRACT

Souza, G. A. **Mechanistic Studies on the Peroxyoxalate System using Different Catalysts**. 2017. 166p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The peroxyoxalate reaction is the non-enzymatic chemiluminescence system with the highest efficiency, achieving quantum yields of up to 50%. The chemiluminescence of this system has been widely used in analytical and bioanalytical applications in order to detect analytes of biological and medicinal interests.

The present work consisted in a study of the peroxyoxalate reaction with different catalysts and the determination of its mechanism in experimental conditions different from those studied before, aiming its adaptation to aqueous media for future applications. The use of sodium salicylate as base catalyst for this system in pure organic medium, in substitution to imidazole, was studied and shown that salicylate acts as a general and/or specific base catalyst. The maximum quantum yield obtained for the transformation in these conditions was in the order of 10^{-3} E mol⁻¹. Emission experiments were also performed in a binary solvent system composed of 1,2-dimethoxyethane/aqueous phosphate buffer at different pH values as catalyst, using oxalic esters with different reactivities. In these conditions the occurrence of general acid catalysis and general base catalysis was observed, since the rate constants proved to be dependent on the buffer concentration. In addition, sodium salicylate was also used as catalyst in the binary 1,2-dimethoxyethane/water system with different oxalic esters, indicating its important catalytic role in the transformation. These studies allowed it to establish a reproducible peroxyoxalate system in partially aqueous media using sodium salicylate as base catalyst, which may increase the use of the chemiluminescence of this system in analytical and bioanalytical applications. However, when the experiments were performed in a medium containing mostly water, salicylate did not act as an efficient catalyst in these conditions. Even in the absence of catalyst, the reaction proved to be reproducible in the medium containing mostly water as solvent.

Keywords: Chemiluminescence, peroxyoxalate system, general acid and base catalysis, analytical and bioanalytical applications.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Ativador
BMPO	Oxalato de bis(4-metoxifenila)
BMePO	Oxalato de bis(4-metilfenila)
CAG	Catálise ácida geral
CBE	Catálise básica específica
CBG	Catálise básica geral
CIEEL	<i>Chemilcally Initiated Electron Exchange Luminescence</i> , Luminescência iniciada quimicamente por troca de elétron
DME	1,2-Dimetoxietano
DNP	2,4-Dinitrofenol
DNPO	Oxalato de bis(2,4-dinitrofenila)
DPA	9,10-Difenilantraceno
EtOAc	Acetato de etila
FLU	Fluoresceína
IAE	Intermediário de alta energia
Imi-H	Imidazol
k_{bim}	Constante de velocidade bimolecular
k_{cat}	Constante de velocidade bimolecular da reação catalisada pelo TBAP
k_{CAT}/k_D	Relação entre a constante de velocidade da reação do IAE catalisada pelo ACT e a constante de velocidade da reação de decomposição unimolecular do IAE
k_{hidr}	Constante de velocidade da reação de hidrólise
k_{obs}	Constante de velocidade observada
k_{per}	Constante de velocidade da reação de peridrólise
k_{ter}	Constante de velocidade termolecular
PPO	2,5-Difeniloxazol
RUB	Rubreno
TBAP	Fosfato de tetrabutilamônio
TCP	2,4,6-Triclorofenol
TCPO	Oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila)
Φ_s	Rendimento quântico singlete
Φ_s[∞]	Rendimento quântico singlete no infinito

LISTA DE ESTRUTURAS RELEVANTES

TCPO

DNPO

BMPO

BMePO

Salicilato de sódio

Imi-H

PPO

RUB

DPA

FLU

Sumário

1. Introdução	13
1.1 Quimiluminescência: aspectos históricos	13
1.2 Princípios básicos de quimiluminescência	14
1.2.1 Decomposição unimolecular de peróxidos cíclicos	20
1.2.2 Decomposição catalisada de peróxidos cíclicos: CIEEL intermolecular	22
1.2.3 Decomposição induzida de peróxidos cíclicos: CIEEL intramolecular	24
1.3 O sistema peroxioxalato	26
1.3.1 Estudos mecanísticos da reação peroxioxalato	27
1.3.3 O sistema peroxioxalato e o intermediário de alta energia	29
1.4 Aplicações analíticas e bioanalíticas da quimiluminescência do sistema peroxioxalato	32
2. Objetivos	35
3. Parte Experimental	37
3.1 Reagentes e solventes	37
3.2 Soluções estoque	38
3.2.1 Preparo das soluções de peróxido de hidrogênio e determinação da concentração	39
3.3 Equipamentos	40
3.4 Espectros de absorção dos ésteres oxálicos, fenóis e salicilato de sódio	40
3.5 Ensaios cinéticos de emissão	42
3.5.1 Ensaios cinéticos para a reação de TCPO e H_2O_2 utilizando salicilato de sódio como catalisador	42
3.5.2 Ensaios cinéticos de injeção em retardo de H_2O_2 na reação peroxioxalato com salicilato de sódio como catalisador	43
3.5.3 Ensaios de emissão com variação da concentração de ativador para a reação de TCPO e H_2O_2 catalisada por salicilato de sódio	45
3.5.4 Ensaios com variação na temperatura para a reação peroxioxalato utilizando salicilato de sódio como catalisador	46
3.5.5 Ensaios cinéticos para a reação de DNPO e H_2O_2 utilizando salicilato de sódio como catalisador	47
3.5.6 Ensaios cinéticos em sistema binário DME/ H_2O 1:1 (v/v) com os ésteres BMePO e BMPO utilizando tampão fosfato como catalisador	48
3.5.7 Ensaios cinéticos com os ésteres TCPO e BMePO em sistema binário DME/ H_2O 1:1 (v/v) com salicilato de sódio como catalisador	49
3.5.8 Ensaios cinéticos da reação peroxioxalato em um meio majoritariamente aquoso	51
3.6 Calibração do espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse	52
3.7 Análises estatísticas	55
3.7.1 Determinação das constantes de velocidade observadas	55
3.7.2 Determinação dos rendimentos quânticos singlete	56
4. Resultados	57
4.1 Ensaios cinéticos de emissão para a reação de TCPO e H_2O_2 utilizando salicilato de sódio como catalisador	57
4.1.1 Determinação das constantes de velocidade observadas e dos rendimentos quânticos singlete	57
4.1.2 Ensaios com adição em retardo de peróxido de hidrogênio	64
4.1.3 Ensaios de emissão com variação da concentração de ativador na reação de TCPO e H_2O_2 catalisada por salicilato de sódio	68
4.1.4 Ensaios de emissão com variação da temperatura para a reação de TCPO e H_2O_2 catalisada por salicilato de sódio	73
4.2 Ensaios cinéticos de emissão para a reação de DNPO e H_2O_2 utilizando salicilato de sódio como catalisador	74

4.3 Ensaio cinético de emissão em sistema binário H ₂ O/DME 1:1 (v/v) com os ésteres BMePO e BMPO utilizando tampão fosfato como catalisador.....	80
4.4 Ensaio cinético de emissão com os ésteres TCPO e BMePO em sistema binário DME/H ₂ O 1:1 (v/v) com salicilato de sódio como catalisador	88
4.4.1 Ensaio cinético de emissão da reação entre TCPO, H ₂ O ₂ , salicilato de sódio utilizando PPO como ativador.....	88
4.4.2 Ensaio cinético de emissão da reação entre BMePO, H ₂ O ₂ , salicilato de sódio utilizando PPO como ativador.....	93
4.5 Ensaio cinético da reação peroxioxalato em um meio majoritariamente aquoso.....	98
5. Discussão	103
5.1 Mecanismos da reação peroxioxalato utilizando salicilato de sódio como catalisador em acetato de etila.....	103
5.1.1 Reação entre TCPO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio..	103
5.1.2 Determinação dos parâmetros de quimiluminescência para a reação entre TCPO e H ₂ O ₂ catalisada por salicilato de sódio.....	115
5.1.3 Reação entre DNPO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio .	121
5.2 Mecanismos da reação peroxioxalato na mistura DME/H ₂ O catalisada por tampão fosfato	127
5.3 Mecanismos da reação peroxioxalato na mistura DME/H ₂ O catalisada por salicilato de sódio.....	138
5.3.1 Reação de TCPO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio na mistura DME/H ₂ O.....	138
5.3.2 Reação de BMePO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio na mistura DME/H ₂ O.....	141
5.4 Reação peroxioxalato em um meio majoritariamente aquoso.....	146
6. Conclusões.....	153
7. Referências bibliográficas.....	155

1. Introdução

1.1 Quimiluminescência: aspectos históricos

O termo “*Chemilumineszenz*” foi primeiramente utilizado por Eilhard Wiedemann, em 1888, para se referir a processos químicos capazes de emitir luz como um de seus produtos:¹ “*Das bei chemischen Prozessen auftretende Leuchten würde Chemilumineszenz genannt*”, ou seja, “*Um processo químico que ocorra com luminescência será denominado quimiluminescência*”.² Reações químicas que emitem luz, em organismos vivos ou não, sempre despertaram a atenção de muitos estudiosos. Gregos e romanos foram os primeiros a analisar diversos animais incluindo peixes, fungos e bactérias. Aristóteles, ao observar a emissão de luz por vários organismos vivos, descreveu este fenômeno como emissão de “luz fria” a partir de um organismo vivo. Posteriormente, denominou-se *bioluminêscência* reações quimiluminescentes que ocorrem espontaneamente em organismos vivos.² A quimi e a bioluminescência são considerados entre os mais fascinantes fenômenos da química e, ao mesmo tempo, uns dos mais incompreendidos do ponto de vista de como ocorre, ou seja, como é possível a simples mistura de alguns reagentes produzir luz como um de seus produtos? A resposta para esta questão está no mecanismo destas transformações, sendo assim, o estudo destes mecanismos tem se tornado cada vez mais atraente nesta área de pesquisa, e sempre com a finalidade de elucidar as diversas etapas reacionais que fazem parte destes processos tão complexos.

Dentre os processos químicos que emitem luz, em 1603, o alquimista Vincent Cascariolo observou uma intensa emissão de luz azul púrpura por um determinado minério, quando este era submetido ao aquecimento. Este minério foi chamado por Cascariolo como “lápiz solaris” ou pedra solar, posteriormente, ficou conhecida como pedra de Bolonha e se descobriu que o principal constituinte químico deste minério é o

sulfato de bário que, quando submetido à combustão produz sulfeto de bário, o qual possui propriedades fosforescentes.² O primeiro composto químico sintético capaz de emitir luz em uma reação química sem a necessidade de aquecimento foi a lofina (2,4,5-trifenilimidazol), sintetizada em 1887 por Bronislau Radziszewski.³ Radziszewski também reportou uma série de compostos orgânicos que, ao sofrerem uma reação química específica, emitem luz, o luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona) é um exemplo desta classe de compostos. A oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio em meio alcalino é catalisada por um metal de transição, esta reação foi extensivamente estudada por Albrecht em 1928;⁴ a reação da lucigenina (*N,N'*-dimetil-9,9'-biacridina) estudada por Gleu e Petsch em 1935 é outro exemplo de transformação quimiluminescente;⁵ e também a reação entre cloreto de oxalila e peróxido de hidrogênio na presença de 9,10-difenilantraceno, denominada reação peroxioxalato, em 1963 por Edwin A. Chandross.⁶

As descobertas de Radziszewski permitiram que Wiedemann pudesse diferenciar o fenômeno químico de quimiluminescência e fenômeno físico de incandescência, sendo este último um processo físico que corresponde à emissão de radiação pelo corpo negro após seu aquecimento.¹ A incandescência foi explicada por Max Planck (Nobel de Física em 1918) e, posteriormente, por Albert Einstein (Nobel de Física em 1921) em seus estudos sobre o efeito fotoelétrico no início do século XX.

1.2 Princípios básicos de quimiluminescência

O entendimento de como as reações quimiluminescentes ocorrem inclui saber diferenciá-las das reações fotoquímicas e reações de decomposição térmica comuns. Nas reações fotoquímicas, um determinado reagente absorve um fóton e é excitado para um estado de maior energia, o qual sofre uma reação química e se formam produtos no

estado fundamental. Reações térmicas comuns são aquelas em que a energia, proveniente das colisões entre as moléculas, está envolvida na quebra e formação de ligações químicas, por exemplo, em reações exotérmicas comuns, a energia, na forma de calor é liberada e provoca o aumento de temperatura da vizinhança. Neste processo, a energia química da reação, proveniente da simples mistura de reagentes, é convertida em luz, enquanto que em reações térmicas comuns, esta energia é liberada para o meio em forma de calor. Deve-se atentar para o fato de que, em reações quimiluminescentes, a energia química é absorvida por alguma espécie no meio reacional, a qual é excitada eletronicamente e, posteriormente, decai emitindo luz.

A emissão de luz em reações quimiluminescentes pode ocorrer de três maneiras: direta, indireta ou ativada (**Esquema 1**). Na quimiluminescência direta, a mistura de dois ou mais reagentes leva à formação de um intermediário de alta energia (IAE), o qual é convertido em um produto no estado eletronicamente excitado (P^*) e a emissão de luz se dá pelo decaimento deste mesmo produto ao estado fundamental; na quimiluminescência indireta, o produto formado no estado excitado transfere sua energia para uma molécula aceptora de energia (AE), a qual é excitada para um estado eletrônico de maior energia que, ao decair para o estado fundamental, emite luz, sendo esta molécula, portanto, a responsável pela quimiluminescência do sistema. Na quimiluminescência ativada, o IAE formado interage com outro reagente (R), levando à formação de um produto (P) no estado fundamental e este reagente no estado excitado (R^*) que, posteriormente, decai para o estado fundamental emitindo luz (**Esquema 1**), neste caso, a etapa em que ocorre a interação do IAE com R é chamada de etapa de quimiexcitação, a qual será abordada mais detalhadamente posteriormente.⁷

Esquema 1: Equações gerais para quimiluminescência direta, indireta e ativada.

A emissão de luz a partir das espécies no estado excitado presentes nestes processos pode ocorrer através da *fluorescência*, em que a transição eletrônica se dá entre estados de mesma multiplicidade (singlete/singlete ou triplete/triplete) ou através da *fosforescência*, em que a transição ocorre entre estados de multiplicidades distintas. O tempo de vida do produto formado no estado singlete varia de nanossegundos a microssegundos, enquanto o tempo de vida de fosforescência é maior, de microssegundos a segundos, neste último ocorre uma transição eletrônica proibida, em que há inversão do spin do elétron durante o cruzamento entre sistemas (“intersystem crossing”, ISC).

De maneira geral, transformações quimiluminescentes são processos exotérmicos e envolvem a formação de estados eletronicamente excitados. Porém, isso não significa que toda reação exotérmica será quimiluminescente. Em uma reação exotérmica comum, as moléculas dos reagentes (R) se chocam de modo randômico e a energia proveniente destes choques deve ser suficiente para levar os reagentes ao estado de transição ($\ddagger$), a partir do qual se origina o produto (P), inicialmente, no estado vibracional excitado (P^*), que posteriormente perde essa energia vibracional na forma de calor (**Figura 1A**). Uma transformação quimiluminescente é, necessariamente, altamente exotérmica, neste caso, a energia proveniente do choque randômico entre as moléculas do reagente leva este a um estado de transição ($\ddagger$), o qual possui energia maior do que o produto no estado excitado (P^*). Para a reação ser quimiluminescente, o

estado de transição deve levar à formação do produto em seu estado excitado (P^*), o qual decai para o estado fundamental emitindo luz (**Figura 1B**). Caso, o estado de transição não origine P^* , esta será uma reação exotérmica comum.

Figura 1: (A) Diagrama de energia para uma transformação exotérmica não quimiluminescente. (B) Diagrama de energia para uma transformação exotérmica e quimiluminescente.

Os estados excitados gerados nas transformações quimiluminescentes devem ser acessíveis, ou seja, capazes de receber a energia de excitação e emití-la sob a forma de luz. Nestes processos, a energia envolvida está entre 50 e 100 kcal mol⁻¹, compatível com a energia de excitação da maior parte dos cromóforos orgânicos, que correspondem a compostos carbonílicos e hidrocarbonetos aromáticos policondensados.⁸

Para que uma reação seja quimiluminescente é necessário que haja uma combinação entre os fatores energéticos descritos acima e os fatores geométricos. Estes últimos são baseados no princípio de Frank-Condon, um princípio fotofísico que propõe que transições eletrônicas ocorrem em uma escala temporal muito mais curta (10^{-16} a 10^{-14} segundos) do que movimentos nucleares (10^{-13} a 10^{-12} s), ou seja, a formação de estados eletronicamente excitados e processos de transferência de elétrons ocorrem antes do rearranjo espacial dos átomos. Deste modo, a formação de estados eletronicamente excitados será mais favorecida quando a estrutura do estado de

transição for mais próxima da estrutura do produto no estado excitado e consideravelmente diferente da estrutura do produto no estado fundamental. Os requisitos geométricos podem ainda ser corroborados pela Teoria de Marcus para reações de transferência de elétron (**Figura 2**).⁹⁻¹¹ Em uma reação exotérmica comum (**Figura 2A**), a variação de entalpia de ativação ($\Delta H^{\ddagger*}$) correspondente ao estado de transição que leva à formação do produto no estado excitado (P^*) é maior do que a entalpia de ativação ($\Delta H^{\ddagger}$) que leva ao produto no estado fundamental (P). Assim, a formação de P é cineticamente favorecida em relação à formação de seu estado excitado. Em uma reação quimiluminescente (**Figura 2B**), $\Delta H^{\ddagger*}$ é menor do que $\Delta H^{\ddagger}$, e a formação de P^* passa a ser cineticamente favorável. Além disso, observa-se que a distância (d_a) entre as superfícies de energia potencial de R e P^* em uma reação exotérmica não quimiluminescente é maior do que a distância (d_b) entre as superfícies de energia potencial de R e P^* para uma reação quimiluminescente, indicando que uma maior proximidade entre as estruturas de R e P^* favorece a transição eletrônica, aumentando a eficiência de sistemas quimiluminescentes (**Figura 2**).

Figura 2: Diagrama de coordenadas de reação para: (A) uma reação exotérmica comum e (B) uma reação exotérmica quimiluminescente, ilustrando a Teoria de Marcus para reações de transferência de elétrons.

Parâmetros importantes e fundamentais para que se possa quantificar a eficiência de um sistema quimiluminescente são os rendimentos quânticos de quimiluminescência e/ou os rendimentos quânticos singlete e triplete destas transformações.^{7,12} Determina-se Φ a partir da quantidade de fótons emitidos por mol de reagente limitante, e é expresso em Einstein por mol ($E \text{ mol}^{-1}$) (**Equação 1**). O rendimento quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}) é constituído pelo rendimento quântico de formação do estado excitado (rendimento quântico singlete (Φ_S) ou rendimento quântico triplete (Φ_T), dependendo a multiplicidade de spin da espécie excitada) e pelo rendimento quântico de emissão da espécie eletronicamente excitada (rendimento quântico de fluorescência para espécies excitadas singlete (Φ_{FL}) e rendimento quântico de fosforescência (Φ_{FO}) para espécies excitadas triplete) (**Equações 2 e 3**).

$$\varphi_{CL} = \frac{n^{\circ} \text{ de fótons emitidos}}{n^{\circ} \text{ de mols de reagente limitante}} \quad \text{Equação 1}$$

$$\varphi_{CL}^S = \varphi_S \times \varphi_{FL} \quad \text{Equação 2}$$

$$\varphi_{CL}^T = \varphi_T \times \varphi_{FO} \quad \text{Equação 3}$$

O rendimento quântico pode ser fortemente influenciado pela estrutura dos reagentes de partida e também pelas condições reacionais do meio, e fornecem informações relevantes sobre estas reações que contribuem para a elucidação de seus mecanismos.^{7,12} Composto orgânicos cíclicos que possuem ligação peroxídica, como dioxetanos, 1,2-dioxetanonas (ou α -peroxilactonas), peróxido de difenoíla e a 1,2-dioxetanodiona são espécies que, sob determinadas condições reacionais, geram estados excitados e estão envolvidos na elucidação do mecanismo de diversos sistemas quimi e bioluminescentes, através de estudos cinéticos envolvendo suas decomposições, catalisadas ou não, e seus valores rendimento quântico.^{7,13-18}

1.2.1 Decomposição unimolecular de peróxidos cíclicos

A decomposição unimolecular de 1,2-dioxetanos e 1,2-dioxetanonas (α -peroxilactonas) constitui um exemplo de uma reação térmica fortemente exotérmica que leva à formação de uma das moléculas do produto no estado eletronicamente excitado.¹⁹ Aparentemente, este processo ocorre em uma única etapa elementar, em que a clivagem da ligação peroxídica fraca alivia a tensão do anel de quatro membros através de sua abertura. Estes compostos podem ser sintetizados e isolados, permitindo estudos mecanísticos de suas transformações quimiluminescentes para a elucidação do passo de quimiexcitação. Nas décadas de 1970 e 1980, foram sintetizados vários derivados de 1,2-dioxetanos e algumas 1,2-dioxetanonas, e foram determinados seus parâmetros de quimiluminescência na decomposição unimolecular, indicando que estes peróxidos cíclicos levam, principalmente, à formação de estados excitados triplete, com rendimentos quânticos de até 30%, e baixa produção de estados excitados singlete, com rendimentos quânticos menores do que 0,10%.²⁰⁻²⁴ Portanto, os rendimentos quânticos de quimiluminescência (Φ_{CL}) destas transformações são baixos, os estados excitados triplete possuem baixo rendimento quântico de emissão, devido à desativação preferencial por processos não radiativos.

Dois mecanismos extremos foram propostos para a decomposição unimolecular de 1,2-dioxetanos: o mecanismo concertado simultâneo (**Esquema 2**),²⁵ em que o rompimento das ligações O-O e C-C ocorrem simultaneamente, e o mecanismo de birradicalar (**Esquema 2**),^{26,27} em que a ligação peroxídica sofre clivagem, levando à

formação de um birradical que, por fim, leva à formação de um composto carbonílico no estado excitado singlete ou no estado fundamental. Além disso, pode ocorrer um cruzamento entre sistemas (*intersystem crossing*, ISC) e um birradical pode ser gerado em seu estado eletronicamente excitado triplete; conseqüentemente, um composto carbonílico no estado triplete pode ser formado após a ruptura da ligação C-C (**Esquema 2**). Ambos os mecanismos envolvem mudanças na multiplicidade de spin, mas postula-se que o ISC no mecanismo birradicalar é reversível, enquanto parece ser irreversível no mecanismo concertado.²⁸ O mecanismo birradicalar é adequado para explicar os parâmetros de ativação de decomposição de 1,2-dioxetanos,²⁹ no entanto, não é capaz de racionalizar os rendimentos quânticos singlete e triplete. Foi, então, proposto um mecanismo intermediário, em que as rupturas das ligações O-O e C-C são concertadas, mas não ocorrem simultaneamente (**Esquema 2**).³⁰ Este mecanismo mesclado mantém os aspectos cinéticos do mecanismo birradicalar e é capaz de explicar a formação do produto eletronicamente excitado do mecanismo concertado simultâneo, sendo, portanto, capaz de racionalizar os parâmetros de ativação e os rendimentos quânticos de excitação de diferentes 1,2-dioxetanos.

Ainda deve ser mencionado que a decomposição unimolecular de 1,2-dioxetanonas ocorre também com baixíssimos rendimentos quânticos singlete, estados excitados tripletes são formados preferencialmente, embora com rendimentos menores do que na decomposição de 1,2-dioxetanos.³⁶

Esquema 2: Mecanismos de decomposição unimolecular propostos para 1,2-dioxetanos: concertado simultâneo, mezclado e birradicalar.

1.2.2 Decomposição catalisada de peróxidos cíclicos: CIEEL intermolecular

Em 1978, Koo e Schuster propuseram um mecanismo conhecido como *Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence* (luminescência quimicamente iniciada por troca de elétron), o mecanismo CIEEL. Naquela época, o CIEEL foi formulado para explicar a decomposição quimiluminescente do peróxido de difenoíla na presença de DPA^{8,13,31,32} e de algumas 1,2-dioxetanonas sintetizadas e isoladas na presença de ACT.^{14,33-36} A proposta mecanística do CIEEL teve um papel decisivo na racionalização do passo de quimiexcitação de diversas transformações quimiluminescentes e bioluminescentes, incluindo a bioluminescência de vagalumes, o qual apresenta altos rendimentos quânticos.¹³ Posteriormente, o CIEEL intermolecular foi utilizado para explicar a interação do IAE com o ACT no passo de quimiexcitação da reação peroxioxalato.³⁷

Nestes estudos, Schuster e colaboradores verificaram que, na decomposição catalisada destes peróxidos orgânicos, a constante de velocidade obtida para o

decaimento da emissão aumentava proporcionalmente com a concentração do ACT, além disso, os rendimentos quânticos de quimiluminescência também aumentavam. Ensaio cinéticos destes peróxidos realizados na presença de diferentes ACTs, como rubreno, perileno, naftaleno e coroneno, mostraram uma dependência da constante de velocidade observada com o potencial de oxidação destes ativadores. Tal fato evidenciou a ocorrência de um processo de transferência de elétron no passo lento da reação. No primeiro passo deste mecanismo (**Esquema 3**), formulado aqui para uma 1,2-dioxetanona genérica, ocorre a aproximação entre o IAE e o ACT formando um complexo de transferência de carga (K_{TC}) no interior da cavidade do solvente. Ocorre, então, o alongamento da ligação O-O diminuindo a energia do orbital antiligante (σ^*) e favorecendo a transferência de elétron do ativador para o peróxido (k_{TE}), seguido pelo rompimento da ligação peroxídica. Mesmo o rompimento da ligação peroxídica sendo desfavorável energeticamente, sua ruptura favorece a transferência de elétron e este passo se torna irreversível. Forma-se, então, o ânion-radical da 1,2-dioxetanona, o qual sofre clivagem da ligação C-C, liberando uma espécie carbonílica neutra e um novo ânion-radical. O novo par de íons radicais formados pelo ânion-radical da espécie carbonílica e pelo cátion-radical do ACT interagem de modo que ocorra uma retrotransferência de elétron (k_{RTE}) dentro da cavidade de solvente. A partir daí, o ACT é excitado para o estado singleto (S_1) e há liberação do composto carbonílico derivado do ânion-radical. Há emissão de luz por fluorescência proveniente do decaimento do ACT para o estado fundamental (S_0) (**Esquema 3**).⁸ Para que a eficiência deste sistema seja alta, toda a sequência de reação deve ocorrer dentro da cavidade de solvente, se alguma espécie escapar desta cavidade, os rendimentos quânticos de emissão diminuem consideravelmente.

Esquema 3: Interação de uma 1,2-dioxetanona genérica com o ACT no passo de quimiexcitação de acordo com o mecanismo CIEEL intermolecular.

Este mecanismo de quimiexcitação foi aplicado a uma variedade de outros sistemas quimiluminescentes e evidências experimentais acerca deste mecanismo foram reportadas por diversos grupos de pesquisa.⁷ Porém, estudos iniciais da decomposição catalisada do peróxido de difenoíla mostram que a eficiência da geração de estados excitados neste processo havia sido superestimada, tendo sido publicados valores de rendimento quântico várias ordens de magnitude maiores do que aqueles relatados em estudos mais recentes sobre este sistema.¹³ Este fato foi confirmado recentemente e foi mostrado que os rendimentos quânticos na decomposição catalisada de 1,2-dioxetanonas são também consideravelmente menores do que aqueles inicialmente relatados.^{14,15,33,35,36}

1.2.3 Decomposição induzida de peróxidos cíclicos: CIEEL intramolecular

Há uma variação do mecanismo CIEEL que pode gerar estados excitados com eficiência muito maior do que dos sistemas até aqui apresentados, chegando, em alguns casos, a até 100%, é o chamado mecanismo CIEEL intramolecular. A alta eficiência do CIEEL intramolecular se deve ao fato de que a transferência de elétrons para a ligação

peroxídica ocorre a partir de um grupo dentro da mesma molécula. Este tipo de mecanismo ocorre com alguns derivados de 1,2-dioxetano, que contém um grupo interno rico em elétron. Em geral, esta classe de compostos contém o anel de quatro membros com ligação peroxídica como fonte de energia, bem como um fluoróforo, responsável pela emissão de luz, e uma parte da molécula rica em elétrons que pode ser ativada pela ação de um agente químico, atuando como um gatilho. Esta classe de compostos é representada pelos derivados de 1,2-dioxetanos, que são estruturalmente semelhantes ao intermediário de alta energia formado a partir de luciferina de vagalume, o qual foi utilizado como modelo para racionalizar a bioluminescência de sistemas eficientes (**Esquema 4**).³⁸⁻⁴⁰

Esquema 4: Estruturas de 1,2-dioxetanos utilizados como sistemas modelo para elucidar o mecanismo CIEEL intramolecular e bioluminescência de vagalumes.

A decomposição destes 1,2-dioxetanos é iniciada pela desprotonação do fenol, ou desproteção do grupo silil, levando à formação do fenolato do dioxetano. O oxigênio rico em elétrons do fenolato atua como um doador de elétron intramolecular para a ligação peroxídica, levando a sua clivagem (TE, **Esquema 5**). O ânion birradicalar formado sofre clivagem de ligação C-C, gerando um composto carbonila neutro e um novo fragmento de ânion birradical (Cliv., **Esquema 5**). Este ânion birradical pode sofrer uma retrotransferência de elétrons intramolecular, levando à formação do fenolato em seu estado eletronicamente excitado singlete (RTE, **Esquema 5**), que pode retornar para o estado fundamental com emissão de fluorescência, completando o processo de quimiluminescência (**Esquema 5**).³⁸⁻⁴⁰

Esquema 5: Sequência reacional para o mecanismo CIEEL intramolecular.

1.3 O sistema peroxioxalato

A quimiluminescência da reação peroxioxalato foi primeiramente descrita por Edwin A. Chandross em 1963, quando trabalhava na *Bell Telephone Laboratories*, ao observar a emissão de uma intensa luz azul proveniente da reação entre cloreto de oxalila e peróxido de hidrogênio na presença de compostos fluorescentes, como o antraceno, 9,10-difenilantraceno e *N*-metilacridona.⁶ Rauhut e colaboradores estudaram esta transformação utilizando ésteres oxálicos com substituintes aromáticos na presença de peróxido de hidrogênio, um catalisador básico e um composto aromático fluorescente com baixo potencial de oxidação, denominado ativador (ACT) (**Esquema 6**).⁴¹ Rauhut e colaboradores foram os primeiros a propor um mecanismo geral para a reação peroxioxalato, o qual envolve a formação de um intermediário de alta energia (IAE), que interage com o ACT no passo quimiexcitação, onde a energia química desta transformação é convertida em energia de excitação eletrônica.⁴² Estes autores já postularam processos de transferência elétrons ou de carga entre IAE e o ACT como os responsáveis pela formação do estado excitados singlete do ACT, de acordo com o mecanismo CIEEL intermolecular (*Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence*) postulado por Schuster para a decomposição catalisada de determinados peróxidos cíclicos isolados.^{14,15} Outros mecanismos semelhantes foram propostos mais recentemente.⁴³⁻⁴⁶ A quimiluminescência do sistema peroxioxalato é a mais eficiente entre as transformações não enzimáticas que ocorrem via CIEEL intermolecular, ou

mecanismo equivalente, com rendimentos quânticos de até 50% em condições experimentais favoráveis.^{7,16,47-49}

Esquema 6: A reação peroxioxalato entre um éster oxálico com substituinte aromático e H₂O₂ na presença de uma base e de um ACT, levando à emissão de luz.

1.3.1 Estudos mecanísticos da reação peroxioxalato

Estudos cinéticos sobre a reação peroxioxalato foram realizados em diferentes condições experimentais. Stevani e colaboradores estudaram a reação de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) com peróxido de hidrogênio, catalisada por imidazol (Imi-H), na presença de 9,10-difenilantraceno (DPA), como o ACT, em acetato de etila, e as constantes de velocidade determinadas para os vários passos reacionais. A cinética desta reação pode ser estudada observando-se a intensidade da luz emitida na presença do ativador ou por UV-vis através do monitoramento do aumento da absorbância devido à formação do fenol, proveniente do éster oxálico, em um comprimento de onda adequado e na ausência de ativador. Estes estudos permitiram elucidar todas as etapas desta transformação complexa, identificando quais delas são lentas e determinantes da sua velocidade.^{47,50, 51}

Foi possível verificar que a primeira etapa deste processo consiste no ataque nucleofílico do Imi-H à carbonila do TCPO, para a formação do intermediário 1,1'-oxalildiimidazolidico, este ataque é auxiliado por outra molécula de Imi-H, através de uma catálise básica do próprio Imi-H, indicando que a reação é de 2ª ordem em relação ao imidazol e caracterizando seu papel como catalisador básico e nucleofílico (**Esquema 7 (1)**).⁵¹⁻⁵³ Esta etapa pode ser observada de duas maneiras: (i) nos ensaios de emissão, é o passo correspondente ao decaimento da intensidade emissão; (ii) nos ensaios de absorção, monitorando o aumento da absorbância devida à liberação do

2,4,6-triclorofenol (TCP) proveniente do TCPO. O segundo passo da reação (**Esquema 7 (2)**) corresponde ao ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio ao intermediário oxalildiimidazolidico, formando o intermediário perácido. Esta etapa também é catalisada por imidazol, porém, há o envolvimento de apenas uma molécula de Imi-H, ou seja, o Imi-H auxilia o ataque do peróxido à 1,1'-oxalildiimidazolidina através de uma catalise básica. Na terceira etapa do processo (**Esquema 7 (3)**), ocorre a ciclização do perácido, formando o intermediário de alta energia (IAE), formulado aqui como a 1,2-dioxetanodiona. A reação do IAE com o ativador (ACT) no passo de quimiexcitação (**Esquema 7 (4)**) através do mecanismo CIEEL intermolecular, libera energia suficiente para a formação do ativador no estado eletrônico excitado singlete e de duas moléculas de dióxido de carbono (**Esquema 7 (4)**).

Esquema 7: Etapas reacionais do sistema peroxioxalato para a reação entre TCPO, H_2O_2 , Imi-H e DPA como ACT em acetato de etila. Nestas condições, verificou-se que o imidazol atua como catalisador básico e nucleofílico.^{51,52}

Foi possível verificar, portanto, que nessas condições o imidazol atua como catalisador básico e nucleofílico.⁵¹⁻⁵³ No entanto, também foi verificado que concentrações crescentes de imidazol levam a uma diminuição drástica nos rendimentos

quânticos de emissão, devido à interação desta base com o IAE, levando a sua decomposição sem emissão de luz.

