

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ESTUDO DE NOVOS SISTEMAS
QUIMILUMINESCENTES APLICADOS NA DETERMINAÇÃO
DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

VALDECIR FARIAS XIMENES

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE CATALANI

SÃO PAULO

2000

*Para a alma nunca há nascimento nem morte.
Nem, uma vez que exista, ela vai deixar de existir.
Ela é não nascida, eterna, sempre existente,
imortal e primordial.*

Bhagavad Gita

*À minha esposa Aparecida, pelo amor,
compreensão e ajuda durante todos estes anos.
Aos meus filhos amados Thomaz e Pedro, o que
de mais importante aconteceu na minha vida.
À minha mãe Francisca, simplesmente por
ser uma verdadeira MÃE*

Agradecimentos

Ao Lique, pela orientação, confiança e por nunca estar plenamente satisfeito com os nossos resultados.

Ao Willi e à Ana Campa, os quais eu considero como meus co-orientadores.

À Paulete, por ter me apresentado ao Willi e ao Lique.

Ao pessoal do nosso laboratório: Lilian, Patrícia, Chien, Érick, Carlão, Sandra, Silvia, Bete, Magali, Ana Luiza, Carminha, Cassius, Sascha, Paulo Cezar, Luzia, Maurício, Xud`s, Daisy e Ivan.

Ao pessoal do Laboratório da Prof^a. Ana Campa: Elaine, Suely, Rita e Boni.

Ao Prof. Jair Chagas da Escola Paulista de Medicina, pelas sugestões nos estudos com o substrato de proteases.

Ao CNPq e à Fapesp, pelo apoio financeiro.

Índice

Resumo
Abstract

1- Introdução

| | |
|--|-----|
| | 13 |
| 1.1- Interação entre luz e matéria | |
| 1.1.1- Absorção de energia na região do ultravioleta e visível | |
| 1.1.2- Estados excitados singletes e tripletes | |
| 1.1.3- A eficiência das transições eletrônicas | |
| 1.1.4- Processos de desativação de um estado eletronicamente excitado | |
| 1.2- O fenômeno da quimiluminescência | 19 |
| 1.2.1- Quais são as características que uma reação quimiluminescente possui? | |
| 1.2.2- Caracterizando algumas reações bio e quimiluminescentes | |
| 1.2.3- Anéis 1,2-dioxetânicos: geração de estados eletronicamente excitados e quimiluminescência | |
| 1.3- Quimiluminescência direta e indireta: transferência de energia | 27 |
| 1.3.1- Reações promovidas por transferência de energia | |
| 1.4- Geração enzimática de compostos carbonílicos excitados tripletes via ação catalítica da peroxidase de raiz forte (HRP) | 30 |
| 1.4.1- Enóis são os verdadeiros substratos da HRP | |
| 1.4.2- Mecanismo de ação da HRP | |
| 1.5- Quimiluminescência de derivados indólicos | .39 |
| 1.6- Quimiluminescência de compostos α -hidroperoxi-carbonílicos | 43 |
| 1.7- Aplicações de reações bio e quimiluminescentes | 49 |
| 1.7.1- Luminescência celular: "burst" oxidativo | |
| 1.7.2- Luciferasas e luciferinas: aplicações de bioluminescência | |
| 1.7.3- Imunoensaios e quimiluminescência | |
| 1.7.3.1- Enzimaimunoensaios e dioxetanos sintéticos | |
| 1.7.4- Detecção de fosfatase alcalina livre e em conjugados por quimiluminescência | |
| 1.7.5- Detecção de HRP por quimiluminescência | |

2- Objetivos54

3- Desenvolvimento de uma Metodologia Quimiluminescente para

Análise da Atividade das Enzimas Fosfatases

Alcalina

(ALP)

e

Ácida

(ACP)

.....59

| | |
|--|-------------|
| 3.1- Resultados | |
| 3.1.1- Síntese do 2-cloro-2-metilpropanal | |
| 3.1.2- Síntese do dimetil-(2-metil-1-propenil)fosfato | |
| 3.1.3- Síntese do bis(trimetilsilil)-(2-metil-1-propenil)fosfato | |
| 3.1.4- Síntese (2-metil-1-propenil)fosfato de anilínio | |
| 3.1.5- Síntese do (2-metil-1-propenil)fosfato de sódio | |
| 3.2- Desenvolvimento do protocolo analítico | |
| 3.2.1- Sal anilínico versus sal sódico | |
| 3.2.2- Efeito da concentração de DBAS e DMSO na atividade da fosfatase alcalina e quimiluminescência | |
| 3.2.3- Correlação [ALP] versus intensidade máxima de luz | |
| 3.2.4- Correlação [ALP] versus consumo de oxigênio | |
| 3.2.5- Aplicação em análise d atividade de ALP em soro sanguíneo | |
| 3.2.6- Aplicação em técnica de imunoenensaio (conjugado ALP-IgG | |
| 3.2.7- Aplicação como revelador em um ensaio completo para determinação do vírus Epstein-Barr.em soro sanguíneo | |
| 3.2.8- Determinação da atividade da enzima fosfatase ácida prostática | |
| 3.3- Discussão e Conclusões | |
| 4- Tentativa de desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente para análise da atividade de proteases..... | 85 |
| 4.1- Resultados | |
| 4.1.1- Síntese da <i>N</i> -isobutilidenoetilamina | |
| 4.1.2- Síntese da <i>N</i> -etil- <i>N</i> -(2-metil-1-propenil)benzenamida | |
| 4.1.3- Medidas de consumo de oxigênio e quimiluminescência na oxidação da <i>N</i> -isobutilidenoetilamina | |
| 4.1.4- Medidas de consumo de oxigênio e quimiluminescência na oxidação da <i>N</i> -etil- <i>N</i> -(2-metil-1-propenil)benzenamida | |
| 4.2- Discussão e Conclusões | |
| 5- Estudo do potencial quimiluminescente da oxidação de derivados indólicos catalisada por HRP: Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de HRP..... | ..94 |
| 5.1- Resultados | |
| 5.1.1- Efeito da concentração do tampão, tipo de tampão e pH na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol via HRP/H ₂ O ₂ /O ₂ | |
| 5.1.2- Efeito da concentração do substrato na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol via HRP/H ₂ O ₂ /O ₂ | |

- 5.1.3- Efeito da concentração da HRP na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂
- 5.1.4- Consumo ou produção de oxigênio na reação 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂
- 5.1.5- Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂
- 5.1.6- Envolvimento de ânions superóxido na reação 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂
- 5.1.7- Comparação da eficiência de quimiluminescência na oxidação de vários derivados indólicos via HRP/H₂O₂/O₂
- 5.1.8- Espectros de quimiluminescência, fluorescência e caracterização de produtos
- 5.1.9- Diindoxil atuando como um sensibilizador da reação 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂
- 5.1.10- Relação entre produtos de oxidação e eficiência de quimiluminescência da reação 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂
- 5.1.11- Potenciais aplicações do sistema 2-Metilindol/HRP/H₂O₂/O₂
- 5.2- Discussão e Conclusões

6- Síntese e estudo de α -hidroperoxi-aldeídos protegidos como substratos quimiluminescentes de enzimas.....151

- 6.1- Resultados
 - 6.1.1- Tentativa de síntese do 2-peracetóxi-2-metilpropanaldeído
 - 6.1.2- Síntese do 2-peracetóxi-2-adamantanocarboxialdeído
 - 6.1.2.1- Síntese do iodeto de trimetilsulfoxônio
 -6.1.2.2- Síntese do 2-epoximetiladamantano
 -6.1.2.3- Síntese do 2-adamantanocarboxialdeído
 -6.1.2.4- Síntese do acetato de 2-metiladamantilideno
 -6.1.2.5- Síntese do 2-peracetóxi-2-adamantanocarboxialdeído
 - 6.1.3- Estudo do potencial quimiluminescente do 2-peracetóxi-2-adamantanocarboxialdeído
- 6.2- Discussão e conclusões

7- Parte Experimental.....164

- 7.1- Reagentes
- 7.2- Equipamentos e métodos
- 7.3- Metodologias analíticas
- 7.4- Preparação de soluções estoques
- 7.5- Sínteses
 - 7.5.1- Síntese de 2-cloro-2-metilpropanal
 - 7.5.2- Síntese de dimetil-(2-metil-1-propenil)fosfato
 - 7.5.3- Síntese de bis(trimetilsilil)-(2-metil-1-propenil)fosfato
 - 7.5.4- Síntese de (2-metil-1-propenil)fosfato de anilínio

- 7.5.5- Síntese de (2-metil-1-propenil)fosfato de sódio
- 7.5.6- Síntese de *N*-(2-metilpropilideno)etilamina
- 7.5.7- Síntese de *N*-etil-*N*-(2-metil-1-propenil)benzenamida
- 7.5.8- Síntese de 5-metil-3-hexen-2-ona
- 7.5.9- Síntese de 5-hidroperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona
- 7.5.10- Síntese de 5-peracetóxi-5-metil-3-hexen-2-ona
- 7.5.11- Ozonólise de 5-peracetóxi-5-metil-3-hexen-2-ona
- 7.5.12- Síntese do iodeto de trimetilsulfoxônio
- 7.5.13- Síntese do 2-epoximetiladamantano
- 7.5.14- Síntese do 2-adamantanocarboxialdeído
- 7.5.15- Síntese do acetato de 2-metiladamantilideno
- 7.5.16- Síntese do 2-peracetóxi-2-adamantanocarboxialdeído

8- Referências Bibliográficas.....183

Resumo

O fenômeno da bio- e quimiluminescência tem atraído o interesse da comunidade científica nas últimas décadas não só pelo seu inerente interesse acadêmico, mas também devido as incontáveis aplicações analíticas que dele têm surgido. A maior parte do trabalho acadêmico que tem sido desenvolvido está relacionado ao estudo do mecanismo de geração de estados excitados e a eficiência de desativação radiativa. Por outro lado, do ponto de vista das aplicações tecnológicas, as metodologias para análise de enzimas, drogas e metabólitos, aplicadas à imunologia, microbiologia, medicina forense, etc., que se baseiam em quimiluminescência, estão entre as mais utilizadas em procedimentos de rotina em laboratórios. O desenvolvimento de substratos e, conseqüentemente, novas técnicas quimiluminescentes tem se tornado cada vez mais importante devido a alta sensibilidade desses ensaios, tipicamente equivalente ou melhor do que aqueles que utilizam rótulos radioativos.

Esta tese apresenta o desenvolvimento de novas metodologias quimiluminescentes para a determinação de atividade enzimática. O princípio químico é a geração de peróxidos cíclicos instáveis, conhecidos como 1,2-dioxetanos, após a hidrólise de substratos específicos, catalisada pela enzima objeto de estudo. Anéis dioxetânicos são conhecidos pela sua propriedade de gerar produtos em estados eletronicamente excitados quando decompostos. A emissão de luz pode ser relacionada à atividade enzimática.

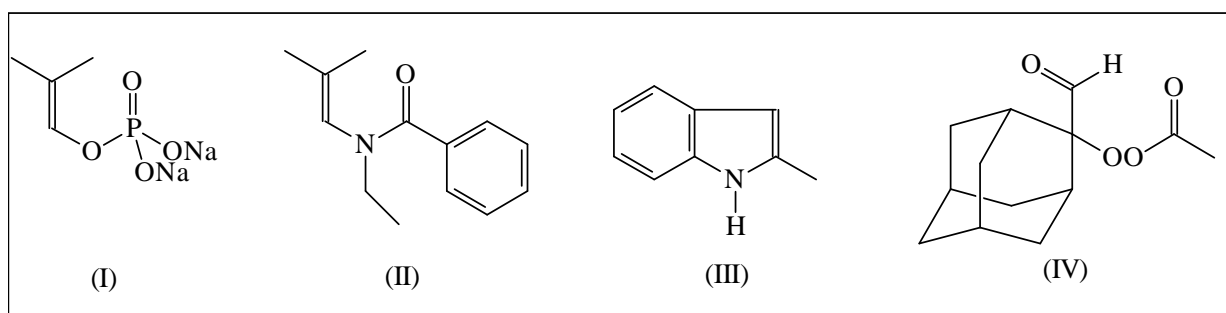
Foi desenvolvido o substrato (fosfato dissódico de 2-metil-1-propenila, NA-MPP) (**I**), capaz de produzir o composto 2-metil-1-propen-1-ol quando hidrolisado via a ação catalítica das enzimas fosfatase alcalina (ALP) ou fosfatase ácida (ACP). Este enol é oxidado, sob ação catalítica da enzima peroxidase de raiz forte (HRP), gerando acetona em estado excitado triplete. A emissão de luz direta ou sensibilizada da acetona excitada pode ser correlacionada a atividade enzimática da ALP ou ACP. A determinação da atividade dessas enzimas livres ou ligadas em anticorpos (conjugados ALP-IgG) tem grande aplicação em tecnologias de diagnóstico, seja como um marcador de diversas doenças, seja como uma sonda em ensaios imuno-enzimáticos (EIA). A sensibilidade alcançada com este substrato foi de 10^{-15} mols de ALP, 0,0027 unid. de ACP e diluições de até 300.000 de um conjugado (ALP-IgG) por ensaio. Também foi possível correlacionar a atividade de ALP à velocidade de consumo do oxigênio dissolvido no meio de reação, que é uma característica dessa oxidação.

Partindo do mesmo princípio delineado no parágrafo anterior, desenvolveu-se um composto para determinação de proteases. Para isso, o composto *N*-etil-*N*-(2-metil-1-propenil)benzenamida (**II**) foi preparado, pois a clivagem de sua ligação amídica geraria uma enamina, que também pode ser oxidada pela ação catalítica da HRP. No entanto, nossos estudos mostraram que este composto não é reconhecido como substrato das proteases.

Tomando como base a bem conhecida característica de gerar uma fraca emissão de luz quando derivados indólicos são oxidados por agentes oxidantes clássicos, como KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, etc., foi estudado o potencial quimiluminescente de alguns derivados indólicos quando submetidos ao sistema HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$. Como era esperado, detectou-se quimiluminescência de baixa intensidade para a maioria dos derivados indólicos. Também neste caso a clivagem do anel indólico, via um intermediário dioxetânico, parece ser a responsável pela emissão observada na maioria dos compostos testados. Além disso, a oxidação do composto 2-metilindol (**III**) mostrou uma eficiência de quimiluminescência com cerca de 3 ordens de grandeza maior que os demais derivados. Verificou-se que o comportamento diferenciado desse composto estava relacionado à exclusiva formação de um composto secundário. A estrutura desse composto foi parcialmente atribuída ao 2,2'-dimetil-2,2'-diindoxil. Então, utilizando o 2-metilindol como substrato, desenvolveu-se

uma metodologia analítica para determinação de HRP livre ou ligada em anticorpos (conjugados HRP-IgG). Assim como no caso da enzima ALP, conjugados do tipo HRP-IgG são largamente utilizados em EIA.

Também com base nas características quimiluminescentes de α -hidroperóxi-cetonas quando submetidas a um forte meio alcalino, desenvolveu-se um potencial substrato para análise de esterases. A hidrólise catalisada por esterase de 2-peracetoadamantano-2-carboxialdeído **(IV)** geraria um α -hidroperóxi-aldeído, que por um ataque nucleofílico intramolecular, levaria a um intermediário dioxetânico. Este composto mostrou-se instável, gerando quimiluminescência mesmo na ausência da enzima. Este fato inviabilizou o seu uso como planejado.



Abstract

The bio- and chemiluminescent phenomena have attracted the scientists attention in the last decades not only because its inherent academic interests, but also due the uncounted analytical applications that it has originated. Most of the academic work was devoted to the study of the mechanism responsible for the generation of the excited states and the efficiency of radiative deactivation. On the other hand, the technological developments pointed to methodologies for enzyme, drug, and metabolite determination applied to immunological, microbiology, forensic science, etc., based on chemiluminescence, which are already among the most applied techniques in routine laboratory procedures. The development of chemiluminescent substrates has become increasingly important due to their high sensitivity, typically equivalent to or better than assays using radioactive labels.

This thesis reports the development of new chemiluminescent methodologies for enzymatic activity determination. The chemical basis is the generation of unstable cyclic peroxides, called 1,2-dioxetanes, upon hydrolysis of

specific substrates catalyzed by the target enzyme. Dioxetanes rings are known by their properties to generate electronically excited products upon decomposition. The light emission can be related to enzymatic activity.

It was developed a substrate (disodium 2-methyl-1-propenyl phosphate) (Na-MPP) (**I**) able to produce 2-methyl-1-propen-1-ol when catalytically hydrolyzed by alkaline (ALP) or acid (ACP) phosphatases enzymes. This enol is oxidized, upon horseradish peroxidase (HRP) action, yielding acetone in triplet excited state. The direct or sensitized light emission of the excited acetone can be correlated to enzymatic activity of ALP or ACP. The activity of this enzyme, free or bound to antibody (ALP conjugates), is widely used in diagnostic technologies, either as a direct marker of several diseases or as an enzymatic probe in enzyme immunoassays (EIA). The sensibility reached with this substrate was 10^{-15} mols to ALP, 0,0027 u/mL to ACP and dilutions up to 300.000 of ALP-IgG per assay. Since the HRP system consumes dissolved oxygen during the oxidation of the enol, ALP quantification may be performed by following the oxygen uptake rate.

By applying the same principle above delineated, it was synthesized a compound for proteases activity determination. Thus, the compound *N*-ethyl-*N*-(2-methylpropen-1-yl)benzenamide (**II**) was prepared, since its hydrolysis would lead to an enamine, which is known to be oxidized via HRP with light emission. However, our studies showed that **II** is not recognized as a substrate by proteases.

Owing to the well known weak emission elicited when indole derivatives are oxidized by classical oxidants like KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_4$, etc., it was studied the chemiluminescent potential when indoles are submitted to the HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$ oxidant system. Indeed, weak chemiluminescence was detected for almost all derivatives. Likewise, the oxidation of 2,3-bond of indoles, through a dioxetane intermediate leading to an open-ring product, seems responsible for this emission. Furthermore, the oxidation of 2-methylindole (**III**) showed a chemiluminescence efficiency about 3 orders of magnitude higher. It was observed that the high chemiluminescent yield was related to exclusive formation of a secondary product. Its structure was partially attributed to 2,2'-dimethyl-2,2'-diindoxil. Thus, using 2-methylindole as substrate was possible to develop an analytical procedure to quantify HRP activity, free or bound to antibodies (conjugates HRP-IgG). In EIA the enzymes HRP and ALP are the most important labels.

From the also known chemiluminescent characteristics of α -hidroperoxyketones, when submitted to strong alkaline medium, it was developed a potential substrate to esterases. The esterase catalyzed hydrolysis of 2-acetylperoxiadamantane-2-carboxaldehyde (**IV**) would generate an α -hidroperoxyaldehyde which, by an intramolecular nucleophilic attack, would lead to a dioxetane intermediate. This compound showed to be unstable and it generated chemiluminescence in the absence of the enzyme. This fact impaired its use as planned.

1- Introdução

1.1- Interação entre luz e matéria

Em última análise, a energia solar é o combustível que torna possível todas as formas de vida em nosso planeta. É realmente interessante imaginar que a energia que gastamos nos movimentando, ou até mesmo pensando, provém dessa radiação eletromagnética extraterrestre, captada pelos vegetais e transformada em carboidratos dos quais nos alimentamos. A “máquina” existente nos seres autotróficos, capaz de absorver e transformar esta energia em energia potencial química, é conhecida como processo fotossintético⁽¹⁾.

No fenômeno de bioluminescência, emissão de luz por organismos vivos, observa-se o processo inverso, ou seja, a transformação de energia química em energia eletromagnética. Certamente, do ponto de vista humano, este processo é bem menos importante do que a fotossíntese, mas será que o mesmo poderia ser dito a respeito de uma extensa variedade de organismos como peixes, crustáceos, insetos e microorganismos, que dele dependem para processos vitais como alimentação, defesa, reprodução, etc.⁽²⁾?

O estudo da interação entre as radiações eletromagnéticas e a matéria, além de ser um assunto de imenso interesse científico, possibilitou o desenvolvimento de uma série de aplicações acadêmicas e tecnológicas. Só para citar alguns exemplos poderíamos questionar o que seria, atualmente, da química ou da bioquímica se não

existissem técnicas como ressonância magnética nuclear, infravermelho ou espectrofotometria? E quantos processos úteis existem nos dias de hoje, que envolvem emissão de luz visível pela matéria, seja através de reações quimiluminescentes, seja através de fluorescência ou fosforescência? Alguns exemplos são: tintas fluorescentes ou fosforescentes, luzes de sinalização como as usadas nos lightsticks, centenas de aplicações de reações bio e quimiluminescentes em metodologias biomédicas, etc.

1.1.1- Absorção de energia na região do ultravioleta e visível

Descoberto por Planck, em 1900 quando estudava as radiações de um corpo negro, e refinado por Einstein em 1905, ao explicar o fenômeno fotoelétrico, a Quantização da energia estabelece que as radiações eletromagnéticas podem ser encaradas como um fluxo de partículas-ondas, chamados fótons, que viajam no espaço com a velocidade da luz. A energia do fóton está relacionada ao comprimento de onda da radiação é dada por $E = h\nu$. Assim, o que difere a radiação gama, obtida nas desintegrações nucleares e que possui um efeito destrutivo sobre a matéria orgânica, das radiações visíveis aos olhos humanos, da qual inclusive faz parte a radiação absorvida na fotossíntese, é simplesmente o comprimento de onda desses fótons e, conseqüentemente, a energia que eles transportam⁽³⁾.

A matéria, ou seja, os átomos e as moléculas, absorvem as diferentes radiações eletromagnéticas fazendo transições entre seus níveis energéticos, os quais, assim como as radiações, são Quantizados. O resultado da absorção é um aumento do nível energético da substância, que dependerá do tipo de radiação absorvida (por exemplo, aumento do nível de vibração das ligações químicas, inversões de spin dos núcleos ou elétrons, transições entre orbitais eletrônicos, etc.).

As absorções de radiação eletromagnética correspondente ao ultravioleta e visível são responsáveis pelas transições eletrônicas e clivagem de ligações químicas nas moléculas. Estas transições consistem na excitação dos elétrons presentes em orbitais moleculares ocupados de mais alta energia (HOMO, *highest occupied molecular orbitals*) para os próximos orbitais moleculares desocupados de mais baixa energia (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*) (figura 1.1). São

usualmente transições entre orbitais não-ligantes (n) ou orbitais ligantes (π) para orbitais antiligantes π^* ou $\sigma^{*(4)}$.

1.1.2- Estados excitados singletes e tripletes

Quando ocorre uma transição eletrônica, o elétron pode conservar ou inverter seu spin, que é o campo magnético gerado pelo movimento do elétron em torno de si mesmo. Isto dará origem aos chamados estados excitados **singletes, se houver conservação do spin, e tripletes, se houver inversão**. Há dois aspectos importantes neste ponto:

- i) **estados excitados tripletes possuem menor energia que singletes**. A explicação desse fato baseia-se na regra de Hund, que estabelece que quando os elétrons têm o mesmo spin, eles devem evitar-se, portanto, haverá menor repulsão eletrostática entre os mesmos;
- ii) **as transições onde ocorre mudança de spin são proibidas**, ou seja, são pouco prováveis. Isto ocorre porque em uma transição deve haver conservação do momento magnético produzido pelo elétron (spin). Experimentalmente, esta é uma propriedade muito interessante, pois reflete diretamente no tempo de vida das espécies em estado excitado. Para tripletes, o tempo de vida é da ordem de 10^{-3} a 10^0 s, portanto, muito superior ao tempo de vida de uma espécie singlete 10^{-9} a 10^{-6} s ⁽⁵⁾.

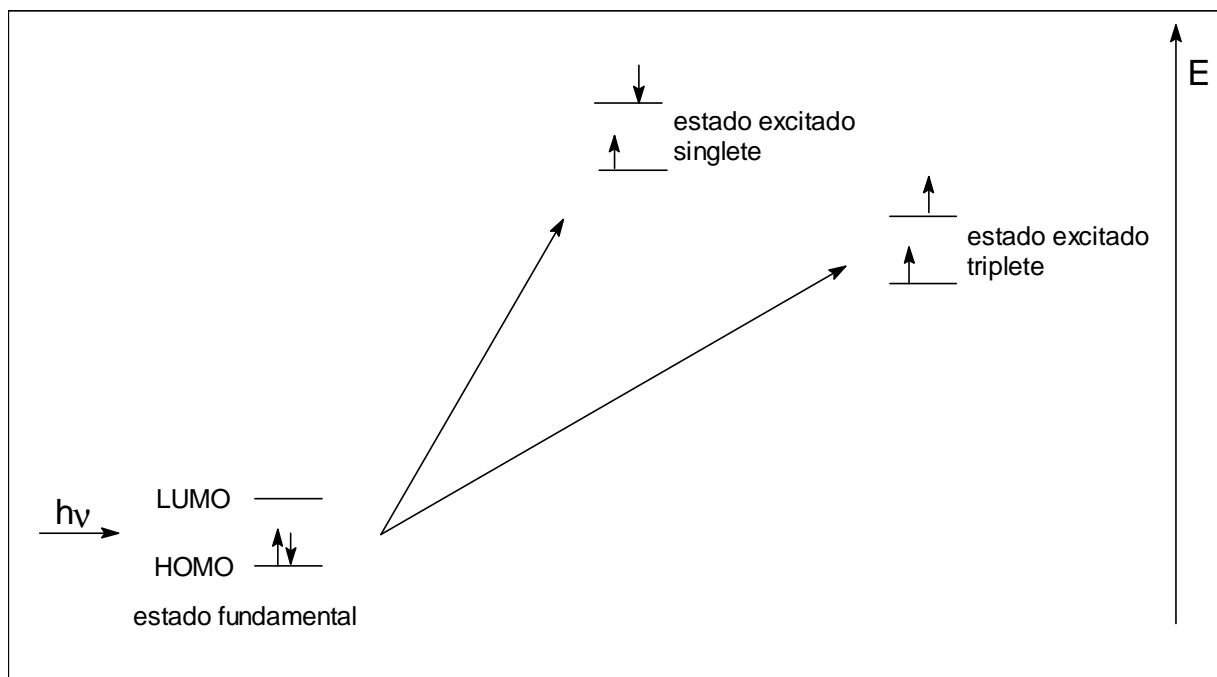


Figura 1.1- Absorção de luz (ultravioleta ou visível) e a geração de estados excitados singlete ou tripleto