1.3.3 O sistema peroxioxalato e o intermediário de alta energia

Estudos envolvendo a natureza do intermediário de alta energia (IAE) do sistema peroxioxalato foram fundamentais para o entendimento do mecanismo desta transformação. Desde sua descoberta por Chandross em 1963,⁶ esforços foram feitos com a finalidade de se detectar e caracterizar o intermediário de alta energia.^{41,50} Sabe-se que esta transformação apresenta um mecanismo bastante complexo, ocorrendo em várias etapas, e que a velocidade da reação depende tanto da concentração do peróxido de hidrogênio como da concentração do catalisador do sistema, já que estes estão envolvidos nos passos lentos da reação. Entretanto, a concentração do ativador (ACT) não afeta a velocidade da reação, uma vez que o passo de quimiexcitação, correspondente à interação do IAE com o ACT, não é um passo determinante para a velocidade da reação.⁷

Após diversos estudos acerca da reação entre cloreto de oxalila e peróxido de hidrogênio, Rauhut e colaboradores⁵⁴ propuseram uma rota de formação do IAE, bem como sua possível estrutura, a qual foi postulada como sendo um derivado de perácido (**1**) possuindo alto conteúdo energético levando à formação de estados excitados responsáveis pela emissão de luz. Rauhut e colaboradores mostraram, em estudos posteriores com anidridos oxálicos, que outros possíveis IAE para esta reação seriam **2** e **3**, este último uma 1,2-dioxetanodiona formada pela liberação de uma molécula de HCl de **2** (**Esquema 8**).^{55,56} Postulou-se, então, que se forma de fato um IAE e este possui conteúdo energético suficiente para, ao se fragmentar, levar à formação de moléculas no estado eletronicamente excitado.⁵⁷

Esquema 8: Reação entre cloreto de oxalila e peróxido de hidrogênio e a formação do IAE proposto por Rauhut.⁵⁴

Para evidenciar a formação deste IAE, Rauhut *et al.*⁴² fizeram ensaios em que o ativador era adicionado ao sistema de forma retardada, ou seja, após um intervalo de tempo em que todos os reagentes já haviam sido misturados, este intervalo de tempo foi de até 70 minutos. Observou-se emissão de luz no sistema logo após a adição do ACT, indicando que um IAE foi formado logo após a mistura de todos os reagentes e foi se acumulando no meio, e seu consumo ocorrendo apenas após a adição em retardo do ativador. Em experimentos com o oxalato de bis(2,4-dinitrofenol) (DNPO) em dimetilftalato, o grupo de Rauhut passou um fluxo de gás por esta reação com a finalidade de detectar um possível IAE volátil que pudesse reagir com o ACT em outro recipiente. Observou-se luz, porém, tentativas de identificar o IAE por infravermelho e espectrometria de massas fracassaram, detectando apenas CO₂, o produto final desta reação.⁴²

Estudos posteriores ainda visando à identificação estrutural do IAE da reação peroxioxalato foram feitos. Cordes *et al.* realizaram a mesma reação que Rauhut, mas com um arranjo experimental diferente, conseguindo detectar um pico com $m/z = 88$, o qual corresponderia à massa da 1,2-dioxetanodiona. Posteriormente, De Corpo *et al.* verificaram que o pico de razão $m/z = 88$ correspondia ao íon C₂O₄⁺ e não houve evidências experimentais da formação da 1,2-dioxetanodiona como IAE desta reação.^{58,59}

Mesmo sem evidências que comprovassem a formação da 1,2-dioxetanodiona como IAE desta reação, Orosz e colaboradores ao realizar ensaios com DNPO e

peróxido de hidrogênio na presença de rubreno como ativador puderam comprovar a liberação de dióxido de carbono por absorção no infravermelho com banda característica em 2336 cm^{-1} . Além disso, estudos também indicaram que o mesmo intermediário de alta energia é formado na reação com cloreto de oxalila e peróxido de hidrogênio e na reação de ésteres oxálicos com peróxido de hidrogênio, indicando que a 1,2-dioxetanodiona poderia ser o IAE para estas transformações.⁶⁰ Diante deste cenário, em que nenhuma evidência direta foi encontrada para confirmar a formação da 1,2-dioxetanodiona como IAE, Stevani *et al.* realizaram a síntese e caracterização de um derivado de perácido oxálico, *O,O*-hidrogênio monoperoxioxalato de 4-clorofenila (**4**). Estudos cinéticos com este intermediário da reação peroxioxalato mostraram que esta espécie não reage diretamente com 9,10-difenilantraceno (DPA) na ausência de uma base. Ao adicioná-la, porém, há uma intensa emissão de luz, o que indica certamente que **4** não é um IAE deste sistema, mas que há o envolvimento de um intermediário perácido oxálico no percurso da reação.⁶⁰ Reações peroxioxalato fotoinduzidas levaram a crer que o IAE poderia ser um peróxido cíclico complexo (**6**) para a reação peroxioxalato,⁶¹ e Hadd *et al.* propuseram um IAE **5** proveniente da reação entre TCPO e peróxido de hidrogênio e que seria convertido na 1,2-dioxetanodiona.⁶²

Bos *et al.*, utilizando métodos espectroscópicos, conseguiram, aparentemente, comprovar a 1,2-dioxetanodiona como IAE do sistema peroxioxalato.⁶³ Eles fizeram ensaios com cloreto de oxalila duplamente marcado com ^{13}C , peróxido de hidrogênio e DPA em THF anidro monitorados por espectroscopia RMN de ^{13}C a baixas

temperaturas. Foi observado um pico em 154,5 ppm, o qual foi atribuído à 1,2-dioxetanodiona e que cálculos teóricos também evidenciavam este resultado; outros picos correspondentes ao CO e CO₂ também foram detectados.

Com as evidências experimentais indicando que a 1,2-dioxetanodiona é o possível IAE da reação peroxioxalato, pode-se formular o mecanismo CIEEL intermolecular para este sistema de maneira análoga àquela postulada para a 1,2-dioxetanona (**Esquema 9**).⁴⁸

Esquema 9: Interação da 1,2-dioxetanodiona com o ACT no passo de quimiexcitação da reação peroxioxalato de acordo com o mecanismo CIEEL intermolecular.

1.4 Aplicações analíticas e bioanalíticas da quimiluminescência do sistema peroxioxalato

A quimiluminescência da reação peroxioxalato vem sendo amplamente utilizada como sistema de detecção em diversos sistemas de análise, tais como cromatografia líquida, eletroforese capilar e análises por injeção em fluxo,⁶⁴ os quais se mostraram altamente sensíveis para a detecção de peróxido de hidrogênio produzido em reações enzimáticas, de compostos fluorescentes e outras moléculas de interesses biológico e medicinal.⁶⁵⁻⁶⁹

Trabalhos recentes mostraram que a reação peroxioxalato em meios micelares, de micelas reversas e microemulsões pode ser utilizada como uma técnica altamente sensível. Esta metodologia permite a detecção de compostos fluorescentes e de interesse biológico, tais como ácido ascórbico e rodamina B, em concentrações na ordem de nanomolar.⁶⁸ Ainda no que diz respeito a meios contendo micelas, foram estudados

também o comportamento cinético dos ésteres oxalato de bis(4-nitrofenila) e oxalato de bis(pentaclorofenila) na reação com peróxido de hidrogênio em um meio aquoso micelar, estes ensaios apresentaram altos rendimentos quânticos, mostrando que meios micelares influenciam na eficiência da reação. A quimiluminescência deste sistema pode ser utilizada no desenvolvimento de outros sistemas medicinais que permitam inserir ácidos nucleicos dentro de células *in vivo*.⁷⁰ Nos casos em que se usa o sistema peroxioxalato acoplado a cromatografia líquida e eletroforese capilar, é possível detectar compostos fluorescentes como aminoácidos, ácidos carboxílicos, compostos carbonílicos e catecolaminas, entre outros.⁷¹ A detecção de peróxido de hidrogênio pôde ser feita em diversas condições reacionais, e também pode ser utilizada em diversos sistemas que produzem ou consomem o peróxido de hidrogênio.^{64,72-74}

Um exemplo mais específico do ponto de vista de aplicações diz respeito ao uso da 1,1'-oxalildiimidazolida e da 1,1'-oxalildi-4-metilimidazolida no lugar de ésteres oxálicos na quimiluminescência da reação peroxioxalato, bem como o efeito do uso de alguns derivados do imidazol como catalisadores nucleofílicos na quimiluminescência deste sistema. O uso da 1,1'-oxalildi-4-metilimidazolida neste sistema permite a obtenção de intensidades máximas de emissão de luz maiores e tempos de reação mais curtos quando comparada ao sistema utilizando TCPO.⁷⁵ Uma das aplicações para esta metodologia é a quantificação de 1-aminopireno, composto de grande importância na química ambiental.⁷⁵ Ainda do ponto de vista da química analítica ambiental, outra possível aplicação da quimiluminescência do sistema peroxioxalato diz respeito à determinação da concentração de hipoclorito em água de torneira, através de uma nova metodologia envolvendo um sistema por análise em fluxo. Neste caso, é feita uma análise de qual solvente é mais apropriado nestes sistemas de fluxo, bem como quais

são as concentrações mais adequadas de cada reagente, a estrutura do ativador e outros parâmetros com a finalidade de se aperfeiçoar esta técnica.⁷⁶

Em termos de aplicações bioquímicas e biomédicas, Albrecht *et al.* desenvolveram um método analítico, utilizando ácidos oxálicos como reagente sob determinadas condições experimentais, altamente sensível que permite detectar oxalato nos fluidos e nas células humanas. Foi possível determinar concentração de oxalato da ordem de 200 nmol L⁻¹. Usando este método, foi possível descobrir que o nível médio de oxalato no plasma humano pode ser de até (14,5±8,5) µmol L⁻¹. Com este método também foi possível determinar as quantidades intracelulares de oxalatos nos eritrócitos e trombócitos, entre outras.⁷⁷⁻⁷⁹

A utilização de nanopartículas e *quantum dots* em conjunto com a reação peroxioxalato foi expandido, a fim de se determinar analitos de diversos interesses comerciais e ambientais e um vasto número de compostos farmacêuticos.⁶⁹ Um trabalho mais recente mostra a utilização de CdS na quimiluminescência da 1,1'-oxalildiimidazolida formada em diversas condições experimentais, em que o CdS pode aumentar o rendimento da formação do intermediário de alta energia, capaz de transferir energia para moléculas fluorescentes.⁸⁰ Neste trabalho, os autores mostram o efeito da polaridade do solvente na quimiluminescência da 1,1'-oxalildiimidazolida na presença e na ausência de CdS; e mostram que compostos como rodamina 101, rodamina 123 e 1-aminoantraceno podem aumentar ainda mais a intensidade da emissão de luz. Além disso, este sistema pode ser utilizado na detecção de glicose no plasma humano com limites de detecção da ordem de micromolar.⁸⁰

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho consiste em estudar o comportamento de diferentes catalisadores frente ao sistema peroxioxalato e compará-los aos resultados já conhecidos quando se usou imidazol como catalisador desta reação; e adaptá-la a meios aquosos visando futuras aplicações analíticas e bionanalíticas.

Uma das frentes da pesquisa visa elucidar o mecanismo desta reação utilizando salicilato de sódio em substituição ao imidazol (Imi-H) nesta transformação. As cinéticas foram realizadas inicialmente com oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO), peróxido de hidrogênio e 9,10-difenilantraceno (DPA) como ativador em um meio puramente orgânico, utilizando acetato de etila como solvente. A continuidade dos estudos da reação peroxioxalato com salicilato de sódio como catalisador foi feita utilizando-se o oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO).

Visa-se ainda adaptar o sistema peroxioxalato ao meio aquoso para futuras aplicações analíticas e bioanalíticas. A reação foi estudada, inicialmente, com o oxalato de bis(4-metilfenila) (BMePO) na presença de peróxido de hidrogênio e 2,5-difeniloxazol (PPO) como ativador na faixa de pH 6 a 8. Estudos posteriores foram realizados com o oxalato de bis(4-metoxifenila) (BMPO) e a reatividade destes ésteres comparadas frente a um meio aquoso tamponado.

Novos estudos utilizando salicilato de sódio como catalisador em meio aquoso dão continuidade aos estudos mecanísticos em meio aquoso iniciados com tampão fosfato. Nestes ensaios, utilizou-se TCPO, peróxido de hidrogênio, salicilato e fluoresceína (FLU) como ACT.

3. Parte Experimental

3.1 Reagentes e solventes

Entre os ésteres oxálicos utilizados nos ensaios cinéticos, o TCPO foi obtido comercialmente (Sigma, $\geq 99\%$) e recristalizado em uma mistura de clorofórmio/hexano na proporção 14:5 (v/v); o DNPO foi obtido comercialmente (Sigma Aldrich) e utilizado sem prévia purificação. Os ésteres BMePO e BMPO foram sintetizados anteriormente pelo grupo de pesquisa a partir do cloreto de oxalila (Sigma Aldrich, 99%; destilado sob atmosfera inerte, PE = 63°C; as frações utilizadas na síntese foram recolhidas a 60°C) e dos fenóis *p*-metilfenol (Aldrich, $\geq 98\%$) e *p*-metoxifenol (Aldrich, $\geq 98\%$) de acordo com o procedimento descrito na literatura.^{42,81} Os reagentes 2,5-difeniloxazol (PPO, Janssen Chimica, 99%), 9,10-difenilantraceno (DPA, Aldrich), rubreno (RUB, Aldrich), 2,4,6-triclorofenol (TCP, Aldrich, 98%), imidazol (Imi-H, Fluka, $\geq 99,5\%$), salicilato de sódio (Sigma Aldrich, $\geq 99,5\%$), peroxidase de raiz forte HRP-VI (Sigma, *hydrogen-peroxidase oxidoreductase*, tipo VI-A), luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona, Sigma Aldrich, 97%), hemina (cloreto de ferriprotoporfirina IX, Sigma Aldrich), peróxido de hidrogênio solução aquosa 60% (m/m) (Solvay Peróxidos do Brasil Ltda.), hidróxido de tetrabutilamônio (TBAOH, Fluka 40%), ácido fosfórico (H_3PO_4 , Synth, 85%), fosfato de sódio dibásico heptaidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Synth), fosfato de sódio tribásico dodecaidratado ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Synth), benzofenona (Velsicol), iodeto de potássio (Synth), fluoresceína (FLU, Aldrich) e sódio metálico (Fluka) foram obtidos comercialmente e utilizados sem prévia purificação.

Os solventes 1,2-dimetoxietano (DME, Aldrich 99,5%) e acetato de etila (EtOAc, Synth) foram submetidos a um tratamento específico de modo a torná-los anidro. O acetato de etila foi inicialmente tratado com cloreto de cálcio anidro durante a

noite e filtrado no dia seguinte. Ao filtrado, adicionou-se hidróxido de potássio sólido (Synth, 85%) e foi mantido sob agitação durante 40 minutos em banho de gelo. Filtrou-se novamente o solvente e destilou-se, mantendo o destilado com peneira molecular de 4Å (Sigma Aldrich) durante a noite. No dia seguinte, filtrou-se o solvente e foi feita uma destilação final sob atmosfera inerte de gás nitrogênio, o destilado foi mantido com peneira molecular de 4Å. O DME foi submetido à destilação e, ao destilado, adicionaram-se fios de sódio, deixou-se o solvente refluxando e, posteriormente, adicionou-se benzofenona com o solvente a quente. Este foi submetido a novo refluxo e, quando adquiriu uma coloração azul intensa, indicando que o meio está anidro, destilou-se o solvente novamente, estando pronto para ser utilizado nos ensaios cinéticos. O clorofórmio (Synth) e o hexano (Synth) utilizados na recristalização do TCPO também foram submetidos a tratamentos específicos. O hexano foi destilado e ao destilado foram adicionados fios de sódio. Realizou-se uma nova destilação e, então, o solvente estava pronto para uso. O clorofórmio foi tratado com carbonato de sódio, a mistura foi mantida em repouso durante a noite. No dia seguinte, foi realizada uma filtração e, então, ao filtrado foi adicionado EDTA dissódico e a mistura mantida sob agitação durante duas horas. Após nova filtração, o clorofórmio foi mantido sob refluxo com pentóxido de fosforo durante 30 minutos e, então, destilou-se a mistura, obtendo-se clorofórmio anidro.

3.2 Soluções estoque

As soluções estoque dos ésteres TCPO, DNPO utilizadas nos ensaios cinéticos de emissão com salicilato de sódio como catalisador, em meios puramente orgânicos, e nos espectros de absorção foram preparadas em acetato de etila anidro, assim como as soluções estoque de DPA, RUB e TCP. As soluções de BMPO e BMePO foram

preparadas sempre em DME anidro. O modo de preparo das demais soluções será descrito nas seções a seguir, bem como as concentrações finais de cada reagente utilizadas nos ensaios de emissão e espectros de absorção. O preparo das soluções tampão de fosfato de tetrabutylamônio (TBAP), ajuste de pH e concentrações finais será descrito detalhadamente na seção 3.5.

3.2.1 Preparo das soluções de peróxido de hidrogênio e determinação da concentração

As soluções de peróxidos de hidrogênio preparadas em DME para os ensaios cinéticos realizados com tampão fosfato, e em acetato de etila para os ensaios utilizados salicilato de sódio em meio orgânico foram feitas a partir da diluição de 1,0 mL da solução aquosa de peróxido 60% (m/m) em 20,0 mL de solvente orgânico resultando em uma solução estoque com concentração de aproximadamente $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A secagem foi feita através da adição de MgSO_4 anidro à solução, a qual foi mantida à 4°C durante quatro horas. Posteriormente, filtrou-se a solução e a concentração exata da solução estoque foi determinada espectrofotometricamente em 353 nm ($\epsilon_{353\text{nm}} = 2,55 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) através do ensaio iodométrico de acordo com o procedimento proposto por Cotton & Dunford.⁸² A uma cubeta de quartzo de com caminho óptico de 10,0 mm adicionou-se 3,0 mL de uma solução de iodeto de potássio em tampão ácido acético/acetato de sódio pH 3,8; 10,0 μL de enzima HRP e 5,0 μL da solução de estoque de peróxido de hidrogênio. Neste método, a quantidade de iodeto oxidado é proporcional à concentração de peróxido, cuja concentração se obtém diretamente pela absorbância em 353 nm da espécie I_3^- formada.

Para os ensaios em meio aquoso utilizando salicilato de sódio como catalisador, a solução estoque de peróxido de hidrogênio foi preparada a partir da diluição de 2,0 mL do peróxido 60% e (m/m) em 20,0 mL de água Milli-Q com concentração de aproximadamente $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. A determinação de sua concentração foi feita de maneira análoga à descrita acima.

3.3 Equipamentos

Os ensaios cinéticos de emissão de luz das reações de TCPO e DNPO foram realizados em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse com fotomultiplicadora Hamamatsu com *cell holder*, com agitação magnética e termoestatizado a $(25,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ por um banho Varian Cary PCB 150. Para os ensaios cinéticos de determinação dos parâmetros de ativação, este mesmo banho foi utilizado em diferentes temperaturas. A sensibilidade da fotomultiplicadora foi ajustada regulando-se a voltagem do equipamento e a abertura da fenda de emissão. Os ensaios cinéticos com BMePO e BMPO, com intensidades de emissão mais baixas foram realizados em um Luminômetro Berthold Sirius.

Os espectros de absorção foram registrados em um espectrofotômetro UV-Visível Varian Cary 50 Probe com *cell holder* para 18 cubetas, termoestatizado por um banho Varian Cary PCB 150 a $(25,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

As medidas de pH das soluções tampão foram feitas em um pHmetro Metrohm 827 Lab.

3.4 Espectros de absorção dos ésteres oxálicos, fenóis e salicilato de sódio

Foram registrados os espectros de absorção do salicilato de sódio, TCPO e do TCP. As soluções estoque de TCPO ($12,0 \text{ mmol L}^{-1}$), de TCP ($12,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e salicilato de sódio ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) foram preparadas em acetato de etila anidro. Em uma cubeta de

quartzo para absorção foram colocados 50,0 μL da solução estoque de TCPO e o volume completado com até 3,0 mL com acetato de etila anidro, sua concentração final foi de 0,20 mmol L^{-1} e registrou-se o espectro. O espectro de absorção do TCP foi obtido através da adição de 50,0 μL da solução estoque de TCP a uma cubeta de absorção e o volume completado até 3,0 mL com acetato de etila anidro, sendo sua concentração final igual a 0,20 mmol L^{-1} . O espectro do salicilato de sódio foi obtido a partir da adição de 100 μL da solução estoque e o volume completado com acetato de etila até 3,0 mL, sua concentração final foi de 0,080 mmol L^{-1} .

O espectro do BMePO foi registrado em mistura binária DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v); preparou-se uma solução estoque do éster em DME anidro com concentração igual a 8,0 mmol L^{-1} . Injetou-se em uma cubeta de quartzo para absorção, com 10,0 mm de caminho óptico e 3,0 mL de volume total, 40,0 μL da solução estoque deste éster, 1,50 mL de água Milli-Q e 1,46 mL de DME. O volume final da solução dentro da cubeta foi igual a 3,0 mL, e a concentração final de BMePO igual a 0,10 mmol L^{-1} . Para a obtenção do espectro de TCPO registrado neste sistema binário, foi feita uma solução estoque deste éster na concentração de 3,0 mmol L^{-1} em DME anidro. A aquisição do espectro foi feita através da adição 100 μL da solução estoque do éster à cubeta de absorção e volume final foi completado para 3,0 mL através da adição de 1,40 mL de DME e 1,50 mL de água Milli-Q, sendo a concentração final da solução de TCPO igual a 0,10 mmol L^{-1} . Preparou-se uma solução estoque de Imi-H em DME (75,0 mmol L^{-1}) e adicionou-se 40,0 μL desta solução à cubeta onde foram registrados os espectros de BMePO e TCPO em DME/ H_2O 1:1 (v/v) para o monitorar o surgimento da banda dos respectivos fenóis.

A solução estoque de salicilato de sódio foi preparada em água Milli-Q com concentração de 10,0 mmol L^{-1} e a uma cubeta de quartzo para absorção adicionou-se

1,50 mL de DME anidro, 30,0 μL da solução estoque de salicilato de sódio e completou-se o volume para 3,0 mL com água Milli-Q, de modo que a concentração final de salicilato foi de 0,10 mmol L^{-1} e a proporção final DME/ H_2O fosse 1:1 (v/v).

Foram registrados os espectros de absorção do DNPO puro e deste éster com concentrações crescentes de Imi-H. Foram preparadas soluções estoque de DNPO com concentração 6,0 mmol L^{-1} e Imi-H com concentração 75,0 mmol L^{-1} . Em uma cubeta de quartzo para absorção, caminho óptico de 10,0 mm e volume total de 3,0 mL, foram adicionados 15,0 μL da solução estoque de DNPO e o volume completado com EtOAc até 3,0 mL com EtOAc anidro, sua concentração final foi de 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e registrou-se o espectro do éster puro. A aquisição dos espectros do DNPO em sua reação com Imi-H, se deu a partir da adição de 15,0 μL da solução estoque de DNPO e 40,0; 80,0; 200; 400; 800 e 2000 μL da solução estoque de Imi-H, resultando em concentrações finais do Imi-H iguais a 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; e 50,0 mmol L^{-1} , respectivamente.

3.5 Ensaios cinéticos de emissão

3.5.1 Ensaios cinéticos para a reação de TCPO e H_2O_2 utilizando salicilato de sódio como catalisador

Nos ensaios de emissão da reação peroxioxalato, utilizando o oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) como éster oxálico, com o salicilato de sódio como catalisador foi estudada a influência que tanto esta base quanto o peróxido de hidrogênio podem exercer na velocidade desta reação. Com esta finalidade, foram realizados ensaios de emissão em que se variou a $[\text{H}_2\text{O}_2]$, e ensaios variando-se a $[\text{salicilato}]$, mantendo-se constantes as concentrações dos demais reagentes. As soluções estoque de TCPO (12,0 mmol L^{-1}), salicilato de sódio (15,0 mmol L^{-1}), DPA (10,0 mmol L^{-1}) e H_2O_2 (1,0 mol L^{-1}) foram preparadas em EtOAc anidro.

Nos ensaios em que se variou a $[H_2O_2]$, foram adicionados a uma cubeta de quartzo para fluorescência, 60,0 μL da solução estoque de DPA, 1,0 mL da solução estoque de salicilato de sódio, de 3,0 a 750 μL da solução estoque de peróxido de hidrogênio e o volume final dentro da cubeta foi completado para 2,975 mL com EtOAc. A concentração final de DPA foi igual a 0,20 mmol L⁻¹ e se variou a $[H_2O_2]$ de 1,0 até 250 mmol L⁻¹. Além disso, estes ensaios foram feitos em diferentes situações, em que foi analisado o comportamento do sistema em três concentrações de salicilato de sódio (5,0 mmol L⁻¹, 1,0 mmol L⁻¹ e 0,30 mmol L⁻¹). Em todos os casos, a reação foi iniciada após a adição de 25,0 μL da solução estoque de TCPO, com concentração final de 0,10 mmol L⁻¹.

Os ensaios em que se variou a [salicilato] foram realizados de maneira análoga aos ensaios com variação da $[H_2O_2]$. Neste caso, as concentrações finais de H_2O_2 e DPA foram fixadas em 10,0 mmol L⁻¹ e 0,20 mmol L⁻¹, respectivamente, o volume de salicilato de sódio adicionado foi de 100 a 2000 μL , correspondente a uma faixa de concentração de 0,50 até 10,0 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada juntamente com a aquisição de dados a partir da injeção de 25,0 μL da solução estoque de TCPO, com concentração final de 0,10 mmol L⁻¹.

Em todos os referidos ensaios cinéticos a sensibilidade da fotomultiplicadora foi ajustada em 600 V e fenda de 20 nm. Nestes ensaios, o volume final de solução na cubeta foi de 3,0 mL.

3.5.2 Ensaios cinéticos de injeção em retardo de H_2O_2 na reação peroxioxalato com salicilato de sódio como catalisador

As soluções estoque dos reagentes TCPO, DPA, salicilato de sódio e peróxido de hidrogênio foram preparadas em EtOAc anidro. A solução estoque de TCPO foi

preparada com concentração final igual a $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a solução estoque de DPA foi preparada na concentração final de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$; solução estoque de H_2O_2 com concentração final de aproximadamente $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e a solução estoque de salicilato de sódio foi preparada com concentração final igual a $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Os ensaios com a injeção em retardo de H_2O_2 foram realizados em diversas condições experimentais. A primeira delas consistiu em se fixar as concentrações finais de salicilato de sódio e peróxido de hidrogênio em $1,0$ e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. A uma cubeta de quartzo para fluorescência injetou-se $1700 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de salicilato de sódio, com concentração final de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $40,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de DPA, com concentração final igual a $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ e completou-se o volume final da cubeta para $1,975 \text{ mL}$ com EtOAc. O início da reação e da aquisição de dados se deu a partir do momento em que se injetou de $25,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de TCPO, resultando em uma concentração final de $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. A adição em retardo de $2,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de H_2O_2 , com concentração final de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, foi feita nos tempos $t = 0; 1,0; 2,0; 5,0$ e 10 minutos após o início da reação, sendo que, quando $t = 0$, a adição peróxido foi feita juntamente com a dos demais reagentes. Este mesmo procedimento foi realizado na condição com $[\text{salicilato}] = [\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e na condição com $[\text{salicilato}] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Realizou-se também ensaios de injeção retardada de H_2O_2 com $t = 2,0 \text{ min}$ a partir do início da reação variando-se a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ de $1,0$ até $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Estes ensaios foram feitos de forma análoga aos descritos anteriormente, com a exceção de que a solução estoque de salicilato de sódio foi preparada na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Além disso, injetou-se na cubeta $400 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de salicilato e volumes de $2,0$ a $20,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de H_2O_2 .

Em todas as condições aqui descritas, os ensaios quimiluminescentes foram realizados em triplicata e em 600 V e fenda de 20 nm. Além disso, o volume final de solução na cubeta foi de 2,0 mL.

3.5.3 Ensaios de emissão com variação da concentração de ativador para a reação de TCPO e H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio

Os ensaios foram realizados variando-se a concentração de ACT e mantendo as concentrações dos demais reagentes constantes, os ACTs utilizados nestes ensaios foram DPA e RUB. As soluções estoque de TCPO, H₂O₂, salicilato de sódio, DPA e RUB foram preparadas em EtOAc com concentrações iguais a 8,0; 1,0; 5,0; 10,0 e 2,0 mmol L⁻¹, respectivamente. Os ensaios cinéticos em que se variou a concentração de ACT foram realizados em diversas condições experimentais, com diferentes concentrações de salicilato. Para cada uma das concentrações de salicilato a seguir, 0,10; 1,0 e 10,0 mmol L⁻¹, variou-se a [DPA] de 0,10 até 2,0 mmol L⁻¹; e nas concentrações de salicilato iguais a 0,10; 1,0 e 5,0 mmol L⁻¹ variou-se [RUB] de 0,10 até 1,0 mmol L⁻¹. Em todas as condições, as concentrações de H₂O₂ e TCPO foram mantidas em 2,0 e 0,10 mmol L⁻¹, respectivamente.

Nos ensaios em que se variou a [DPA] de 0,10 até 2,0 mmol L⁻¹ e se fixou a [salicilato] em 0,10 mmol L⁻¹ foram adicionados a uma cubeta de quartzo para fluorescência com 10,0 mm de caminho óptico e 3,0 mL de volume total, 4,0 µL da solução estoque de H₂O₂, resultando em uma concentração final de 2,0 mmol L⁻¹; 40,0 µL da solução estoque de salicilato, e 20,0 a 400 µL da solução estoque de DPA, o volume foi ajustado para 1,975 mL com EtOAc. A reação foi iniciada após a adição de 25,0 µL da solução estoque de TCPO, resultando em uma concentração final igual a 0,10 mmol L⁻¹. Os ensaios em que se fixou a [salicilato] em 1,0 e 10,0 mmol L⁻¹, foram

realizados de maneira análoga à já descrita, porém, os volumes adicionados da solução estoque de salicilato foram de 400 e 1300 μL , respectivamente, sendo que a solução estoque correspondente a este último volume foi preparada na concentração de 15,0 mmol L^{-1} .

Nos ensaios em que se variou a $[\text{RUB}]$ de 0,10 até 1,0 mmol L^{-1} e se fixou a $[\text{salicilato}]$ em 0,10 mmol L^{-1} foram adicionados a uma cubeta de quartzo para fluorescência com 10,0 mm de caminho óptico e 3,0 mL de volume total, 4,0 μL da solução estoque de H_2O_2 , resultando em uma concentração final de 2,0 mmol L^{-1} ; 40,0 μL da solução estoque de salicilato e 100 a 1000 μL da solução estoque de RUB, o volume foi ajustado para 1,975 mL com EtOAc. A reação foi iniciada após a adição de 25,0 μL da solução estoque de TCPO, resultando em uma concentração final igual a 0,10 mmol L^{-1} . Os ensaios em que se fixou a $[\text{salicilato}]$ em 1,0 e 5,0 mmol L^{-1} , foram realizados de maneira análoga à já descrita, porém, os volumes adicionados da solução estoque de salicilato foram de 400 e 1000 μL , respectivamente, sendo que a solução estoque correspondente a este último volume foi preparada na concentração de 10,0 mmol L^{-1} . Em todos os casos o volume final de solução na cubeta foi de 2,0 mL.

3.5.4 Ensaios com variação na temperatura para a reação peroxioxalato utilizando salicilato de sódio como catalisador

As soluções estoque de cada reagente foram preparadas da mesma maneira que nos ensaios descritos anteriormente. Estes ensaios foram realizados nas seguintes condições experimentais: (i) $[\text{salicilato}] = [\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (ii) $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (iii) $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Em todas as condições apresentadas, as concentrações finais de TCPO e DPA foram sempre iguais a 0,10 e 0,20 mmol L^{-1} , respectivamente, com a sensibilidade da

fotomultiplicadora ajustada em 600 V e fenda de 20 nm. Além disso, a adição dos reagentes à cubeta foi feita de maneira análoga a dos ensaios descritos anteriormente. Após a mistura de reagentes nas concentrações desejadas, o início da reação e da aquisição de dados também se deu a partir do momento em que se injetou TCPO à cubeta. O intervalo de temperatura utilizado em cada condição foi de 10,0 a 40,0°C, com volume final na cubeta igual a 2,0 mL.

3.5.5 Ensaios cinéticos para a reação de DNPO e H₂O₂ utilizando salicilato de sódio como catalisador

Foram preparadas soluções estoque de oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) (12,0 mmol L⁻¹), salicilato de sódio (2,5 mmol L⁻¹), DPA (10,0 mmol L⁻¹) e H₂O₂ (1,0 mmol L⁻¹), todas em EtOAc anidro. Em uma cubeta de quartzo para fluorescência foram adicionados 60,0 µL da solução estoque de DPA, resultando em uma concentração final igual a 0,20 mmol L⁻¹, 300 µL da solução estoque de salicilato de sódio, resultando na concentração final de 0,25 mmol L⁻¹ e de 1,40 a 640 µL da solução estoque de peróxido de hidrogênio nos ensaios em que se variou a [H₂O₂] de 0,50 até 250 mmol L⁻¹. O volume da mistura reacional na cubeta foi completado até 2,975 mL com EtOAc anidro; a reação e a aquisição de dados foram iniciadas apenas após a adição de 25,0 µL da solução estoque de DNPO, sendo sua concentração final igual a 0,10 mmol L⁻¹.

Nos ensaios em que se variou a [salicilato] de 0,10 até 5,0 mmol L⁻¹, a concentração de peróxido foi 10,0 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ e o volume de salicilato de sódio adicionado foi de 100 a 2000 µL. O volume da mistura reacional na cubeta foi completado até 2,975 mL com EtOAc anidro. A reação foi iniciada juntamente com a aquisição de dados após da injeção de 25,0 µL da solução estoque de DNPO, com concentração final de 0,10 mmol L⁻¹.

Em todos os referidos ensaios cinéticos a voltagem da fotomultiplicadora foi sempre igual a 1000 V e fenda de 20 nm e o volume final da mistura reacional na cubeta foi 3,0 mL.

3.5.6 Ensaios cinéticos em sistema binário DME/H₂O 1:1 (v/v) com os ésteres BMePO e BMPO utilizando tampão fosfato como catalisador

As cinéticas de emissão de luz envolvendo as transformações quimiluminescentes dos ésteres oxálicos oxalato de bis(4-metilfenila) (BMePO) e oxalato de bis(4-metoxifenila) (BMPO) com peróxido de hidrogênio e catalisado por tampão fosfato de tetrabutilamônio (TBAP), utilizando 2,5-difeniloxazol (PPO) como ACT, em um sistema binário composto por 1,2-dimetoxietano e água na proporção 1:1 (v/v) foram realizadas em um luminômetro Berthold Sirius. As soluções estoque dos ésteres oxálicos (16,0 mmol L⁻¹), PPO (30,0 mmol L⁻¹) e H₂O₂ (1,0 mol L⁻¹) foram preparadas em DME anidro.

A solução tampão fosfato de tetrabutilamônio (0,20 mol L⁻¹) para cinéticas variando [TBAP] foi preparada em água Milli-Q a partir da mistura das soluções estoque de H₃PO₄ (0,40 mol L⁻¹) e TBAOH (0,40 mol L⁻¹) em proporções adequadas e o pH ajustado até o valor desejado com o auxílio de um pHmetro Metrohm 827 Lab. Para as cinéticas variando a concentração de [H₂O₂], a solução estoque de TBAP foi feita na concentração 0,050 mol L⁻¹. Os ensaios foram feitos na faixa de pH de 6 até 8. Para todos os pH, foram feitas cinéticas em que se variou as concentrações de peróxido de hidrogênio e de tampão fosfato de tetrabutilamônio, para ambos os ésteres oxálicos, BMePO e BMPO.