1.1.3- A eficiência das transições eletrônicas

Embora a condição primária para que haja absorção seja a igualdade entre a energia do fóton e a diferença de energia entre os orbitais, outro fator de extrema importância é a eficiência do processo. Esta eficiência ou probabilidade de absorção é medida experimentalmente pelo coeficiente de absorvidade molar (ϵ). São três os fatores que influenciam a probabilidade de uma transição⁽⁵⁾:

- i) **princípio de Franck-Condon:** transições que levam a grandes mudanças na geometria dos núcleos são pouco prováveis. Se a posição de equilíbrio dos núcleos é bastante diferente entre os estados fundamental e excitado, parte da energia de excitação eletrônica deve ser transformada em energia vibracional dos núcleos, o que não é um processo favorável;
- ii) **sobreposição espacial dos orbitais:** transições entre orbitais de diferentes simetrias ou bastante separados no espaço são pouco prováveis. Por exemplo, transições do tipo $n-\pi^*$ em compostos carbonílicos (em cetonas $\epsilon_{\max} < 200$), comparado a transições $\pi-\pi^*$ (em cetonas $\epsilon_{\max} > 1000$). Orbitais não ligantes (n) possuem simetria diferente em relação aos orbitais π^* , assim, a probabilidade de

transição de um elétron em um orbital n para um orbital π^* é baixa, o que está refletido no baixo coeficiente de absorvidade molar;

iii) **sobreposição de spin**: como dito anteriormente, transições que levam a inversão de spin são de baixa probabilidade⁽⁵⁾.

1.1.4- Processos de desativação de um estado eletronicamente excitado

Obviamente, uma molécula em estado excitado é termodinamicamente instável e deve desativar-se voltando ao estado fundamental. Abaixo são descritos os vários processos que podem acontecer após a excitação eletrônica:

i) **fluorescência**: uma molécula em estado excitado singlete pode reemitir a energia absorvida na forma de um fóton, usualmente de menor energia (maior comprimento de onda), pois ocorre relaxação vibracional do estado excitado;

ii) **cruzamento inter-sistema**: uma molécula em estado excitado singlete pode ser convertida em triplete. Embora este processo seja termodinamicamente favorável, pois a energia singlete é sempre maior que a energia triplete, ele é proibido pela regra de conservação de spin. Por outro lado, esta regra pode ser parcialmente quebrada quando ocorrer o chamado acoplamento spin-orbital. Neste caso, uma interação entre os campos magnéticos gerados pelos movimentos do elétron em torno de si mesmo (spin) e pelo movimento no próprio orbital criam um força capaz de inverter o spin do elétron. Este efeito é pronunciado nas transições $n-\pi^*$ e, principalmente, quando houver a presença de **átomos pesados** na molécula;

iii) **fosforescência**: é a desativação radiativa de um estado triplete para o estado fundamental singlete. Uma comparação entre a fosforescência e fluorescência revela duas características principais que distinguem entre estados excitados tripletes e singletes. Uma delas é o tempo de vida do estado excitado, sendo para o singlete da ordem de nanosegundos e, para o triplete, de milissegundos a segundos. A outra é obviamente a mais baixa energia dos estados tripletes e, portanto, emissão de luz em comprimento de onda maior;

iv) **desativação térmica**: uma molécula em estado excitado pode perder energia por relaxação vibracional, ou seja, convertendo a energia de excitação eletrônica em calor (relaxação vibracional ou conversão interna);

v) transferência de energia: uma molécula pode desativar-se transferindo a sua energia de excitação para outra molécula e conseqüentemente promovendo a sua excitação;

vi) foto-reação: uma vez em estado excitado, uma molécula pode sofrer uma profunda mudança em suas propriedades químicas, assim, reações que não seriam possíveis com os reagentes no estado fundamental tornam-se factíveis. Um bom exemplo são as reações com oxigênio excitado singlete, que perde a sua característica de um birradical e comporta-se como uma olefina (dupla ligação). Outro exemplo importantíssimo e estímulo inicial para a apresentação desse assunto é a fotossíntese. Neste caso, a excitação da molécula de clorofila promove um decréscimo no seu potencial de redução, aumentando a sua tendência em doar elétrons, tornando-a, dessa forma, capaz de reduzir o NADP^+ à NADPH , que após um seqüência de reações e juntamente com ATP irá converter o CO_2 em glicose.

O diagrama da figura 1.2 esquematiza os processos citados acima (diagrama de Jablonski)⁽⁶⁾.

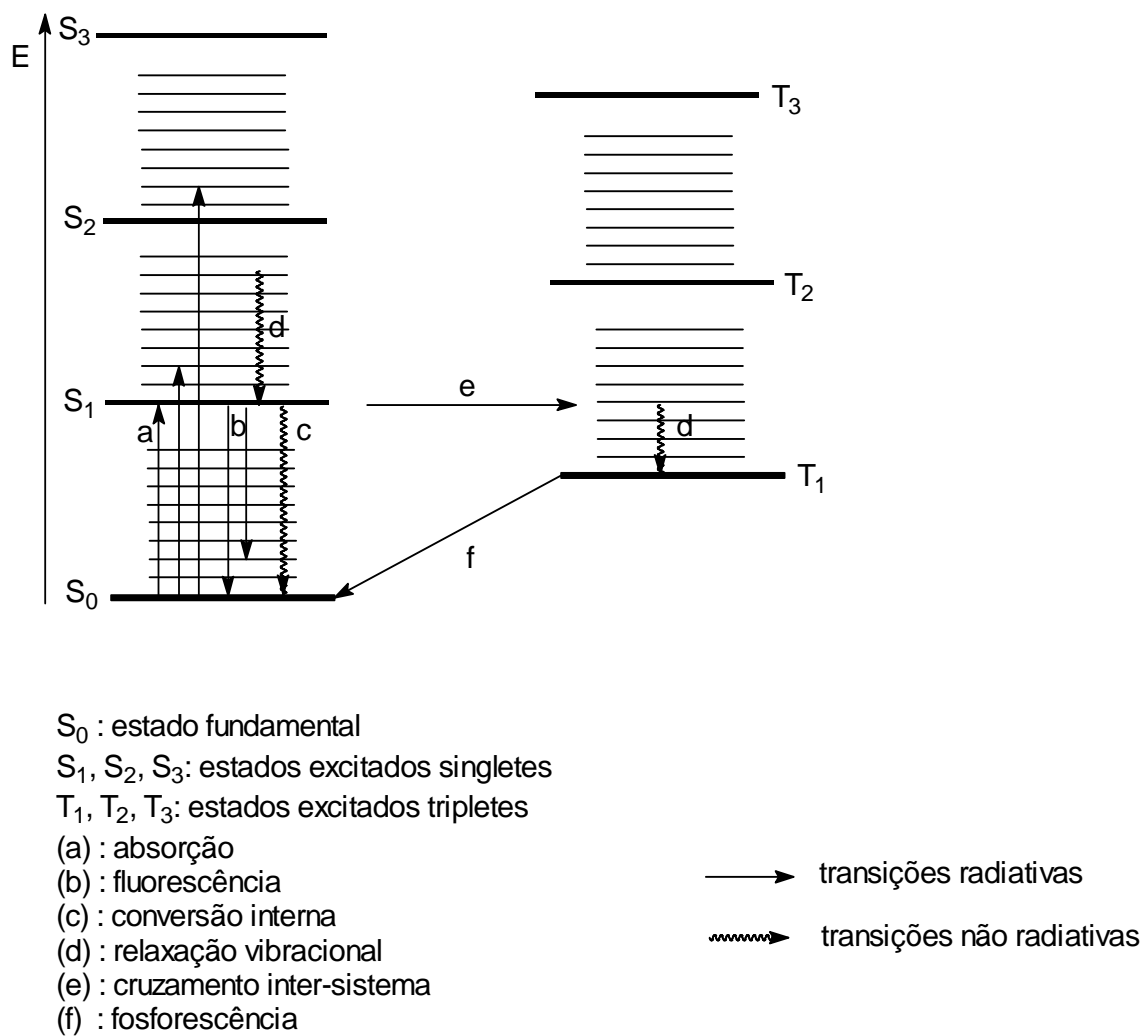


Figura 1.2- Diagrama de Jablonski

1.2- O fenômeno da quimiluminescência

Nos itens anteriores foi mostrado que as moléculas podem absorver radiações eletromagnéticas. A absorção na região do visível ou ultravioleta gera estados eletronicamente excitados, que se desativam e provocam uma série de fenômenos. Agora inicia-se o estudo da quimiluminescência, em que a geração de estados eletronicamente excitados ocorre através de uma reação química.

Se a energia não pode ser criada nem destruída, então, certamente, a luz produzida pelos vagalumes deve ser proveniente de uma transformação de energia. Como mostrado, a emissão de luz, a partir de um composto químico, é possível através da desativação radiativa de um estado eletronicamente excitado. Se este composto não foi inicialmente excitado por absorção de radiação, então, deve existir um processo **“escuro” de excitar moléculas eletronicamente**. Este método é chamado de quimi-excitação e está por trás de todos os fenômenos de bio e quimiluminescência. A seguir, a descrição das características comumente encontradas em reações capazes de emitir luz serão apresentadas. Mas antes é importante **frisar a diferença entre um processo de quimiluminescência (geração de luz a partir de reações químicas) e processos luminescentes como fluorescência ou fosforescência onde a emissão de luz provém de uma excitação prévia também por radiação, embora nem sempre visível.**

1.2.1- Quais são as características que uma reação quimiluminescente possui⁽⁷⁾?

A primeira característica observada nas reações quimiluminescentes é seu caráter exotérmico, devido a liberação de energia sob a forma de radiação. A figura 1.3 abaixo mostra a exigência energética para que uma reação possa levar a geração de estados eletronicamente excitados. Como apresentado, a soma da variação de entalpia da reação com a entalpia de ativação deve ser pelo menos igual a energia de excitação do produto.

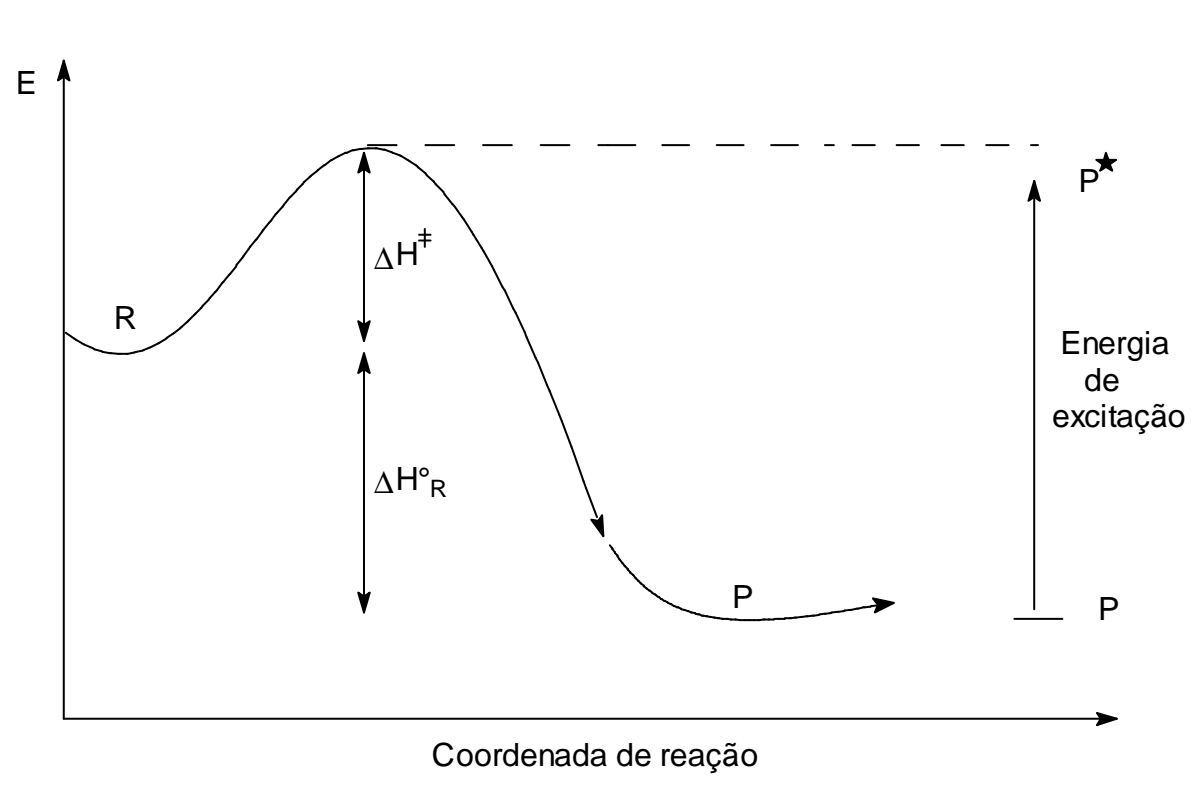


Figura 1.3- Exigências energéticas para que uma reação seja quimiluminescente

A segunda característica e talvez a mais importante é a existência de um mecanismo pelo qual esta energia liberada possa ser canalizada para gerar produtos em estados eletronicamente excitados (mecanismo de quimi-excitação). Este é realmente um ponto fundamental pois, para a maioria das reações exotérmicas, esta energia é liberada na forma de calor e assim são classificadas como reações térmicas.

A terceira característica, certamente menos óbvia do que a primeira, é que o produto excitado eletronicamente deve possuir um bom rendimento de desativação radiativa. Como será exposto mais adiante, uma reação pode gerar produtos em estados eletronicamente excitados, sem entretanto produzir quimiluminescência.

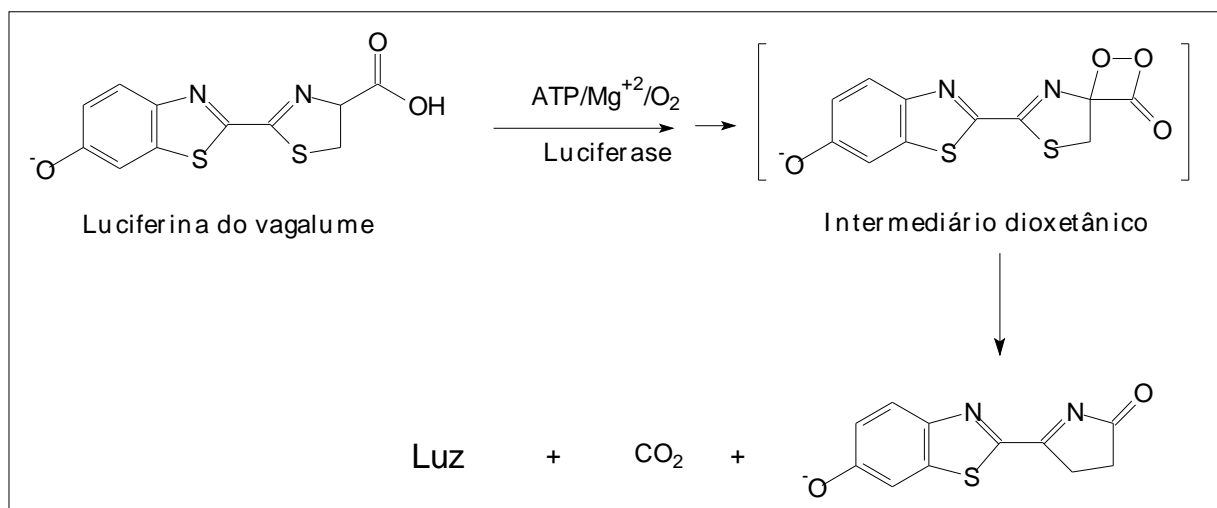
1.2.2- Caracterizando as reações bio e quimiluminescentes

Em primeiro lugar, reações bioluminescentes nada mais são do que reações quimiluminescentes que ocorrem em organismos vivos ou nas secreções destes. São reações enzimáticas que foram denominadas por Du BOIS em 1887 como sistemas luciferina/luciferase⁽⁸⁾. Luciferinas são os substratos que serão oxidados e luciferases são as enzimas que catalisam as reações.

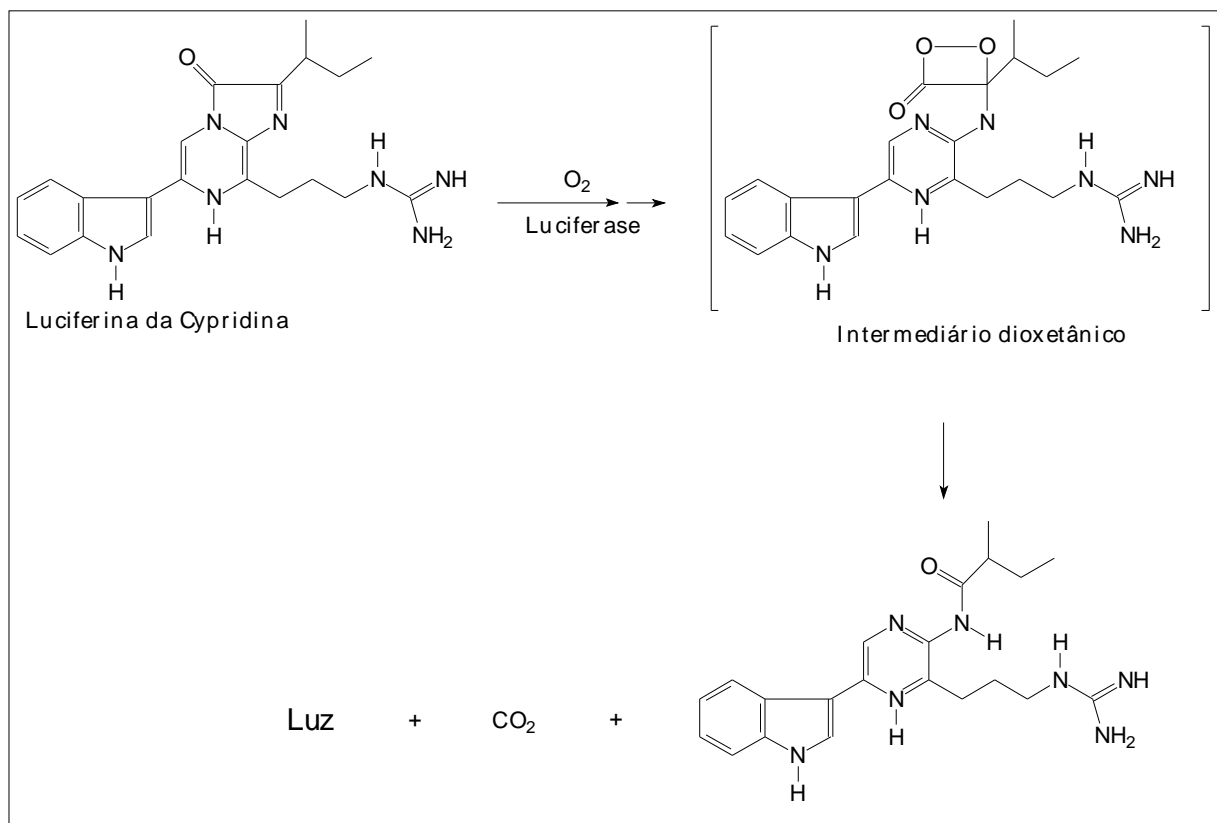
Todas as reações bioluminescentes conhecidas e a maioria das reações quimiluminescentes orgânicas são, direta ou indiretamente, oxidações envolvendo oxigênio ou alguns dos seus derivados, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) entre outros e, portanto, a primeira condição parece estar satisfeita, visto que **oxidações são, por natureza, reações que liberam calor.**

Em todas estas reações foi proposto o envolvimento de intermediários peroxídicos lineares ou, principalmente, cíclicos (**anéis 1,2-dioxetânicos**), que são conhecidos pela sua capacidade de gerar estados excitados após clivagem térmica. Estes **fornecem o mecanismo de quimi-excitação** citado anteriormente⁽⁹⁾.

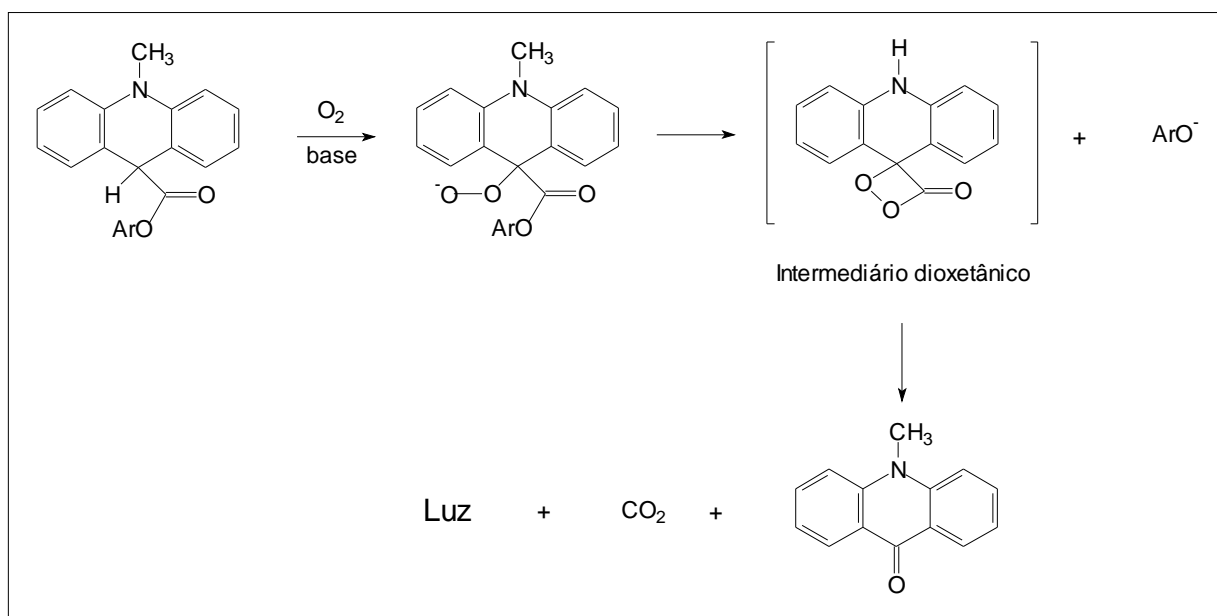
A alta eficiência de desativação radiativa das reações bioluminescentes poderá ser entendida com a apresentação das propriedades dos compostos dioxetânicos. Os esquemas 1.1, 1.2 e 1.3 mostram os mecanismos propostos para alguns sistemas bio e quimiluminescentes já esclarecidos, em que se pode constatar as características citadas.



Esquema 1.1- Mecanismo proposto para a reação bioluminescente do vagalume⁽¹⁰⁾

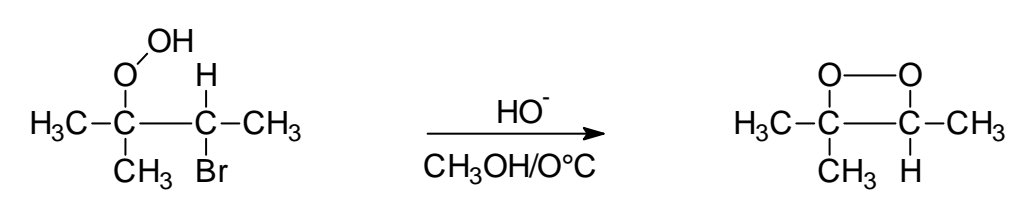


Esquema 1.2- Mecanismo proposto para a reação bioluminescente da cipridina (crustáceo) ⁽¹¹⁾



Esquema 1.3- Oxidação quimiluminescente da acridina ⁽¹²⁾

Como mostra os esquemas anteriores, os anéis peroxídicos cíclicos (1,2-dioxetanos) têm papel relevante nessas reações e, de fato sua clivagem é o passo fundamental no processo de quimi-excitação. Estes peróxidos que se acreditava serem apenas intermediários instáveis foram sintetizados e isolados pela primeira vez em 1969 por Kopeck e Munford⁽¹³⁾ (esquema 1.4) e, desde então, centenas de novos derivados têm sido sintetizados e estudados, com o objetivo de entender o mecanismo de geração de estado excitado quando os mesmos são decompostos. Atualmente, além do grande progresso alcançado do ponto de vista acadêmico, dioxetanos artificiais são comercializados como sondas quimiluminescentes extremamente úteis em biotecnologia. A seguir são descritos algumas características destes importantes compostos.



Esquema 1.4- Síntese do primeiro dioxetano (trimetil-1,2-dioxetano)

1.2.3- Anéis 1,2-dioxetânicos: geração de estados eletronicamente excitados e quimiluminescência.

Como foi dito anteriormente, o primeiro critério que uma reação deve satisfazer para gerar quimiluminescência é ser exotérmica. De fato, esta é a evidência experimental mais direta que a clivagem térmica de um anel 1,2-dioxetânico fornece. A alta exotermicidade (62 ∓ 7 Kcal/mol), dependendo dos substituintes, somada a típica energia de ativação para decomposição dos dioxetanos de 25 ∓ 3 Kcal/mol é mais do que suficiente para excitar carbonilas aos primeiros estados singletes e tripletes ($\Delta H_{ex} \leq 85$ Kcal/mol)^(14,15).