Nos ensaios em que se variou a concentração de TBAP, a concentração final de peróxido de hidrogênio foi de 10,0 mmol L⁻¹, de modo que a um tubo de ensaio foram

adicionados 1,0 mL da solução estoque de TBAP ($0,20 \text{ mol L}^{-1}$) no pH desejado, com concentração final na faixa de $8,0$ a 100 mmol L^{-1} ; $15,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de H_2O_2 e $100 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de PPO com concentração final igual a $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$. O volume no tubo de ensaio foi completado até $1,975 \text{ mL}$ com DME anidro. A reação foi iniciada com a injeção de $25,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque do éster oxálico, com concentração final igual a $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Quando foram feitas as cinética com variação de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ nos pH desejados, a $[\text{TBAP}]$ foi de $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$, de modo que em um tubo de ensaio foram adicionados $1,0 \text{ mL}$ da solução estoque $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ de TBAP, $100 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de PPO com concentração final igual a $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e volumes na faixa de $5,5$ a $110 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de H_2O_2 , com concentrações finais na faixa de $2,5$ até 50 mmol L^{-1} . O volume da solução no tubo foi completado até $1,975$ com DME anidro. A reação foi iniciada com a injeção de $25,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque do éster oxálico com concentração final de $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$.

Em todos os casos, a proporção entre a fase aquosa tamponada e a fase orgânica ($\text{H}_2\text{O}/\text{DME}$) foi sempre de $1:1$ (v/v), na faixa de pH de 6 até 8 , e o volume final da solução no tubo de ensaio igual a $2,0 \text{ mL}$.

3.5.7 Ensaios cinéticos com os ésteres TCPO e BMePO em sistema binário DME/ H_2O 1:1 (v/v) com salicilato de sódio como catalisador

Os ensaios cinéticos de emissão de luz dos ésteres TCPO e BMePO com peróxido de hidrogênio e salicilato de sódio utilizando PPO como ativador em foram realizados um sistema binário DME/ H_2O na proporção $1:1$ (v/v).

A solução estoque do TCPO, do PPO e do peróxido de hidrogênio foram preparadas em DME anidro, a solução estoque de salicilato de sódio foi preparada em água Milli-Q. Nos ensaios cinéticos com TCPO, em que foi realizada a variação da

concentração de salicilato de sódio, a concentração de peróxido de hidrogênio foi igual a 40,0 mmol L⁻¹. Em uma cubeta de quartzo para fluorescência foram adicionados 250 µL da solução estoque de PPO (40,0 mmol L⁻¹) sendo sua concentração final de 5,0 mmol L⁻¹, 37,0 µL da solução estoque de peróxido de hidrogênio (2,16 mol L⁻¹), com concentração final de 40,0 mmol L⁻¹ e 1,0 mL das soluções diluídas de salicilato de sódio a partir da solução estoque na concentração desejada. As soluções diluídas de salicilato de sódio foram preparadas com um volume final de 5,0 mL a partir da solução estoque (0,80 mol L⁻¹) nas concentrações de: 128, 160, 256, 384, 512, 640 e 800 mmol L⁻¹, de modo que suas concentrações finais na cubeta fossem de 64, 128, 192, 256, 320 e 400 mmol L⁻¹. O volume final na cubeta foi completado para 1,975 mL com a adição do volume adequado de DME. A reação foi iniciada com a adição de 25,0 µL da solução estoque de TCPO, sendo sua concentração final de 0,10 mmol L⁻¹. Para os ensaios com variação da concentração de peróxido de hidrogênio o procedimento foi similar ao descrito anteriormente, porém, preparou-se uma solução estoque de salicilato de sódio na concentração de 160 mmol L⁻¹ para que, ao se injetar 1,0 mL desta solução na cubeta, sua concentração final fosse de 80,0 mmol L⁻¹. O intervalo de concentração de peróxido de hidrogênio foi de 40,0 a 500 mmol L⁻¹. O intervalo de concentrações escolhido em ambos os casos foi aquele em o sistema apresentou boa intensidade de emissão e reprodutibilidade. Os ensaios foram realizados com a fotomultiplicadora em 1000 V e a fenda de 2,5 a 20 nm, o volume final da mistura reacional na cubeta foi 2,0 mL.

Os ensaios cinéticos com BMePO foram realizados em um Luminômetro Berthold Sirius. As soluções estoque e os ensaios foram realizados da mesma maneira que os ensaios utilizando TCPO, com exceção de que as soluções diluídas de salicilato de sódio foram preparadas nas concentrações de 20,0; 40,0; 80,0; 160; 320; 640 e 800

mmol L⁻¹ para que suas concentrações finais fossem de 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 160; 320 e 400 mmol L⁻¹ ao se injetar 1,0 mL destas soluções nos tubos de ensaios; a concentração de peróxido foi de 10,0 mmol L⁻¹. Quando se variou a concentração de peróxido de hidrogênio (10,0 a 500 mmol L⁻¹), as condições utilizadas também foram similares às dos ensaios com TCPO, exceto que se fixou a concentração de salicilato em 10,0 mmol L⁻¹. O intervalo de concentrações escolhidos foi em ambos os casos aquele em o sistema apresentou boa intensidade de emissão e reprodutibilidade.

3.5.8 Ensaios cinéticos da reação peroxioxalato em um meio majoritariamente aquoso

Os ensaios cinéticos de emissão de luz para a reação peroxioxalato em meio aquoso foi realizada utilizando-se TCPO, H₂O₂, salicilato de sódio como catalisador e FLU como ACT deste sistema. As soluções estoque de salicilato de sódio, H₂O₂ e FLU foram preparadas em água Milli-Q, enquanto que a solução estoque de TCPO foi preparada em DME anidro. A solução estoque de TCPO foi preparada na concentração de 8,0 mmol L⁻¹, a solução de salicilato de sódio foi preparada na concentração de 0,80 mol L⁻¹ e a solução estoque de H₂O₂ foi de aproximadamente 2,0 mol L⁻¹.

Os ensaios cinéticos de emissão de luz com variação da [H₂O₂] foram realizados em diferentes condições: (i) [salicilato] = 60,0 mmol L⁻¹, (ii) [salicilato] = 120 mmol L⁻¹ e (iii) [salicilato] = 240 mmol L⁻¹; em todos eles o intervalo de concentração de H₂O₂ foi de 1,0 a 400 mmol L⁻¹. A uma cubeta de quartzo para fluorescência injetou-se 150 µL da solução estoque de salicilato de sódio, com concentração final de 60,0 mmol L⁻¹; 100 µL da solução estoque de FLU, com concentração final igual a 0,20 mmol L⁻¹; de 1,0 a 400 µL da solução estoque de H₂O₂ e completou-se o volume final da cubeta para 1,975 mL através da adição de H₂O Milli-Q. O início da reação e da aquisição de dados

se deu a partir do momento em que se injetou de 25,0 μL da solução estoque de TCPO, resultando em uma concentração final de 0,10 mmol L^{-1} . Nos ensaios em que as concentrações finais de salicilato foram 120 e 240 mmol L^{-1} , injetou-se na cubeta 300 e 600 μL da solução estoque, respectivamente. Nestes ensaios a voltagem foi sempre de 1000 V e fendas de 10 ou 20 nm, com volume final da mistura reacional igual a 2,0 mL.

O ensaio cinético de emissão de luz com a variação da [salicilato] foi realizado com $[\text{H}_2\text{O}_2] = 200 \text{ mmol L}^{-1}$ e intervalo de concentração de salicilato foi de 30,0 até 300 mmol L^{-1} . A uma cubeta de quartzo para fluorescência injetou-se 200 μL da solução estoque de H_2O_2 , com concentração final de 200 mmol L^{-1} ; 100 μL da solução estoque de FLU, com concentração final igual a 0,20 mmol L^{-1} ; de 75,0 a 750 μL da solução estoque de salicilato de sódio e completou-se o volume final da cubeta para 1,975 mL através da adição de H_2O Milli-Q. O início da reação e da aquisição de dados se deu a partir do momento em que se injetou de 25,0 μL da solução estoque de TCPO, resultando em uma concentração final de 0,10 mmol L^{-1} . Nestes ensaios a voltagem foi sempre de 1000 V e fendas de 5,0 ou 10 nm e volume final da mistura reacional igual a 2,0 mL.

3.6 Calibração do espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse

A calibração da fotomultiplicadora do espectrofluorímetro foi feita através da metodologia padrão utilizando luminol.^{16,47,83-85} Preparou-se uma solução estoque de luminol $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio pH 11,6, cuja concentração exata foi determinada espectrofotometricamente em 347 nm ($\epsilon_{347\text{nm}} = 7,6 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Preparou-se duas soluções de hemina com absorbâncias, em 414 nm, iguais a 0,2 (solução diluída) e 0,6 (solução concentrada) através da dissolução de 2,5 mg de hemina em 5,0 mL de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de peróxido de hidrogênio 0,30% foi

preparada através da diluição de 1,25 mL da solução aquosa de peróxido de hidrogênio 60% (m/m) em 250 mL de água Milli-Q.

Para uma cubeta de quartzo para fluorescência com caminho óptico de 10 mm e volume total de 3,0 mL foram transferidos 2,8 mL da solução de luminol, 100 μ L da solução de H₂O₂ 0,30% iniciou-se aquisição de dados, em seguida, adicionou-se 50,0 μ L da solução de hemina com absorbância 0,2; quando a intensidade de luz emitida chegou a 2,0% da intensidade inicial, adicionou-se 50,0 μ L da solução de hemina com absorbância 0,6. Este procedimento foi repetido até que todo luminol fosse consumido. Foi feita a calibração da fotomultiplicadora em 400 V, nas fendas 10 e 20 nm; 600 V nas fendas 2,5; 5; 10 e 20 nm; 800 V nas fendas 10 e 20 nm e 1000 V nas fendas 2,5; 5,0; 10 e 20 nm. Para a calibração em 400 V nas fendas de 10 e 20 nm, e 600 V nas fendas 2,5 e 5,0 nm utilizou-se diretamente a solução estoque de luminol, com concentração na ordem de 10^{-4} mol L⁻¹. Entretanto, a solução estoque de luminol foi diluída 100 vezes para a calibração em 600 V com fendas 10 e 20 nm, sendo sua concentração final na ordem de 10^{-6} mol L⁻¹, 1000 vezes para a calibração em 800 V, sendo sua concentração final da ordem de 10^{-7} mol L⁻¹ e, por fim, diluída 10000 vezes para calibração em 1000 V nas fendas 2,5; 5,0; 10 e 20 nm, sendo sua concentração final da ordem de 10^{-8} mol L⁻¹.

Os cálculos dos fatores de calibração (f_{lum}) da fotomultiplicadora foram feitos a partir da área sob a curva obtida em cada ensaio (**Figura 3, Equação 4**). Os valores de f_{lum} obtidos para a calibração com volume final de 3,0 mL na cubeta foram corrigidos para um volume de 2,0 mL (**Tabela 1**).

Figura 3: Perfil temporal de uma curva de calibração da fotomultiplicadora utilizando-se o padrão luminol.^{16,47,83-85}

$$f_{lum} = \frac{\phi_{lum} n_{lum}}{Q_{lum}}$$

Equação 4

Em que:

f_{lum} = fator de correção da calibração da fotomultiplicadora utilizando o padrão luminol;

$\phi_{lum} = (1,14 \pm 0,06) 10^{-2} \text{ E mol}^{-1}$, rendimento quântico quimiluminescente do luminol
válido no intervalo de concentração de 10^{-3} até $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$;

n_{lum} = número de mols do luminol na cubeta;

Q_{lum} = área sob a curva.

Tabela 1: Valores dos fatores de calibração (f_{lum}) utilizando o método padrão do luminol.

Voltagem (V)	Fenda (nm)	f_{lum} (E (u.a.) ⁻¹)	f_{lum} (E (u.a.) ⁻¹)
		(V _{cubeta} = 3,0 mL)	(V _{cubeta} = 2,0 mL)
400	10	$1,54 \times 10^{-12}$	$1,03 \times 10^{-12}$
	20	$7,05 \times 10^{-13}$	$4,69 \times 10^{-13}$
600	2,5	$2,04 \times 10^{-13}$	$1,36 \times 10^{-13}$
	5,0	$7,00 \times 10^{-14}$	$4,66 \times 10^{-14}$
	10	$6,95 \times 10^{-14}$	$7,01 \times 10^{-15}$
	20	$5,54 \times 10^{-15}$	$3,70 \times 10^{-15}$
800	10	$2,27 \times 10^{-15}$	$1,51 \times 10^{-15}$
	20	$5,21 \times 10^{-16}$	$3,48 \times 10^{-16}$
1000	2,5	$5,55 \times 10^{-16}$	$3,17 \times 10^{-16}$
	5,0	$2,93 \times 10^{-16}$	$1,95 \times 10^{-16}$
	10	$1,99 \times 10^{-16}$	$1,33 \times 10^{-16}$
	20	$7,46 \times 10^{-17}$	$4,97 \times 10^{-17}$

Os fatores de calibração determinados para a fotomultiplicadora do espectrofluorímetro foram utilizados para a determinação dos rendimentos quânticos singlete das reações de TCPO e DNPO.

A calibração do luminômetro foi feita anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa utilizando também o padrão luminol^{16,47,83-85} e o fator de calibração determinado foi $f_{lum} = 1,346 \times 10^{-23}$ E (u.a)⁻¹.⁸⁶ Este valor foi utilizado para a determinação dos rendimentos quânticos singlete nos ensaios de emissão dos ésteres BMePO e BMPO (**Seção 3.7.2**).

3.7 Análises estatísticas

Todos os ajustes matemáticos das curvas resultantes da emissão de luz do sistema peroxioxalato, bem como o cálculo das áreas sob a curva resultante da calibração da fotomultiplicadora e dos cálculos de rendimento quântico foram feitos com o auxílio do software Microcal Origin 8.0 (2008).

3.7.1 Determinação das constantes de velocidade observadas

As curvas de intensidade *versus* tempo resultantes das cinéticas de emissão com os ésteres TCPO, DNPO, BMePO e BMPO foram ajustadas com uma função monoexponencial (**Equação 5**) para a obtenção das constantes de velocidade observadas (k_{obs}), em que foi possível fazer o ajuste matemático apenas do decaimento da emissão, já que a subida é muito rápida para todos os ensaios realizados nos diversos meios especificados, não havendo pontos suficientes para fazer o ajuste.

A constante de velocidade observada para o decaimento (k_{obs}) corresponde ao inverso do tempo (t) obtido no ajuste matemático e sua unidade é s⁻¹ (**Equação 5**).

$$y = y_0 + A_1 e^{-x/t}$$

Equação 5

Para as cinéticas realizadas com adição em retardo de H₂O₂, o ajuste matemático foi feito através de uma função exponencial com duas constantes ajustadas para o decaimento $k_{obs}^{RÁPIDO}$ e k_{obs}^{LENTO} (**Equação 6**).

$$y = y_0 + A_1 e^{-k_{obs}^{RÁPIDO} x} + A_2 e^{-k_{obs}^{LENTO} x}$$

Equação 6

3.7.2 Determinação dos rendimentos quânticos singlete

A determinação dos rendimentos quânticos singlete (Φ_s) para os ensaios de emissão foi feita através do cálculo da área (Q) sob a curva de intensidade *versus* tempo. O rendimento quântico é obtido em unidades arbitrárias e, posteriormente, convertido para Einstein por mol (E mol⁻¹) através dos fatores de calibração (f_{lum}) obtidos conforme descrito anteriormente (**Tabela 1, Equação 7**).

$$\varphi_s = \frac{Q}{N_R} \frac{f_{lum}}{\varphi_{FL}} \times f_{foto}$$

Equação 7

Em que:

Q = área sob a curva;

f_{lum} = fator de calibração da fotomultiplicadora;

N_R = número de mols do reagente limitante, no caso, o éster oxálico;

φ_{FL} = rendimento quântico de fluorescência do ativador. Corresponde a 0,95 para o DPA; 0,98 para o RUB e 0,64 para o PPO em solventes polares.^{47,86,87}

f_{foto} = fator de sensibilidade da fotomultiplicadora determinado de acordo com o comprimento de onda máximo de cada ativador utilizado e com as especificações fornecidas pelo fabricante. Os valores obtidos para cada ativador foram iguais a 1,0 ou muito próximos deste valor.^{47,86}

4. Resultados

4.1 Ensaios cinéticos de emissão para a reação de TCPO e H_2O_2 utilizando salicilato de sódio como catalisador

Analogamente às cinéticas feitas em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa utilizando imidazol (Imi-H) como catalisador da reação peroxioxalato, em que foi determinado o papel do Imi-H como catalisador básico e nucleofílico para este sistema (**Esquema 7, seção 1.3.1**),^{47,50,52} neste trabalho foram realizados ensaios cinéticos de emissão utilizando o salicilato de sódio como base em substituição ao Imi-H. A reação estudada inicialmente foi a de TCPO com H_2O_2 na presença de salicilato, usando DPA como ativador (ACT), em um meio puramente orgânico em acetato de etila como solvente, a 25°C.

4.1.1 Determinação das constantes de velocidade observadas e dos rendimentos quânticos singlete

Para o sistema aqui descrito, procurou-se verificar a influência da variação da [salicilato] e da $[\text{H}_2\text{O}_2]$ na velocidade desta transformação para a obtenção de informações mecanísticas que pudessem esclarecer as etapas lentas deste sistema quimiluminescente complexo. Após a mistura dos reagentes dentro da cubeta, verificou-se que o aumento da intensidade de emissão foi extremamente rápido, mesmo nas menores concentrações de salicilato e/ou peróxido (**Figura 4**), impossibilitando um ajuste matemático da subida da curva de emissão, sendo possível apenas ajustar matematicamente o decaimento da intensidade de emissão com uma função monoexponencial (**Equação 5, seção 3.7.1**), do qual se obteve a constante de velocidade observada (k_{obs}).

Figura 4: Perfil cinético de emissão em função do tempo para a reação entre TCPO (0,10 mmol L⁻¹), H₂O₂ (1,0 mmol L⁻¹) e salicilato de sódio (0,30; 1,0 e 5,0 mmol L⁻¹) usando DPA (0,20 mmol L⁻¹) como ACT, em acetato de etila, a 25°C.

Nos ensaios cinéticos em que se variou a [salicilato] de 0,50 até 10,0 mmol L⁻¹, as concentrações de H₂O₂, DPA e TCPO foram iguais a 10,0; 0,20 e 0,10 mmol L⁻¹, respectivamente. Estes ensaios mostraram que k_{obs} aumenta com a concentração de [salicilato], observou-se que uma variação de vinte vezes na concentração de salicilato provoca um aumento de quase quatro vezes nos valores de k_{obs} (**Tabela 2**). Estabeleceu-se uma correlação linear entre a [salicilato], de 0,50 até 5,0 mmol L⁻¹, e k_{obs} (**Figura 5**), em que o coeficiente linear fornece a constante de velocidade da reação não catalisada, ou seja, aquela em que não há envolvimento do salicilato de sódio ($k_0 = (9 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$); o coeficiente angular fornece a constante de velocidade bimolecular correspondente à interação do éster com o salicilato no passo lento da reação ($k_{bim} = (3,8 \pm 0,5) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (**Figura 5**).

Tabela 2: Dependência da constante de velocidade observada para o decaimento de emissão (k_{obs}) com a [salicilato] na reação de TCPO com peróxido de hidrogênio, usando DPA como ACT.

[salicilato] (mmol L ⁻¹)	$k_{\text{obs}} \times 10^3$ (s ⁻¹)
0,50	9,2±0,8
1,0	12,9±0,3
2,0	17,7±0,3
5,0	27,4±0,7
10,0	33±1

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ em acetato de etila a 25°C.

Figura 5: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a [salicilato] em sua reação com TCPO (0,10 mmol L⁻¹) e peróxido de hidrogênio (10,0 mmol L⁻¹), usando DPA (0,20 mmol L⁻¹) como ACT, em EtOAc a 25°C. Regressão linear feita com $k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{bim}}[\text{salicilato}]$, para [salicilato] = 0,50 – 5,0 mmol L⁻¹, $R^2 = 0,951$.

Os estudos da influência da [H₂O₂] na velocidade da reação foram feitos em três diferentes condições de salicilato (0,30; 1,0 e 5,0 mmol L⁻¹) e em uma ampla faixa de concentração de peróxido, de 1,0 até 250 mmol L⁻¹, em que [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ e [TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹ para cada ensaio. Em todos os casos, observou-se que k_{obs} aumenta significativamente com a [H₂O₂] de 1,0 até 50,0 mmol L⁻¹, a partir daí, os valores de k_{obs} apresentam-se relativamente constantes, alcançando uma região de saturação na faixa de concentração de 100 a 250 mmol L⁻¹ (**Tabela 3, Figura 6**). Deve-se observar ainda que, para uma mesma concentração de peróxido, os valores de k_{obs}

aumentam com o aumento da [salicilato] de 0,30 até 5,0 mmol L⁻¹ (**Tabela 3, Figura 6**). Quando se fixou a concentração de salicilato em 5,0 mmol L⁻¹, o que se observou foi uma dependência linear de k_{obs} com a [H₂O₂] na região de 1,0 até 50,0 mmol L⁻¹, obtendo-se uma constante bimolecular a partir do coeficiente angular da regressão linear, denominada constante de peridrólise, $k_{\text{per}} = (2,04 \pm 0,06) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a qual corresponde à interação do TCPO com H₂O₂ no passo lento da reação. O coeficiente linear desta correlação forneceu uma constante de velocidade em que não há o envolvimento do peróxido, $k_0' = (3,97 \pm 0,08) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (**Figura 6**). Neste ensaio, o valor máximo que k_{obs} assumiu foi de $k_{\text{máx}} = (143 \pm 2) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, quando [H₂O₂] = 175 mmol L⁻¹ (**Tabela 3**).

Com a finalidade de se conseguir fazer um ajuste do aumento da intensidade de emissão, a cinética de variação de peróxido de hidrogênio foi feita em uma concentração mais baixa de salicilato, 1,0 mmol L⁻¹. O comportamento do sistema foi semelhante ao anterior, ou seja, determinou-se k_{obs} apenas para o decaimento de emissão. Porém, da regressão linear feita na região de 1,0 até 20,0 mmol L⁻¹, a constante de velocidade obtida para a reação de peridrólise foi ligeiramente menor ($k_{\text{per}} = (1,6 \pm 0,2) \text{ s}^{-1}$) do que aquela obtida quando [salicilato] = 5,0 mmol L⁻¹; e os valores de $k_{\text{máx}} = (82,5 \pm 0,4) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e do intercepto, $k_0' = (2,3 \pm 0,8) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, também foram menores (**Tabela 3, Figura 6**). Em uma terceira tentativa de se conseguir ajustar a subida da curva, ou seja, tornar a reação mais lenta, os ensaios foram realizados com [salicilato] = 0,30 mmol L⁻¹. Neste caso, k_{obs} apresentou uma dependência linear com [H₂O₂] na região de 1,0 até 20,0 mmol L⁻¹, com $k_{\text{per}} = (0,56 \pm 0,06) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a região de saturação se iniciou em 50,0 mmol L⁻¹ em que $k_{\text{máx}} = (20,7 \pm 0,1) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $k_0' = (1,32 \pm 0,05) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (**Tabela 3, Figura 6**). Os valores de k_{per} aumentam quase quatro

vezes com um aumento da concentração de salicilato de mais de 15 vezes, indicando que o ataque do peróxido ao TCPO é catalisado pelo salicilato.

Tabela 3: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ na reação de TCPO catalisada por salicilato de sódio usando DPA como ACT.

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mmol L ⁻¹)	$[\text{salicilato}]$ (mmol L ⁻¹)		
	0,30	1,0	5,0
	$k_{\text{obs}} \times 10^3$ (s ⁻¹)		
1,0	1,88±0,01	3,83±0,03	6,00±0,03
2,0	2,5±0,1	5,5±0,2	9,0±0,8
5,0	4,22±0,07	9,9±0,1	14,8±0,7
10,0	8,1±0,4	23,4±0,1	26±1
20,0	11,4±0,4	29,8±0,3	43±1
50,0	16,8±0,6	52±1	97±7
100	20±1	75±2	129±8
150	20,7±0,3	78±1	-
175	-	-	143±2
200	20,7±0,1	82,04±0,05	-
250	20±1	82,5±0,4	132±3

$[\text{TCPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ em EtOAc, a 25°C.

Figura 6: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ em sua reação com TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) catalisada por salicilato de sódio ($0,30$; $1,0$ e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) usando DPA ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT, em acetato de etila, a 25°C. O ajuste foi feito usando regressão linear $k_{\text{obs}} = k_0' + k_{\text{per}}[\text{H}_2\text{O}_2]$; para $[\text{salicilato}] = 0,30 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 - 20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $R^2 = 0,986$; para $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 - 20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $R^2 = 0,903$; para $[\text{salicilato}] = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 - 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $R^2 = 0,995$.

Foram determinados os rendimentos quânticos singlete (Φ_S), inicialmente, em função da [salicilato]. Observou-se que os valores de Φ_S são, majoritariamente, da ordem de 10^{-4} E mol⁻¹ e diminuem aproximadamente seis vezes com o aumento da [salicilato] de 0,50 até 10,0 mmol L⁻¹, sendo seu valor máximo $\Phi_S = (1,24 \pm 0,06) 10^{-3}$ E mol⁻¹, quando [salicilato] = 0,50 mmol L⁻¹ (**Tabela 4, Figura 7**). Este comportamento de Φ_S foi observado também com imidazol como base, porém, os valores de Φ_S obtidos em função da [Imi-H] são uma ordem de grandeza maior do que os obtidos no presente trabalho.^{47,50,52}

Tabela 4: Variação do rendimento quântico singlete (Φ_S) em função da [salicilato] em sua reação com TCPO e H₂O₂, usando DPA como ACT.

[salicilato] (mmol L ⁻¹)	$\Phi_S \times 10^3$ (E mol ⁻¹)
0,50	1,24±0,06
1,0	0,80±0,06
2,0	0,41±0,08
5,0	0,15±0,02
10,0	0,2±0,1

Figura 7: Rendimentos quânticos singlete (Φ_S) determinados em função da [salicilato] em sua reação com TCPO (0,10 mmol L⁻¹) e H₂O₂ (10,0 mmol L⁻¹) usando DPA (0,20 mmol L⁻¹) como ACT, em acetato de etila, a 25°C.

Os rendimentos quânticos calculados para a variação da concentração de peróxido de hidrogênio também diminuiriam significativamente com o aumento da concentração de peróxido de 1,0 até 100 mmol L⁻¹, sendo da ordem de 10⁻³ E mol⁻¹. A partir daí, os valores de Φ_S mantiveram constantes, da ordem de 10⁻⁴ E mol⁻¹ (**Tabela 5**). Tal comportamento diverge daquele observado neste sistema quando se utiliza imidazol, em que os valores de Φ_S apresentam-se constantes em toda faixa de concentração de peróxido de hidrogênio.^{47,50,52}

Tabela 5: Variação do rendimento quântico singlete (Φ_S) com a [H₂O₂] na reação de TCPO com salicilato de sódio, usando DPA como ativador.

[H ₂ O ₂] (mmol L ⁻¹)	[salicilato] (mmol L ⁻¹)		
	0,30	1,0	5,0
	$\Phi_S \times 10^3$ (E mol ⁻¹)		
1,0	3,5±0,1	3,1±0,1	0,9±0,1
2,0	3,40±0,05	3,4±0,3	1,2±0,1
5,0	2,24±0,08	2,5±0,1	0,99±0,08
10,0	1,1±0,2	1,7±0,1	0,44±0,01
20,0	0,75±0,01	0,9±0,1	0,26±0,01
50,0	0,58±0,04	0,56±0,01	0,18±0,08
100	0,4±0,1	0,38±0,03	0,43±0,05
150	0,37±0,01	0,33±0,03	-
175	-	-	0,12±0,08
200	0,46±0,03	0,31±0,03	-
250	0,5±0,1	0,36±0,01	0,4±0,1

Com a finalidade de se obter informações mecânicas sobre uma possível catálise nucleofílica do salicilato nesta transformação, poderiam ser feitos estudos cinéticos de absorção monitorando a liberação do 2,4,6-triclorofenol (TCP) em 296 nm.⁵¹ Porém, os espectros do TCPO, TCP e salicilato de sódio (**Figura 8**) mostram que existe absorção competitiva entre o salicilato e o TCP, o que impede a determinação da constante de velocidade observada (k_{obs}), determinada a partir do aumento da absorção em 296 nm, devido à liberação do fenol.

Figura 8: Espectros de absorção do TCPO ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$), TCP ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) e salicilato de sódio ($0,080 \text{ mmol L}^{-1}$), estes últimos com máximos de absorção em 296 nm.

4.1.2 Ensaios com adição em retardo de peróxido de hidrogênio

Os ensaios de emissão com adição em retardo de H_2O_2 à mistura reacional contendo TCPO, salicilato de sódio e DPA em acetato de etila como solvente visam esclarecer a função catalítica do salicilato no que diz respeito à formação ou não de um intermediário de reação análogo à 1,1'-oxalildiimidazolida (**Esquema 7 (1), seção 1.3.1**), formado no percurso desta reação e que pôde ser detectado por espectrofotometria UV-vis quando se usou imidazol como catalisador desta reação.^{47,53} Porém, a detecção deste possível intermediário por UV-vis foi impossibilitada nestas condições, uma vez que o salicilato apresenta banda de absorção com máximo na mesma região que o TCPO, como apresentado anteriormente (**Figura 8, seção 4.1.1**).

Alternativamente, estudos de injeção em retardo de H_2O_2 no sistema peroxioxalato utilizando salicilato de sódio como catalisador foram realizados com a finalidade de se verificar o acúmulo ou não deste possível intermediário de reação, o qual poderia ser formado através do ataque nucleofílico do salicilato à carbonila do éster oxálico. Estes ensaios foram realizados em diferentes condições experimentais, com diferentes concentrações de peróxido e salicilato (**Tabela 6**). Os tempos de retardo em

que o peróxido de hidrogênio foi adicionado ao sistema foram de zero até 10,0 minutos após a adição de TCPO, em que a adição no tempo $t_0 = 0$ corresponde aos ensaios convencionais cujo procedimento foi descrito na seção 3.5.1 e seus resultados apresentados na seção 4.1.1.

Estes ensaios quimiluminescentes realizados nos tempos de 1,0 até 10,0 minutos forneceram curvas de emissão com um perfil cinético de decaimento que é rápido no início e lento no final (**Figura 9**); no tempo $t_0 = 0$, o perfil cinético das curvas se apresentou dentro do padrão descrito na seção anterior (**Figuras 4 e 9**). O ajuste matemático em todos os casos de adição em retardo de H_2O_2 (incluindo $t_0 = 0$) foi feito, inicialmente, com uma função monoexponencial (**Equação 5, seção 3.7.1**) para a obtenção dos valores de k_{obs} (**Tabela 6**). Observou-se que, dentro de cada condição experimental, os valores de k_{obs} não apresentam uma variação significativa em função do tempo de retardo em que o peróxido é adicionado ao sistema reacional (**Tabela 6**). As intensidades máximas de emissão diminuíram dentro de cada condição (**Figura 9, Tabela 7**).

Figura 9: Perfis de decaimento da intensidade da emissão nos ensaios cinéticos com adição de H_2O_2 ($10,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes tempos (de zero até 10,0 minutos) em sua reação com TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) e salicilato de sódio ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) usando DPA ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT.

Tabela 6: Comportamento de k_{obs} em função do tempo de adição de H_2O_2 em sua reação com TCPO e salicilato de sódio utilizando DPA como ativador.

Condições experimentais			
Tempo (min)	[salicilato]=1,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 10,0 mmol L ⁻¹	[salicilato]=1,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 1,0 mmol L ⁻¹	[salicilato]=10,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 1,0 mmol L ⁻¹
	$k_{\text{obs}} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$		
0	19±1	6±1	5±1
1,0	19±1	6,6±0,1	5,9±0,1
2,0	22±2	8±1	7±1
5,0	24±1	8±1	8±
10,0	24±1	6,6±0, 2	8±2

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹; [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ em acetato de etila a 25°C.

Tabela 7: Intensidades médias de emissão obtidas nos ensaios cinéticos de injeção retardada de H_2O_2 em sua reação com TCPO e salicilato de sódio utilizando DPA como ativador.

Condições experimentais			
Tempo (min)	[salicilato]= 1,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 10,0 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 1,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 1,0 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 10,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 1,0 mmol L ⁻¹
	Intensidades médias (u.a.)		
0	625±70	352±52	224±31
1,0	580±30	300±18	218±21
2,0	546±42	308±31	215±19
5,0	442±23	221±10	204±11
10,0	302±33	127±6	164±12

Em uma segunda tentativa, ajustaram-se as curvas de decaimento com uma função exponencial com duas constantes (**Equação 6, seção 3.7.1**). Atribuiu-se uma constante de velocidade observada ($k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$) ao decaimento inicial e outra constante de velocidade correspondente à parte final do decaimento da emissão ($k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$) (**Equação 6, Tabela 8**). Nas condições apresentadas, houve um aumento de $k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$ até 2,0 minutos de reação nos três casos, e os valores de $k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$ se mostraram menores do que aqueles obtidos quando se fez um ajuste matemático com uma função monoexponencial (**Tabelas 6 e 8**).

Tabela 8: Valores de $k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$ e $k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$ obtidos através da injeção retardada de H_2O_2 em sua reação com TCPO, salicilato de sódio utilizando DPA como ativador.

Condições experimentais						
Tempo (min)	[salicilato] = 1,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 10,0 mmol L ⁻¹		[salicilato] = 1,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 1,0 mmol L ⁻¹		[salicilato] = 10,0 mmol L ⁻¹ [H ₂ O ₂] = 1,0 mmol L ⁻¹	
	$k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$	$k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$	$k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$	$k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$	$k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$	$k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$
	x 10 ³ (s ⁻¹)		x 10 ³ (s ⁻¹)		x 10 ³ (s ⁻¹)	
0	80±20	17±1	16±2	3,7±0, 2	8±1	3,3±0, 4
1,0	190±40	18±1	130±30	5,09±0, 02	62±3	4,9±0, 1
2,0	400±70	19±1	170±20	5,3±0, 2	82±4	4,9±0, 3
5,0	140±40	19±1	194±4	5,0±0,3	85±3	4,6±0,1
10,0	50±10	18±3	133±1	4,4±0, 4	87±2	4,1±0,1

Embora não se espere que a velocidade da reação sofra qualquer alteração com o acúmulo deste possível intermediário de reação, o fato de $k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$ aumentar até 2,0 minutos se mostrou inusitado. Assim, decidiu-se estudar o comportamento deste sistema em diferentes concentrações de peróxido com o tempo de injeção em retardo fixado em 2,0 minutos e, a partir daí, verificar se há uma mudança significativa nas intensidades máximas do sistema nesta condição, sendo a [salicilato] = 1,0 mmol L⁻¹ (**Tabela 9**).

Tabela 9: Comportamento de k_{obs} com a variação da [H₂O₂] em sua reação com TCPO, salicilato de sódio utilizando DPA como ACT nos ensaios cinéticos de injeção retardada, com t = 2,0 min, e valores das intensidades médias.

[H ₂ O ₂] (mmol L ⁻¹)	[salicilato] = 1,0 mmol L ⁻¹ t = 2,0 min		Intensidades médias para cada ajuste (u.a)	
	$k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$	$k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$	Rápido	Lento
	(s ⁻¹)			
1,0	0,14±0,01	0,0045±0,0001	396±27	148±1
2,0	0,25±0,01	0,0066±0,0001	576±17	217±5
5,0	0,31±0,02	0,0115±0,0001	422±34	295±5
10,0	0,3±0,1	0,0189±0,0005	372±17	346±10

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹; [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ em acetato de etila.