A segunda característica dos dioxetanos, e a mais importante, é a capacidade que eles têm de canalizar a energia liberada, após a clivagem, para popular uma das moléculas produto em estado eletronicamente excitado. Outra característica importantíssima dos dioxetanos simples, ou seja, aqueles que possuem como

substituintes os grupos alquila, acila, alcoxila e homoarilas, deve ser mencionada. Trata-se da formação principal de carbonilas tripletes (6 a 40%) em relação a singletes, geralmente menor do que 0,1%, quando estes compostos são decompostos⁽¹⁴⁾. Entre os mecanismos propostos para explicar o processo de quimi-excitação, responsável pela geração de carbonilas predominantemente tripletes, destaca-se o mecanismo intermediado por um birradical⁽¹⁶⁾. As evidências para esta proposta baseiam-se em experimentos de captura do birradical intermediário⁽¹⁷⁾, na explicação dos efeitos dos substituintes no anel dioxetânicos e nos cálculos teóricos que mostram a proximidade entre as superfícies de energia potencial do dioxetano, no estado fundamental, com a superfície de energia potencial do dioxetano no estado excitado triplete, à medida que a ligação O-O alonga-se.⁽¹⁸⁾

Esta propriedade de gerar especialmente estados eletronicamente excitados tripletes, quando dioxetanos são clivados, afastou, de certa forma, os mesmos como intermediários das eficientes reações bioluminescentes já mencionadas. O fato é que estados excitados tripletes são por natureza pouco emissivos, haja visto que, devido ao seu longo tempo de vida, como foi mencionado anteriormente, estes são preferencialmente desativados por processos não radiativos. Assim, principalmente em soluções aeradas, é quase impossível detectar quimiluminescência direta a partir da termólise de dioxetanos simples. No estudo da decomposição do tetrametil-1,2-dioxetano por exemplo, observou-se que em soluções aeradas a quimiluminescência caiu para cerca de 1% do valor obtido em soluções desaeradas⁽¹⁹⁾, já que o oxigênio é um ótimo supressor de tripletes.

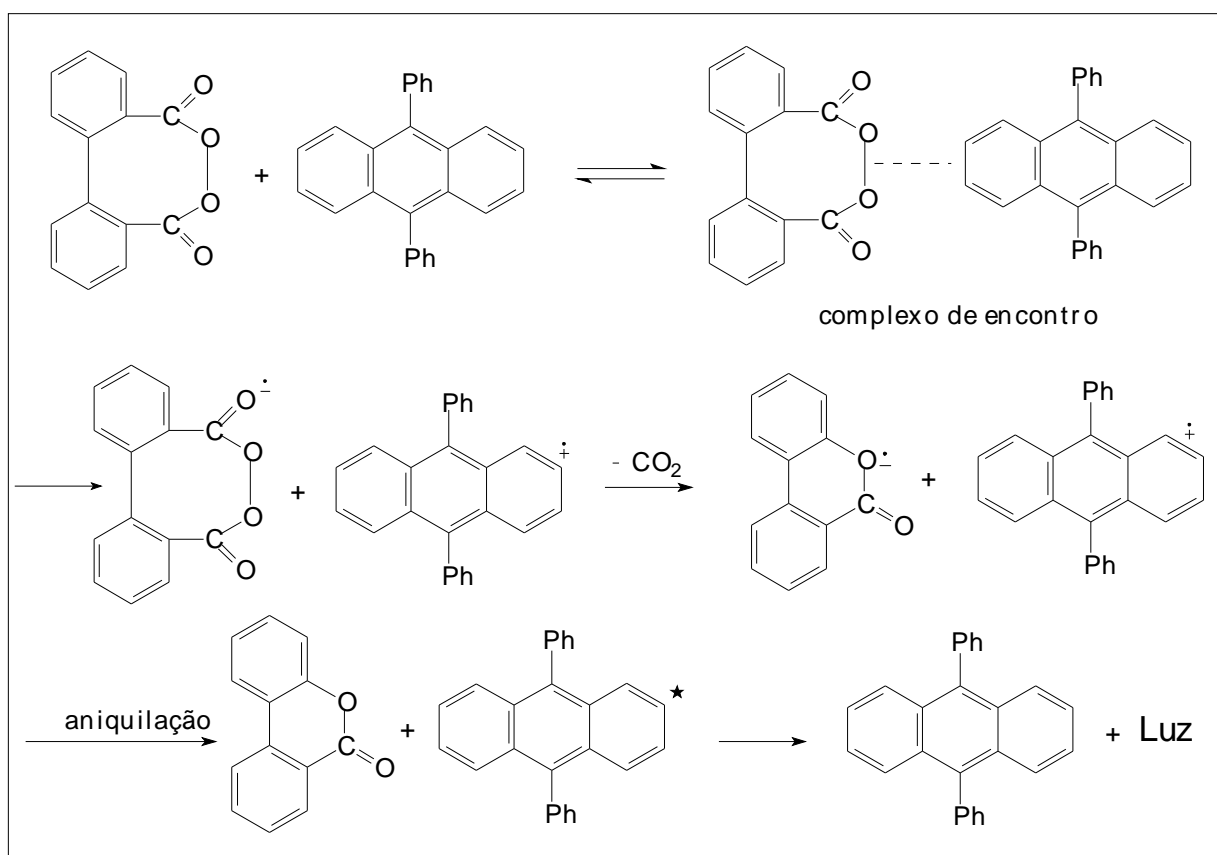
Esta controvérsia, embora ainda hoje em estudo, começou a ser esclarecida com os trabalhos de Schuster sobre a decomposição térmica do peróxido de dibenzoíla. Verificou-se, neste caso, que embora a reação fosse suficientemente exotérmica para gerar o produto (benzocoumarina) em estado excitado, isto não era observado. Por outro lado, quando 9,10-difenilantraceno foi adicionado à reação, além de ocorrer um acréscimo na velocidade da reação, observava-se uma eficiente fluorescência do difenilantraceno, o que indicava a formação de estado excitado singlete. Schuster propôs um mecanismo com os seguintes passos⁽²⁰⁾:

- i) formação de um complexo;
- ii) transferência de elétrons do difenilantraceno para o peróxido de dibenzoíla formando um par de íons radicais;

iii) perda de CO_2 ;

iv) aniquilamento do par radical com formação do difenilantreno em estado excitado singlete (esquema1.5).

Observou-se, também, que outros hidrocarbonetos poliaromáticos, agora classificados como ativadores, podiam ser usados e a eficiência catalítica de decomposição era inversamente dependente do potencial de oxidação destes, ou seja, estaria relacionado à capacidade de doação de elétrons dos mesmos.

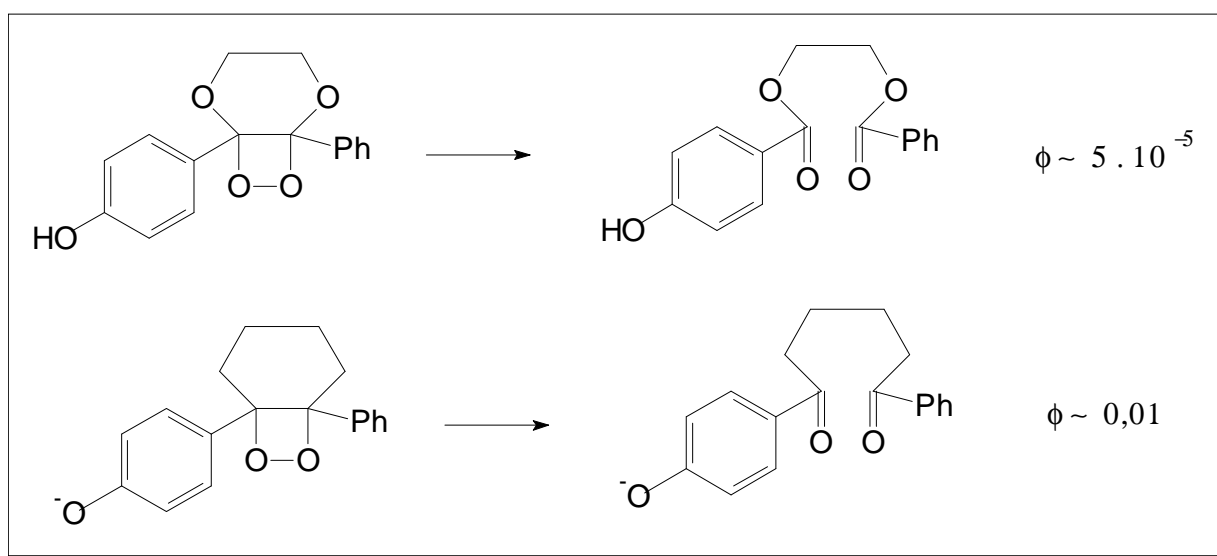


Esquema1.5- Proposta de mecanismo para decomposição quimiluminescente do peróxido de dibenzoíla (mecanismo CIEEL)

Resultado semelhante foi obtido no estudo da decomposição de uma dioxetanona (3,3-dimetil-1,2-dioxetanona). Neste caso, a decomposição simples levava à formação de estados excitados predominantemente tripletes, como seria esperado. Por outro lado, quando na presença de ativadores, verificou-se a formação dos mesmos em estado excitado singlete e, conseqüentemente, um grande aumento no rendimento quântico de quimiluminescência ⁽²¹⁾. **Este mecanismo foi chamado**

de CIEEL (*Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence*) e, atualmente, é aceito como envolvido em grande parte das reações bioluminescentes conhecidas, em que além dos intermediários dioxetânicos, grupos heteroaromáticos capazes de doar elétrons estão normalmente presentes.

Estas propostas foram apoiadas ainda pelos trabalhos de Schaap e Gagnon⁽²²⁾, ao estudarem a decomposição dos derivados do 1,6-diaril-2,5,7,8-tetraoxabicyclo-[2,4,0]-octanos em função do pH. Observou-se que a forma desprotonada, além de decompor cerca de 10^6 vezes mais rapidamente, possuía um rendimento de fluorescência de aproximadamente 200 vezes maior do que a forma protonada. Aqui foi proposto que um mecanismo CIEEL intramolecular estivesse operando, em que a forma desprotonada fosse mais efetiva na doação de elétrons ao anel dioxetânico (esquema 1.6).



Esquema 1.6- Mecanismo CIEEL intramolecular. O dioxetano desprotonado transfere elétrons para o anel peroxídico aumentando a eficiência de quimiluminescência.

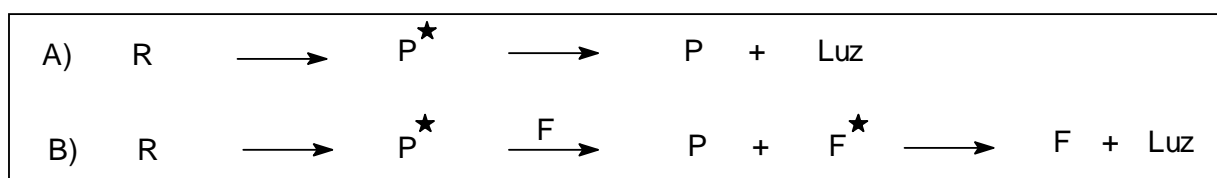
Com essa nova proposta, Schuster sugeriu que no sistema bioluminescente do vagalume um mecanismo do tipo CIEEL intramolecular fosse o responsável pela alta eficiência de quimiluminescência⁽²³⁾. De fato, na estrutura da luciferina há uma dioxetanona ligada a um grupo fenólico capaz de doar elétrons. Em 1966, White

também observou que luciferinas de vagalume, em que o grupo fenólico estava metilado, apesar de ser oxidada *in vitro* na presença de luciferase, não se observava quimiluminescência⁽²⁴⁾.

Concluindo, além do envolvimento de intermediários dioxetânicos, a presença de grupos facilmente oxidáveis pode ser a resposta para a alta eficiência de quimiluminescência dos processos bioluminescentes. É importante ressaltar que em alguns organismos bioluminescentes, como é o caso das bactérias luminescentes, um hidroperóxido linear está envolvido no processo de quimi-excitação e, portanto, tudo o que foi colocado até agora não é uma regra geral e absoluta.

1.3- Quimiluminescência direta e indireta: transferência de energia

Uma reação quimiluminescente é classificada como direta quando um dos produtos da mesma é o responsável pela emissão de luz. Por outro lado, ela será indireta se apenas gerar produtos excitados que transferem energia para uma outra molécula, que uma vez excitada desativa-se radiativamente (esquema 1.8). Exemplos desses casos podem ser encontrados até mesmos em organismos bioluminescentes. Por exemplo, enquanto na maioria dos sistemas bioluminescentes conhecidos as chamadas oxiluciferinas (luciferina oxidada) são as espécies emissoras (quimiluminescência direta), em outros casos, como na bioluminescência do camarão *meganyctiphanes*, uma substância fluorescente "F", que não sofre alteração no decorrer da reação, é a espécie emissiva, revelando-se assim como um caso de quimiluminescência indireta⁽²⁵⁾.