Observou-se que, enquanto se variou a concentração de peróxido dez vezes, $k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$ apenas duplicou seu valor e $k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$ sofreu uma variação de aproximadamente quatro vezes. Este comportamento é similar àqueles obtidos quando se fez a variação da $[\text{H}_2\text{O}_2]$ nos ensaios cinéticos convencionais apresentados na seção anterior (**seção 4.1.1**). Além disso, os valores de intensidade para $k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$ mantiveram-se muito próximos entre si, já os valores de intensidade para $k_{\text{obs}}^{\text{LENTO}}$ aumentaram pouco frente à variação da concentração de peróxido (**Tabela 9**).

4.1.3 Ensaios de emissão com variação da concentração de ativador na reação de TCPO e H_2O_2 catalisada por salicilato de sódio

Os ensaios de emissão de luz da reação peroxioxalato utilizando TCPO, H_2O_2 e salicilato de sódio como catalisador básico foram realizados também quando se variou a concentração de ACT neste sistema. Inicialmente, conforme apresentado nas seções anteriores, a reação foi estudada utilizando o DPA como ACT deste sistema. Esta transformação foi estudada mantendo-se fixas as concentrações de TCPO, H_2O_2 e salicilato, e variando-se a $[\text{DPA}]$ de 0,10 até 2,0 mmol L^{-1} . Estes ensaios foram realizados em diferentes condições de concentração de salicilato ($[\text{salicilato}] = 0,10; 1,0$ e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$; com $[\text{TCPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$), foi observado que a constante de velocidade da reação sofre uma pequena redução de $3,88 \times 10^{-3}$ para $3,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ com o aumento da concentração de DPA de 0,10 para $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com $k_{\text{obs}}^{\text{médio}} = (3,8 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, quando $[\text{salicilato}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Tabela 10**). Nas concentrações de salicilato iguais a 1,0 e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, os valores de k_{obs} decrescem de $9,1 \times 10^{-3}$ para $7,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e de $10,4 \times 10^{-3}$ para $6,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. (**Tabela 10**). Os valores de $k_{\text{obs}}^{\text{médio}}$ aumentam significativamente quando se aumenta a

concentração de salicilato de 0,10 para 1,0 mmol L⁻¹, porém, são praticamente iguais quando se aumenta a concentração de salicilato de 1,0 para 10,0 mmol L⁻¹ (**Tabela 10**).

De uma maneira geral, a velocidade da reação não depende da [DPA] (**Tabela 10, Figura 10**). Porém, observou-se que a intensidade de emissão de luz nestes ensaios aumentou com o aumento da [DPA] (**Figura 10**), tanto que durante os ensaios foi sempre necessário diminuir tanto a voltagem quanto a fenda da fotomultiplicadora (**Tabela 11**).

Tabela 10: Valores de k_{obs} determinados para a reação entre TCPO, H₂O₂ e salicilato de sódio usando DPA como ACT em diferentes concentrações.

[DPA] (mmol L ⁻¹)	[salicilato] (mmol L ⁻¹)		
	0,10	1,0	10,0
	$k_{\text{obs}} \times 10^3$ (s ⁻¹)		
0,10	3,88±0,03	9,1±0,4	10,4±0,7
0,20	4,3±0,1	8,5±0,4	9,2±0,7
0,50	3,94±0,04	8,1±0,2	8,7±0,3
1,0	3,83±0,03	8,1±0,1	8,4±0,1
2,0	3,2±0,1	7,9±0,1	6,3±0,3
$k_{\text{obs}}^{\text{médio}} \times 10^3$ (s ⁻¹)	3,8±0,4	8,3±0,5	8±1

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 2,0 mmol L⁻¹; em acetato de etila a 25°C.

Figura 10: Comportamento da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a [DPA] na reação de TCPO (0,10 mmol L⁻¹) com salicilato de sódio (0,10; 1,0 e 10,0 mmol L⁻¹) e H₂O₂ (2,0 mmol L⁻¹) em acetato de etila.

Tabela 11: Comportamento das intensidades de emissão em função da concentração de ACT para a reação entre TCPO, H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio.

Sensibilidade da fotomultiplicadora (V/nm)	[DPA] (mmol L ⁻¹)	Intensidades médias de emissão (u.a.) ^a
600/20	0,10	140±7
	0,20	290±14
	0,50	560±38
600/10	1,0	480±14
	2,0	626±35

^a[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 2,0 mmol L⁻¹, [salicilato] = 0,10 mmol L⁻¹.

Os valores de rendimento quântico singlete (Φ_S) aumentaram com o aumento da [DPA] em todos os casos, estes valores são majoritariamente da ordem de 10⁻³ E mol⁻¹, sendo $\Phi_S^{\max} = (47 \pm 3) \cdot 10^{-3}$ E mol⁻¹ obtido quando [salicilato] = 1,0 mmol L⁻¹ (**Tabela 12**).

Tabela 12: Valores de Φ_S determinados para a reação entre TCPO, H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio e usando DPA como ACT.

[DPA] (mmol L ⁻¹)	[salicilato] (mmol L ⁻¹)		
	0,10	1,0	10,0
	$\Phi_S \times 10^3$ (E mol ⁻¹)		
0,10	1,52±0,03	1,3±0,2	0,90±0,09
0,20	3,3±0,6	2,5±0,7	1,4±0,3
0,50	6,6±0,5	4,9±0,2	2,5±0,1
1,0	11,2±0,4	8,78±0,06	5,0±0,2
2,0	15±1	47±3	2,5±0,1

Os ensaios de emissão também foram realizados com rubreno (RUB) como ACT na reação de TCPO e H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio. Estes ensaios foram feitos de maneira análoga àqueles descritos com DPA, com a diferença de que se variou [RUB] de 0,10 até 1,0 mmol L⁻¹, em diversas concentrações de salicilato, sendo 5,0 mmol L⁻¹ a maior concentração de salicilato utilizada nestes ensaios. Foi observado que os valores de k_{obs} não variam com o aumento da concentração de RUB de 0,10 para 1,0

mmol L⁻¹, quando [salicilato] = 0,10 mmol L⁻¹ (**Tabela 13**). Nas concentrações de salicilato iguais a 1,0 e 5,0 mmol⁻¹, os valores de k_{obs} decrescem de $6,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para $4,81 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e de $9,4 \times 10^{-3}$ para $5,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, com o aumento da [RUB] (**Tabela 13**). Os valores de $k_{\text{obs}}^{\text{médio}}$ aumentam sete vezes com o aumento da concentração de salicilato, sendo $k_{\text{obs}}^{\text{médio}} = (1,03 \pm 0,04) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, quando [salicilato] = 0,10 mmol L⁻¹; $k_{\text{obs}}^{\text{médio}} = (5,4 \pm 0,6) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, quando [salicilato] = 1,0 mmol L⁻¹ e $k_{\text{obs}}^{\text{médio}} = (7 \pm 1) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, quando [salicilato] = 10,0 mmol L⁻¹, mostrando que a reação é mais sensível à variação da [salicilato] com RUB do que quando se usou DPA como ACT.

Analogamente aos ensaios feitos com DPA como ACT, aqui também não se observou uma tendência das constantes de velocidades observadas variarem sistematicamente em função da [DPA] (**Tabela 13, Figura 11**). Porém, assim como nos ensaios utilizando DPA, os valores das intensidades iniciais aumentaram com o aumento da [RUB] e foi necessário diminuir tanto a fenda quanto a voltagem do equipamento (**Tabela 14**).

Tabela 13: Valores de k_{obs} determinados para a reação entre TCPO e H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio usando RUB como ACT.

	[salicilato] (mmol L ⁻¹)		
	0,10	1,0	5,0
[RUB] (mmol L ⁻¹)	$k_{\text{obs}} \times 10^3$ (s ⁻¹)		
0,10	1,05±0,4	6,2±0,4	9,4±0,5
0,20	1,0±0,1	5,9±0,1	8,3±0,2
0,50	0,97±0,09	5,2±0,1	6,7±0,1
0,75	1,06±0,07	5,06±0,02	6,2±0,1
1,0	1,06±0,03	4,81±0,05	5,9±0,1
$k_{\text{obs}}^{\text{médio}}$ $\times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	1,03±0,04	5,4±0,6	7±1

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 2,0 mmol L⁻¹; em acetato de etila a 25°C.

Figura 11: Comportamento da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a [RUB] na reação de TCPO (0,10 mmol L⁻¹) com salicilato de sódio (0,10; 1,0 e 5,0 mmol L⁻¹) e H₂O₂ (2,0 mmol L⁻¹) em acetato de etila.

Tabela 14: Comportamento das intensidades de emissão em função da concentração de ACT para a reação entre TCPO, H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio.

Sensibilidade da fotomultiplicadora (V/nm)	[RUB] (mmol L ⁻¹)	Intensidades médias de emissão (u.a.) ^a
600/5	0,10	380±77
	0,20	578±27
	0,50	612±21
	1,0	574±22
	2,0	558±18

^a[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 2,0 mmol L⁻¹, [salicilato] = 0,10 mmol L⁻¹.

Os rendimentos quânticos singlete determinados aqui foram, de maneira geral, duas ordens de grandeza maiores do que aqueles obtidos quando se usou DPA como ACT, sendo o maior deles $\Phi_s^{\text{max}} = (0,86 \pm 0,02) \text{ E mol}^{-1}$ quando [salicilato] = 1,0 mmol L⁻¹ e [RUB] = 1,0 mmol L⁻¹, indicando que esta reação se mostra mais eficiente quando se usa RUB no lugar de DPA nesta reação (**Tabela 15**). Além disso, o rendimento quântico da reação aumenta com o aumento da [salicilato] quando as [RUB] são 0,10 e 0,20 mmol L⁻¹. Porém, nas concentrações de rubreno de 0,50 até 1,0 mmol L⁻¹, observa-se que o rendimento quântico aumenta da concentração de salicilato de 0,10 mmol L⁻¹

para 1,0 mmol L⁻¹ e diminui da concentração de salicilato igual a 1,0 mmol L⁻¹ para 5,0 mmol L⁻¹ (**Tabela 15**). Este comportamento difere daquele observado quando se usa DPA como ACT, em que o rendimento quântico, além de ser duas ordens de grandeza menor, também diminui com o aumento da [salicilato] em todas as condições estudadas.

Tabela 15: Valores de Φ_s determinados para a reação entre TCPO, H₂O₂ e salicilato de sódio usando RUB como ativador em diferentes condições.

	[salicilato] (mmol L ⁻¹)		
	0,10	1,0	5,0
[RUB] (mmol L ⁻¹)	Φ_s (E mol ⁻¹)		
0,10	0,27±0,03	0,33±0,02	0,36±0,02
0,20	0,39±0,03	0,41±0,01	0,53±0,04
0,50	0,45±0,03	0,73±0,01	0,69±0,03
0,75	0,50±0,01	0,74±0,01	0,63±0,01
1,0	0,52±0,01	0,86±0,02	0,66±0,05

4.1.4 Ensaios de emissão com variação da temperatura para a reação de TCPO e H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio

Os ensaios cinéticos de emissão para a reação de TCPO e H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio utilizando DPA como ACT foram realizados em diferentes temperaturas, com o objetivo de entender o comportamento da velocidade da reação nestas condições. A variação de temperatura nestes ensaios foi de 10,0 até 40,0°C em diferentes condições de [salicilato] e [H₂O₂] (**Tabela 16**). Entre as três condições experimentais apresentadas, a condição em que [salicilato] = 1,0 mmol L⁻¹ e [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹ foi aquela que apresentou os maiores valores de k_{obs} . Em todas as condições, as variações nos valores de k_{obs} foram similares entre si, de aproximadamente três vezes, em cada caso, com uma variação de quatro vezes na temperatura do sistema (**Tabela 16**).

Tabela 16: Valores de k_{obs} determinados para a reação entre TCPO, H_2O_2 e salicilato de sódio usando DPA como ativador em diferentes temperaturas.

T (°C)	Condições experimentais		
	[salicilato] = 1,0 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 1,0 mmol L ⁻¹	[salicilato]=10,0 mmol L ⁻¹
	[H ₂ O ₂] = 1,0 mmol L ⁻¹	[H ₂ O ₂] = 10,0 mmol L ⁻¹	[H ₂ O ₂] = 1,0 mmol L ⁻¹
	$k_{\text{obs}} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$		
10,0	2,44±0,03	13,1±0,5	3,3±0,3
20,0	3,6±0,2	17,5±0,1	4,2±0,1
25,0	-	21±1	5,11±0,06
30,0	5,5±0,2	23,9±0,8	5,84±0,07
40,0	8,1±0,2	31,8±0,3	7,8±0,1

4.2 Ensaios cinéticos de emissão para a reação de DNPO e H_2O_2 utilizando salicilato de sódio como catalisador

Analogamente às cinéticas feitas utilizando-se TCPO como o éster oxálico da reação peroxioxalato e salicilato de sódio como catalisador desta transformação, foram realizados ensaios quimiluminescentes utilizando o oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO), um éster mais reativo do que o TCPO, nesta reação com a finalidade de se elucidar o mecanismo desta transformação através da determinação das constantes de velocidade observadas e a atribuição das mesmas para cada etapa desta transformação. Além disso, visa-se determinar a eficiência desta reação através da determinação dos rendimentos quânticos singlete. Foram realizados ensaios de emissão de luz em que se verificou a influência do salicilato de sódio na velocidade da reação, variando sua concentração de 0,10 até 5,0 mmol L⁻¹; e ensaios em que se verificou o efeito que a variação da concentração de peróxido de hidrogênio provoca na velocidade da reação, a variação na $[\text{H}_2\text{O}_2]$ foi de 0,50 até 250 mmol L⁻¹. Em todos os ensaios, as concentrações de DNPO e DPA foram fixadas em 0,10 e 0,20 mmol L⁻¹, respectivamente. Em todos os casos, as condições da fotomultiplicadora foram sempre de 1000 V e fenda de 20 nm.

Nos ensaios com variação da [salicilato] e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, observou-se que a intensidade de luz emitida diminui com o aumento de sua concentração. Além disso, a reação se mostrou muito rápida mesmo nas menores concentrações de salicilato, o aumento da intensidade de emissão foi extremamente rápido, impossibilitando um ajuste matemático da subida da curva de emissão, sendo possível apenas ajustar matematicamente o decaimento da intensidade de emissão para a obtenção das constantes de velocidade observadas para este decaimento (k_{obs}). Estes ensaios mostraram que k_{obs} aumenta com a concentração desta base, observa-se que enquanto a concentração de salicilato varia cinquenta vezes, de 0,10 a 5,0 mmol L^{-1} , k_{obs} sofre uma variação de dez vezes (**Tabela 17**), foi possível estabelecer uma correlação linear entre k_{obs} e a [salicilato], em que o coeficiente linear fornece a constante de velocidade correspondente à reação não catalisada ($k_0 = (-0,049 \pm 0,008) \text{ s}^{-1}$) e o coeficiente angular fornece a constante bimolecular de interação entre o salicilato e o DNPO no passo lento da reação ($k_{\text{bim}} = (952 \pm 30) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (**Figura 12**).

Tabela 17: Variação da constante de velocidade de decaimento (k_{obs}) com a [salicilato] na reação de DNPO com peróxido de hidrogênio, usando DPA como ativador.

[salicilato] (mmol L^{-1})	k_{obs} (s^{-1})
0,10	$0,046 \pm 0,006$
0,25	$0,19 \pm 0,02$
0,50	$0,41 \pm 0,02$
0,75	$0,6 \pm 0,1$
1,0	$0,97 \pm 0,04$
1,5	$1,20 \pm 0,07$
2,0	$1,8 \pm 0,1$
3,5	$3,4 \pm 0,2$
5,0	$4,5 \pm 0,6$

[DNPO] = 0,10 mmol L^{-1} , $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, [DPA] = 0,20 mmol L^{-1} em acetato de etila a 25°C.

Figura 12: Dependência da constante de velocidade observada para o decaimento (k_{obs}) com [salicilato] em sua reação com DNPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) e H_2O_2 ($10,0 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de DPA ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT, em acetato de etila a 25°C . O ajuste foi feito usando a regressão linear $k_{obs} = k_0 + k_{bim}[\text{salicilato}]$, $R^2 = 0,992$.

Os resultados aqui apresentados para o DNPO mostram que a reação ocorre preferencialmente pelo caminho em que há a catálise pelo salicilato, uma vez que o valor de k_0 é muito próximo de zero. Além disso, k_{bim} apresenta um valor alto mostrando que há uma interação entre o DNPO e o salicilato no passo lento desta reação.

Analogamente às cinéticas com variação de [salicilato de sódio], as reações com variação de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ e $[\text{salicilato}] = 0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, também se mostraram relativamente rápidas, principalmente no que diz respeito ao aumento da intensidade de emissão. Como a subida se mostrou muito rápida, mesmo nas menores concentrações de peróxido, não foi possível fazer um ajuste matemático nesta região da curva devido ao número insuficiente de pontos. Assim, fez-se o ajuste com a função monoexponencial para o decaimento de emissão de luz para a obtenção de k_{obs} . Observou-se que os valores de k_{obs} aumentam significativamente com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ de $0,50$ até $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a partir daí, este aumento se torna menos significativo. De uma maneira geral, um

aumento de 500 vezes na $[H_2O_2]$ proporcionou um aumento nos valores de k_{obs} de quase 18 vezes (**Tabela 18, Figura 13**). Foi possível estabelecer uma correlação linear de k_{obs} com a $[H_2O_2]$ na região de 0,50 até 20,0 mmol L⁻¹, obtendo-se uma constante de velocidade de peridrólise, $k_{per} = (14,8 \pm 0,2) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a partir da inclinação da reta, e a constante de velocidade em que o peróxido não está envolvido a partir do intercepto, $k_0' = (30 \pm 1) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (**Figura 13**).

Tabela 18: Variação da constante de velocidade de decaimento (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ na sua reação com DNPO e salicilato de sódio, usando DPA como ativador.

$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)
0,50	36,9±0,4
1,0	47±1
2,0	69±3
5,0	100±10
10	160±10
20	230±30
50	360±50
100	547±1
200	630±10
250	650±30

[salicilato] = 0,25 mmol L⁻¹, [DNPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ em acetato de etila a 25°C.

Figura 13: Dependência da constante de velocidade observada de decaimento (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ em sua reação com DNPO (0,10 mmol L⁻¹) e salicilato de sódio (0,25 mmol L⁻¹) na presença de DPA (0,20 mmol L⁻¹) como ACT, acetato de etila, a 25°C. Regressão linear feita com $k_{obs} = k_0 + k_{per}[H_2O_2]$, com $[H_2O_2] = 0,50 - 20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $R^2 = 0,900$.

Não foi possível realizar os ensaios cinéticos de absorção com monitoramento da formação do 2,4-dinitrofenol, embora este fenol não presente banda de absorção coincidente com o salicilato, sendo seu máximo de absorção em 350 nm (**Figura 14**), a reação é muito rápida e não foi possível monitorar o aumento da absorbância do sistema, uma vez que a absorbância já se apresentava constante desde o início da aquisição de dados.

Figura 14: Espectros de absorção do DNPO puro ($30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e deste éster em sua reação com Imi-H ($1,0$ até $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$), com formação do 2,4-dinitrofenol em 350 nm.

O rendimento quântico foi determinado para esta transformação tanto em função da concentração de salicilato quanto em função da concentração de peróxido, em ambos os casos, os valores de Φ_S foram da ordem de $10^{-6} \text{ E mol}^{-1}$ (**Tabelas 19 e 20, Figuras 15 e 16**).

Tabela 19: Variação do rendimento quântico singlete (Φ_S) com a [salicilato] na reação de DNPO com H_2O_2 , usando DPA como ativador.

[Salicilato] (mmol L ⁻¹)	$\Phi_S \times 10^6$ (E mol ⁻¹)
0,10	2,5±0,6
0,25	8±1
0,50	3,6±0,5
0,75	5,2±0,6
1,0	6,8±0,4
1,5	7,7±0,2
2,0	8,7±0,1
3,5	10,4±0,1
5,0	9,5±0,1

Figura 15: Variação do rendimento quântico singlete (Φ_S) em função da [salicilato] em sua reação com DNPO (0,10 mmol L⁻¹) e H_2O_2 (10,0 mmol L⁻¹) usando DPA (0,20 mmol L⁻¹) como ACT.

Tabela 20: Variação do rendimento quântico singlete (Φ_S) com a [H_2O_2] na reação de DNPO com salicilato de sódio, usando DPA como ativador.

[H_2O_2] (mmol L ⁻¹)	$\Phi_S \times 10^6$ (E mol ⁻¹)
0,50	2,7±0,9
1,0	1,3±0,5
2,0	1,2±0,6
5,0	3,4±0,1
10,0	4,3±0,2
20,0	5,4±0,2
50,0	6,1±0,2
100	7,7±0,2
200	7,8±0,1
250	8,0±0,2

Figura 16: Variação do rendimento quântico singlete (Φ_s) em função da $[H_2O_2]$ em sua reação com DNPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) e salicilato de sódio ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$) usando DPA ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT.

4.3 Ensaios cinéticos de emissão em sistema binário H_2O/DME 1:1 (v/v) com os ésteres BMePO e BMPO utilizando tampão fosfato como catalisador

Visando-se adaptar o sistema peroxioxalato ao meio aquoso para aplicações analíticas e bioanalíticas, foram feitos ensaios cinéticos desta reação em meios binários H_2O/DME com proporção 1:1 (v/v) utilizando neste trabalho, inicialmente, o éster oxalato de bis(4-metilfenila) (BMePO) e, posteriormente, o oxalato de bis(4-metoxifenila) (BMPO). Houve a necessidade de se preparar o tampão a partir de um fosfato orgânico, o fosfato de tetrabutilamônio (TBAP), para que não ocorresse qualquer tipo de precipitação na mistura reacional. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa iniciaram estes estudos em meio aquoso tamponado utilizando o éster TCPO, em que houve indicativas de uma possível ocorrência de catalise ácida neste sistema.⁸⁸ Foram estudadas a variação de concentração de tampão e a variação da concentração de peróxido de hidrogênio nas reações de BMePO e BMPO usando 2,5-difeniloxazol (PPO) como ACT em diferentes pH.

Os estudos das variações da [TBAP] e da [H₂O₂] visam esclarecer as etapas lentas desta reação em um sistema binário H₂O/DME 1:1 (v/v), os ensaios foram feitos em um luminômetro, já que estes ésteres são menos reativos do que o TCPO e, consequentemente, a intensidade da emissão é mais baixa, de forma que foi necessário um equipamento mais sensível para realizar tais medidas. Tanto nos ensaios com BMePO quanto no ensaios com BMPO, variou-se a [TBAP] de 8,0 a 100 mmol L⁻¹ nos pH 6, 7 e 8, com [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 1,5 mmol L⁻¹ e [éster oxálico] = 0,10 mmol L⁻¹. Observou-se que a reação para os dois ésteres nestas situações é extremamente rápida, de modo que foi possível apenas determinar a constante de velocidade observada (k_{obs}) para o decaimento da emissão (**Equação 5**), o aumento da intensidade de emissão se mostrou muito rápido, impossibilitando um ajuste matemático da subida devido ao baixo número de pontos registrados (**Figura 17**).

Figura 17: Perfil cinético de emissão da reação entre BMePO (0,10 mmol L⁻¹), H₂O₂ (10,0 mmol L⁻¹) e TBAP (25,0 mmol L⁻¹) usando PPO (1,5 mmol L⁻¹) como ACT em pH 6. A proporção H₂O/DME foi de 1:1 (v/v).

Nos ensaios de BMePO com variação da [TBAP], verificou-se uma tendência de k_{obs} aumentar com o aumento da concentração de tampão nos pH 6 e 7, esta tendência se tornou mais pronunciada em pH 8, em que se obteve os maiores valores de k_{obs} . Para

uma variação da [TBAP] de 12,5 vezes, os valores de k_{obs} em pH 6 aumentaram mais de três vezes; em pH 7, k_{obs} sofreu uma variação de 1,6 vezes; em pH 8, os valores de k_{obs} quase dobraram (**Tabela 21**). Foi possível estabelecer uma correlação linear entre [TBAP] e k_{obs} nas concentrações mais baixas de tampão nos pH 6 e 7, e em todo intervalo de concentração de tampão em pH 8 (**Figura 18A**). Do intercepto destas correlações se obteve a constante de velocidade k , que corresponde à reação em que não há envolvimento do fosfato ($k = (0,028 \pm 0,005) \text{ s}^{-1}$ em pH 6; $k = (0,188 \pm 0,004) \text{ s}^{-1}$ em pH 7 e $k = (0,41 \pm 0,02) \text{ s}^{-1}$ em pH 8). A inclinação da correlação linear fornece a constante de velocidade bimolecular (k_{cat}) indicativa do papel catalítico do fosfato neste sistema, nos três pH estudados, os valores de k_{cat} de mostraram muito similares entre si ($k_{\text{cat}} = (4,3 \pm 0,3) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 6; $k_{\text{cat}} = (4,8 \pm 0,3) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7 e $k_{\text{cat}} = (3,4 \pm 0,3) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 8).

Para o éster BMPO, foi possível apenas determinar os valores de k_{obs} em pH 7, os ensaios realizados em pH 6 e 8 com BMPO não permitiram obter quantidade de dados suficientes e reprodutíveis que fornecessem informações mecanísticas sobre esta reação, pois nestas condições a reação se torna extremamente rápida, não sendo possível medir e obter pontos suficientes correspondentes ao início da reação, impedindo a determinação de k_{obs} . Em pH 7, os valores de k_{obs} aumentam com a [TBAP] até 50,0 mmol L⁻¹, a partir daí, os valores de k_{obs} mantiveram-se constantes (**Tabela 21**). Obteve-se uma correlação linear entre [TBAP] e k_{obs} de 8,0 até 50,0 mmol L⁻¹ neste pH, (**Figura 18B**). O coeficiente angular da correlação linear fornece $k_{\text{cat}} = (9,2 \pm 0,8) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e do intercepto tem-se $k = (0,22 \pm 0,04) \text{ s}^{-1}$, correspondendo à reação em que não há participação do fosfato.

Tabela 21: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a [TBAP] nas reações de BMePO e BMPO com peróxido de hidrogênio, usando PPO como ACT.

[TBAP] (mmol L ⁻¹)	BMePO			BMPO
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 7
	k_{obs} (s ⁻¹)			k_{obs} (s ⁻¹)
8,0	0,058±0,008	0,226±0,005	0,45±0,03	0,25±0,01
12,5	0,083±0,003	0,23±0,02	0,54±0,05	0,33±0,02
25,0	0,135±0,007	0,309±0,008	0,50±0,01	0,49±0,01
50,0	0,18±0,01	0,320±0,006	0,56±0,02	0,684±0,004
75,0	0,179±0,003	0,33±0,01	0,668±0,003	0,64±0,01
100	0,179±0,004	0,36±0,02	0,82±0,03	0,63±0,04

[TBAP] = 8,0 a 100 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 1,5 mmol L⁻¹ e [éster oxálico] = 0,10 mmol L⁻¹ em um meio binário DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v).

Figura 18: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a [TBAP] em sua reação com (A) BMePO em pH 6, 7 e 8, a regressão linear foi feita com $k_{obs} = k + k_{cat}[TBAP]$; com [TBAP] = 8,0 – 25,0 mmol L⁻¹, em pH 6, $R^2 = 0,987$; [TBAP] = 8,0 – 25,0 mmol L⁻¹ em pH 7, $R^2 = 0,994$; [TBAP] = 8,0 – 100 mmol L⁻¹ em pH 8, $R^2 = 0,961$; (B) BMPO em pH 7, regressão linear feita com $k_{obs} = k + k_{cat}[TBAP]$; com [TBAP] = 8,0 – 50,0 mmol L⁻¹, $R^2 = 0,973$. [éster oxálico] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 1,5 mmol L⁻¹. Proporção DME/H₂O 1:1 (v/v).

As cinéticas de emissão com a variação da concentração de peróxido de hidrogênio foram feitas variando-se [H₂O₂] de 2,5 até 50,0 mmol L⁻¹ com concentrações finais de [TBAP] = 25,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 1,5 mmol L⁻¹ e [éster oxálico] = 0,10 mmol

L^{-1} . Analogamente aos ensaios descritos anteriormente, a reação é extremamente rápida, sendo possível ajustar apenas a curva de decaimento para a obtenção de k_{obs} .

Nos ensaios com BMePO, observou-se que a reação se mostrou bastante sensível à variação da $[\text{H}_2\text{O}_2]$. Em pH 6, os valores de k_{obs} aumentaram de 0,043 até $0,51 \text{ s}^{-1}$; em pH 7 k_{obs} variou de 0,150 até $1,16 \text{ s}^{-1}$ e em pH 8 k_{obs} aumentou de 0,31 até $1,24 \text{ s}^{-1}$, sendo que neste último pH, k_{obs} apresentou seus maiores valores, em concordância com os resultados obtidos nos ensaios de variação de [TBAP] (**Tabela 22**). Foi possível estabelecer uma correlação linear entre k_{obs} e $[\text{H}_2\text{O}_2]$ em todos os pH estudados (**Figura 19**), da qual se obteve a constante de peridrólise (k_{per}) através do coeficiente angular da reta, esta é uma constante bimolecular resultante da interação entre o éster e o peróxido de hidrogênio, cujos valores aumentam consideravelmente de pH 6 até pH 8 ($k_{\text{per}} = (9,6 \pm 0,4) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 6; $k_{\text{per}} = (20 \pm 1) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7 e $k_{\text{per}} = (61 \pm 3) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 8). As constantes de hidrólise (k_{hidr}), obtidas através do coeficiente linear da reta e resultantes da interação direta entre o éster e a água levando a produtos sem emissão de luz, apresentaram-se uma ordem de grandeza menor e muito próxima de zero em pH 6 do que nos pH 7 e 8 ($k_{\text{hidr}} = (0,01 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$ em pH 6; $k_{\text{hidr}} = (0,16 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$ em pH 7 e $k_{\text{hidr}} = (0,15 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$ em pH 8).

Tabela 22: Dependência da constante de velocidade (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ em sua reação com BMePO catalisada por TBAP, usando PPO como ACT nos pH 6, 7 e 8.

$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	pH 6	pH 7	pH 8
	k_{obs} (s ⁻¹)		
2,5	0,043±0,002	0,150±0,007	0,310±0,003
5,0	0,066±0,002	0,233±0,005	0,55±0,03
10,0	0,114±0,005	0,388±0,001	0,77±0,03
15,0	0,151±0,006	0,462±0,007	1,1±0,2
20,0	0,189±0,007	0,62±0,01	1,36±0,04
35,0	0,32±0,01	0,88±0,01	1,24±0,04
50,0	0,517±0,001	1,16±0,01	-

$[BMePO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[PPO] = 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$; $[H_2O_2] = 2,5 - 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $[TBAP] \text{ (pH 6, 7 e 8)} = 25,0 \text{ mmol L}^{-1}$. DME/H₂O 1:1 (v/v).

Figura 19: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com $[H_2O_2]$ em sua reação com BMePO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) catalisada por TBAP ($25,0 \text{ mmol L}^{-1}$) usando-se PPO ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT em um meio binário H₂O/DME proporção 1:1 (v/v). Regressão linear feita com $k_{obs} = k_{hidr} + k_{per}[H_2O_2]$; com $[H_2O_2] = 2,5 - 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 6, $R^2 = 0,987$; $[H_2O_2] = 2,5 - 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 7, $R^2 = 0,971$; $[H_2O_2] = 2,5 - 20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 8, $R^2 = 0,989$.

Nos ensaios cinéticos de emissão com BMPO variando-se a concentração de peróxido de hidrogênio observou-se que em pH 7 os valores de k_{obs} variaram quase 10 vezes, de $0,11$ até $1,06 \text{ s}^{-1}$, com uma variação de 20 vezes da $[H_2O_2]$, de $2,5$ até $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Tabela 23**), obtendo-se um valor da constante de velocidade de peridrólise ($k_{per} = (34 \pm 1) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), correspondente à inclinação da reta quando se relaciona os

valores de k_{obs} com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (**Figura 20**). Os valores de k_{obs} neste pH aumentam até $[\text{H}_2\text{O}_2] = 35,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a partir daí mantiveram-se constantes em $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, o que pode indicar a mudança do passo lento da reação. Em pH 8, a reação apresenta valores de k_{obs} maiores do que em pH 7, com a constante de velocidade variando quase 6 vezes, de 0,21 até $1,18 \text{ s}^{-1}$, enquanto que a concentração de peróxido aumentou de 2,5 até $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Tabela 23**). O valor de k_{per} em pH 8 é quase o dobro do que em pH 7 (pH 8, $k_{\text{per}} = (74 \pm 1) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (**Figura 20**). Em pH 6, a reação apresenta os maiores valores de k_{obs} (**Tabela 23**), porém, é tão rápida que a determinação de k_{obs} acima de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 é dificultada, não sendo possível a determinação de k_{per} nesta situação (**Figura 20**). As constantes da reação de hidrólise são baixas em pH 7 e 8, e menores do que aquelas obtidas para BMePO ($k_{\text{hidr}} = (0,02 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$ em pH 7 e $k_{\text{hidr}} = 0,06 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ em pH 8), não foi possível determinar k_{hidr} em pH 6 (**Tabela 23**).

Tabela 23: Dependência da constante de velocidade (k_{obs}) com a concentração de H_2O_2 em sua reação com BMPO catalisada por TBAP, usando PPO como ACT nos pH 6, 7 e 8.

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mmol L^{-1})	pH 6	pH 7	pH 8
	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$		
2,5	$0,92 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$
5,0	$1,1 \pm 0,1$	$0,18 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,03$
10,0	$1,23 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,02$	$0,811 \pm 0,005$
15,0	-	$0,52 \pm 0,02$	$1,18 \pm 0,06$
20,0	-	$0,70 \pm 0,01$	-
35,0	-	$1,04 \pm 0,01$	-
50,0	-	$1,06 \pm 0,09$	-

$[\text{BMPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{PPO}] = 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,5 - 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{TBAP}] (\text{pH 6, 7 e 8}) = 25,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Proporção DME/ H_2O 1:1 (v/v).

Figura 20: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ nos pH 6, 7 e 8 em sua reação com BMPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) catalisada por TBAP ($25,0 \text{ mmol L}^{-1}$) usando PPO ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT. Proporção DME/ H_2O 1:1 (v/v). Regressão linear feita com $k_{obs} = k_{hidr} + k_{per}[H_2O_2]$; com $[H_2O_2] = 2,5 - 20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 7, $R^2 = 0,988$; $[H_2O_2] = 2,5 - 15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 8, $R^2 = 0,998$.

Os rendimentos quânticos de singlete (Φ_s) obtidos para BMePO nos ensaios com variação de [TBAP] se mostraram bastante baixos, em geral da ordem de $10^{-7} \text{ E mol}^{-1}$, sendo $\Phi_s^{\max} = (4 \pm 3) \cdot 10^{-5} \text{ E mol}^{-1}$ obtido em pH 8. Para o BMPO os rendimentos quânticos a pH 7 são uma ordem de grandeza menor do que para BMePO nas mesmas condições (**Tabela 24**).

Tabela 24: Dependência dos rendimentos quânticos singlete (Φ_s) com a [TBAP] para as reações de BMePO e BMPO com H_2O_2 usando PP como ACT em pH 6, 7 and 8.