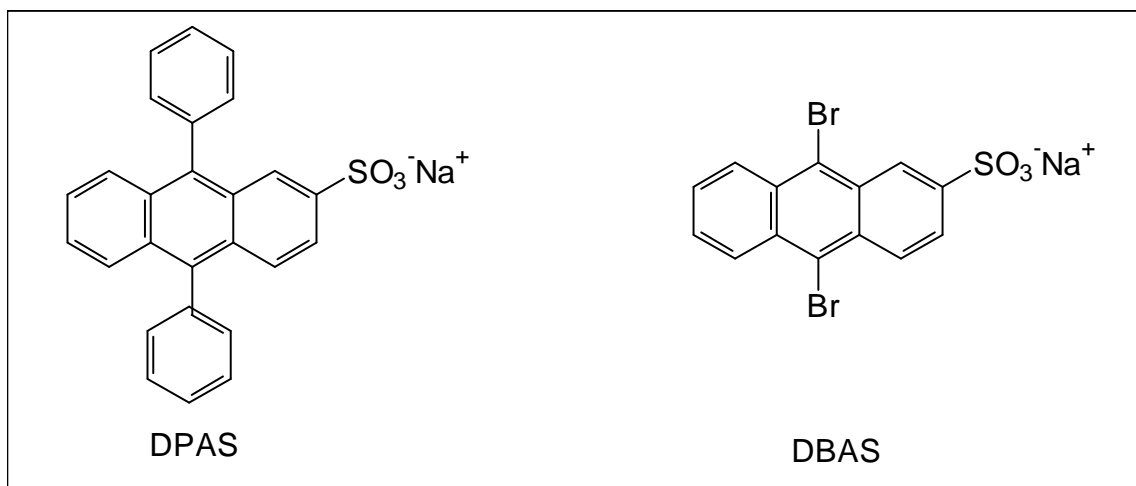


Esquema 1.7- Representação genérica de uma reação quimiluminescente direta (A) e indireta (B)

Os compostos que desempenham esta função são chamados aceptores fluorescentes de energia e têm como principal característica aumentar o rendimento total de quimiluminescência. Como foi exposto anteriormente, dioxetanos simples em que o mecanismo CIEEL não opera são pouco emissivos, pois geram principalmente tripletes. Assim, a utilização desses aceptores é extremamente comum no estudo de reações quimiluminescentes artificiais.

Basicamente, as características buscadas em um acceptor de energia, para que ele seja útil como intensificador de quimiluminescência (*enhancer*), são um alto rendimento de fluorescência e, principalmente, que a energia do estado excitado do mesmo seja inferior à do doador, isto é, o processo deve ser termodinamicamente favorável. Normalmente, os aceptores clássicos são compostos aromáticos policondensados e alguns corantes, os quais, devido a sua extensa rede de conjugação, possuem estados excitados de baixa energia e, em muitos casos, bons rendimentos de fluorescência.

Outro ponto de grande importância, no que diz respeito aos aceptores de energia, é que por meio de uma escolha adequada dos mesmos é possível distinguir a multiplicidade das moléculas em estado excitado, se singlete ou triplete. Por exemplo, no estudo de rendimento de quimi-excitação de dioxetanos é extensamente utilizado o 9,10-difenilantraceno (DPA) para singletes, e 9,10-dibromoantraceno (DBA) para tripletes. DPA apresenta um rendimento de fluorescência de quase 100% e a energia de seu estado singlete (70,1 Kcal/mol) está abaixo da energia singlete de cetonas e aldeídos formados na decomposição de dioxetanos. A sua seletividade para estados singletes baseia-se no fato de que a transferência de energia de carbonilas triplete para gerar DPA singlete é desprezível. No caso do DBA, o efeito de átomo pesado (bromo) possibilita que após ocorrer uma transferência de energia, permitida por spin, do triplete da carbonila excitada para o 2^o triplete do DBA, aconteça uma inter-conversão triplete-singlete deste último e, finalmente, sua fluorescência⁽²⁶⁾. Estas “sondas”, extremamente úteis na detecção e quantificação de estados excitados, puderam ser aplicadas em sistemas aquosos com a síntese de seus equivalentes sulfonados: DPAS (9,10-difenilantraceno-2-sulfonato de sódio) e DBAS (9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio) (esquema 1.9)⁽²⁷⁾.

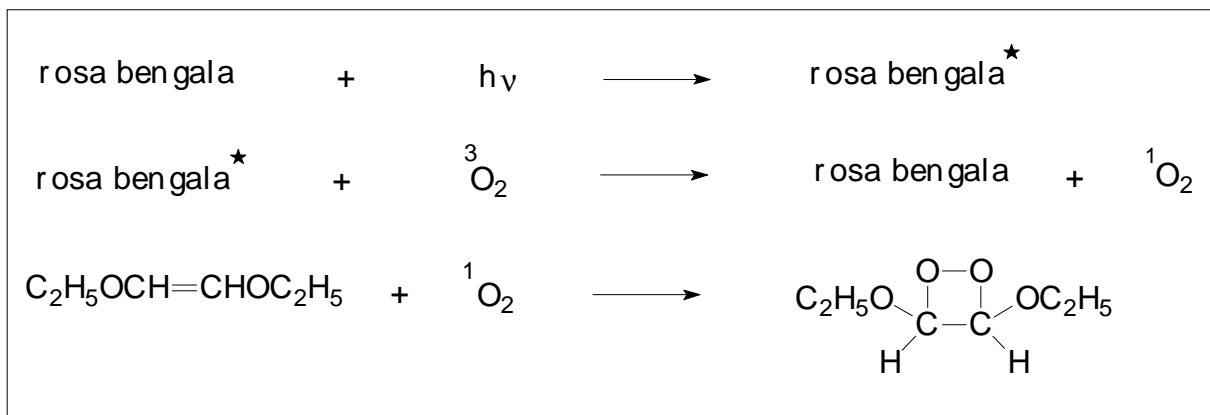


Esquema 1.9- Aceptores fluorescentes para detecção específica de carbonilas excitadas singlete (DPAS) e tripletes (DBAS) em meio aquoso

1.3.1-Reações promovidas por transferência de energia

Outra importante aplicação das transferências de energia de um composto em estado excitado (doador) para outro no estado fundamental (aceptor), encontra-se nas reações fotoquímicas. Trata-se dos casos em que o reagente, que deveria estar em estado excitado, não possui um bom rendimento de excitação a partir de absorção direta de luz. Nestes casos, com o uso de um sensibilizador a radiação será captada e então transferida para o reagente. Um ótimo exemplo disso são as reações com oxigênio excitado singlete. Por exemplo, um importante método de síntese de alguns 1,2-dioxetanos é por meio da reação de olefinas com oxigênio singlete. Trata-se de uma ciclo-adição [2+2] permitida fotoquimicamente por simetria de orbitais (esquema 1.10)⁽²⁸⁾. Neste tipo de reação, um corante (sensibilizador) absorve energia de uma fonte de luz visível, populando seu estado excitado singlete e então, por cruzamento inter-sistema, popula seu triplete. Depois disso poderá ocorrer transferência de energia do corante excitado triplete para o oxigênio no seu estado fundamental triplete, de modo a gerar oxigênio excitado singlete. Os sensibilizadores normalmente utilizados são: azul de metileno, rosa bengala polimérica e algumas porfirinas. É importante lembrar que a molécula de oxigênio no seu estado fundamental tem seus dois últimos elétrons em orbitais degenerados e, obedecendo a regra de Hund, são desemparelhados (mesmo spin). Assim, oxigênio

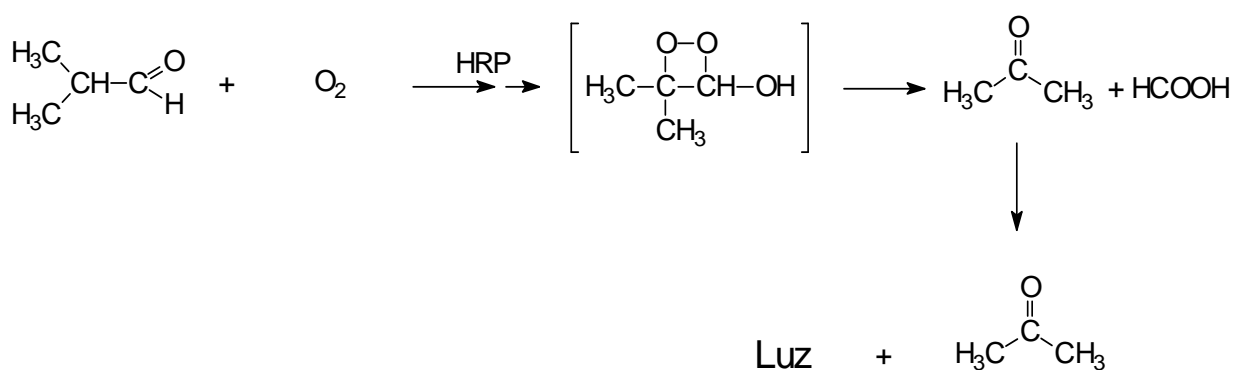
no estado fundamental possui multiplicidade triplete, explicando o seu caráter paramagnético.



Esquema 1.10- Exemplo de uma reação promovida por sensibilização. Síntese de um dioxetano por meio da reação com oxigênio singlete

1.4- Geração enzimática de compostos carbonílicos excitados tripletes via ação catalítica da peroxidase de raiz forte (HRP)

O grupo de pesquisa do prof. Cilento, durante as décadas de 70 e 80, na busca por processos bioquímicos capazes de gerar compostos em estado eletronicamente excitado e identificar os possíveis efeitos que estes causariam, fisiológicos ou deletérios, estudou reações que, potencialmente, poderiam levar à geração de espécies excitadas tripletes. O critério escolhido foi identificar reações enzimáticas em que, presumivelmente, intermediários dioxetânicos pudessem estar envolvidos. Utilizou a oxidação do isobutanal⁽²⁹⁾ como modelo inicial, que é conhecida por gerar acetona e ácido fórmico quando na presença de peroxidase de raiz forte (HRP), atuando como catalisador⁽³⁰⁾. Como mostrado no esquema 1.11 abaixo, um intermediário dioxetânico pode facilmente ser formulado com base nos produtos formados.



Esquema 1.11- Oxidação quimiluminescente do isobutanal catalisada por HRP

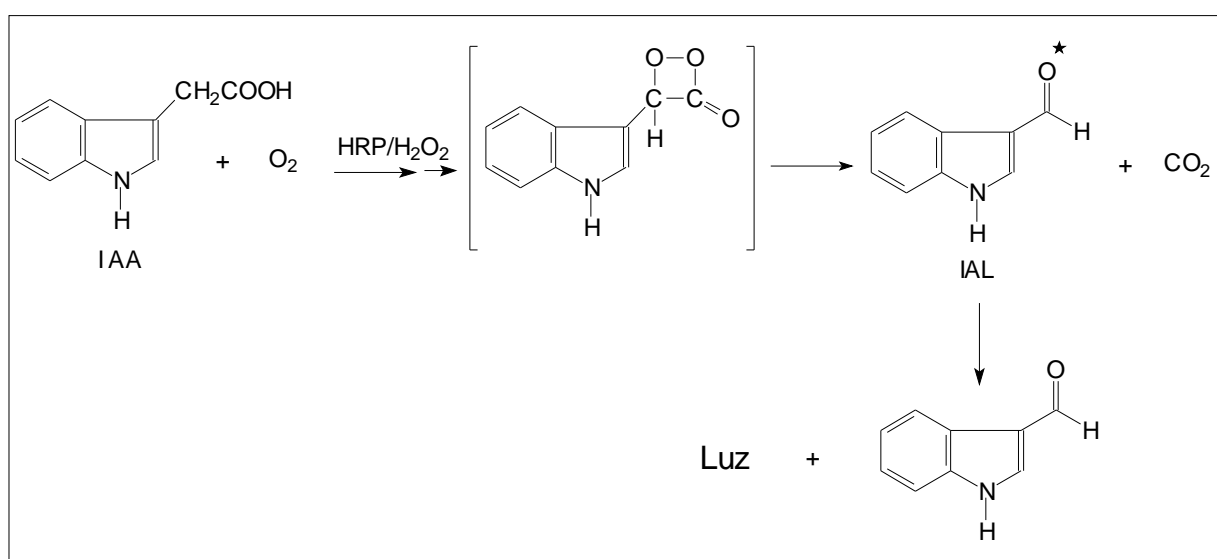
Sua proposta estava correta, pois pode-se detectar até mesmo quimiluminescência direta, embora fraca, em condições otimizadas nesta reação. Mais do que isso, fortes evidências apontavam para a geração de acetona em estado excitado triplete, como seria esperado pela clivagem de um dioxetano simples, como foi visto anteriormente. Dentre estas evidências, destacaram-se:

- i) espectro de quimiluminescência idêntico ao espectro de fosforescência da acetona;
- ii) intensificação de emissão na presença de sensibilizadores específicos para tripletes (9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio, DBAS);
- iii) intensificação da emissão à medida que o oxigênio era consumido. Lembrando que oxigênio suprime estados excitados tripletes, então a diminuição da concentração do mesmo deve favorecer a emissão.