[TBAP] (mmol L^{-1})	BMePO			BMPO
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 7
	$\Phi_s \times 10^7 (\text{E mol}^{-1})$			$\Phi_s \times 10^7 (\text{E mol}^{-1})$
8,0	$0,10 \pm 0,01$	$2,5 \pm 2,3$	70 ± 70	$0,21 \pm 0,05$
12,5	$0,15 \pm 0,01$	$2,4 \pm 1,8$	300 ± 200	$0,25 \pm 0,01$
25,0	$0,21 \pm 0,07$	$4,2 \pm 0,2$	80 ± 80	$0,15 \pm 0,05$
50,0	$0,3 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	300 ± 300	$0,10 \pm 0,01$
75,0	$0,27 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,3$	300 ± 200	$0,08 \pm 0,01$
100	$0,06 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,2$	400 ± 300	$0,07 \pm 0,01$

[éster oxálico] = $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, [PPO] = $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, [TBAP] = 8,0 até 100 mmol L^{-1} , em pH 6, 7 e 8, em um meio binário DME/ H_2O 1:1 (v/v).

4.4 Ensaios cinéticos de emissão com os ésteres TCPO e BMePO em sistema binário DME/H₂O 1:1 (v/v) com salicilato de sódio como catalisador

Estudos utilizando salicilato de sódio como catalisador em um sistema binário composto por água e DME dão continuidade aos estudos mecanísticos em meio aquoso iniciados com tampão fosfato. Porém, o objetivo principal destes estudos visa completa adaptação do sistema peroxioxalato a um meio majoritariamente aquoso, em que somente a solução do éster oxálico é preparada em solvente orgânico visando aplicações analíticas e bioanalíticas desta transformação. Inicialmente, verificou-se a eficácia catalítica do salicilato de sódio na reação de TCPO com H₂O₂ em sistemas binários DME/H₂O 1:1 (v/v) em condições experimentais que fossem reprodutíveis para este sistema. Posteriormente, utilizou-se o BMePO, já que se trata de um éster oxálico menos reativo do que o TCPO, e que poderia trazer informações mecanísticas importantes sobre as etapas lentas desta transformação nas condições experimentais apresentadas.

4.4.1 Ensaios cinéticos de emissão da reação entre TCPO, H₂O₂, salicilato de sódio utilizando PPO como ativador

Os ensaios de emissão iniciais foram feitos com TCPO, salicilato de sódio, peróxido de hidrogênio e PPO em um sistema binário DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v). A reação é rápida e, novamente, foi possível apenas determinar k_{obs} para o decaimento da emissão, já que não há pontos suficientes para ajustar a subida (**Figura 21**). Além disso, a intensidade de emissão para este sistema é baixa, sendo necessário utilizar a fotomultiplicadora do espectrofluorímetro em sua máxima sensibilidade 1000 V com fendas de 2,5 a 20 nm.

Figura 21: Perfil cinético da reação de TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) com salicilato de sódio ($80,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e H_2O_2 ($80,0 \text{ mmol L}^{-1}$), usando PPO ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v).

Nestes ensaios, variou-se a concentração de salicilato de sódio de $64,0$ até 400 mmol L^{-1} e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 40,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Foi escolhido este intervalo de concentrações, pois esta foi uma condição experimental adequada para que o ensaio fosse reprodutível. Assim, os resultados iniciais mostraram que existe uma tendência de k_{obs} em aumentar com a $[\text{salicilato}]$ (**Tabela 25**). Estabeleceu-se uma correlação linear entre a $[\text{salicilato}]$ e k_{obs} ; foi possível obter a constante de velocidade $k_0 = (3,2 \pm 0,2) 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, através do coeficiente linear da correlação, esta constante se refere à reação não catalisada por salicilato. Através do coeficiente angular, obteve-se a constante bimolecular ($k_{\text{bim}} = (6,5 \pm 0,8) 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) referente à interação do salicilato com o TCPO no passo lento da reação (**Figura 22**).

Tabela 25: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a [salicilato] em sua reação com TCPO e H_2O_2 , usando PPO como ACT em um meio DME/ H_2O 1:1 (v/v).

[salicilato] (mmol L ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)
64,0	33±3
80,0	36±2
128	43±2
192	46±2
256	51±3
320	54±1
400	55±2

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H_2O_2] = 40,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 5,0 mmol L⁻¹ e [salicilato] = 64,0 a 400 mmol L⁻¹ em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v).

Figura 22: Dependência da constante de velocidade observada para o decaimento da emissão (k_{obs}) com a [salicilato] em sua reação com TCPO (0,10 mmol L⁻¹) e H_2O_2 (40,0 mmol L⁻¹), usando PPO (5,0 mmol L⁻¹) como ACT em sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v). Regressão linear feita com $k_{obs} = k_0 + k_{bim}[\text{salicilato}]$, $R^2 = 0,926$.

A tendência que os valores de k_{obs} apresentam de aumentar com a concentração de salicilato é bastante sutil, já que se variou a concentração de salicilato em mais de 6 vezes e a constante de velocidade variou apenas 1,5 vezes. Logo, k_{obs} varia pouco com [salicilato] em um meio parcialmente aquoso, o TCPO é bastante reativo e a concorrência entre a reação catalisada com a reação de hidrólise é bastante significativa para este éster.

Nos ensaios com variação de peróxido de hidrogênio, a concentração de salicilato foi de 80,0 mmol L⁻¹ e se variou a [H_2O_2] no intervalo de 40,0 até 500 mmol

L⁻¹. A concentração de peróxido variou mais de 12,5 vezes enquanto que k_{obs} variou quase 6 vezes (**Tabela 26**). Os valores de k_{obs} mostraram uma dependência linear com a $[H_2O_2]$, assim, foi possível obter a constante de peridrólise ($k_{per} = (0,27 \pm 0,02) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) através da inclinação da reta, e a constante de hidrólise ($k_{hidr} = (18 \pm 1) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) em que não há envolvimento de peróxido e leva a produtos sem emissão de luz (**Figura 23**).

Tabela 26: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ em sua reação com TCPO catalisada por presença de salicilato de sódio, usando PPO como ACT em um sistema binário DME/H₂O 1:1 (v/v).

$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)
40,0	29,0±0,2
80,0	36,2±0,5
160	64±2
240	88±2
320	109±2
400	133±4
500	170±10

$[TCPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{salicilato}] = 80,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[PPO] = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[H_2O_2] = 40,0$ a 500 mmol L^{-1} em um sistema binário DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v).

Figura 23: Dependência da constante de velocidade observada no decaimento da emissão de luz (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ em sua reação com TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) catalisada por salicilato de sódio ($80,0 \text{ mmol L}^{-1}$), usando PPO ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT em um sistema binário DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v). Regressão linear feita com $k_{obs} = k_{hidr} + k_{per}[H_2O_2]$, $R^2 = 0,971$.

O espectro de absorção do TCPO puro e com adições de Imi-H em DME/H₂O, mostra a intensificação da banda de absorção em 320 nm, indicando a formação do fenol correspondente (**Figura 24A**). O monitoramento desta reação por espectrofotometria UV-vis, em que se mede a absorção do fenol liberado, não é possível, já que o salicilato de sódio apresenta absorção competitiva (**Figura 24B**) com o TCP proveniente do TCPO quando este reage com uma base (**Figura 24**).

Figura 24: Espectros de absorção de **(A)** TCPO (0,10 mmol L⁻¹) e de sua reação com Imi-H (1,0 mmol L⁻¹), com os espectros da reação registrados em 20 ciclos de 15 segundos cada, em um sistema binário DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v) com máximo de absorção do éster em 287 nm e do fenol correspondente em 320 nm. **(B)** Salicilato de sódio (0,10 mmol L⁻¹) na mistura DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v) com um máximo de absorção em 296 nm e outra banda de absorção na região de 220 a 230 nm.

Os valores de rendimento quântico singlete (Φ_S) determinados para esta transformação em função da [salicilato] mantiveram-se relativamente constantes, porém muito baixos, da ordem de 10^{-5} E mol⁻¹ (**Tabela 27, Figura 25**).

Tabela 27: Variação do rendimento quântico singlete (Φ_s) com a [salicilato] em sua reação com TCPO e H_2O_2 , usando PPO como ACT em um meio DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v).

[salicilato] (mmol L ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^5$ (E mol ⁻¹)
64,0	7 $\pm$ 1
80,0	8,7 $\pm$ 0,7
128	7 $\pm$ 1
192	7,4 $\pm$ 0,6
256	7,7 $\pm$ 0,6
320	8,0 $\pm$ 0,6
400	7,3 $\pm$ 0,7
$\Phi_s^{\text{médio}} \times 10^5$ (E mol ⁻¹)	7,5 $\pm$ 0,6

Figura 25: Comportamento do rendimento quântico singlete (Φ_s) com a [salicilato] em sua reação com TCPO (0,10 mmol L⁻¹) e H_2O_2 (40,0 mmol L⁻¹) usando PPO (5,0 mmol L⁻¹) como ACT em um sistema binário DME/ H_2O 1:1 (v/v).

4.4.2 Ensaios cinéticos de emissão da reação entre BMePO, H_2O_2 , salicilato de sódio utilizando PPO como ativador

Ensaios cinéticos de emissão análogos aos realizados com TCPO foram feitos com o éster BMePO, um éster menos reativo e que poderia ajudar a compreender melhor o mecanismo dessa reação em meio aquoso. A reação mostrou um rápido aumento da intensidade de emissão seguido por um decaimento mais lento, ao qual se pôde atribuir a constante de velocidade observada (k_{obs}) (**Figura 26**).

Figura 26: Perfil cinético da reação de BMePO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) com salicilato de sódio ($20,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e peróxido de hidrogênio ($10,0 \text{ mmol L}^{-1}$), usando PPO ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v).

A cinética com variação da [salicilato] foi feita no intervalo de concentração de $10,0$ até 400 mmol L^{-1} e a concentração de peróxido de hidrogênio foi de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Diferentemente do que foi feito com TCPO, foi possível trabalhar com concentrações mais baixas de salicilato, condições em que o sistema se mostrou reprodutível (**Tabela 28**). Pôde-se observar que no intervalo de concentração de salicilato de $10,0$ até 160 mmol L^{-1} a constante de velocidade aumentou quase quatro vezes e, a partir daí, manteve-se com valores relativamente constantes, apresentando uma região de saturação. Os valores de k_{obs} apresentaram um comportamento linear com a [salicilato] de $10,0$ até $80,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Figura 27**), a partir do qual foi possível obter a constante de velocidade bimolecular ($k_{\text{bim}} = (0,21 \pm 0,04) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) através da inclinação da reta e a constante de velocidade não catalisada ($k_0 = (3,8 \pm 0,7) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) através do intercepto da reta (**Figura 27**).

Tabela 28: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a [salicilato] em sua reação com BMePO e H_2O_2 , usando PPO como ACT em um meio DME/ H_2O 1:1 (v/v).

[salicilato] (mmol L ⁻¹)	$k_{\text{obs}} \times 10^3$ (s ⁻¹)
10,0	5,6±0,1
20,0	8,6±0,2
40,0	13±1
80,0	18±1
160	21±1
320	22±1
400	21,1±0,1

[BMePO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H_2O_2] = 10,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 5,0 mmol L⁻¹ e [salicilato] = 10,0 a 400 mmol L⁻¹ em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v).

Figura 27: Dependência da constante de velocidade observada no decaimento da emissão de luz (k_{obs}) com a [salicilato] em sua reação com BMePO (0,10 mmol L⁻¹) e peróxido de hidrogênio (10,0 mmol L⁻¹), usando PPO (5,0 mmol L⁻¹) como ACT em sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v). Regressão linear feita com $k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{bim}}[\text{salicilato}]$, com [salicilato] = 10,0 – 80,0 mmol L⁻¹, $R^2 = 0,888$.

O comportamento desta reação também foi estudado com a variação da concentração de peróxido de hidrogênio de 10,0 até 500 mmol L⁻¹ com a [salicilato] = 10,0 mmol L⁻¹. Foi possível observar que k_{obs} aumenta mais de 15 vezes com um aumento de 50 vezes na [H_2O_2]; aumentando linearmente no intervalo de 10,0 até 160 mmol L⁻¹ e, a partir daí, chegando a uma região de saturação (**Tabela 29**). Da região linear da curva obteve-se $k_{\text{per}} = (0,38 \pm 0,02) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{hidr}} = (2,3 \pm 0,5) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (**Figura 28**). Estes resultados mostram que a constante de hidrólise neste caso é

consideravelmente menor do que aquela obtida na reação com TCPO e a constante de peridrólise é da mesma ordem de grandeza. A região de saturação da curva indica que a reação deixou de depender da $[H_2O_2]$ e houve uma mudança no passo lento da reação.

Tabela 29: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ em sua reação com BMePO catalisada por salicilato de sódio, usando PPO como ACT em um meio DME/ H_2O 1:1 (v/v) .

$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)
10,0	5,7±0,5
20,0	9,9±0,5
40,0	18±1
80,0	33±1
160	58±3
320	76±10
400	84±4
500	87±3

$[BMePO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[salicilato] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[PPO] = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[H_2O_2] = 10,0$ a 500 mmol L^{-1} em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v).

Figura 28: Dependência da constante de velocidade observada no decaimento da emissão (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ em sua reação com BMePO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) catalisada por salicilato de sódio ($10,0 \text{ mmol L}^{-1}$), usando PPO ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v). Regressão linear feita com $k_{obs} = k_{hidr} + k_{per}[H_2O_2]$, com $[H_2O_2] = 10,0 - 160 \text{ mmol L}^{-1}$, $R^2 = 0,993$.

Do espectro de absorção do BMePO puro e com adições de Imi-H em DME/ H_2O , o que se observou foi a intensificação da banda de absorção em 224 nm e na

região de 270 a 290 nm, indicando a formação do fenol correspondente (**Figura 29**). O monitoramento desta reação por espectrofotometria UV-vis, em que se mede a absorção do fenol liberado, também não é possível, já que o salicilato de sódio apresenta bandas de absorção coincidentes com o 4-metilfenol proveniente do éster oxálico quando este reage com uma base, no caso o Imi-H (**Figuras 24B e 29**).

Figura 29: Espectros de absorção do BMePO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) puro e de sua reação com Imi-H ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), com os espectros da reação adquiridos em 20 ciclos de 15 segundos cada, em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v) com máximo de absorção do éster em 255 nm e do fenol correspondente em 224 nm e na região de 270 a 290 nm.

Os valores de rendimento quântico singlete (Φ_S) obtidos para a transformação quimiluminescente de BMePO foram determinados conforme descrito anteriormente (**seção 3.7.2**) em função da [salicilato] e seus valores máximos são da ordem de $10^{-7} \text{ E mol}^{-1}$. Observou-se que os valores de Φ_S apresentam um decréscimo com o aumento da concentração de salicilato, o que não foi observado nos ensaios com TCPO (**Tabela 30, Figura 30**).

Tabela 30: Variação do rendimento quântico singlete (Φ_s) com a [salicilato] em sua reação com BMePO e H_2O_2 , usando PPO como ACT em um meio DME/ H_2O 1:1 (v/v).

[salicilato] (mmol L ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^7$ (E mol ⁻¹)
10,0	2,4±0,3
20,0	1,7±0,1
40,0	1,4±0,1
80,0	1,10±0,02
160	1,10±0,01
320	0,80±0,07
400	0,49±0,07

Figura 30: Comportamento do rendimento quântico singlete (Φ_s) com a [salicilato] em sua reação com BMePO (0,10 mmol L⁻¹) e H_2O_2 (10,0 mmol L⁻¹) usando PPO (5,0 mmol L⁻¹) como ACT em um sistema binário DME/ H_2O 1:1 (v/v).

4.5 Ensaios cinéticos da reação peroxioxalato em um meio majoritariamente aquoso

Os ensaios cinéticos utilizando salicilato de sódio em meio orgânico, com acetato de etila como solvente, apresentaram uma grande limitação, já que o salicilato de sódio é pouco solúvel neste solvente, logo, não foi possível estudar este sistema em concentrações mais altas de salicilato. Porém, os ensaios em um sistema binário DME/ H_2O mostraram que é possível usar uma ampla faixa de concentração de salicilato (**Seção 4.4**), os quais encorajaram o uso do salicilato em um meio majoritariamente aquoso. Foi estudada a reação de TCPO e H_2O_2 com salicilato de sódio como possível

catalisador e fluoresceína (FLU) como ACT, em um meio aquoso em que apenas a solução do éster oxálico foi preparada em solvente orgânico, no caso DME. Verificou-se a influência tanto da $[H_2O_2]$ quanto da [salicilato] na velocidade desta reação nos ensaios de emissão. Entre os ativadores utilizados na reação peroxioxalato, a FLU apresenta maior solubilidade em água, mostrando-se a mais adequada para os ensaios cinéticos em meio aquoso. Em ambos os casos, a reação apresentou um perfil cinético do decaimento de emissão de luz relativamente rápido, ao qual se atribuiu à constante de velocidade observada (k_{obs}); o aumento da intensidade da emissão foi extremamente rápido, não apresentando número suficiente de pontos para fazer o ajuste matemático (**Figura 31**).

Figura 31: Perfil cinético da reação peroxioxalato com TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$), H_2O_2 (200 mmol L^{-1}) e salicilato de sódio ($30,0 \text{ mmol L}^{-1}$), com FLU como ativador.

A influência da $[H_2O_2]$ nesta transformação foi verificada em diversas condições experimentais: (i) [salicilato] = $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$, (ii) [salicilato] = 120 mmol L^{-1} e (iii) [salicilato] = 240 mmol L^{-1} ; o intervalo de concentração de peróxido foi de $1,0$ até 400 mmol L^{-1} com $[TCPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[FLU] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Figura 32**). No primeiro caso, viu-se que uma variação de 400 vezes na concentração de peróxido provocou uma variação de apenas três vezes nos valores de k_{obs} (**Figura 32A, Tabela**

31). No segundo e terceiro casos, em que as concentrações de salicilato são iguais a 120 e 240 mmol L⁻¹, respectivamente, viu-se que, para a mesma variação da [H₂O₂] do caso anterior, os valores de k_{obs} variaram aproximadamente 13 vezes em cada caso. Foi possível estabelecer uma correlação linear entre a [H₂O₂] e k_{obs} nos dois últimos casos (**Figura 32B e 32C**), em que o intercepto da reta corresponde à constante de hidrólise (k_{hidr}), e sua inclinação à constante de peridrólise (k_{per}). A influência da [H₂O₂] na velocidade da reação é pequena nestes ensaios ($k_{per} = (0,162 \pm 0,003) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ quando [salicilato] = 120 mmol L⁻¹; e $k_{per} = (0,16 \pm 0,01) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ quando [salicilato] = 240 mmol L⁻¹) As constantes de hidrólise apresentaram valores baixos em ambos os casos ($k_{hidr} = (5,1 \pm 0,1) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ quando [salicilato] = 120 mmol L⁻¹; e $k_{hidr} = (4,3 \pm 0,2) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ quando [salicilato] = 240 mmol L⁻¹) (**Figura 32**).

Tabela 31: Dependência de k_{obs} com a [H₂O₂] em sua reação com TCPO, salicilato de sódio e FLU como ACT em meio aquoso.

Condições experimentais			
[H ₂ O ₂] (mmol L ⁻¹)	[salicilato] = 60,0 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 120 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 240 mmol L ⁻¹
	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)		
1,0	12±1	5,0±3	3,5±0,2
5,0	10±1	6,0±0,1	5,4±0,3
10,0	13±1	6,7±0,4	7,1±0,1
20,0	11±1	9,0±0,1	8,9±0,2
50,0	19±4	10±2	13±1
100	20±3	17±6	20±2
200	28±3	35±11	32±8
400	37±10	71±1	61±1

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [FLU] = 0,20 mmol L⁻¹, em meio majoritariamente aquoso.

Figura 32: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ em sua reação com TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$), salicilato de sódio e FLU ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) como ativador em meio aquoso. **(A)** $[salicilato] = 60,0 \text{ mmol L}^{-1}$; **(B)** $[salicilato] = 120 \text{ mmol L}^{-1}$; **(C)** $[salicilato] = 240 \text{ mmol L}^{-1}$. Regressão linear feita com $k_{obs} = k_{hidr} + k_{per}[H_2O_2]$, quando $[salicilato] = 120 \text{ mmol L}^{-1}$, $R^2 = 0,996$; quando $[salicilato] = 240 \text{ mmol L}^{-1}$, $R^2 = 0,911$.

A verificação da influência do salicilato na reação foi feita através da variação da $[salicilato]$ de $30,0$ até 300 mmol L^{-1} , com $[H_2O_2] = 200 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[FLU] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$. Esta variação na concentração de salicilato pouco influenciou na velocidade da reação, uma variação de 10 vezes na concentração de salicilato provocou um aumento em k_{obs} de apenas 1,2 vezes, indicando que a reação não se mostrou sensível à presença do salicilato neste meio (**Tabela 32, Figura 33**).

Tabela 32: Dependência de k_{obs} com a [salicilato] em sua reação com TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$), H_2O_2 (200 mmol L^{-1}) e FLU ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) como ativador em meio aquoso.

[salicilato] (mmol L^{-1})	$k_{\text{obs}} \times 10^3$ (s^{-1})
30,0	35 ± 3
60,0	34 ± 6
120	31 ± 3
240	38 ± 1
300	42 ± 7

[TCPO] = $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, [H_2O_2] = 200 mmol L^{-1} , [FLU] = $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ e [salicilato] = $30,0$ a 300 mmol L^{-1} em meio aquoso.

Figura 33: Dependência da constante de velocidade observada (k_{obs}) com a [salicilato] em sua reação com TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$), H_2O_2 (200 mmol L^{-1}) e FLU ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) como ACT em um meio majoritariamente aquoso.

5. Discussão

5.1 Mecanismos da reação peroxioxalato utilizando salicilato de sódio como catalisador em acetato de etila

5.1.1 Reação entre TCPO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio

Nos ensaios cinéticos de emissão referentes à reação entre oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO), peróxido de hidrogênio e salicilato de sódio como catalisador, utilizando 9,10-difenilantraceno (DPA) como ativador (ACT), em acetato de etila (**Esquema 10**), foi possível verificar que a velocidade da reação se mostrou sensível à variação da concentração de salicilato de sódio, em que k_{obs} apresentou uma dependência linear com a [salicilato] de 0,50 até 5,0 mmol L⁻¹ (**Figura 5, seção 4.1.1**), esta correlação linear forneceu a constante de velocidade bimolecular, k_{bim} (**Tabela 33**), a partir de seu coeficiente angular, a qual diz respeito à interação do éster oxálico com o salicilato no passo lento da reação; e a constante de velocidade em que não há o envolvimento do salicilato na reação, k_0 , obtida através do coeficiente linear da correlação (**Tabela 33**).

Esquema 10: Reação peroxioxalato utilizando TCPO, H₂O₂ e salicilato de sódio como catalisador na presença de DPA como ACT.

Tabela 33: Valores das constantes de velocidade k_0 e k_{bim} obtidos da correlação linear entre k_{obs} e [salicilato] na reação de TCPO, H₂O₂ usando DPA como ACT.

$k_0 \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	9 ± 1
$k_{bim} \text{ (L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$3,8 \pm 0,5$

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ em acetato de etila a 25°C. Regressão linear feita com $k_{obs} = k_0 + k_{bim}[\text{salicilato}]$.

Os estudos em que foram feitas a variação da concentração de peróxido de hidrogênio também mostraram que a velocidade da reação depende fortemente da $[H_2O_2]$, principalmente em suas concentrações mais baixas (**Figura 6**), em todas as condições de salicilato utilizadas. Foi possível estabelecer correlações lineares entre a $[H_2O_2]$ e k_{obs} , nas diversas condições experimentais em que os ensaios foram feitos. A inclinação destas correlações fornece a constante de velocidade da reação de peridrólise, k_{per} , que corresponde à interação do éster com o peróxido no passo lento da reação; e o intercepto fornece a constante de velocidade k_0' , que corresponde à reação em que o peróxido não está envolvido (**Tabela 34**). Observou-se que, quanto maior a concentração de salicilato, maiores são os valores de k_{obs} para uma mesma concentração de peróxido, o que pode ser mais facilmente verificado pelos valores de $k_{obs}^{máx}$ em cada condição. Além disso, os valores de k_{per} aumentaram com o aumento da concentração de salicilato na série de experimentos realizada, mostrando que o ataque do peróxido à carbonila do éster depende da concentração desta base. Porém, nas concentrações mais altas de peróxido, as constantes de velocidade deixam de depender da $[H_2O_2]$, o que indica uma mudança no passo lento da reação, mas continuam dependendo da concentração de salicilato de sódio (**Tabela 34**).

Tabela 34: Valores das constantes de velocidade de peridrólise (k_{per}) obtidas a partir das correlações lineares entre k_{obs} e $[H_2O_2]$ em sua reação com TCPO, catalisada por salicilato e na presença de DPA como ACT.

	[salicilato] (mmol L ⁻¹)		
	0,30	1,0	5,0
$k_0' \times 10^3$ (s ⁻¹)	1,32±0,05	2,3±0,8	3,97±0,08
k_{per} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	0,56±0,06	1,6±0,2	2,04±0,06
$k_{obs}^{máx} \times 10^2$ (s ⁻¹)	2,07±0,03	8,25±0,04	14,3±0,2

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, $[H_2O_2]$ = 1,0 – 250 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ em acetato de etila a 25°C. A regressão linear foi feita com $k_{obs} = k_0' + k_{per}[H_2O_2]$.

Como as constantes de velocidade observadas apresentam dependência linear com as concentrações de ambos os reagentes, entende-se que tanto o peróxido de hidrogênio quanto o salicilato estão envolvidos no mesmo passo lento da reação. As constantes de velocidade termoleculares (k_{ter} e k_{ter}') foram calculadas a partir das constantes de velocidade bimoleculares obtidas a partir das correlações lineares (**Tabela 35**). O valor de k_{ter} foi obtido a partir da razão entre k_{bim} e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$; as constantes k_{ter}' foram determinadas através da razão entre k_{per} e $[\text{salicilato}] = 0,30; 1,0$ e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente (**Tabela 35**). A constante termolecular obtida a partir da dependência com salicilato, k_{ter} , é da mesma ordem de grandeza do que a constante termolecular obtida para a mais alta concentração de peróxido k_{ter}' (**Tabela 35**).

Tabela 35: Constantes de velocidade termoleculares (k_{ter} e k_{ter}') obtidas a partir das constantes de velocidade bimoleculares, k_{bim} e k_{per} , da dependência de k_{obs} com as concentrações de salicilato e peróxido, respectivamente.

Dependência com salicilato ^a		Dependência com H_2O_2 ^b			
$[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$		$[\text{salicilato}] =$	0,30 mmol L⁻¹	1,0 mmol L⁻¹	5,0 mmol L⁻¹
k_{ter} ($\text{L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	$(3,8 \pm 0,5) 10^2$	k_{ter}' ($\text{L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	$(1,9 \pm 0,2) 10^3$	$(1,6 \pm 0,2) 10^3$	$(4,1 \pm 0,1) 10^2$

^a $[\text{TCPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{salicilato}] = 0,50 - 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

^b $[\text{TCPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 - 250 \text{ mmol L}^{-1}$.

Estes fatos indicam que ambos os reagentes participam do mesmo passo limitante da velocidade da reação. O primeiro passo desta transformação corresponde ao ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio à carbonila do éster oxálico, catalisado por salicilato de sódio (**Esquema 11**), o qual pode atuar como catalisador básico geral (CBG) ou específico (CBE) (**Esquemas 12 e 13**). Nesta etapa, forma-se um intermediário perácido, e a esta se atribui a constante de velocidade k_1 , a qual é uma constante de velocidade termolecular, indicativa do envolvimento das três espécies (TCPO, H_2O_2 e salicilato) no estado de transição desta primeira etapa de reação

(**Esquema 11**). Os perfis de saturação obtidos na dependência de k_{obs} com $[\text{H}_2\text{O}_2]$ em suas concentrações mais altas e em diferentes concentrações de salicilato levam a valores máximos de k_{obs} ($k_{\text{obs}}^{\text{máx}}$) em cada condição, os quais também se mostraram dependentes da concentração de salicilato (**Tabela 34**). Estas constantes correspondem ao passo reacional em que o peróxido de hidrogênio não participa, porém, este passo também está sujeito à catálise básica do salicilato, indicando que este segundo passo corresponde à ciclização do intermediário perácido formado no primeiro passo da reação, levando à formação do IAE deste sistema, a 1,2-dioxetanodiona. A este passo se atribui a constante de velocidade k_2 , a qual mostra que a velocidade da reação apresenta um valor máximo e que ainda depende da concentração do salicilato (**Esquema 11**). A etapa final desta sequência de reações corresponde ao passo de quimiexcitação, em que há a interação do IAE com o ACT, de acordo com o mecanismo CIEEL intermolecular, levando o ACT ao estado excitado singlete que, ao decair para o estado fundamental, emite luz. Os outros produtos formados nesta etapa são duas moléculas de CO_2 e o ACT no estado fundamental. Este último passo é rápido demais para ser observado em ensaios cinéticos convencionais e ao qual se atribui a constante de velocidade k_3 (**Esquema 11**).

Esquema 11: Mecanismo proposto para a reação peroxioxalato entre TCPO e H_2O_2 catalisado por salicilato de sódio, o qual pode atuar como catalisador básico geral, ou específico.

Esquema 12: Estado de transição formulado para uma possível catálise básica geral (CBG) exercida pelo salicilato sobre o ataque do peróxido de hidrogênio à carbonila do TCPO.

Esquema 13: Catálise básica específica (CBE) em que o salicilato abstrai o próton do peróxido, em um pré-equilíbrio rápido (K_{eq}), seguido pelo ataque do ânion hidropéroxido à carbonila do TCPO.

Comparando-se esta proposta mecanística para a reação peroxioxalato quando se usa salicilato de sódio como catalisador com aquela em que se usou Imi-H, verificou-se que a primeira diferença consiste no fato de o Imi-H atuar como catalisador básico e nucleofílico, ou seja, na primeira etapa da reação ocorre o ataque do Imi-H à carbonila do éster, o qual é catalisado pelo próprio Imi-H, este passo é lento e se mostrou independente da concentração de peróxido, nele se forma o intermediário de reação oxalildiimidazolidico (**Esquema 7 (1), seção 1.3.1**). A informação mecanística obtida deste passo diz respeito ao fato de que a reação apresenta uma dependência de 2ª ordem em relação ao Imi-H.^{47,50-53} Além disso, o passo seguinte, o qual também é lento, é fortemente dependente da concentração de peróxido, correspondendo ao ataque deste último à 1,1'-oxalildiimidazolido, o qual também é catalisado pelo Imi-H, e verificou-se

uma dependência de 1ª ordem em relação ao peróxido e ao Imi-H nesta etapa (**Esquema 7(2)**). Pode-se observar que a utilização de Imi-H neste sistema permite que duas etapas da reação sejam observadas experimentalmente, enquanto que, quando se usa salicilato, apenas uma etapa lenta é verificada, e nela estão envolvidos tanto o salicilato, quanto o peróxido de hidrogênio, e a reação mostra uma dependência de 1ª ordem em relação a cada um destes reagentes (**Equação 8**). A partir do momento em que se forma o intermediário perácido neste sistema, as reações com salicilato e Imi-H ocorrem de maneira semelhante, culminando com a emissão de luz.

$$v = k_1[\text{salicilato}][H_2O_2][TCPO], \text{ com } k_{obs} = k_1[\text{salicilato}][H_2O_2]$$

Equação 8

Uma vez proposto o mecanismo geral para a reação peroxioxalato utilizando salicilato de sódio como catalisador, foram feitas algumas considerações mais detalhadas em relação a esta proposta. Com a finalidade de se verificar a ocorrência de uma possível catálise nucleofílica do salicilato, a cinética da reação poderia ser monitorada espectrofotometricamente medindo-se o aumento da absorbância devida à liberação do 2,4,6-triclorofenol (TCP) proveniente do TCPO, o qual apresenta máximo de absorção em 296 nm (**Figura 8, seção 4.1.1**). Porém, o salicilato e o TCP apresentam sobreposição das bandas de absorção (**Figura 8**), o que inviabilizou a realização destes ensaios em um espectrofotômetro. Um experimento alternativo que poderia dar informações sobre um possível ataque do salicilato à carbonila do éster, caracterizando uma catálise nucleofílica foi a realização de ensaios com adição de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos a partir do início da reação. A adição de peróxido com diferentes tempos de retardo teriam como finalidade verificar o acúmulo ou não deste possível intermediário de reação, o qual poderia ser formado através do ataque nucleofílico do grupo carboxilato do salicilato à carbonila do éster oxálico, porém, este

ataque também poderia ocorrer através do oxigênio fenólico do salicilato (**Esquema 14**).

Esquema 14: Reação peroxioxalato com possível ataque nucleofílico do salicilato à carbonila do éster oxálico.

A injeção retardada de peróxido é um artifício experimental que pode levar à evidência da formação deste intermediário no percurso da reação. Enquanto não há peróxido, o intermediário poderia estar sendo formado no meio e ir se acumulando no sistema, já que não há peróxido para consumi-lo. A partir do momento em que se injeta o peróxido, esperar-se-ia que houvesse um aumento da intensidade inicial nos perfis cinéticos das curvas de decaimento da emissão de luz, devido à reação preferencial do peróxido com este intermediário (**Esquema 14**). Porém, os resultados apresentados (**seção 4.1.2, Figura 9**) mostraram que não há um aumento sistemático da intensidade de emissão em função do tempo de adição de peróxido, indicando que não há um acúmulo do derivado de ácido oxálico formado pela adição nucleofílica do salicilato à carbonila do éster.

Pôde-se observar que as constantes de velocidade permaneceram as mesmas dentro de uma mesma condição experimental, independentemente do tempo de espera

para a injeção retardada de peróxido (**Tabela 6, seção 4.1.2**). As intensidades médias em cada condição e nos diferentes tempos de injeção de peróxido diminuíram continuamente com o aumento do tempo de espera para a injeção do peróxido (**Tabela 7, seção 4.1.2**), não havendo, portanto, a indicação para a formação de um intermediário na ausência de H_2O_2 , o qual poderia reagir rapidamente com este reagente após adição retardada. Neste caso, se esperaria uma emissão intensa com decaimento rápido da intensidade de emissão. Como este comportamento cinético não foi observado, conclui-se que não foi possível obter uma indicação para a formação de um intermediário que se acumula durante o percurso da transformação na ausência de peróxido de hidrogênio (**Esquema 14**). Além disso, de acordo com os dados experimentais apresentados, conforme se diminui a concentração de peróxido no meio e se aumenta a de salicilato, percebe-se uma diminuição nas intensidades médias de emissão (**Tabelas 6 e 7**). Os experimentos em que se fixou a concentração de salicilato em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com o tempo de adição de peróxido igual a 2,0 minutos também não mostraram uma tendência de $k_{\text{obs}}^{\text{RÁPIDO}}$ e das intensidades médias de emissão aumentarem conforme se variou peróxido de $1,0$ até $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Tabela 9**).

Portanto, o conjunto de resultados obtidos até o momento para a reação peroxioxalato utilizando TCPO, H_2O_2 , com salicilato como catalisador e DPA como ativador mostra que a extensão da reação que pode ocorrer via a formação deste intermediário é ínfima. Deste modo, o caminho reacional que se confirma para esta transformação é aquele já proposto anteriormente com salicilato e peróxido de hidrogênio atuando conjuntamente no passo lento da reação, para o qual podem ser atribuídas as constantes de velocidade observadas obtidas a partir do tempo de decaimento da intensidade da emissão (**Esquema 11**).