A partir deste modelo, rotas bioquímicas em que peroxidases ou oxidases estavam presentes, ou substratos que potencialmente pudessem ser oxidados via ação catalítica dessa enzimas, foram investigados e, como era esperado, observou-se a geração de estados excitados tripletes em vários casos⁽³¹⁾. Dentre estes, pode-se destacar:

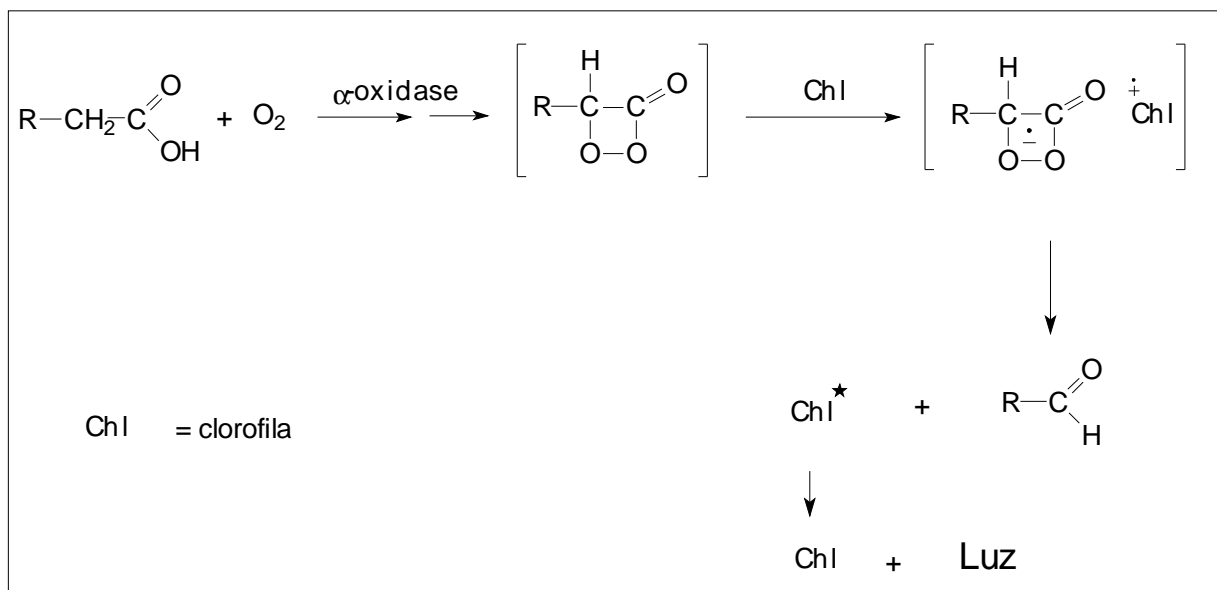
- i) Oxidação do hormônio vegetal ácido 2-(indol-3-il)acético (IAA) via HRP/O₂/H₂O₂:** Peroxidase é considerada a principal enzima responsável pelo catabolismo do hormônio vegetal ácido 2-(indol-3-il)acético (IAA), envolvido no crescimento de plantas⁽³²⁾. Diversos pesquisadores têm realizado estudos sobre o mecanismo dessa reação e muitos produtos foram identificados⁽³³⁾. A estrutura de alguns desses produtos sugere a formação de espécies excitadas, o que de fato

foi confirmado pelo caráter emissivo dessa reação. Dentre os produtos dessa reação, destaca-se o indol-3-carboxialdeído (IAL), cuja formação pode ser formulada via um intermediário dioxetânico⁽³⁴⁾ (esquema 1.12). Estudos posteriores, utilizando técnicas de ressonância paramagnética de elétrons (EPR), mostraram a formação de radicais terciários na oxidação do éster metílico do IAA. Este fato, associado à semelhança do espectro de emissão deste com o do próprio IAA, levantou a suspeita de que compostos do tipo *N*-formil-kinurenínicos (abertura do núcleo indólico) pudessem também ser formados em estado excitado⁽³⁵⁾.



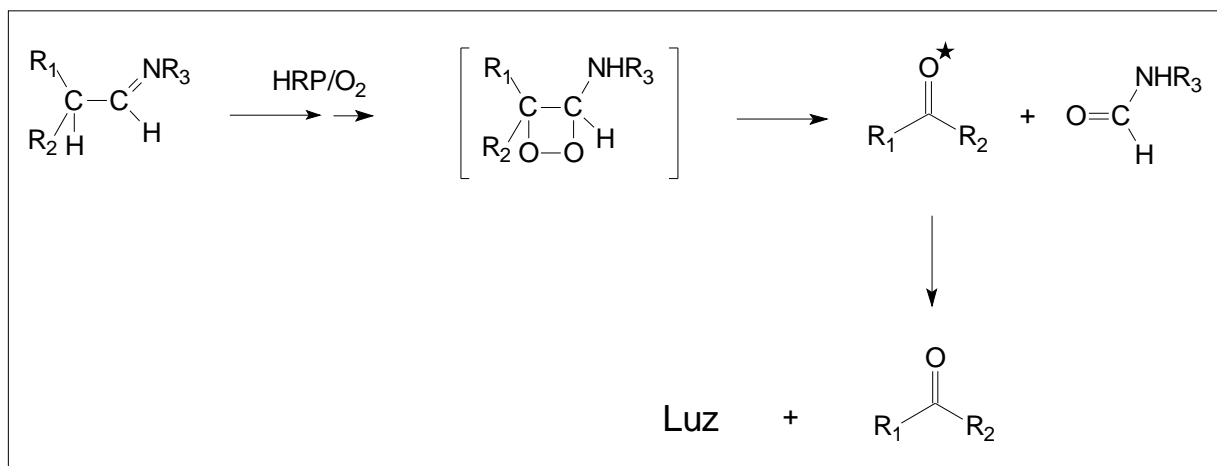
Esquema 1.12- Oxidação do ácido 2-(indol-3-il)acético catalisada por HRP

ii) **Oxidação de ácidos graxos por α -oxidase extraída de plantas:** a oxidação de ácidos graxos por uma preparação enzimática extraída de plantas produz o aldeído homólogo com um -CH₂- a menos e perda de CO₂. Uma emissão de luz pode ser observada quando esta reação é conduzida na presença de clorofila solubilizada em micelas⁽³⁶⁾. Neste caso, a não observância de quimiluminescência direta ou intensificação da mesma, quando aceptores de tripletes foram utilizados, e o fato de que, ao contrário de um dioxetano, uma dioxetanona seria o intermediário formado, levou a proposição que um mecanismo tipo CIEEL estivesse operando neste caso.



Esquema 1.13- Oxidação de ácidos graxos por α -oxidases

iii) **Oxidação de bases de Schiff:** iminas são os análogos nitrogenados dos aldeídos e, de fato, observou-se que estes compostos também poderiam ser oxidados via ação catalítica de HRP, gerando quimiluminescência. Tanto iminas alifáticas quanto iminas geradas por aminoácidos (histidina, arginina, lisina e fenilalanina) incubados com glicolaldeído foram submetidos a oxidação catalisada por HRP. Como esperado, observou-se, além do consumo de oxigênio, quimiluminescência direta e indireta intensificada por DBAS⁽³⁷⁾ (esquema 1.14).



Esquema 1.14- Oxidação quimiluminescente de bases de Schiff

1.4.1- Enóis são os verdadeiros substratos da HRP

A necessidade do tampão fosfato ou arseniato, e a dependência de suas concentrações para que a oxidação, seja do isobutanal, seja das iminas, fosse observada, levou à suspeita de que a forma enólica ou enamínica dos mesmos pudessem ser os reais substratos da HRP. Neste caso, o fosfato poderia estar atuando como um catalisador do equilíbrio ceto-enólico⁽³⁸⁾. Esta proposta foi posteriormente apoiada a partir da observação de que o enol-fosfato atuava como catalisador da reação⁽³⁹⁾. Ainda dentro dessa proposta, foram realizados estudos comparativos entre o isobutanal e o seu correspondente enol protegido por trimetilsilano (trimetilsilil-enol-éter), quando oxidados em diferentes tampões e de diferentes concentrações. A tabela 1.1 abaixo reproduz os resultados obtidos e deixa claro, tanto o papel catalítico desempenhado pelo tampão fosfato, como a participação efetiva da forma enólica dos substratos no mecanismo de oxidação⁽⁴⁰⁾.

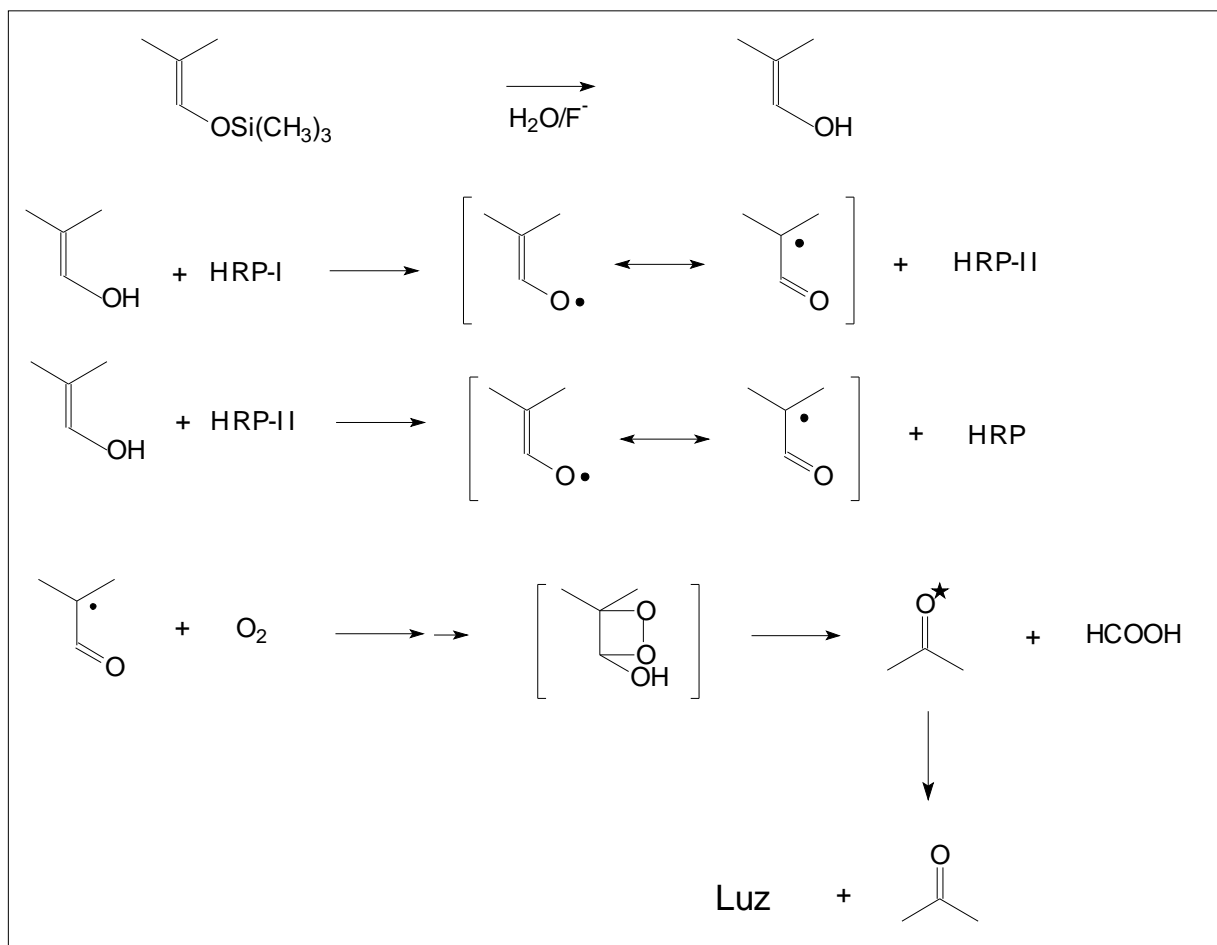
Tabela 1.1- Influência da natureza e concentração do tampão sobre a oxidação de isobutanal e sua forma enólica catalisada por HRP

| <i>Tampão</i> | <i>Concentração</i> | <i>Substrato</i> | <i>Intensidade máxima (10^5 cps)</i> |
|----------------|---------------------|------------------|---|
| Fosfato | 0,1 | Isobutanal | 0,83 |
| | 0,1 | Enol | 19,5 |
| | 0,01 | Isobutanal | 0,025 |
| | 0,01 | Enol | 5,35 |

| | | | |
|---------------|-------|------------|-------------|
| Borato | 0,067 | Isobutanal | Sem emissão |
| | 0,067 | Enol | 3,70 |
| Tris | 0,033 | Isobutanal | Sem emissão |
| | 0,033 | Enol | 0,82 |

T = 27,5°C ; [enol] = 16 mM; [isobutanal] = 55 mM; [H₂O₂] = 0,1 mM, [HRP] = 2 μM

Neste trabalho também foi possível correlacionar a intensidade de emissão à concentração de fluoreto, que desempenhava um papel de catalisador da reação, por meio da desproteção do enol-éter. No esquema 1.15 é mostrado o mecanismo proposto para a oxidação quimiluminescente do enol derivado do isobutanal protegido pelo grupo trimetilsilano⁽⁴¹⁾. **A descoberta de que as formas enólicas desses substratos eram as reais espécies oxidadas pela peroxidase constitui, como veremos, o princípio básico dessa tese.**