Os rendimentos quânticos singlete (Φ_S) para esta transformação diminuem com o aumento da concentração de salicilato, sendo o valor máximo de $\Phi_S = (1,24 \pm 0,06) 10^{-3}$ E mol⁻¹ obtido na concentração mais baixa de salicilato (**Tabela 4, Figura 7, seção 4.1.1**). Estes resultados indicam que, analogamente ao imidazol, o salicilato de sódio também interage com o IAE formado neste sistema, desativando-o e diminuindo os rendimentos quânticos de emissão. Os valores de Φ_S também diminuíram com o aumento da concentração de peróxido e apresentaram uma região de saturação nas concentrações mais altas (**Tabela 5**). Este comportamento pode indicar a ocorrência de uma reação de concorrência, possivelmente a hidrólise do TCPO, devido a traços de água presentes no sistema, e que se torna mais significativa nas maiores concentrações de peróxido.

Uma vez proposto o mecanismo da reação peroxioxalato utilizando TCPO, H₂O₂, salicilato de sódio como catalisador e DPA como ativador, no qual se verificou que tanto o peróxido quanto o salicilato estão envolvidos no passo lento da reação (**Esquema 11**), determinou-se também os parâmetros de Arrhenius (fator pré-exponencial (A) e energia de ativação (E_a)) e os parâmetros de ativação ($\Delta S^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta G^\ddagger$) através dos gráficos de Eyring para o passo lento desta transformação. Estes parâmetros ainda não são conhecidos, embora já tenha sido reportado na literatura os parâmetros de ativação para o passo de quimiexcitação da reação peroxioxalato em condições experimentais específicas.³⁷ A reação foi estudada variando-se a temperatura de 10,0 até 40,0°C, em diferentes condições de concentrações de peróxido e salicilato (**Tabela 16, seção 4.1.4**).

Inicialmente, foram determinados os parâmetros de Arrhenius para esta transformação correlacionando-se $\ln k_{obs}$ com $1/T$ (**Equação 9**). O fator pré-exponencial

(A) foi obtido a partir do intercepto da reta com o eixo y, e a energia de ativação (E_a), a partir da inclinação (**Figura 34, Tabela 36**).

$$\ln k_{obs} = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

Equação 9

Figura 34: Gráfico de Arrhenius correspondente à reação entre TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$), salicilato de sódio e H_2O_2 utilizando DPA ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) como ativador. **(A)** $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, equação de reta: $\ln k_{obs} = (6,5 \pm 0,1) - (3,54 \pm 0,04) \frac{10^3}{T}$, $R^2 = 0,999$; **(B)** $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, equação de reta: $\ln k_{obs} = (5,2 \pm 0,1) - (2,71 \pm 0,04) \frac{10^3}{T}$, $R^2 = 0,999$; e **(C)** $[\text{salicilato}] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, equação de reta: $\ln k_{obs} = (3,8 \pm 0,3) - (2,71 \pm 0,08) \frac{10^3}{T}$, $R^2 = 0,996$.

Tabela 36: Parâmetros de Arrhenius para a reação entre TCPO, H₂O₂ e salicilato de sódio usando DPA como ativador.

[salicilato] / [H ₂ O ₂] (mmol L ⁻¹)	A (s ⁻¹)	E _a (kcal mol ⁻¹)
1,0 / 1,0	665±66	7,06±0,07
1,0 / 10,0	187±24	5,5±0,7
10,0 / 1,0	45±12	6,1±0,2

Observa-se que os valores de A diferem consideravelmente em cada condição, este parâmetro está relacionado com o número de colisões efetivas que levam ao estado de transição desta reação, A diminui conforme se aumenta a concentração de peróxido ou de salicilato (**Tabela 36**). Os valores de E_a, por sua vez, são similares entre si e correspondem à energia do estado de transição do passo lento da reação, do qual participam o TCPO, H₂O₂ e o salicilato de sódio.

A obtenção dos parâmetros de ativação ($\Delta S^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$) foi feita a partir dos gráficos de Eyring (**Figura 35**), correlacionando-se $\ln(k_{obs}/T)$ com $1/T$ (**Equação 10**). Os valores da energia de Gibbs ($\Delta G^\ddagger$) para esta transformação foram determinados a 298K a partir dos valores de $\Delta S^\ddagger$ e $\Delta H^\ddagger$ (**Equação 11, Tabela 37**).

$$\ln \frac{k_{obs}}{T} = \ln \frac{k'}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}$$

Equação 10

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Equação 11

Figura 35: Gráfico de Eyring para a reação entre TCPO (0,10 mmol L⁻¹), salicilato de sódio e H₂O₂ utilizando DPA (0,20 mmol L⁻¹) como ativador. (A) [salicilato] = 1,0 mmol L⁻¹ e [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹ com equação de reta: $\ln \frac{k_{obs}}{T} = -(0,16 \pm 0,27) - (3,26 \pm 0,08) \frac{10^3}{T}$, R² = 0,998; (B) [salicilato] = 1,0 mmol L⁻¹ e [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹, equação de reta: $\ln \frac{k_{obs}}{T} = -(1,5 \pm 0,1) - (2,41 \pm 0,04) \frac{10^3}{T}$, R² = 0,998; e (C) [salicilato] = 10,0 mmol L⁻¹ e [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹, equação de reta: $\ln \frac{k_{obs}}{T} = -(2,8 \pm 0,3) - (2,41 \pm 0,08) \frac{10^3}{T}$, R² = 0,995.

Tabela 37: Parâmetros de ativação obtidos a partir dos gráficos de Eyring ($\Delta S^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$) e valores de $\Delta G^\ddagger$ determinados a 298K para a reação entre TCPO, H₂O₂ e salicilato de sódio usando DPA como ativador.

[salicilato] / [H ₂ O ₂] (mmol L ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (cal K ⁻¹ mol ⁻¹)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal mol ⁻¹) a 298K
1,0 / 1,0	-47,4±0,5	6,5±0,2	20,6±0,4
1,0 / 10,0	-50,1±0,2	4,81±0,07	19,7±0,1
10,0 / 1,0	-50,6±0,5	4,8±0,2	19,9±0,4

Os valores de $\Delta S^\ddagger$ são bastante próximos em todas as condições (aproximadamente $-50 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) (**Tabela 37**), seus valores altamente negativos são devidos à maior ordem do sistema quando TCPO, H_2O_2 e salicilato reagem entre si, alcançando um estado de transição termolecular no passo lento da reação, indicando a ocorrência de catálise básica geral pelo salicilato. Os valores de $\Delta H^\ddagger$ (valor médio = $(5,4 \pm 0,4) \text{ kcal mol}^{-1}$) são baixos e estão em concordância entre si e também com os valores de E_a (valor médio igual a $(6,2 \pm 0,3) \text{ kcal mol}^{-1}$) determinados a partir dos gráficos de Arrhenius. Espera-se que esta reação tenha valores de $\Delta H^\ddagger$ baixos devido à alta reatividade do TCPO, contendo substituintes sacadores de elétrons. Os valores de $\Delta G^\ddagger$ nas três condições também são bastante similares, com valor médio igual a $(20,1 \pm 0,3) \text{ kcal mol}^{-1}$. Os parâmetros de ativação determinados estão em concordância com a proposta mecanística em que há o envolvimento de três espécies no estado de transição do passo limitante da velocidade, o nucleófilo H_2O_2 que ataca o TCPO com catálise básica geral do salicilato (**Esquema 12**), embora a catálise básica específica não possa ser excluída dos dados experimentais (**Esquema 13**).

5.1.2 Determinação dos parâmetros de quimiluminescência para a reação entre TCPO e H_2O_2 catalisada por salicilato de sódio

Uma vez determinado o mecanismo da reação entre TCPO e H_2O_2 catalisada por salicilato de sódio, foi estudado o passo de quimiexcitação desta reação, no qual ocorre a interação do ACT com IAE, formulado para a reação peroxioxalato, como a 1,2-dioxetanodiona. Estes estudos foram feitos através de ensaios cinéticos de emissão em que se variou a concentração do ativador e como a velocidade da reação seria afetada por esta variação. Inicialmente, os ensaios foram realizados com o DPA como ACT, o qual possui rendimento quântico de fluorescência $\Phi_{\text{FL}} = 0,95$, e verificou-se que uma

variação na [DPA] de 0,10 até 2,0 mmol L⁻¹ não afetou significativamente a velocidade da reação em nenhuma das condições utilizadas (**Tabela 10, seção 4.1.3**), indicando que o ACT não está envolvido na etapa lenta desta transformação, participando apenas da última etapa levando à emissão de luz (**Esquema 11**). Porém, observou-se que a intensidade de emissão aumentou significativamente com o aumento da concentração de ACT, implicando na necessidade de redução da fenda da fotomultiplicadora (**Tabela 11, seção 4.1.3**), conseqüentemente, os valores de Φ_S também aumentaram, com $\Phi_S^{\max} = (47 \pm 3) \cdot 10^{-3} \text{ E mol}^{-1}$, quando [salicilato] = 1,0 mmol L⁻¹ (**Tabela 12, seção 4.1.3**) evidenciando que a decomposição do IAE é catalisada pelo ACT.

Através da correlação de k_{obs} com a [ACT] não é possível quantificar a extensão da interação entre o ACT e o IAE no mecanismo CIEEL com a finalidade de se obter uma constante de velocidade da decomposição catalisada do IAE pelo ACT (k_{CAT}), levando à emissão de luz. Porém, quando se faz uma correlação de duplo-recíproco, plotando-se $1/\Phi_S$ vs. $1/[DPA]$, é possível se obter a relação k_{CAT}/k_D da inclinação da reta, na qual k_D se refere à constante de velocidade de decomposição unimolecular do IAE, levando a produtos sem emissão de luz. O intercepto da reta obtida fornece o rendimento quântico singlete no infinito (Φ_S^∞), ou seja, quando a concentração do ACT tende a zero, além disso, Φ_S^∞ é proporcional ao rendimento de formação dos estados excitados singlete na etapa de retrotransferência de elétron no mecanismo CIEEL (**Equação 12**). Esta é uma situação hipotética em que se postula que toda e qualquer molécula que se formar do IAE irá interagir com o ACT, levando à decomposição do peróxido cíclico pelo mecanismo CIEEL intermolecular. Como a reação é realizada nas mesmas condições, e as concentrações dos reagentes são sempre as mesmas, varia-se apenas a concentração do ativador, e a identidade estrutural do IAE não se altera,

entende-se que k_D não sofrerá alterações em seu valor, logo a relação k_{CAT}/k_D é uma medida indireta dos valores de k_{CAT} .

$$\frac{1}{\varphi_S} = \frac{1}{\varphi_S^\infty} + \left(\frac{k_D}{k_{CAT}\varphi_S^\infty} \right) \frac{1}{[ACT]}$$

Equação 12

A relação k_{CAT}/k_D é uma medida relativa da eficiência catalítica de um ativador frente à decomposição de uma peróxido cíclico, o qual é formulado como a 1,2-dioxetanodiona para o sistema peroxioxalato. Os valores de k_{CAT}/k_D obtidos quando se usa DPA como ativador neste sistema são da ordem de 10^2 L mol^{-1} (**Tabela 38**), os quais indicam uma alta eficiência no processo de transferência de elétron no passo de quimiexcitação desta transformação. Entende-se que os valores que k_D pode assumir nesta transformação sejam muito próximos, uma vez que a reação é sempre realizada com os mesmos reagentes. Assim, variações nos valores da relação k_{CAT}/k_D seriam devidos à interação do ACT com o IAE no passo de quimiexcitação, dando uma medida indireta do valor de k_{CAT} . Os valores de Φ_S e Φ_S^∞ diminuem nas condições em que se aumenta a concentração de salicilato, indicando que quando se trabalha com altas concentrações de base, esta interage com o IAE, desativando-o e impedindo que este participe do passo de quimiexcitação (**Figura 36, Tabela 38**). Na condição em que $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, não foi possível determinar Φ_S^∞ e, conseqüentemente, a relação k_{CAT}/k_D não foi obtida, uma vez que a correlação linear apresentou um valor negativo para o intercepto.

Figura 36: Correlação de duplo recíproco $1/\Phi_s$ vs. $1/[DPA]$ para a reação entre TCPO (0,10 mmol L⁻¹) e peróxido de hidrogênio (2,0 mmol L⁻¹) catalisada por salicilato de sódio (0,10; 1,0 e 10,0 mmol L⁻¹), em acetato de etila anidro, a 25°C. Equações de reta: $\frac{1}{\varphi_s} = (28 \pm 3) + (63 \pm 1) \frac{1}{[DPA]}$, quando $[\text{salicilato}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; $\frac{1}{\varphi_s} = (-56 \pm 19) + (167 \pm 20) \frac{1}{[DPA]}$, quando $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; e $\frac{1}{\varphi_s} = (91 \pm 45) + (123 \pm 30) \frac{1}{[DPA]}$, quando $[\text{salicilato}] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabela 38: Valores de Φ_s^∞ e k_{CAT}/k_D obtidos da correlação de duplo recíproco $1/\Phi_s$ vs. $1/[DPA]$ para a reação entre TCPO, H₂O₂ e salicilato de sódio com diferentes concentrações de DPA como ACT.

	[salicilato] (mmol L ⁻¹)		
	0,10	1,0 ^c	10,0
Φ_s^∞ (E mol ⁻¹)	$(3,5 \pm 0,4) 10^{-2}$	-	$(1,1 \pm 0,5) 10^{-2}$
k_{CAT}/k_D (L mol ⁻¹)	$(6 \pm 1) 10^2$	-	$(7 \pm 5) 10^2$
R²	0,968	0,964 ^a	0,988 ^b

^aRegressão linear feita desconsiderando-se os dois últimos pontos correspondentes às concentrações de DPA iguais a 0,10 e 0,20 mmol L⁻¹.

^bRegressão linear feita desconsiderando-se o primeiro ponto correspondente à concentração de DPA igual a 2,0 mmol L⁻¹.

^cNesta condição, o valor do intercepto da regressão linear é negativo, impossibilitando a determinação de Φ_s^∞ e k_{CAT}/k_D .

Ensaio análogos foram realizados com rubreno (RUB) como ACT desta transformação, o qual possui rendimento quântico de fluorescência, $\Phi_{FL} = 0,98$, próximo ao do DPA. A variação na [RUB] de 0,10 até 1,0 mmol L⁻¹ não afetou a

velocidade da reação, k_{obs} apresentou os valores médios iguais a $(1,03 \pm 0,04) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $(5,4 \pm 0,6) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $(7 \pm 1) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, nas condições em que $[\text{salicilato}] = 0,10$; $1,0$ e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente (**Tabela 13, seção 4.1.3**). As intensidades de emissão também aumentam em função da $[\text{RUB}]$ (**Tabela 14**), com consequente aumento do rendimento quântico singlete da reação (**Tabela 15, seção 4.1.3**).

Foi feita a correlação de duplo-recíproco, plotando-se $1/\Phi_S$ vs. $1/[\text{RUB}]$, os valores de Φ_S^∞ são muito próximos de $1,0 \text{ E mol}^{-1}$ nas condições apresentadas, indicando que a eficiência de formação de estados excitados singlete é relativamente maior do que quando se usa DPA. Os valores de $k_{\text{CAT}}/k_{\text{D}}$ são elevados, da ordem de 10^2 L mol^{-1} , porém, são relativamente mais elevados do que aqueles obtidos quando se usou DPA como ACT, sendo seu valor máximo igual a $(100 \pm 13) 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ quando $[\text{salicilato}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Os valores de $k_{\text{CAT}}/k_{\text{D}}$ são menores nas condições em que a concentração de salicilato é maior, o que está relacionado com o fato desta base interagir com o IAE deste sistema, logo, há menos moléculas do IAE disponíveis para interagir com o RUB na etapa de quimiexcitação deste processo pelo mecanismo CIEEL intermolecular (**Tabela 39, Figura 37**).

Figura 37: Correlação de duplo recíproco $1/\Phi_s$ vs. $1/[RUB]$ para a reação entre TCPO ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) e peróxido de hidrogênio ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) catalisada por salicilato de sódio ($0,10$; $1,0$ e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em acetato de etila anidro, a 25°C . Equações de reta: $\frac{1}{\varphi_s} = (1,77 \pm 0,03) + (0,18 \pm 0,02) \frac{1}{[RUB]}$, quando $[\text{salicilato}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; $\frac{1}{\varphi_s} = (0,97 \pm 0,09) + (0,25 \pm 0,05) \frac{1}{[RUB]}$, quando $[\text{salicilato}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; e $\frac{1}{\varphi_s} = (1,10 \pm 0,04) + (0,168 \pm 0,008) \frac{1}{[RUB]}$, quando $[\text{salicilato}] = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabela 39: Valores de Φ_s^∞ e k_{CAT}/k_D obtidos da correlação de duplo recíproco $1/\Phi_s$ vs. $1/[RUB]$ para a reação entre TCPO, H_2O_2 e salicilato de sódio com diferentes concentrações de RUB como ACT.

	[salicilato] (mmol L^{-1})		
	0,10	1,0	5,0
Φ_s^∞ (E mol^{-1})	$0,56 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,03$
k_{CAT}/k_D (L mol^{-1})	$(100 \pm 13)10^2$	$(40 \pm 10)10^2$	$(65 \pm 5)10^2$
R^2	0,939	0,997	0,980 ^a

^aRegressão linear feita desconsiderando-se os dois primeiros pontos correspondentes às concentrações de RUB iguais a $0,75$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Comparando-se os valores de k_{CAT}/k_D , aqueles obtidos com RUB são maiores do os obtidos quando se usou DPA nesta reação, ou seja, o RUB possui maior eficiência catalítica no processo de decomposição da 1,2-dioxetanodiona no passo de quimiexcitação, que leva a produtos excitados no estado singlete, seguido pela emissão de luz. Os resultados estão coerentes entre si, uma vez que o potencial de oxidação do

RUB ($E_{\text{ox}}^{1/2} = 0,61 \text{ V}$) é menor do que o potencial de oxidação do DPA ($E_{\text{ox}}^{1/2} = 1,06 \text{ V}$),⁸⁶ ou seja, o rubreno é mais facilmente oxidável do que o DPA, isto favorece a transferência de elétron do ACT para o IAE dentro da cavidade do solvente no mecanismo CIEEL da etapa de quimiexcitação, levando a maiores rendimentos quânticos singlete (**Esquema 9, seção 1.3.3**). Assim, quanto menor o potencial de oxidação do ativador, mais facilmente ele é oxidado, favorecendo a transferência de elétron do ACT para IAE e, conseqüentemente, maiores serão os valores da relação $k_{\text{CAT}}/k_{\text{D}}$.

5.1.3 Reação entre DNPO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio

A velocidade da reação entre oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio utilizando DPA como ACT (**Esquema 15**) se mostrou altamente sensível à variação da concentração de salicilato, da correlação linear estabelecida entre k_{obs} e [salicilato] (**Figura 12, seção 4.2**) obteve-se uma constante de velocidade bimolecular, $k_{\text{bim}} = (952 \pm 30) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a qual indica a interação do éster com o salicilato no passo lento da reação (**Tabela 40**). O intercepto da correlação linear forneceu a constante de velocidade da reação não catalisada pelo salicilato, $k_0 = (-49 \pm 8) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, a qual é muito próxima de zero, indicando que a reação ocorre preferencialmente pela via catalisada (**Tabela 40**).

Esquema 15: Reação peroxioxalato entre oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) e peróxido de hidrogênio catalisado por salicilato de sódio, utilizando DPA como ACT, em acetato de etila.

Os ensaios cinéticos com variação da concentração de peróxido de hidrogênio mostraram que a velocidade da reação também é bastante sensível a variações na $[H_2O_2]$. A correlação linear estabelecida entre $[H_2O_2]$ e k_{obs} forneceu uma inclinação da qual se obteve a constante de velocidade de peridrólise, $k_{per} = (14,8 \pm 0,2) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, uma constante de velocidade bimolecular indicativa da interação entre o peróxido e o DNPO no passo lento da reação (**Tabela 40**). O intercepto desta correlação forneceu a constante de velocidade em que não há o envolvimento do peróxido de hidrogênio, $k_0' = (30 \pm 1) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (**Figura 13, Tabela 40**).

Tabela 40: Valores das constantes de velocidade k_0 , k_{bim} , obtidas da correlação linear entre k_{obs} e $[\text{salicilato}]$, e k_0' e k_{per} obtidas da correlação linear entre k_{obs} e $[H_2O_2]$ para a reação de DNPO com H_2O_2 catalisada por salicilato de sódio, utilizando DPA como ACT.

Dependência com salicilato ^a		Dependência com peróxido ^b	
$k_0 \times 10^3$ (s^{-1})	k_{bim} ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$k \times 10^3$ (s^{-1})	k_{per} ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)
-49 ± 8	952 ± 30	30 ± 1	$14,8 \pm 0,2$

^a $[\text{DNPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetato de etila a 25°C . Regressão linear feita com $k_{obs} = k_0 + k_{bim}[\text{salicilato}]$.

^b $[\text{DNPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{salicilato}] = 0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetato de etila a 25°C . Regressão linear feita com $k_{obs} = k_0 + k_{per}[H_2O_2]$.

Pôde-se inferir destes estudos que o salicilato de sódio proporciona um comportamento cinético distinto ao sistema peroxioxalato, utilizando DNPO como éster oxálico, em relação àqueles já conhecidos quando se usa o TCPO/ H_2O_2 /Imi-H e TCPO/ H_2O_2 /salicilato nesta transformação. Comparando-se diretamente os resultados obtidos com DNPO/ H_2O_2 /salicilato e aqueles discutidos anteriormente para o sistema TCPO/ H_2O_2 /salicilato (**seção 5.1.1**), constatou-se que, na reação com TCPO, k_{obs} aumenta com a $[\text{salicilato}]$ e chega a uma região de saturação nas maiores concentrações de salicilato (**Tabela 2, Figura 5, seção 4.1.1**). Porém, este aumento é bem menos

acentuado do que na reação com DNPO, na qual k_{obs} apresentou um comportamento linear ao longo de toda faixa de concentração de salicilato utilizada (**Figura 12, seção 4.2**). Das correlações lineares estabelecidas em ambos os casos, verificou-se que existe uma dependência de primeira ordem de k_{obs} com a [salicilato], sendo o valor de k_{bim} obtido para DNPO aproximadamente 250 vezes maior do que k_{bim} obtido na reação com TCPO (**Tabelas 33 e 40**).

O comportamento de k_{obs} em função da concentração de peróxido de hidrogênio é semelhante nos sistemas TCPO/H₂O₂/salicilato e DNPO/H₂O₂/salicilato. Em ambos os casos, k_{obs} apresenta um aumento acentuado nas concentrações mais baixas de peróxido, alcançando uma região de saturação nas concentrações maiores de H₂O₂. As correlações lineares estabelecidas nos dois casos mostram altos valores de k_{per} , principalmente na reação com DNPO (**Tabelas 34 e 40**), indicando a interação do peróxido com o éster no passo lento da reação, concluindo-se que, em ambos os casos, o peróxido também está envolvido no passo lento da reação.

Entende-se que, se tanto o salicilato de sódio quanto o peróxido de hidrogênio estão envolvidos no passo lento da reação e com uma dependência de primeira ordem em relação a cada um destes reagentes, como foi mostrado, existe uma constante de velocidade termolecular (k_{ter}) para este passo da reação que pode ser calculada através da razão entre a constante de velocidade bimolecular obtida através da inclinação da reta pela concentração padrão do reagente que não se variou a concentração. Deste modo, a razão entre k_{bim} pela concentração padrão de H₂O₂ (10,0 mmol L⁻¹) deve ser aproximadamente igual à razão de k_{per} pela concentração padrão de salicilato de sódio (0,25 mmol L⁻¹) (**Tabela 41**).

Tabela 41: Constantes de velocidade termoleculares (k_{ter} e k_{ter}') obtidas a partir das constantes de velocidade bimoleculares, k_{bim} e k_{per} , da dependência de k_{obs} com as concentrações de salicilato e peróxido, respectivamente, para a reação com DNPO.

Dependência com salicilato ^a	Dependência com H ₂ O ₂ ^b
[H ₂ O ₂] = 10,0 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 0,25 mmol L ⁻¹
k_{ter} (L ² mol ⁻² s ⁻¹) (95±3) 10 ³	k_{ter}' (L ² mol ⁻² s ⁻¹) (59±1) 10 ³

^a[DNPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹, [salicilato] = 0,10 – 5,0 mmol L⁻¹.

^b[DNPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 0,50 – 250 mmol L⁻¹.

As duas constantes são da mesma ordem de grandeza, porém, k_{ter}' obtida a partir de k_{per} é um fator de 1,5 maior do que k_{ter} obtida a partir de k_{bim} . Embora haja esta pequena diferença entre os valores de k_{ter} , pode-se afirmar que na etapa lenta da reação estão envolvidos o éster oxálico, o peróxido de hidrogênio e o salicilato de sódio (**Tabela 41, Equação 13**).

$$v = k_1[\text{salicilato}][\text{H}_2\text{O}_2][\text{DNPO}], \text{ com } k_{\text{obs}} = k_1[\text{salicilato}][\text{H}_2\text{O}_2]$$

Equação 13

Todas as constantes de velocidade obtidas (k_{bim} , k_{per} , k_{ter} e k_{ter}') para a reação de DNPO e H₂O₂ catalisada por salicilato são maiores do que aquelas obtidas para a transformação quimiluminescente do TCPO (**Tabela 42**). Isto se deve à maior reatividade do DNPO frente ao TCPO, a presença de grupos nitro (–NO₂), como substituintes no anel aromático do DNPO, aumenta a reatividade deste éster frente ao TCPO, uma vez que o grupo nitro é um forte sacador de elétrons, tanto por efeito indutivo, quanto por efeito mesomérico, tornando a carbonila deste éster mais eletrofílica e, portanto, mais propensa ao ataque nucleofílico do peróxido. Embora o TCPO possua substituintes cloro em sua porção aromática, deve-se ressaltar que a natureza eletrônica deste substituinte é sacadora por efeito indutivo, porém, doadora de elétrons por efeito mesomérico, tornando a carbonila do TCPO menos eletrofílica

quando comparada à carbonila do DNPO. Assim, a maior reatividade do DNPO é comprovada pelos maiores valores das constantes de velocidade bimoleculares e termoculares, quando ambos os ésteres são submetidos a transformações em condições experimentais similares (**Tabela 42**).

Tabela 42: Súmula das constantes de velocidades obtidas para as reações de TCPO e DNPO com H₂O₂, catalisadas por salicilato de sódio, utilizando DPA como ACT, em acetato de etila, a 25°C.

	k_{bim} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	k_{per} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	k_{ter} (L ² mol ⁻² s ⁻¹)	k_{ter}' (L ² mol ⁻² s ⁻¹)
TCPO	3,8±0,5	(2,04±0,06) ^a	(3,8±0,5) 10 ²	(4,1±0,1) 10 ²
DNPO	952±30	14,8±0,2	(95±3) 10 ³	(59±1) 10 ³

^aValor de k_{per} obtido na condição em que [salicilato] = 5,0 mmol L⁻¹.

Nesta transformação não se espera que aconteça uma catálise nucleofílica do salicilato de sódio em sua reação com DNPO e H₂O₂, uma vez que os estudos realizados com TCPO, em que foi feita a adição em retardo de H₂O₂ à mistura reacional contendo o éster oxálico, salicilato e DPA, após intervalos de tempo regulares, não se observou mudanças na intensidade máxima de emissão e nem nas constantes de velocidade observadas (**Seção 5.1.1**). Assim, descartou-se uma possível formação de um intermediário na reação entre TCPO e salicilato análogo ao 1,1'-oxalildiimidazolidina, resultante do ataque do imidazol à carbonila do éster, quando esta base é empregada como catalisador desta transformação. Conclui-se que a atuação do salicilato frente à reação entre DNPO e H₂O₂ é de catalisador básico apenas.

Deste modo, o mecanismo proposto para a transformação quimiluminescente do DNPO catalisada por salicilato de sódio é semelhante àquela proposta para a reação envolvendo TCPO. A reação se inicia com o ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio catalisado pelo salicilato, o qual pode exercer catálise básica geral (CBG) e/ou específica (CBE). Neste passo se forma o intermediário perácido, e se atribui a

constante de velocidade termolecular, k_1 , indicando o envolvimento das três espécies – DNPO/ H_2O_2 /salicilato – neste passo lento (**Esquema 16**). A região de saturação observada na curva, a partir de 100 mmol L^{-1} (**Figura 13, seção 4.2**), indica que a velocidade da reação não depende mais da $[\text{H}_2\text{O}_2]$, indicando a mudança do passo lento da reação, o qual deixa de ser o ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio à carbonila do éster, auxiliado pelo salicilato de sódio, e passa a ser a etapa de ciclização, correspondente à formação do intermediário de alta energia (IAE), a 1,2-dioxetanodiona. A este passo se atribui a constante de velocidade k_2 . O último passo da reação corresponde à interação do ACT com o IAE, ocorrendo de acordo com o mecanismo CIEEL intermolecular, o qual é rápido e se atribui a constante de velocidade k_3 . Neste passo, o ACT é levado ao estado excitado singlete, que ao decair para o estado fundamental, emite luz. Os outros produtos da reação são duas moléculas de CO_2 e o ACT no estado fundamental (**Esquema 16**).

Esquema 16: Sequência reacional para o sistema peroxioxalato envolvendo a reação de DNPO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio.

Estudos recentes feitos pelo nosso grupo de pesquisa mostram que a utilização do Imi-H como catalisador na reação de DNPO e H_2O_2 também proporciona ao sistema um mecanismo análogo ao aqui proposto para as transformações quimiluminescentes de DNPO e TCPO catalisadas por salicilato de sódio.⁸⁹

O rendimento quântico foi determinado para esta transformação tanto em função da concentração de salicilato quanto em função da concentração de peróxido, em ambos os casos, os valores de Φ_S foram da ordem de 10^{-6} E mol⁻¹, indicando uma baixa eficiência na formação de estados singlete no passo de quimiexcitação desta reação (**Tabelas 19 e 20, Figuras 15 e 16, seção 4.2**). Estes valores são três ordens de grandeza menores do que rendimento quântico máximo obtido quando os ensaios foram realizados com TCPO.

A realização de ensaios cinéticos de absorção com monitoramento da formação do 2,4-dinitrofenol em 350 nm (**Figura 14, seção 4.2**) não foi possível, uma vez que a reação se mostrou muito rápida, assim que se iniciou a aquisição de dados, a absorbância já se apresentava constante, impossibilitando o ajuste exponencial do aumento da absorbância.

5.2 Mecanismos da reação peroxioxalato na mistura DME/H₂O catalisada por tampão fosfato

As condições experimentais escolhidas para a reação peroxioxalato em meio aquoso tamponado utilizando tampão fosfato, em que a proporção entre a fase orgânica e a fase aquosa é de 1:1 (v/v) foi previamente otimizada em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa.⁸⁸ A mistura DME/H₂O na referida proporção impede que haja a precipitação dos reagentes empregados nestes ensaios na faixa de pH estudada, além disso, uma alta porcentagem de água permite a solubilização de diversos analitos hidrossolúveis utilizados em possíveis aplicações e bioanalíticas deste sistema. O tampão fosfato de tetrabutilamônio (TBAP), um fosfato orgânico, foi o escolhido para ser utilizado nos ensaios de adaptação do sistema peroxioxalato em meios aquosos uma vez que permite a utilização de concentrações mais altas tanto de peróxido de

hidrogênio como do próprio tampão no meio reacional. A escolha do ativador 2,5-difeniloxazol (PPO) se deu por conta de sua solubilidade em água, a qual é maior do que a solubilidade dos ativadores mais comumente utilizados na reação peroxioxalato em meio orgânico, tais como DPA e RUB.^{47,53}

Dos estudos realizados com os ésteres oxálicos oxalato de bis(4-metilfenila) (BMePO) e oxalato de bis(4-metoxifenila) (BMPO) em suas transformações quimiluminescentes quando se reage o éster com H₂O₂ e TBAP utilizando PPO como ACT (**Esquema 17**), verificou-se que, para ambos os ésteres, a velocidade da reação é fortemente afetada pela variação nas concentração de peróxido e tampão na faixa de pH de 6 até 8.

Esquema 17: Mecanismo geral para a transformação peroxioxalato realizada em uma mistura binária DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v), com TBAP como catalisador em diferentes pH (**cat:** H₃O⁺ / OH⁻ / H₂PO₄⁻ / HPO₄²⁻).

Os ensaios cinéticos de emissão com o éster BMePO com variação da concentração de peróxido de hidrogênio mostraram que a constante de velocidade observada (k_{obs}) aumenta em função da concentração de peróxido, os maiores valores de k_{obs} foram observados em pH 8, seguido por pH 7 e, por fim, os menores valores foram obtidos em pH 6 (**Tabela 22, seção 4.3**). A partir daí, foi possível estabelecer uma correlação linear entre [H₂O₂] e k_{obs} em todos os pH estudados, as quais forneceram as constantes de velocidade da reação de peridrólise (k_{per}), a constante k_{per} corresponde à

interação do éster oxálico com o peróxido no passo lento da reação; e as constantes de velocidade unimoleculares (k_{hidr}) correspondem à reação de hidrólise, em que não há envolvimento do peróxido, e que leva a produtos sem emissão de luz (**Esquema 17, Tabela 43**). Os valores de k_{per} aumentam mais de seis vezes quando o pH do meio vai de 6 até 8, indicando uma eficiente catálise básica. Os valores de k_{hidr} são baixos, porém aumentam em função do pH.

Nos ensaios com BMPO em que se variou a concentração de peróxido de hidrogênio, observou-se que, contrariamente aos resultados obtidos para BMePO, os maiores de valores de k_{obs} foram obtidos quando se realizou a reação em pH 6, seguido por pH 8, e os menores valores de k_{obs} obtidos em pH 7. Em pH 6, foi possível apenas obter as constantes de velocidade observadas em concentrações mais baixas de peróxido (**Tabela 23, seção 4.3**). A correlação linear estabelecida nos pH 7 e 8 para estes ensaios forneceu os valores de k_{per} e k_{hidr} , em que k_{per} aumenta do pH 7 para 8 e os valores de k_{hidr} são baixos e muito próximos entre si, em pH 6 não foi possível estabelecer esta correlação linear devido ao baixo número de pontos adquiridos nesta condição (**Tabela 43**). Estes ensaios indicam uma possível ocorrência de catálise ácida pelo fosfato predominante em pH 6 e catálise básica em pH 8.

Tabela 43: Valores das constantes de velocidade de hidrólise (k_{hidr}) e de peridrólise (k_{per}) obtidas a partir da correlação linear entre k_{obs} e $[\text{H}_2\text{O}_2]$ em sua reação com BMePO e BMPO em meio aquoso tamponado.

	BMePO			BMPO		
	k_{hidr} (s^{-1})	k_{per} ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	R^2	k_{hidr} (s^{-1})	k_{per} ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	R^2
pH 6	0,01±0,01	9,6±0,4	0,987	-	-	-
pH 7	0,16±0,01	20±1	0,971	0,02±0,01	34±1	0,988
pH 8	0,15±0,01	61±3	0,989	0,06±0,02	74±1	0,998

[éster oxálico] = 0,10 mmol L⁻¹; [PPO] = 1,5 mmol L⁻¹; [H₂O₂] = 2,5 – 50,0 mmol L⁻¹; [TBAP] (pH 6, 7 e 8) = 25,0 mmol L⁻¹. Proporção DME/H₂O 1:1 (v/v).

O papel catalítico do fosfato neste sistema pôde ser completamente entendido apenas quando se variou a concentração do tampão fosfato de tetrabutylamônio em cada pH estudado. Para os estudos com BMePO, observou-se que, assim como nos ensaios de variação da $[H_2O_2]$, k_{obs} aumenta com o aumento da $[TBAP]$ e também em função do pH, ou seja, os maiores valores de k_{obs} apresentam-se em pH 8, seguido pelo pH 7 e, por fim, em pH 6 (**Tabela 21, seção 4.3**). Das correlações lineares estabelecidas entre $[TBAP]$ e k_{obs} , obtiveram-se as constantes de velocidade bimoleculares para a reação catalisada pelo fosfato (k_{cat}) e as constantes de velocidade unimoleculares em que o fosfato não está envolvido (k) (**Tabela 44**). Os valores de k_{cat} obtidos para a reação de BMePO são próximos entre si em todos os pH, enquanto que o valores de k aumentam progressivamente de pH 6 até 8, mostrando que a extensão da reação de hidrólise aumenta em função do pH (**Tabela 44**).

Nos estudos com BMPO foi possível obter apenas dados cinéticos em pH 7, já que a reação se mostrou muito rápida em pH 6 e 8, impedindo a aquisição dos pontos iniciais da reação. O valor de k_{cat} para BMPO em pH 7 é alto, indicando a ocorrência de uma catálise pelo fosfato, e maior do que aquele obtido para BMePO (**Tabela 44**).

Tabela 44: Valores das constantes de velocidade de hidrólise (k) e da reação catalisada pelo fosfato (k_{cat}) obtidos a partir da correlação linear entre k_{obs} e $[TBAP]$ para os ésteres BMePO e BMPO em aquoso tamponado.

	BMePO			BMPO
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 7
$k \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0,028±0,005	0,188±0,004	0,41±0,02	0,22±0,04
$k_{cat} \text{ (L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	4,3±0,3	4,8±0,3	3,4±0,3	9,2±0,8
R^2	0,987	0,994	0,961	0,973

$[TBAP] = 8,0$ a 100 mmol L^{-1} , $[H_2O_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[PPO] = 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{éster oxálico}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ em um meio binário DME/ H_2O proporção 1:1 (v/v).

Analisando-se a reatividade de cada éster individualmente, o conjunto de resultados aqui apresentados mostram que o BMePO é mais reativo em um meio mais básico, já que os valores de k_{per} aumentam do pH 6 para o pH 8, indicando a importância de uma catálise básica promovida pelo fosfato. O BMPO se mostrou mais reativo em um meio mais ácido, já que em pH 6 foram obtidos os maiores valores de k_{obs} , indicando que o fosfato proporciona a este éster uma catálise ácida. A ocorrência de ambas, catálises ácida e básica, na peridrólise dos ésteres oxálicos pode ser utilizada para explicar o comportamento dos valores de k_{per} para os dois ésteres obtidos para valores de pH de 6 até 8. Comparando-se a reatividade destes ésteres, observa-se que a catálise ácida é mais eficiente para BMPO do que para BMePO, uma vez que o BMPO é mais básico, ou seja, o éster protonado é estabilizado pelo efeito doador de elétrons do substituinte *p*-metóxi. Porém, em pH 8, o BMPO também apresentou um alto valor de k_{per} , sendo a catálise básica também muito importante para sua reatividade.

A diferença na reatividade destes ésteres frente ao tipo de catálise envolvida em suas reações pode ser interpretada levando-se em consideração a natureza eletrônica dos substituintes *p*-metil e *p*-metóxi e como estes substituintes influenciam a reatividade de cada éster nos diferentes pH. O caráter doador de elétrons do grupo *p*-metóxi é mais forte do que o caráter doador do grupo *p*-metil, já que o primeiro ocorre por efeito de ressonância, enquanto que o segundo ocorre por efeito indutivo. Isso torna estes ésteres mais básicos do que ésteres que possuem substituintes sacadores de elétrons, ou seja, mais reativos em um meio mais ácido, sendo a maior reatividade atribuída ao BMPO pelos motivos já citados.

Uma vez que a velocidade da reação depende da concentração de tampão em todos os pH, pode-se entender que o tipo de catálise envolvida nestes processos é a catálise geral, em que a transferência de próton ocorre no passo lento da reação. Assim,

a catálise ácida geral (CAG) predomina na transformação de BMPO e a catálise básica geral (CBG) ocorre para ambos os ésteres. Em pH 7, ocorrem tanto CBG quanto CAG, os maiores valor de k_{cat} e k_{per} obtidos para BMPO neste pH (**Tabelas 43 e 44**) mostram que a CAG é predominante no percurso da reação deste éster e de menor importância para a transformação de BMePO (**Tabela 44**). O alto valor de k_{per} para BMPO em pH 8 mostra que a CBG também é altamente eficiente para este éster indicando que neste pH, porém, a CAG ainda tem contribuição em sua reação neste pH.

Os mecanismos para as transformações de BMePO e BMPO foram propostos de acordo com a ocorrência de CBG e CAG e com a distribuição das espécies fosfato em cada pH. Dentre as três espécies fosfato presentes no meio: fosfato (PO_4^{3-}), diidrogenofosfato (H_2PO_4^-) e monoidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), o H_2PO_4^- está presente em maior quantidade em meios mais ácidos ($\text{pH} < 7$), o HPO_4^{2-} é a espécie predominante em meios mais básicos (pH entre 7 e 12), em meios em que o pH é maior do 12, predomina a espécie totalmente desprotonada PO_4^{3-} , isto levando-se em consideração os três valores de pKa do ácido fosfórico ($\text{pKa}_1 = 2,12$; $\text{pKa}_2 = 7,2$ e $\text{pKa}_3 = 12,2$) (**Tabela 45**).

Tabela 45: Distribuição das espécies fosfato de acordo com os valores de pKa do ácido fosfórico e do pH do meio.

pH	% H_2PO_4^-	% HPO_4^{2-}
5	99,2	0,6
6	94	5,9
7	61,3	38,7
8	13,7	86,3
9	1,6	98,4

A determinação da distribuição das espécies fosfato foi feita utilizando-se o software CurtiPot®.

Em meios ácidos moderados, o mecanismo para a reação peroxioxalato via CAG se inicia com o ataque do peróxido ao éster oxálico assistido por H_2PO_4^- , em que a

transferência de próton do H_2PO_4^- para uma das carbonilas do éster oxálico e o ataque nucleofílico do peróxido a esta mesma carbonila ocorrem de maneira concertada no passo lento da reação, ao qual se atribui a constante de velocidade k_{per} , caracterizando uma CAG, conforme ilustrado pelo estado de transição desta etapa lenta, o qual conduz à formação de um intermediário tetraédrico (**Esquema 18**). No passo seguinte desta transformação, o qual se mostrou rápido, a carbonila do intermediário tetraédrico formado na etapa anterior é regenerada, sendo o grupo de partida o fenol protonado, forma-se então o intermediário perácido. No passo seguinte, este intermediário perácido sofre ciclização, ou seja, um ataque nucleofílico intramolecular do oxigênio do grupo perácido à outra carbonila do éster, e esta última, quando regenerada, leva à expulsão do fragmento fenólico remanescente, e se forma o intermediário de alta energia (IAE), formulado aqui como a 1,2-dioxatanodiona. O IAE interage com o ACT pelo mecanismo CIEEL intermolecular, uma etapa extremamente rápida, na qual ocorrem processos de transferência e retrotransferência de elétron entre o ACT e o IAE, levando à formação do ACT no estado excitado singlete, que decai para o estado fundamental por fluorescência emitindo luz, o que caracteriza a quimiluminescência do processo (**Esquema 18**). O passo de quimiexcitação em meios puramente orgânicos já foram extensivamente estudados,^{7,16,41,47-49} porém, ainda não foram reportados estudos sistemáticos para este passo em meios aquosos. Os outros produtos desta reação são duas moléculas de CO_2 e o ACT no estado fundamental. A reação em que o éster oxálico sofre ataque nucleofílico da água, passo ao qual se atribui a constante de velocidade de hidrólise (k_{hidr}), leva à formação do ácido oxálico e dois fragmentos de fenol, produtos sem emissão de luz (**Esquema 18**).

Esquema 18: Mecanismo da reação peroxioxalato catalisada por tampão fosfato em meios ácidos moderados, mostrando as reações de hidrólise (k_{hydr}) e peridrólise (k_{per}) e caracterizando a ocorrência de uma CAG pelo TBAP.

Conforme indicado pela reatividade relativa destes ésteres, a reação peroxioxalato em meio aquoso também está sujeita à CBG. O passo lento desta reação também corresponde ao ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio à carbonila do éster, porém, a transferência de próton neste caso ocorre do peróxido para o ânion monoidrogenofosfato, dentre as espécies fosfato presentes no meio, esta é a mais abundante em meios básicos mais moderados, como pode ser observado no estado de transição característico de uma CBG (**Esquema 19**). A reação prossegue de maneira análoga à reação em meio ácido, o intermediário tetraédrico formado neste primeiro passo tem sua carbonila regenerada no passo seguinte, conjuntamente à saída do fenolato como grupo de partida, o qual é posteriormente protonado. Forma-se, então, o intermediário perácido, que sofre ciclização, levando à formação do IAE. O IAE interage com ACT pelo mecanismo CIEEL intermolecular no passo de quimiexcitação desta reação, por processos de transferência e retrotransferência de elétrons, o ACT é levado ao estado excitado singlete, que ao decair para o estado fundamental, emite luz (**Esquema 19**). Produtos sem emissão de luz também se formam aqui devido à reação

de hidrólise do éster oxálico, passo ao qual se atribui a constante de velocidade k_{hidr} (Esquema 19).

Esquema 19: Mecanismo da reação peroxioxalato catalisada por tampão fosfato em meios básicos moderados, mostrando as reações de hidrólise (k_{hidr}) e peridrólise (k_{per}) e caracterizando a ocorrência de uma CBG pelo TBAP.

Como já discutido anteriormente, os resultados indicam que o éster oxálico BMPO reage preferencialmente via catálise ácida, em que a natureza eletrônica de seu substituinte *p*-metoxifenila fortemente doador de elétrons permite que, em condições ácidas, o éster oxálico protonado seja estabilizado, além disso, o grupo de partida nesta transformação é o *p*-metoxifenol, o qual é estável na forma protonada. Assim, sua rota reacional principal é através da CAG. Este processo é dominante em pH 6, condição em que k_{obs} assume valores maiores, porém, nos outros pH estudados, a CAG também ocorre, tendo em vista os altos valores de k_{per} , maiores até do que aqueles obtidos para BMePO nas mesmas condições (**Tabela 43**). A CBG se mostrou eficiente para ambos os ésteres oxálicos, neste processo, o grupo de partida no segundo passo da reação é o fenolato, ou seja, o fenol desprotonado, que é protonado nesta mesma etapa por alguma espécie ácida presente no meio. Este fenolato é mais estável quando o substituinte é o grupo *p*-metil um doador de elétrons mais fraco do que o grupo *p*-metóxi, já que este último contribui para o aumento de densidade de carga negativa na molécula. Assim,

espera-se que a CBG seja mais eficiente para o BMePO, porém, valores de k_{per} mostram que este tipo de catálise também se mostrou bastante eficiente para BMPO e ocorre juntamente com a CAG em todos os pH estudados para este meio.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que quando estes mesmos estudos são feitos com TCPO, este se mostra o éster mais reativo via CBG, e o menos reativo via CAG, tendo em vista que é o éster menos básico de todos, além disso, o fenolato liberado via CBG é estabilizado pelo efeito sacador de elétrons de seus substituintes cloro.^{88,90} As reações de hidrólise e peridrólise devem ser cuidadosamente analisadas para estes três ésteres, principalmente no que diz respeito a possíveis aplicações analíticas e bioanalíticas deste sistema uma vez que a reação de hidrólise é uma via de desperdício do éster oxálico, já que leva a produtos sem emissão de luz (**Esquemas 18 e 19**). Com a finalidade de quantificar esta competição, as constantes de velocidades unimoleculares ($k_{\text{H}_2\text{O}_2}$), quando $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$, foram calculadas a partir das constantes de peridrólise ($k_{\text{H}_2\text{O}_2} = k_{\text{per}} \times [\text{H}_2\text{O}_2]$), e comparadas com a constante de velocidade de hidrólise (**Tabela 46**). As velocidades para hidrólise e peridrólise são similares para TCPO, com exceção do pH 6. Para os ésteres com substituintes doadores de elétrons, as velocidades de peridrólise se mostraram sempre maiores do que as velocidades de hidrólise, comportamento contrário àquele observado para TCPO, em pelo menos uma ordem de grandeza (**Tabela 46**). Para BMPO a diferença chega a ser de duas ordens de magnitude, isso significa que a hidrólise do éster contribui com apenas 1,0% do consumo do éster pela via sem emissão de luz (**Tabela 46**).

Tabela 46: Comparação entre as constantes de velocidade unimoleculares de hidrólise (k_{hidr}) e peridrólise ($k_{\text{H}_2\text{O}_2}$) nas reações de TCPO, BMePO e BMPO com H_2O_2 em meio aquoso tamponado.^{88,90}

	TCPO		BMePO		BMPO	
	$k_{\text{hidr}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{s}^{-1})^a$	$k_{\text{hidr}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{s}^{-1})^a$	$k_{\text{hidr}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{s}^{-1})^a$
pH 6	baixo	0,25	0,01	1,0	-	-
pH 7	0,4	1,2	0,16	2,0	0,02	3,4
pH 8	2,6	3,1	0,15	6,1	0,06	7,4

^a Valores de $k_{\text{H}_2\text{O}_2}$ calculados a partir dos valores de k_{per} com $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Os valores de rendimento quântico singlete (Φ_S) para BMePO e BMPO, majoritariamente, da ordem de $10^{-7} \text{ E mol}^{-1}$, reportados neste trabalho (**Tabela 24, seção 4.3**) são ordens de magnitude menores do que aqueles determinados em trabalhos anteriores em meios orgânicos, em que Φ_S chegam até 50%.⁴⁷ Como discutido anteriormente, estes baixos valores não são devidos à grande quantidade de água no meio, uma vez que a extensão das reações de hidrólise é muito baixa para estes ésteres. Os baixos valores de Φ_S podem estar relacionados a baixa eficiência de formação de estados excitado singlete no passo de quimiexcitação deste sistema. Embora o efeito de solvente sobre o rendimento quântico tenha sido estudado para diversos sistemas quimiluminescentes, não existem estudos sobre este passo reacional em meio aquosos. Um dos poucos trabalhos já publicados sobre transformações quimiluminescentes em meio aquosos diz respeito à eficiência do CIEEL na decomposição induzida de 1,2-dioxatanos⁹¹ e que estão em concordância com os dados obtidos no presente trabalho com o sistema peroxioxalato. A baixa eficiência do CIEEL em meio aquoso pode ser devido à separação das espécies íon radicalares formadas durante o passo de quimiexcitação. Porém, os baixos rendimentos quânticos também podem ser causados pelo baixo rendimento de formação do IAE ou do complexo IAE-ACT. Estudos mais

detalhados sobre o passo de quimiexcitação serão necessários para racionalizar a baixa eficiência desta reação em meios aquosos.

5.3 Mecanismos da reação peroxioxalato na mistura DME/H₂O catalisada por salicilato de sódio

Os ensaios cinéticos de emissão para a reação dos ésteres oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) e oxalato de bis(4-metilfenila) (BMePO) com peróxido de hidrogênio, catalisada por salicilato de sódio, utilizando 2,5-difeniloxazol (PPO) como ACT, em um sistema binário contendo DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v) foram realizados visando a adaptação deste sistema a um meio aquoso (**Esquema 20**).

Esquema 20: Reação peroxioxalato para os ésteres TCPO e BMePO realizada em uma mistura DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v), catalisada por salicilato de sódio, utilizando PPO como ACT.

5.3.1 Reação de TCPO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio na mistura DME/H₂O

A reação de TCPO com H₂O₂ em um meio DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v) se mostrou pouco sensível à variação da [salicilato]. A correlação linear estabelecida entre k_{obs} e [salicilato] (**Figura 22, seção 4.4.1**) forneceu, a partir de sua inclinação, a constante de velocidade bimolecular, $k_{\text{bim}} = (6,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**Tabela 47**), a qual expressa a extensão da interação entre o salicilato e o TCPO no passo lento da reação. O coeficiente linear desta correlação forneceu a constante de velocidade, $k_0 =$

$(3,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, que se refere à reação em que o salicilato não está envolvido (**Tabela 47**).

Este comportamento é similar àquele apresentado na seção 4.1.1 e discutido na seção 5.1.1 com os ensaios realizados com TCPO em acetato de etila, porém, os resultados lá apresentados mostram que a reação naquela condição era mais sensível à variação na concentração de salicilato ($k_{\text{bim}} = (3,8 \pm 0,5) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (**Tabela 33, seção 5.1.1**), mesmo utilizando concentrações menores deste reagente, já que sua solubilidade em acetato de etila é baixa. Além de k_{obs} variar pouco com [salicilato] em um meio parcialmente aquoso, o valor de k_{bim} aqui obtido (**Tabela 47**) é menor do que o valor de k_{bim} obtido em meio orgânico puro (**Tabela 33, seção 5.1.1**). Isto ocorre, pois o TCPO é um éster muito reativo e a concorrência entre as reações não catalisada e a catalisada por salicilato é bastante significativa para este éster.

Quando se variou a concentração de peróxido de hidrogênio, obteve-se uma dependência linear de k_{obs} com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (**Figura 23, seção 4.4.1**), determinou-se a constante de velocidade bimolecular referente à reação de peridrólise, $k_{\text{per}} = (0,27 \pm 0,02) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a partir de seu coeficiente angular, e a constante de velocidade da reação de hidrólise, $k_{\text{hidr}} = (18 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, a partir do coeficiente linear (**Tabela 47**). Deve-se notar que o valor de k_{per} obtido para este meio parcialmente aquoso é um fator de 2 menor do que aquele obtido para os ensaios com TCPO em acetato de etila ($k_{\text{per}} = (2,04 \pm 0,06) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, quando $[\text{salicilato}] = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) (**seções 4.1.1 e 5.1.1**).

Tabela 47: Valores das constantes de velocidade k_0 e k_{bim} , obtidas a partir da correlação linear entre k_{obs} e [salicilato], e k_{hidr} e k_{per} , obtidas da correlação entre k_{obs} e $[H_2O_2]$ para a reação de TCPO com H_2O_2 catalisada por salicilato de sódio, utilizando PPO como ACT, em sistema binário DME/ H_2O 1:1 (v/v).

Dependência com salicilato ^a		Dependência com peróxido ^b	
k_0 (s ⁻¹)	k_{bim} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	k_{hidr} (s ⁻¹)	k_{per} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
(3,2±0,2) 10 ⁻²	(6,5±0,8) 10 ⁻²	(1,8±0,1) 10 ⁻²	0,27±0,02

^a[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, $[H_2O_2]$ = 40,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 5,0 mmol L⁻¹ e [salicilato] = 64,0 a 400 mmol L⁻¹ em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v). A regressão linear foi feita com $k_{obs} = k_0 + k_{bim}[\text{salicilato}]$.

^b[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [salicilato] = 80,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 5,0 mmol L⁻¹ e $[H_2O_2]$ = 40,0 a 500 mmol L⁻¹ em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v). A regressão linear foi feita com $k_{obs} = k_{hidr} + k_{per}[H_2O_2]$.

Tendo em vista que a velocidade da reação apresentou uma dependência de primeira ordem tanto em relação à concentração de salicilato quanto em relação à concentração de peróxido, pode-se entender que ambas as espécies estão envolvidas no passo lento desta transformação. As constantes de velocidade termoleculares (k_{ter}) foram determinadas a partir das constantes de velocidade bimoleculares, k_{bim} e k_{per} (**Tabela 48**). A constante de velocidade termolecular obtida a partir de k_{bim} (dependência com a [salicilato]), $k_{ter} = (1,6\pm0,2) \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$, é da mesma ordem de grandeza do que a constante de velocidade termolecular obtida a partir de k_{per} (dependência com a $[H_2O_2]$), $k_{ter}' = (3,4\pm0,2) \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (**Tabela 48**), mostrando que no estado de transição da etapa lenta desta reação estão envolvidos TCPO, H_2O_2 , e salicilato.

Tabela 48: Constantes de velocidade termoleculares (k_{ter} e k_{ter}') obtidas a partir das constantes de velocidade bimoleculares (k_{bim} e k_{per}) para a reação de TCPO com H_2O_2 , catalisada por salicilato em meio parcialmente aquoso.

$k_{ter} (\text{L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1})$	(1,6±0,2) ^a
$k_{ter}' (\text{L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1})$	(3,4±0,2) ^b

^a $[H_2O_2]$ = 40,0 mmol L⁻¹. ^b[salicilato] = 80,0 mmol L⁻¹.

O TCPO é um éster muito reativo e sua alta reatividade pode contribuir para que aumente a concorrência entre as reações de hidrólise e peridrólise, ou seja, a seletividade deste éster frente a um ataque nucleofílico da água ou do peróxido é baixa. Para fins de comparação entre as constantes de velocidade bimoleculares e termoleculares obtidas nestes ensaios para a elucidação do mecanismo aqui envolvido, optou-se por realizar ensaios análogos a este com um éster de diferente reatividade, o BMePO, um éster mais básico e menos reativo do que o TCPO.

5.3.2 Reação de BMePO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio na mistura DME/H₂O

As constantes de velocidade da reação de BMePO com H₂O₂ utilizando PPO como ACT, em um sistema binário contendo DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v), catalisada por salicilato apresentaram uma dependência de primeira ordem em relação à [salicilato]. Da correlação linear estabelecida entre k_{obs} e [salicilato] na faixa de concentração de 10,0 até 80,0 mmol L⁻¹, obteve-se a constante bimolecular, $k_{\text{bim}} = (0,21 \pm 0,04) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**Tabela 49**), a qual é mais de três vezes maior do que o valor de k_{bim} obtido para TCPO em condições experimentais semelhantes (**Tabela 47**). O intercepto da correlação forneceu a constante de velocidade em que não há catálise pelo salicilato, $k_0 = (3,8 \pm 0,7) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (**Tabela 49**), a qual é uma ordem de grandeza menor do que k_0 obtido para a reação de TCPO.

A menor reatividade de BMePO, comparado ao TCPO, pôde ser comprovada pelos menores valores de k_{obs} obtidos quando se variou a concentração de salicilato (**Tabela 25, seção 4.4.1; Tabela 28, seção 4.2.2**). Embora menores, a variação nos valores de k_{obs} é maior na faixa de concentração de salicilato utilizada, o que levou a um maior valor de k_{bim} para BMePO do que para o TCPO (**Tabelas 46 e 47**). Este mesmo

comportamento foi observado quando se variou a concentração de peróxido de hidrogênio (**Tabela 29, seção 4.4.2**). Os valores de k_{obs} foram menores nestes ensaios do que nos ensaios com TCPO, porém, com BMePO, k_{obs} sofreu uma variação maior, de mais de quinze vezes na faixa de concentração de peróxido de 10,0 até 500 mmol L⁻¹ (**Tabela 29, seção 4.4.2**), enquanto que para TCPO esta variação foi de apenas cinco vezes. Consequentemente, a correlação linear estabelecida entre k_{obs} e [H₂O₂] na faixa de concentração de 10,0 até 160 mmol L⁻¹, forneceu uma constante de velocidade da reação de peridrólise, $k_{per} = (0,38 \pm 0,02) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**Tabela 49**), maior do que aquela obtida para TCPO; e uma constante de hidrólise, $k_{hidr} = (2,3 \pm 0,5) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (**Tabela 49**), uma ordem de grandeza menor do que k_{hidr} obtida para o TCPO (**Tabela 47**).

Tabela 49: Valores das constantes de velocidade k_0 e k_{bim} , obtidas através da correlação linear entre k_{obs} e [salicilato], e k_{hidr} e k_{per} obtidas através da correlação entre k_{obs} e [H₂O₂] para a reação de BMePO com H₂O₂ catalisada por salicilato de sódio, utilizando PPO como ACT, em um sistema binário DME/H₂O 1:1 (v/v).

Dependência com salicilato ^a		Dependência com peróxido ^b	
$k_0 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{bim} \text{ (L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$k_{hidr} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{per} \text{ (L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$
$(3,8 \pm 0,7) 10^{-3}$	$0,21 \pm 0,04$	$(2,3 \pm 0,5) 10^{-3}$	$0,38 \pm 0,02$

^a[BMePO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 5,0 mmol L⁻¹ e [salicilato] = 10,0 a 400 mmol L⁻¹ em um sistema binário DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v). O ajuste foi feito através de uma regressão linear $k_{obs} = k + k_{bim}[\text{salicilato}]$.

^b[BMePO] = 0,10 mmol L⁻¹, [salicilato] = 10,0 mmol L⁻¹, [PPO] = 5,0 mmol L⁻¹ e [H₂O₂] = 10,0 a 500 mmol L⁻¹ em um sistema binário DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v). A regressão linear foi feita com $k_{obs} = k_{hidr} + k_{per}[\text{H}_2\text{O}_2]$.

Com a finalidade de se quantificar quanto do éster que foi consumido pela reação de hidrólise, foi determinada a constante de velocidade unimolecular, $k_{\text{H}_2\text{O}_2}$, em três concentrações distintas de peróxido de hidrogênio ($k_{\text{H}_2\text{O}_2} = k_{per} \times [\text{H}_2\text{O}_2]$), a qual foi comparada com a constante de velocidade da reação de hidrólise, k_{hidr} , para BMePO e TCPO (**Tabela 50**). Observou-se que na concentração de peróxido igual a 40,0 mmol L⁻¹, a reação de hidrólise prevalece em relação à peridrólise do TCPO ($k_{hidr} > k_{\text{H}_2\text{O}_2}$),

sendo a extensão da reação de hidrólise correspondente a 62,5% para este éster. Porém, na maior concentração de peróxido, a reação de peridrólise passa a prevalecer ($k_{H_2O_2} > k_{hidr}$). A maior reatividade do TCPO torna-o menos seletivo, e a competição entre as reações de hidrólise e peridrólise é muito alta, sendo que esta última predomina apenas quando a concentração de peróxido é alta (**Tabela 50**). O BMePO é um éster menos reativo, podendo reagir preferencialmente com o peróxido, o qual é mais nucleofílico do que a água devido ao efeito α .⁹²⁻⁹⁵ Portanto, o caminho reacional que prevalece para BMePO é o da reação de peridrólise, conforme os dados de k_{hidr} e $k_{H_2O_2}$, em que $k_{H_2O_2}$ é sempre maior do que k_{hidr} , inclusive na menor concentração de peróxido, onde a peridrólise corresponde a 62% desta transformação. Na maior concentração de peróxido, a extensão da reação de peridrólise é de 98% para BMePO, enquanto que para o TCPO é de 88% (**Tabela 50**).

Tabela 50: Valores das constantes de velocidade unimoleculares para as reações de hidrólise (k_{hidr}) e peridrólise ($k_{H_2O_2}$) dos ésteres TCPO e BMePO em um meio parcialmente aquoso.

$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	TCPO		BMePO	
	$k_{hidr} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$k_{H_2O_2} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$k_{hidr} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$k_{H_2O_2} \times 10^3$ (s ⁻¹)
10,0		-		3,8
40,0	(18±1)	10,8	(2,3±0,5)	15,2
500		135		190

Analogamente aos ensaios realizados com TCPO, aqui também se obteve uma dependência de primeira ordem da velocidade da reação em relação tanto ao salicilato de sódio quanto o peróxido de hidrogênio. Assim, ambos estão envolvidos no passo lento da reação e entende-se que existe uma constante de velocidade termolecular (k_{ter}) para este passo da reação que pode ser calculada através da razão entre a constante obtida da inclinação da reta pela concentração padrão do reagente que não se variou. Deste modo, obtiveram-se as constantes de velocidade termoleculares da dependência

com salicilato (k_{ter}) e da dependência com peróxido (k_{ter}'), as quais são da mesma ordem de grandeza, mostrando o envolvimento do peróxido e do salicilato no passo lento da reação (**Tabela 51**).

Tabela 51: Constantes de velocidade termoleculares (k_{ter} e k_{ter}') obtidas a partir das constantes de velocidade bimoleculares (k_{bim} e k_{per}) para a reação de BMePO com H_2O_2 , catalisada por salicilato em meio parcialmente aquoso.

$k_{\text{ter}} (\text{L}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1})$	$21 \pm 4^{\text{a}}$
$k_{\text{ter}}' (\text{L}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1})$	$38 \pm 2^{\text{b}}$

^a $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. ^b $[\text{salicilato}] = 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Os resultados mostram que o mecanismo para as reações de TCPO e BMePO em um sistema binário DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v) com salicilato de sódio como catalisador é análogo a aqueles já propostos com TCPO e DNPO em acetato de etila. A reação se inicia com o ataque nucleofílico do peróxido à carbonila do éster catalisado pelo salicilato de sódio, através de catálise básica geral e/ou específica. Nesta etapa se forma um intermediário perácido e é atribuída a constante de velocidade termolecular k_1 (**Esquema 21, Equação 14**). A reação prossegue com um ataque intramolecular do perácido à carbonila vizinha, levando à formação do IAE, a 1,2-dioxetanodiona, a este passo se atribui a constante de velocidade k_2 , a qual corresponde ao valor máximo de k_{obs} obtido na região de saturação dos valores de k_{obs} em função da $[\text{H}_2\text{O}_2]$ nos ensaios com BMePO (**Figura 28, seção 4.4.2**), indicando que a reação deixou de depender da $[\text{H}_2\text{O}_2]$. O último passo corresponde à interação do IAE com o ACT através do mecanismo CIEEL intermolecular, culminando com a emissão de luz pelo sistema. A esta etapa de atribui a constante de velocidade k_3 (**Esquema 21**).

Esquema 21: Reação peroxioxalato envolvendo BMePO e peróxido de hidrogênio catalisada por salicilato de sódio em um sistema binário DME/ H_2O . Esta sequencia de reações também se aplica para a reação de TCPO nas mesmas condições experimentais.

$$v = k_1[\text{salicilato}][H_2O_2][\text{éster oxálico}], \text{ com } k_{obs} = k_1[\text{salicilato}][H_2O_2]$$

Equação 14

A determinação do rendimento quântico singlete (Φ_S) mostrou que os valores de Φ_S mantiveram-se relativamente constantes nos ensaios com TCPO, da ordem de 10^{-5} E mol^{-1} , mostrando que, nestas condições experimentais, o salicilato de sódio não interage com o IAE, desativando-o, e levando a produtos sem emissão de luz. Este resultado é bastante surpreendente, uma vez que os resultados apresentados anteriormente nos ensaios com TCPO em acetato de etila (**Tabela 4, Figura 7, seção 4.1.1**) mostraram que os valores de Φ_S diminuía em função da [salicilato]. Existe uma diferença bastante relevante nestes ensaios, o intervalo de concentração de salicilato utilizado em ambos difere significativamente; na reação em acetato de etila, [salicilato] = 0,50 até 10,0 mmol L^{-1} , menor do que o utilizado nos ensaios em meio parcialmente aquoso, de 64,0 até 400 mmol L^{-1} . Além disso, os valores de Φ_S nestes ensaios foram duas ordens de grandeza menores do que $\Phi_S^{\text{máx}}$ obtido em acetato de etila puro. Embora os valores de Φ_S difiram significativamente destes últimos, estes valores são da mesma ordem de

grandeza do que aqueles obtidos em meio aquoso tamponado.^{88,90} Os rendimentos quânticos obtidos para BMePO são da ordem de 10^{-7} E mol⁻¹ (**Tabela 30, Figura 30, seção 4.4.2**), e estão em concordância com aqueles obtidos em meio aquoso tamponado.⁹⁰ Isso mostra que, embora o salicilato não interfira ou interfira pouco no rendimento quântico das reações de TCPO e BMePO, o mecanismo CIEEL não é tão eficiente no sistema binário DME/H₂O quanto em sistemas puramente orgânicos. Quando há água no meio reacional, o encontro do IAE com o ACT para a formação do complexo de transferência de carga dentro da cavidade do solvente é menos eficiente (**Esquema 9, seção 1.3.3**). Além disso, o encontro das espécies íon radicalares pode ser desfavorecido nestes meios, levando a baixos rendimentos quânticos.

Ensaio cinéticos de absorção não foram realizados devido à sobreposição de bandas de absorção do salicilato e dos fenóis 2,4,6-triclorofenol e 4-metilfenol, o que impede o monitoramento do aumento da absorbância no comprimento de onda correspondente a estes fenóis (**Figura 24, seção 4.4.1; Figura 29, seção 4.4.2**).

5.4 Reação peroxioxalato em um meio majoritariamente aquoso

Os ensaios cinéticos de emissão com os ésteres TCPO e BMePO em sistemas binários DME/H₂O na proporção 1:1 (v/v), mostraram que é possível se trabalhar com concentrações mais altas de salicilato, devido a sua maior solubilidade em água, o que não ocorre em acetato de etila, solvente em que a solubilidade do salicilato é baixa. Os resultados mostraram que, nos ensaios de emissão de luz para estes ésteres, o salicilato de sódio apresenta um papel catalítico bastante evidente, principalmente nos ensaios com BMePO. Embora houvesse a concorrência da reação de hidrólise, a catálise promovida pelo salicilato pôde ser observada quando se utilizaram concentrações mais elevadas desta base. Estes resultados encorajaram o uso deste mesmo catalisador em

sistemas majoritariamente aquosos, visando mais uma maneira de se adaptar o sistema peroxioxalato a meios aquosos (**Seção 5.3**). A reação realizada visando estudar esta adaptação foi a de TCPO, H_2O_2 e salicilato de sódio utilizando fluoresceína (FLU) como ativador (**Esquema 22**). Optou-se por se utilizar a pelo sal da FLU, na sua forma diânion, como ACT, em substituição ao PPO, devido a sua maior solubilidade em água.

Esquema 22: Reação peroxioxalato em um meio majoritariamente aquoso utilizando TCPO em sua reação com H_2O_2 , salicilato de sódio e FLU como ACT.

Os resultados dos ensaios de emissão mostram que a velocidade da reação é fortemente influenciada pela variação na concentração de peróxido de hidrogênio, principalmente nas condições em que $[\text{salicilato}] = 120 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{salicilato}] = 240 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Seção 4.5**), nas quais os valores de k_{obs} sofrem um aumento mais significativo do que quando $[\text{salicilato}] = 60,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Tabela 31, Figura 32, seção 4.5**). As correlações lineares estabelecidas entre k_{obs} e $[\text{H}_2\text{O}_2]$, nas condições em que a concentração de salicilato é maior, forneceram constantes de velocidade da reação de peridrólise (k_{per}) com valores similares (**Tabela 52**), indicando que mesmo aumentando a concentração de salicilato de uma série de experimentos para outra, não há uma mudança na velocidade da reação de peridrólise, indicando que esta reação pode não estar sujeita a uma catálise pelo salicilato. As constantes de hidrólise, fornecidas pela correlação linear, mudam pouco de uma condição para outra, e são da ordem de 10^{-3} s^{-1} (**Tabela 52**).

Tabela 52: Valores das constantes de velocidade das reações de hidrólise (k_{hidr}) e peridrólise (k_{per}) obtidas em diferentes condições experimentais para a reação de TCPO, H_2O_2 e salicilato de sódio, utilizando FLU como ACT.

	Condições experimentais		
	[salicilato] = 60,0 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 120 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 240 mmol L ⁻¹
$k_{\text{hidr}} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	-	5,1±0,1	4,3±0,2
$k_{\text{per}} \text{ (L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	-	0,162±0,003	0,16±0,01

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [FLU] = 0,20 mmol L⁻¹, em meio majoritariamente aquoso.

Os ensaios com variação da concentração de salicilato não mostram uma dependência de k_{obs} com a concentração desta base, os quais se mantiveram praticamente constantes dentro de uma ampla faixa de concentração de salicilato; de 30,0 até 300 mmol L⁻¹, $k_{\text{obs}}^{\text{médio}} = (36 \pm 4) \text{ s}^{-1}$. (**Tabela 32, Figura 33, seção 4.5**). Monitorou-se o pH da solução durante os ensaios, os valores obtidos foram, em média, iguais a 6,79±0,05. Portanto, nestes meios, o salicilato encontra-se desprotonado, uma vez que o pKa do ácido salicílico corresponde a 2,81 em meio aquoso, e mesmo assim não foi verificada qualquer ação catalítica nestas condições.⁹⁶

O comportamento da reação peroxioxalato utilizando TCPO como éster oxálico neste meio majoritariamente aquoso se mostrou bastante distinto daqueles em meios puramente orgânicos (**Seções 4.1 e 5.1**) e daqueles em sistemas binários DME/H₂O 1:1 (v/v) (**Seções 4.4 e 5.3**). No primeiro caso, observou-se que, mesmo em concentrações mais baixas, o salicilato de sódio catalisa a reação de TCPO e H₂O₂ (**Tabela 33, seção 5.1.1**), podendo ser entendido como um catalisador básico geral e/ou específico. No segundo caso, em que o sistema é binário DME/H₂O, também se observou que o salicilato influencia na velocidade da reação (**Tabela 47, seção 5.3.1**). Em ambos os casos, postulou-se um mecanismo em que o salicilato participa do passo lento da reação juntamente com o peróxido de hidrogênio (**Esquema 11, seção 5.1.1 e Esquema 21, seção 5.3.2**).

Comparando-se os valores das constantes de velocidade observadas em função da [salicilato] para a transformação do TCPO em sistema binário DME/H₂O (**Seção 4.4**) com os valores de k_{obs} obtidos em meio aquoso (**Seção 4.5**), observa-se que quando se usa concentrações de salicilato que são próximas entre si (**Tabela 25, seção 4.4.1 e Tabela 32, seção 4.5**), os valores de k_{obs} são similares nas menores concentrações de salicilato, porém, são maiores em sistema binário DME/H₂O nas maiores concentrações de salicilato do que em meio majoritariamente aquoso. Isto poderia levar a um entendimento de que a reação não catalisada seria um agravante em sistemas majoritariamente aquosos, por proporcionar uma alta concorrência com a reação catalisada pelo salicilato. Os valores de k_{obs} também foram comparados frente à variação da concentração de peróxido de hidrogênio nestes dois meios e se verificou que estes valores são sempre maiores no sistema binário DME/H₂O (**Tabela 26, seção 4.4.1 e Tabela 31, seção 4.5**). Esta observação poderia indicar que, de fato, uma maior quantidade de água no meio poderia favorecer amplamente a reação de hidrólise em relação à reação de peridrólise. Porém, ao se calcular a constante de velocidade unimolecular da peridrólise ($k_{\text{H}_2\text{O}_2}$), quando $[\text{H}_2\text{O}_2] = 400 \text{ mmol L}^{-1}$, a partir das constantes de peridrólise obtidas da dependência da velocidade da reação com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (**Tabela 52**), verificou-se que a reação ocorre preferencialmente pelo caminho da peridrólise, já que os valores de $k_{\text{H}_2\text{O}_2}$ são sempre muito maiores do que o valores de k_{hidr} (**Tabela 53**).

Tabela 53: Valores das constantes de velocidade unimoleculares de hidrólise (k_{hidr}) e peridrólise ($k_{\text{H}_2\text{O}_2}$) obtidos para a reação de TCPO, H_2O_2 e salicilato, utilizando FLU como ACT em um meio majoritariamente aquoso.

	Condições experimentais	
	[salicilato] = 120 mmol L ⁻¹	[salicilato] = 240 mmol L ⁻¹
$k_{\text{hidr}} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	5,1±0,1	4,3±0,2
$k_{\text{H}_2\text{O}_2} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}^a$	64,8	64,0

^aValores determinados para $[\text{H}_2\text{O}_2] = 400 \text{ mmol L}^{-1}$.

A extensão da reação de peridrólise é de aproximadamente 93% nos casos em que a concentração de salicilato é de 120 e 240 mmol L⁻¹, maior até do que extensão da reação de peridrólise do TCPO em sistema binário DME/H₂O, a qual era de 88% e a reação era catalisada pelo salicilato (**Tabela 50, seção 5.3.2**). Assim, não se pode dizer que uma maior proporção de água no sistema seja uma agravante para esta reação, de modo que poderia haver uma preferência pela reação do TCPO com água do que com salicilato ou peróxido. Verificou-se apenas que o salicilato não catalisa a reação nas condições experimentais aqui apresentadas. Logo, no passo lento da reação, está envolvido apenas o peróxido de hidrogênio, em relação ao qual a reação apresentou uma dependência de primeira ordem. Assim, uma possível proposta do mecanismo desta transformação consiste no ataque nucleofílico do peróxido à carbonila do éster, formando o intermediário perácido, este passo é lento e ao qual de atribui a constante de velocidade bimolecular k_1 (**Esquema 23, Equação 15**). A reação prossegue com a ciclização do perácido levando à formação da 1,2-dioxetanodiona, o IAE deste sistema, a este passo se atribui a constante k_2 . O terceiro passo da reação corresponde à interação do IAE com o ACT através do mecanismo CIEEL intermolecular, o ACT é excitado para o estado singlete e decai para o estado fundamental emitindo luz, formam-se também duas moléculas de CO₂. Este passo é rápido e se atribui a constante de velocidade k_3 (**Esquema 23**).

Esquema 23: Proposta do mecanismo da reação entre TCPO, H_2O_2 utilizando FLU como ACT, a qual se mostrou independente da concentração de salicilato de sódio.

$$v = k_1[H_2O_2][\text{éster oxálico}], \text{ com } k_{obs} = k_1[H_2O_2]$$

Equação 15

6. Conclusões

Neste trabalho foi estudado o mecanismo da reação peroxioxalato utilizando-se salicilato de sódio e tampão fosfato como catalisadores adaptando-se as condições de reação para meios aquosos, importante para aplicações analíticas e bioanalíticas.

Especificamente foram obtidas as seguintes conclusões:

- (i) Verificou-se que, na reação dos ésteres oxálicos TCPO e DNPO com H_2O_2 , ambas catalisadas por salicilato em meio puramente orgânico, o salicilato atua como catalisador básico geral, embora não se possa desconsiderar seu papel como catalisador básico específico. Em ambos os casos, o peróxido de hidrogênio e o salicilato estão envolvidos na etapa lenta da reação, havendo uma dependência de primeira ordem em relação a cada um destes reagentes. O mecanismo que o salicilato promove para estes sistemas é distinto daquele verificado quando se usa imidazol na reação peroxioxalato, o qual atua como catalisador básico e nucleofílico.
- (ii) Mecanismo similar a este aqui proposto também postulado observado quando se estudou as reações de TCPO e BMePO com H_2O_2 em meio parcialmente aquoso com DME/ H_2O na proporção 1:1 (v/v), também utilizando salicilato como catalisador. A utilização de BMePO possibilitou a completa elucidação deste mecanismo em sistema binário DME/ H_2O , uma vez que é um éster menos reativo do que o TCPO, sendo sua reação mais lenta, possibilitando uma melhor interpretação dos dados cinéticos.
- (iii) O estudo da reação peroxioxalato, utilizando ésteres oxálicos com reatividades distintas, em meio aquoso tamponado mostrou que o tampão fosfato proporciona diferentes mecanismos de acordo com o pH do meio reacional, sendo o primeiro deles o de catálise ácida geral (CAG) e o outro de catálise básica geral (CBG). A reação peroxioxalato via CAG se mostrou mais eficiente para a reação de BMPO, enquanto que

o caminho reacional via CBG se mostrou eficiente tanto para BMPO quanto para BMePO.

(iv) A reação peroxioxalato em um meio majoritariamente aquoso utilizando TCPO e H_2O_2 na presença de salicilato de sódio e utilizando FLU como ativador não se mostrou dependente da concentração de salicilato, os valores de k_{obs} permanecem constantes com o aumento da concentração de salicilato, indicando que este não promove qualquer tipo de catalise para esta reação nas condições experimentais aqui apresentadas. Assim, o mecanismo proposto para esta transformação foi aquele em que há envolvimento apenas do peróxido de hidrogênio com o éster no passo lento da reação.

7. Referências bibliográficas

1. Wiedemann, E.; "Ueber Fluoreszenz und phosphoreszenz I. Abhandlung". *Ann. Phys. Chem.* **1888**, *34*, 446.
2. Campbell, A. K.; *Chemiluminescence, Principles and Applications in Biology and Medicine*, Ellis Howard Ltd.: Chichester, **1988**.
3. Radziszewski, B.; "Untersuchungen über Hydrobenzarnid, Amarm und Lophin". *Ber. Chem. Ges.* **1887**, *10*, 70.
4. Albrecht, H. O.; "Über die Chemilumineszenz des Aminophthalsäurehydrazids". *Z. Phys. Chem. (Muenchen, Ger.)* **1928**, *136*, 321.
5. Gleu, K.; Petsch, W.; "Die Chemilumineszenz der Dimethyldiacridyliumsalze". *Angew. Chem.* **1935**, *48*, 57.
6. Chandross, E. A.; "A New Chemiluminescent System". *Tetrahedron Lett.* **1963**, *12*, 761.
7. Baader, W. J.; Stevani, C. V.; Bastos, E. L.; "Chemiluminescence of Organic Peroxides" Em *The Chemistry of Peroxides*; Rappoport, Z., ed.; Wiley & Sons: Chichester, **2006**, vol. 2, p.1211-1278.
8. Schuster G. B.; S. P. Schmidt; "Chemiluminescence of Organic-Compounds". *Adv. Phys. Org. Chem.* **1982**, *18*, 187-238.
9. Marcus, R. A.; "On the theory of chemiluminescent electron-transfer reactions". *J. Chem. Phys.* **1965**, *43*, 2654.
10. Marcus, R. A.; Siders, P.; "Theory of highly exothermic electron transfer reactions". *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 622.
11. Marcus, R. A. Em *Electron Transfer – From Isolated Molecules to Biomolecules*; Jortner, J.; Bixon, M., eds.; John Wiley & Sons: Chichester, **1999**.
12. Adam, W.; Cilento, G.; Em *Chemical and Biological Generation of Excited States*; Academic Press: New York, **1982**, p. 115-152.
13. Koo, J.-Y; Schuster, G.B.; "Chemiluminescence of Diphenoyl Peroxide. Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence. A New General Mechanism for Chemical Production of Electronically Excited States". *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4496.
14. Schmidt, S. P.; Schuster, G. B.; "Chemiluminescence of Dimethyldioxetanone – Unimolecular Generation of Excited Singlet and Triplet Acetone. Chemically Initiated Electron-Exchange Luminescence, the Primary Light Generating Reaction". *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 306.
15. Oliveira, M. A.; Bartoloni, F. H.; Augusto, F. A.; Ciscato, L. F. M. L.; Bastos, E. L.; Baader, W. J.; "Revision of Singlet Quantum Yields in the Catalyzed Decomposition of Cyclic Peroxides". *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10537.

-
16. Augusto, F. A.; Souza, G. A.; Souza Jr, S. P.; Khalid, M.; Baader, W. J.; "Efficiency of Electron Transfer Initiated Chemiluminescence". *Photochem. Photobiol.* **2013**, 89, 1299.
17. Khalid, M.; Oliveira, M. A.; Souza Jr., S. P.; Ciscato, L. F. M. L.; Bartoloni, F. H.; Baader, W. J.; "Efficiency of intermolecular chemiluminescence systems lacks significant solvent cavity effect in binary toluene/diphenylmethane mixtures". *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2015**, 312, 81.
18. Souza Jr., S. P.; Khalid, M.; Augusto, F. A.; Baader, W. J.; "Peroxyoxalate efficiency in polar medium is moderately enhanced by solvent viscosity". *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2016**, 321, 143.
19. McCapra, F.; "An Application of the Theory of Electrocyclic Reactions to Bioluminescence". *Chem. Commun.* **1968**, 155.
20. Adam, W.; Cilento, G.; "Four-Membered-Ring Peroxides as Excited States Equivalents: a New Dimension in Bioorganic Chemistry". *Angew. Chem. Int. Ed.* **1983**, 22, 529.
21. Adam, W.; "Thermal Generation of Electronic Excitation with Hyperenergetic Molecules". *Pure Appl. Chem.* **1980**, 52, 2591.
22. Wilson, T.; "Comments on the Mechanisms of Chemi- and Bioluminescence". *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 601.
23. Nery, A. L. P.; Baader, W. J.; "Quimiluminescência de Peróxidos Orgânicos: Geração de Estados Eletronicamente Excitados na Decomposição de 1,2-Dioxetanos". *Quim. Nova* **2001**, 24, 626.
24. Wilson, T.; "Chemiluminescence in the Liquid Phase: Thermal Cleavage of Dioxetanes". *Int. Rev. Sci. Phys. Chem. Ser. Two* **1976**, 9, 266.
25. Turro, N. J.; Lechtken, P. "Thermal and Photochemical Generation of Electronically Excited Organic Molecules". *Pure Appl. Chem.* **1973**, 33, 363.
26. Richardson, W. H.; O'Neal, H. E.; "Thermochemistry and Estimated Activation Parameters for the Thermal Decomposition of 1,2-Dioxetanedione, 4-*tert*-Butyl-1,2-Dioxetan-3-One and 4,4-Dimethyl-1,2-Dioxetan-3-One". *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 8665.
27. O'Neal, H. E.; Richardson, W. H.; (1970) "Thermochemistry of 1,2-Dioxetane and its Methylated Derivatives. Estimation of Activation Parameters". *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6553.
28. Wilson, T.; Halpern, A. M.; "Dioxetane Decomposition Revisited: a Semi-Empirical Study of the Potential Energy Surface". *J. Phys. Org. Chem.* **1995**, 8, 359.
29. Bastos, E. L.; Baader, W. J.; "Theoretical Studies on Thermal Stability of Alkyl-Substituted 1,2-Dioxetanes". *ARKIVOC* **2007**, 257.
30. Turro, N. J.; Devaquet, A.; "Chemiexcitation Mechanisms – Role of Symmetry and Spin-Orbit-Coupling in Diradicals". *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3859.

-
31. Schuster, G. B.; "Chemiluminescence of Organic Peroxides. Conversion of Ground-State Reactants to Excited State Products by the Chemically Initiated Electron-Exchange Luminescence Mechanism". *Acc. Chem. Res.*, **1979**, *12*, 366.
32. Koo, J.-Y.; Schuster, G.B.; "Dioxetane Chemiluminescence. The Effect of Deuterium Substitution on the Thermal Decomposition of trans - 3,4-Diphenyl- 1,2-dioxetane". *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5403.
33. Schmidt, S. P.; Schuster, G. B.; "Dioxetanone Chemiluminescence by the Chemically Initiated Electron Exchange Pathway". Efficient Generation of Excited Singlet States *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 1966.
34. Adam, W.; Simpson, A.; Yany, F.; "Mechanism of Direct and Rubrene Enhanced Chemiluminescence During α -Peroxylactone Decarboxylation". *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 2559.
35. Adam, W.; Cueto, O.; "Fluorescer-Enhanced Chemiluminescence of α -Peroxylactones via Electron Exchange". *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6511.
36. Turro, N. J.; Chow, M.-F.; "Chemiluminescent Thermolysis of α -Peroxylactones". *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5058.
37. Ciscato, L. F. M. L.; Bartoloni, F. H.; Bastos, E. L.; Baader, W. J.; "Direct Kinetic Observation of the Chemiexcitation Step in Peroxyoxalate Chemiluminescence". *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8974.
38. Schaap, A. P.; Gagnon, S. D.; "Chemiluminescence from a Phenoxide-Substituted 1,2-Dioxetane: a Model for Firefly Bioluminescence". *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3504.
39. Nery, A. L. P.; Röpke, S.; Catalani, L. H.; Baader, W. J.; "Fluoride-Triggered Decomposition of *m*-Sililoxiphenyl-Substituted 1,2-Dioxetanes by an Intramolecular Electron Transfer (CIEEL) Mechanism". *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2443.
40. Nery, A. L. P.; Weiss, D.; Catalani, L. H.; Baader, W. J.; "Studies on the Intramolecular Electron Transfer Catalyzed Thermolysis of 1,2-Dioxetanes". *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5317.
41. Rauhut, M. M.; "Chemiluminescence from Concerted Peroxide Decomposition Reactions". *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 80.
42. Rauhut, M. M.; Bollyky, L. J.; Roberts, B. G.; Loy, M.; Whitman, R. H.; Iannotta, A. V.; "Chemiluminescence from Reactions Electronegatively Substituted Aryl Oxalates with Hydrogen Peroxide and Fluorescent Compounds". *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 6515.
43. Isobe, H.; Takano, Y.; Okumura, M.; Kuramitsu, S.; Yamaguchi, K.; "Mechanist Insights in Charge-Transfer-Induced Luminescence of 1,2-Dioxetanones with a Substituent of Low Oxidation Potential". *J. Am. Chem Soc.* **2005**, *127*, 8667.
44. Yue, L.; Liu, Y. J.; Fang, W. H.; "Mechanist Insight into the Chemiluminescent Decomposition of Firefly Dioxetanone". *J. Am. Chem Soc.* **2012**, *134*, 11632.

-
45. Silva, L. P.; Silva, J. C. G. E.; "Interstate Crossing-Induced Chemiexcitation as the Reason for the Chemiluminescence of Dioxetones". *ChemPhysChem*. **2013**, *14*, 1071.
46. Silva, L. P.; Silva, J. C. G. E.; "Mechanistic Study of Unimolecular Decomposition of 1,2-dioxetanedione". *J. Phys. Org. Chem.* **2013**, *26*, 659.
47. Stevani, C. V.; Silva, S. M.; Baader, W. J.; "Studies on the Mechanism of the Excitation Step in Peroxyoxalate System". *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 4037.
48. Ciscato, L. F. M. L.; Augusto, F. A.; Weiss, D.; Bartoloni, F. H.; Albrecht, S.; Brandl, H.; Zimmermann, T.; Baader, W. J.; "The Chemiluminescent Peroxyoxalate System: State of the Art Almost 50 Years from its Discovery". *ARKIVOC* **2012**, 391.
49. Bartoloni, F. H.; Ciscato, L. F. M. L.; Peixoto, M. M. M.; Santos, A. P. F.; Santos, C. S.; Oliveira, S.; Augusto, F. A.; Pagano, A. P. E.; Baader, W. J.; "Luz: Um Raro Produto de Reação". *Quim. Nova* **2011**, *34*, 544.
50. Stevani, C. V.; Baader, W. J.; "O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato". *Quim. Nova* **1999**, *22*, 715.
51. Stevani, C. V.; Lima, D. F.; Toscano, V. G.; Baader, W. J.; "A Kinetic Study on the Peroxyoxalate Reaction: Imidazole as Nucleophilic Catalyst". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 989.
52. Silva, S. M.; Casallanovo Jr., F.; Oyamaguchi, K. H.; Ciscato, L. F. M. L.; Stevani, C. V.; Baader, W. J.; "Kinetic Studies on the Peroxyoxalate Chemiluminescence Reaction: Determination of the Cyclization Rate Constant". *Luminescence* **2002**, *17*, 313.
53. Neuvonen, H.; "A Two-Intermediate Model for Imidazole-Promoted Peroxyoxalate Chemiluminescence". *J. Biolumin. Chemilumin.* **1997**, *12*, 241.
54. Rauhut, M. M.; Roberts, B. G.; Semsel, A. M.; "A Study of Chemiluminescence from Reactions of Oxalyl Chloride, Hydrogen Peroxide, and Fluorescent Compounds". *J. Org. Chem.* **1966**, *88*, 3604.
55. Bollyky, L. J.; Whitman, R. H.; Roberts, B. G.; Rauhut, M. M.; "Chemiluminescence from Reactions Electronegatively Substituted Aryl Oxalates with Hydrogen Peroxide and Fluorescent Compounds". *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 6523.
56. Bollyky, L. J.; Loy, M.; Roberts, B. G.; Whitman, R. H.; Iannotta, A. V.; Semsel, A. M.; Clarke, R. A.; 153rd National Meeting of the American Chemical Society, Miami Beach, Florida, USA, Abril, 1967: Resumo O-169.
57. Boaro, A.; Bartoloni, F. H.; "Peroxyoxalate High-Energy Intermediate is Efficiently Decomposed by the Catalyst Imidazole". *Photochem. Photobiol.* **2016**, *92*, 546.
58. Cordes, H. F.; Richter, H. P.; Heller, C. A.; "Mass spectrometric evidence for the existence of 1,2-dioxetanedione (carbon dioxide dimer). Chemiluminescent intermediate". *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7209.

-
59. De Corpo, J. J.; Baronavisk, A.; McDowell, M. V.; Saalfeld, F. E.; "Facile conversion of oxiranes to thiiranes by phosphine sulfides. Scope, stereochemistry, and mechanism". *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2880.
60. Orosz, G.; Givens, R. S.; Schowen, R. L.; "Chemiluminescence arising from the interaction of rubrene with intermediates derived from hydrogen peroxide and bis(2,4 dinitrophenyl) oxalate (DNPO): quantum yield and carbondioxide yield". *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 219.
61. Milofsky, R. E.; Birks, J. W.; "Laser photolysis study of the kinetics and mechanism of photoinitiated peroxyoxalate chemiluminescence". *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9715.
62. Hadd, A. G.; Seeber, A.; Birks, J. W.; "Kinetics of two pathways in peroxyoxalate chemiluminescence". *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2675.
63. Bos, R.; Barnett, N. W.; Dyson, G. A.; Lim, K. F.; Russel, R. A.; Watson, S. P.; "Studies on the Mechanism of Peroxyoxalate Chemiluminescence Reaction. Part 1: Confirmation of 1,2-Dioxetanedione as an Intermediate using ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy". *Anal. Chim. Acta.* **2003**, *502*, 141.
64. Garcia-Campana A. M.; Baeyens, W. R. G.; Cuadros-Rodriguez, R.; Barrero, F. A.; Bosque-Sendra J. M.; Gamiz-Gracia, L.; "Potential of Chemiluminescence and Bioluminescence in Organic Analysis". *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 1.
65. Schaap, A. P.; Sandison, M. D.; Handley, R. S.; "Chemical and Enzymatic Triggering of 1,2-Dioxetanes. 3: Alkaline Phosphatase-Catalyzed Chemiluminescence from an Aryl Phosphate-Substituted Dioxetane". *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1159.
66. Nishizono, I.; Iida, S.; Suzuki, N.; Kawada, H.; Murakami, H.; Ashihara, Y.; Okada, M.; "Rapid and Sensitive Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Measuring Tumor Markers". *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 1639.
67. Beck, S.; Köster, H.; "Applications of Dioxetane Chemiluminescent Probes to Molecular Biology". *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2258.
68. Lin, T.-K.; Komoda, Y.; Nakamura, N.; Matsunaga, T.; "Automated Detection of Anti-Double-Stranded DNA Antibody in Systemic Lupus Erythematosus Serum by Flow Immunoassay". *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1298.
69. Waseem, A.; Yaqoob, M.; Nabi, A.; "Analytical Applications of Flow Injection Chemiluminescence for the Determination of Pharmaceuticals – A Review". *Curr. Pharm. Anal.* **2013**, *9*, 363.
70. Romanyuk, A. V.; Melik-Nubarov, N. S.; "Micelles of Amphiphilic Copolymers as a Medium for Peroxyoxalate Chemiluminescent Reaction in Water Environment", *Funct. Polym.* **2015**, *57*, 301.

-
71. Garcia-Campana, A. M.; Gamiz-Gracia, L.; Baeyens, W. R. G.; Barrero, F. A.; "Derivatization of Biomolecules for Chemiluminescent Detection in Capillary Electrophoresis". *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 793, 49.
72. Gamiz-Gracia, L.; Garcia-Campana, A. M.; Huertas-Perez, J. F.; Lara, F. J.; "Chemiluminescence detection in Liquid Chromatography: Applications to Clinical, Pharmaceutical, Environmental and Foos Analysis – A Review". *Anal.Chim. Acta* **2009**, 640, 7.
73. Garcia-Campana, A. M.; Lara, F. J.; Gamiz-Gracia, L.; Huertas-Perez, J. F.; "Chemiluminescence Detection Coupled to Capillary Electrophoresis". *TrAC-Trend Anal. Chem.* **2009**, 28, 973.
74. Lara, F. J.; Garcia-Campana, A. M.; Aaron, J. J.; "Analytical Applications of Photoinduced Chemiluminescence in Flow Systems – A Review". *Anal.Chim. Acta* **2010**, 679, 17.
75. Lee, J.; Je, J.; Schlautman, M. A.; Carraway, E. R.; "Fast Peroxyoxalate Chemiluminescence for Minimized Analytical Separation Systems". *Chem. Commun.* **2003**, 2, 270.
76. Nakamura, M. M.; Coichev, N.; Lin, J. M.; Tamada, M.; "Flow-injection Investigation of the Chemiluminescent Reaction of Bis(2,4,6-(trichlorophenyl)oxalate) with Free Chlorine". *Anal. Chim. Acta* **2003**, 484, 101.
77. Albrecht, S.; Hornak, H.; Freidt, T.; Böhm, W. D.; Weiss, K.; Reinschke, A.; "Determination of Serum Oxalate Using Peroxyoxalate Chemiluminescence of Free Oxalic Acid". *J. Biolumin Chemilum.* **1993**, 8, 21.
78. Albrecht, S.; Brandl, H.; Schönfels, C.; "Humanes Oxalat – Tatsächlich Nur Ein Stoffwechsel-Endprodukt?". *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1864.
79. Albrecht, S.; Brandl, H.; Schönfels, C.; "Human Oxalate—Really Just an End-Product of Metabolism?". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1780.
80. Cho, H.; Lee, S.; Lee, J. H.; "Roles of CdS Quantum Dots in 1,1'-oxalyldiimidazole Chemiluminescence". *Analyst* **2012**, 137, 5368.
81. Santos, A. P. F.; Tese de Doutorado, "Estudos cinéticos da reação peróxi-oxalato com ésteres oxálicos assimétricos e determinação dos parâmetros de ativação na decomposição de 1,2-dioxetanos". Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, **2011**.
82. Cotton, M. L.; Dunford, H. B.; "Studies on Horseradish Peroxidase. XI. On the Nature of Compounds I and II as Determined from the Kinetics of the Oxidation of Ferrocyanide". *Can. J. Chem. Rev. Can. Chim.* **1973**, 51, 582.
83. Lee, J.; Wesley, A. S.; Ferguson III, J. F.; Seliger, H. H.; Em *Bioluminescence in Progress*; Johnson, F. H.; Haneda, Y., eds; Princeton University Press: Princeton, **1965**, p. 35.

-
84. Lee, J.; Seliger, H. H.; "Absolute Spectral Sensitivity of Phototubes and the Application to the Measurement of the Absolute Quantum Yields of Chemiluminescence and Bioluminescence". *Photochem. Photobiol.* **1965**, *4*, 1015.
85. Lee, J.; Seliger, H. H.; "Quantum Yields of the Luminol Chemiluminescence Reaction in Aqueous and Aprotic Solvents". *Photochem. Photobiol.* **1972**, *15*, 227.
86. Bartoloni, F. H.; Tese de Doutorado, "Mecanismo do sistema peróxi-oxalato em meios aquosos e da quimiluminescência de 1,2-dioxetanonas". Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, **2010**.
87. Morris, J. V.; Mahaney, M. A.; Huber, J. R.; "Fluorescence Quantum Yield Determinations. 9,10-Diphenylanthracene as a Reference Standard in Different Solvents". *J. Phys. Chem.* **1976**, *80*, 969.
88. Peixoto, M. M. M.; Tese de Doutorado; "Estudo do mecanismo da quimiluminescência do sistema peróxi-oxalato em meio aquoso com tampão fosfato e em líquidos iônicos". Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, **2010**.
89. Augusto, F. A.; Tese de Doutorado; "Desvendando a alta eficiência do sistema peroxioxalato". Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, **2016**.
90. Souza, G. A.; Peixoto, M. M. M.; Santos, A. P. F.; Baader, W. J.; "General Acid and Base Catalysis by Phosphate in Peroxyoxalate Chemiluminescence". *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 2307.
91. Adam, W.; Bronstein, I.; Edwards, B.; Engel, T.; Reinhardt, D.; Schneider, F. W.; Trofimov, A. V.; Vasil'ev, R. F.; "Electron Exchange Luminescence of Spiroadamantane-Substituted Dioxetanes Triggered by Alkaline Phosphatase. Kinetics and Elucidation of pH Effects". *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10400.
92. Edwards, J. O.; Pearson R. G.; "The Factors Determining Nucleophilic Reactivities". *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 16.
93. Gerstein, J.; Jencks, W. P.; "Equilibria and Rates for Acetyl Transfer among Substituted Phenyl Acetates, Acetylimidazole, O-Acylhydroxamic Acids, and Thiol Esters". *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 4655.
94. Eigen, M.; "Proton Transfer, Acid-Base Catalysis, and Enzymatic Hydrolysis. Part I: ELEMENTARY PROCESSES". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 1.
95. Pearson, R. G.; Edgington, D. N.; "Nucleophilic Reactivity of the Hydrogen Peroxide Anion: Distinction Between S_N2 and S_N1CB Mechanisms". *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 4607.
96. Aksoy, M. S.; Ozer, U.; "Equilibrium Studies on Chromium (III) Complexes of Salicylic Acid and Salicylic Acid Derivatives in Aqueous Solution". *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1280.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Glalci Alves de Souza

Local e data de nascimento: São Paulo, 17 de Fevereiro de 1988.

EDUCAÇÃO

Colégio Agostiniano Mendel, São Paulo, 2005.

Ensino médio

Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2012.

Bacharela em Química

OCUPAÇÃO

Pós-graduação:

Doutorado Direto – Laboratório de Quimiluminescência Orgânica – *Área de atuação:* Físico-química Orgânica – Supervisão: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader. *Projeto:* Estudo Mecanístico do Sistema Peroxioxalato com Diferentes Catalisadores. *Vínculo institucional:* Bolsista de Doutorado do CNPq, vigência da bolsa: agosto de 2012 – julho de 2017.

Experiência Profissional

1. Abr/2010 – Jul/2012: Cursinho Pré-vestibular Henfil. *Enquadramento Profissional:* Professora de Química. *Descrição:* Plantão de dúvidas. *Sem vínculo empregatício.*

Estágios Didáticos Realizados no Instituto de Química da USP

1. Ago/2012 – Dez/2012: Estágio realizado - Monitora da disciplina QFL 2340 - Estrutura e Propriedades de Compostos Orgânicos. *Monitora Voluntária.*

2. Fev/2013 – Jul/2013: Estágio realizado - Monitora da disciplina QFL 2342 - Reatividade de Compostos Orgânicos I pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da Universidade de São Paulo (PAE).

3. Ago/2013 – Dez/2013: Estágio realizado - Monitora da disciplina QFL 2343 - Química Orgânica Experimental pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino pela Universidade de São Paulo (PAE).

4. Fev/2014 – Jul/2014: Estágio realizado - Monitora na disciplina QFL 2453 - Físico-química Experimental pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da Universidade de São Paulo (PAE).

5. Ago/2015 – Dez/2015: Estágio realizado - Monitora da disciplina QFL 2343 - Química Orgânica Experimental pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino pela Universidade de São Paulo (PAE).

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Souza, G. A.**; Lang, A. P.; Baader, W. J.; Mechanistic Studies on the Peroxyoxalate Chemiluminescence Using Sodium Salicylate as Base Catalyst. *Photochem. Photobiol.* No prelo. DOI: 10.1111/php.12797.

2. **Souza, G. A.**; Peixoto, M. M. M.; Santos, A. P. F.; Baader, W. J.; General Acid and Base Catalysis by Phosphate in Peroxyoxalate Chemiluminescence. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 2307.

3. Oliveira, S.; **Souza, G. A.**; Eckert, C. R.; Silva, T. A.; Sobral, E. S.; Fávero, O. A.; Ferreira, M. J. P.; Romoff, P.; Baader, W. J.; Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quím. Nova* **2014**, *37*, 497.

4. Augusto, F. A.; **Souza, G. A.**; Souza Jr., S. P.; Khalid, M.; Baader, W. J.; Efficiency of Electron Transfer Initiated Chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 1299.

Apresentações de Trabalho

1. Romoff, P.; Oliveira, S.; **Souza, G. A.**; Eckert, C. R.; Silva, T. A.; Sobral, E. S.; Fávero, O. A.; Ferreira, M. J. P.; Baader, W. J. *Comparison of the Luminol Chemiluminescence Antiradical Capacity Assay with Colorimetric Assays Using Pure Compounds and Plant Extracts*, no 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 2016, Tsukuba, Japão.
2. **Souza, G. A.**; Baader, W. J. *Activation Parameters for the Peroxyoxalate Reaction Using Sodium Salicylate as Catalyst*, no 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 2016, Tsukuba, Japão.
3. **Souza, G. A.**; Baader, W. J. *Mechanistic Studies of the Peroxyoxalate Reaction in Aqueous Medium Using Sodium Salicylate as Catalyst*, no 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 2016, Tsukuba, Japão.
4. Lopes, S. F. S.; Peres, V. O. ; Fávero, O. A.; Ferreira, E. A.; Ferreira, M. J. P.; **Souza, G. A.**; Romoff, P.; Baader, W. J. *Baccharis oxyodonta Extratcts: Antiradical Capacity and Phenolic Compounds*, no 5th Brazilian Conference on Natural Products, 2015, Atibaia/SP.
5. **Souza, G. A.**; Baader, W. J. *Comparação da reatividade de diferentes ésteres oxálicos no sistema peroxioxalato catalisado por tampão fosfato*, na sessão coordenada de Fotoquímica da 37^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal/RN.
6. **Souza, G. A.**; Baader, W. J. *Kinetic studies on the sodium salicylate catalyzed peroxyoxalate reaction*, no 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 2014, Uppsala, Suécia.
7. **Souza, G. A.**; Peixoto, M. M. M.; Baader, W. J. *Investigation into the phosphate buffer role on the peroxyoxalate system in aqueous medium*, no 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 2014, Uppsala, Suécia.

8. **Souza, G. A.**; Baader, W. J. *Estudo do mecanismo do sistema peroxioxalato em meio aquoso com tampão fosfato*, no 20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2012, São Paulo, Brasil.

9. Silva, T. A.; **Souza, G. A.**; Baader, W. J. *Determinação da atividade antirradicalar de compostos naturais com potencial antioxidante*, no 20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2012, São Paulo, Brasil.

Participação em eventos

1. 25ª Semana da Química, 2008. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

2. 20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (**20º SIICUSP**), 2012. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

3. IV Encontro da Pós-Graduação IQ-USP, 2013. Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, Brasil.

4. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (**37ª RASBQ**), Natal/RN, 2014.

5. 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (**18th ISBC**), Uppsala/Suécia, 2014.

6. 5th Brazilian Conference on Natural Products (**5th BCNP**), Atibaia/SP, 2015.

7. 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (**19th ISBC**), Tsukuba, Japão, 2016.

Outras informações relevantes

Menção Honrosa recebida pelos painéis apresentados no 20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2012.