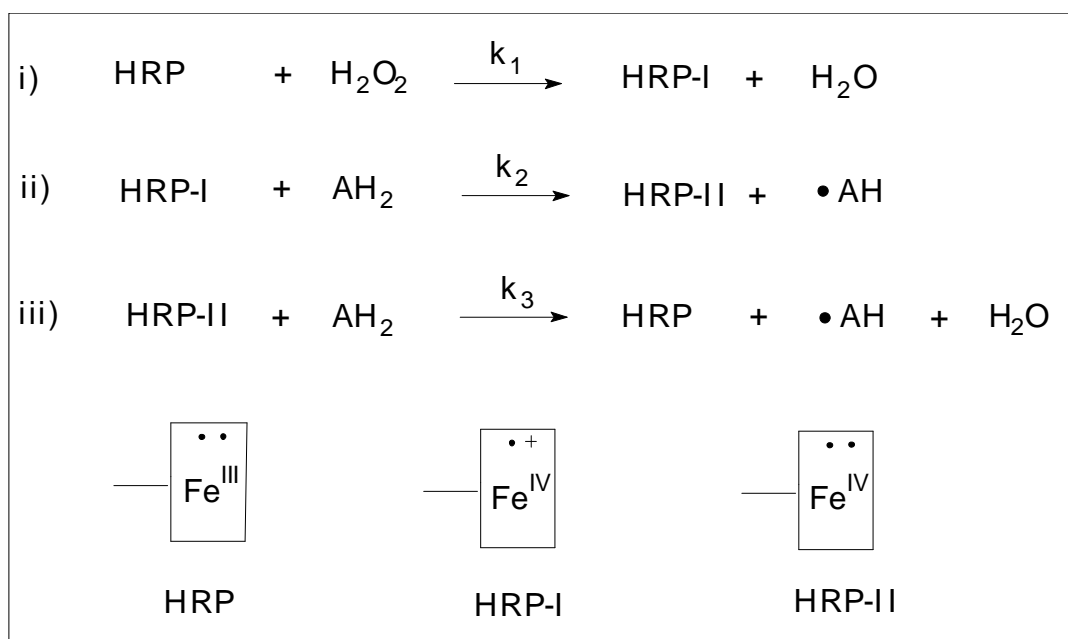
Esquema 1.15- Mecanismo proposto para a oxidação quimiluminescente do enol derivado do isobutanal protegido por trimetilsilano. **O passo limitante da velocidade da reação é a desproteção do siliol-enol-éter**

A geração de quimiluminescência de baixa intensidade, via ação catalítica de HRP, não é exclusiva para compostos enolizáveis. Substratos fenólicos como *L*-tirosina e ácido *p*-hidroxibenzoico, quando submetidos ao sistema oxidante HRP/H₂O₂, geram quimiluminescência⁽⁴²⁾. É também conhecida a geração de quimiluminescência devido a produção de oxigênio singlete, quando o peróxido de hidrogênio é adicionado a outros tipos de peroxidases, como mieloperoxidase, lactoperoxidase e cloroperoxidase^(43,44).

1.4.2- Mecanismo de ação da HRP

Peroxidasas são enzimas que catalisam a oxidação de diversos substratos às custas de peróxido de hidrogênio. Estas enzimas estão largamente distribuídas tanto no reino animal quanto no vegetal; existem cerca de 40 formas isoenzimáticas só para a peroxidase de raiz forte (HRP). Esta peroxidase pode ser facilmente extraída da planta raiz forte, que lhe dá o nome. É a peroxidase mais extensamente estudada e utilizada em metodologias analíticas devido a sua alta estabilidade, o que a faz ser encarada quase como um reagente químico. Possui um peso molecular de 42100 e, como grupo prostético, a protoporfirina IX férrica ligada não covalentemente a proteína⁽⁴⁵⁾.

A HRP atua sobre os seus substratos através de um ciclo que consta das seguintes etapas (esquema 1.16)⁽⁴⁶⁾:



Esquema 1.16- Mecanismo de ação catalítica da peroxidase de raiz forte

- i) Oxidação da HRP nativa pelo peróxido de hidrogênio levando à formação do composto I (HRP-I), que está formalmente dois níveis de oxidação acima da forma nativa. Ele é aceito como possuindo o átomo de ferro em estado de oxidação IV e o núcleo porfirínico deficiente em um elétron (π cátion radical);

- ii) Abstração de hidrogênio de um substrato do tipo AH com conseqüente redução da HRP-I para HRP-II, formalmente em estado de oxidação IV. Neste passo, o elétron é transferido para o anel porfirínico e o próton é retido pela cadeia polipeptídica, provavelmente por meio de um resíduo de histidina (base);
- iii) Abstração do hidrogênio de um segunda molécula de substrato com a redução da HRP-II à forma nativa. Neste passo, o oxigênio é deslocado na forma de água pela retenção de um próton do substrato e o outro já previamente retido pela enzima. A formação de água como grupo de partida está condicionado ao pKa do resíduo de histidina e, como conseqüência disso, este passo é dependente do pH do meio. Medidas do potencial de redução mostram que o par HRP-II/HRP tem o seu potencial reduzido de 1,0 V em pH 6,5 para aproximadamente 0,5 V em pH alcalino⁽⁴⁷⁾.

Outra importante forma ativa das peroxidases é o chamado HRP-III, composto três. Ele pode ser formado das seguintes maneiras: reação entre HRP nativa e excesso de peróxido de hidrogênio ou superóxido; reação entre HRP-II e peróxido de hidrogênio; reação entre HRP ferrosa (forma reduzida de peroxidase, Fe^{II}) e oxigênio. A HRP-III que formalmente está em um estado de oxidação seis é representada como um híbrido de ressonância entre um complexo da forma ferrosa com oxigênio e da forma férrica com ânions superóxido ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^-$)⁽⁴⁶⁾. Um ciclo envolvendo a forma ferrosa e HRP-III foi proposto como responsável pela oxidação do ácido 2-(3-indolil)acético na ausência de peróxido⁽⁴⁸⁾.

1.5- Quimiluminescência de derivados indólicos

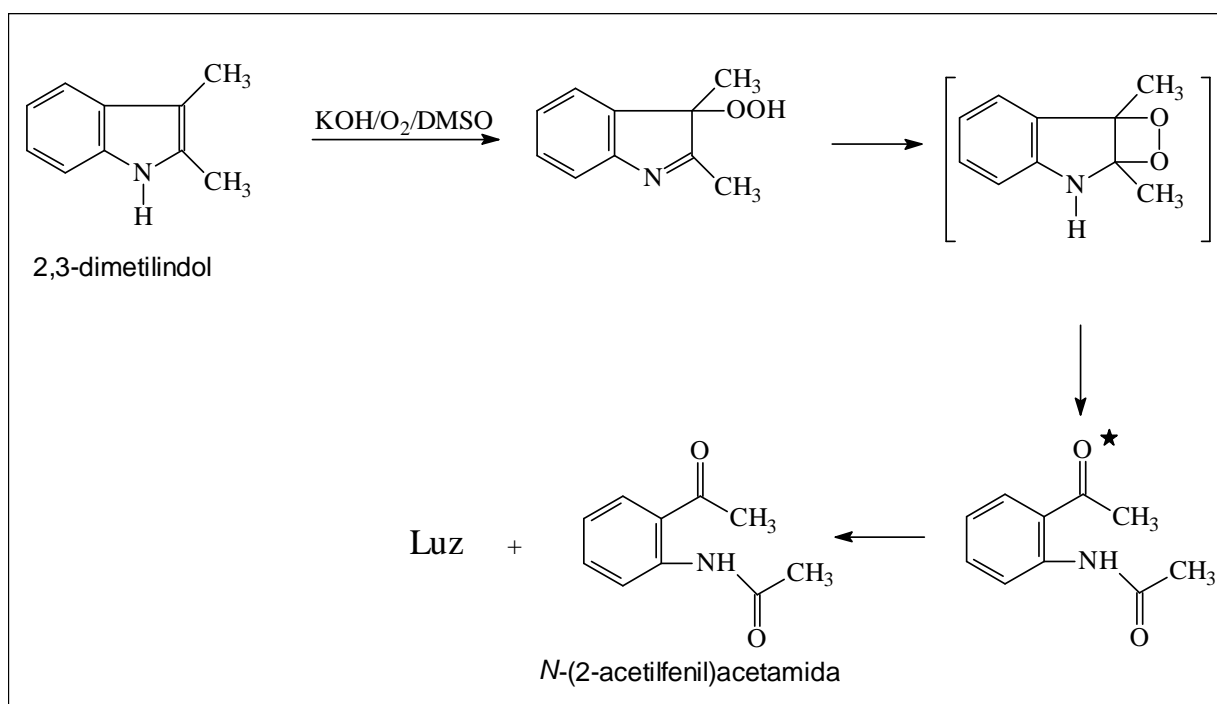
Os primeiros trabalhos que procuravam identificar em derivados indólicos as propriedades de potenciais luciferinas apareceram na década de 60. Em 1965, motivados pela presença do núcleo indólico em sistemas bioluminescentes como a luciferina da ciperidina (esquema 1.2), ou a luciferina de um verme marinho, *balonoglossus*, que apresenta um forte odor, característico de compostos indólicos; Philbrook e colaboradores⁽⁴⁹⁾ realizaram um estudo sobre o potencial quimiluminescente de 24 derivados indólicos, quando submetidos ao sistema oxidante $K_2S_2O_8/HO^-$ em meio aquoso ou em DMSO. Uma comparação de intensidade de quimiluminescência foi realizada entre os vários derivados testados, tomando como referência a emissão originada pela oxidação do luminol quando submetido as mesmas condições. De modo geral, obteve-se pouco ou nenhum indício de quimiluminescência para a maioria dos derivados testados, exceto para alguns derivados alquilados como o 3-metilindol, cuja quimiluminescência foi comparável a emissão do luminol. A tabela 1.2 reproduz os resultados obtidos por estes autores.

Tabela1.2- Quimiluminescência de Derivados Indólicos

| Substrato | Intensidade de Quimiluminescência em H_2O | Intensidade de Quimiluminescência em DMSO |
|---------------------------------------|---|--|
| Luminol | 6000 | - |
| 2-metilindol | 40 | 2100 |
| 3-metilindol | 80 | 10000 |
| 1,2-dimetilindol | 55 | 300 |
| 2,3-dimetilindol | 0 | 3000 |
| 2,5-dimetilindol | 0 | 600 |
| 3-fenilindol | 0 | 30 |
| Indol-3-carboxialdeído | 0 | 30 |
| Ácido indol-3-carboxílico | 0 | 0 |
| Ácido 2-(indol-3-il)acético | 0-10 | 95 |
| Ácido 3-(indol-3-il)propanóico | 0 | 120 |
| Triptofano | 25 | 0 |
| 3-acetilindol | 0 | 60 |
| 3-cloroindol | 0 | 0 |
| 5-nitroindol | 0 | 0 |
| 2,3-dicloroindol | 0 | 0 |
| 3-acetil-2-metilindol | 0 | 0 |
| 2,3-difenil-1-metilindol | 0 | 0 |
| 1-etil-2,3-difenilindol | 0 | 0 |
| Indol | 135 | 105 |
| 2-fenilindol | 0 | 0 |

Em DMSO: [Indol] = 0,05 mol/L, KOH = 0,5 g. Em água: [indol] = 0,025 mol/L, [NaOH] = 0,5 mol/L, [K₂S₂O₄] = 0,08 mol/L

Em 1967, Sugiyama e colaboradores mostraram que durante a oxidação do 2,3-dimetilindol por O₂ em meio alcalino (DMSO/KOH) ocorria quimiluminescência que era dependente da formação de um hidroperóxido intermediário. Este hidroperóxido foi inclusive sintetizado e submetido às mesmas condições (DMSO/KOH), mas em meio desaerado, gerando quimiluminescência. Aliado a esta evidência experimental, e a posterior identificação de *N*-(2-acetilfenil)acetamida como produto da oxidação do 2,3-dimetilindol, estes autores propuseram um mecanismo intermediado por um derivado dioxetânico como responsável pelo passo de quimi-excitação da reação (esquema-1.17)^(50,51).



Esquema1.17- Proposta de mecanismo para oxidação quimiluminescente do 2,3-dimetilindol

Estruturas indólicas estão presentes em um grande número de compostos de importância biológica, como o hormônio envolvido no crescimento de plantas ácido 2-(indol-3-il)acético, o neuro-hormônio melatonina, serotonina e o aminoácido triptofano. Apoiando-se nas potenciais propriedades quimiluminescentes dos mesmos quando oxidados, metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para determinação desses compostos. Neste contexto, vários sistemas oxidantes, como $\text{Fe}^{+3}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}^-$, $\text{MnO}_4^-/\text{HO}^-/\text{Cu}^{+2}$, $\text{MnO}_4^-/\text{H}^+/\text{Ce}^{+4}$, etc. foram testados, visando encontrar a maior eficiência de quimiluminescência^(52,53). Dos resultados apresentados, embora fracas emissões estejam presentes em muitos casos, não é possível indicar uma estrutura indólica ou um sistema oxidante que se mostrem mais eficientes em gerar quimiluminescência.

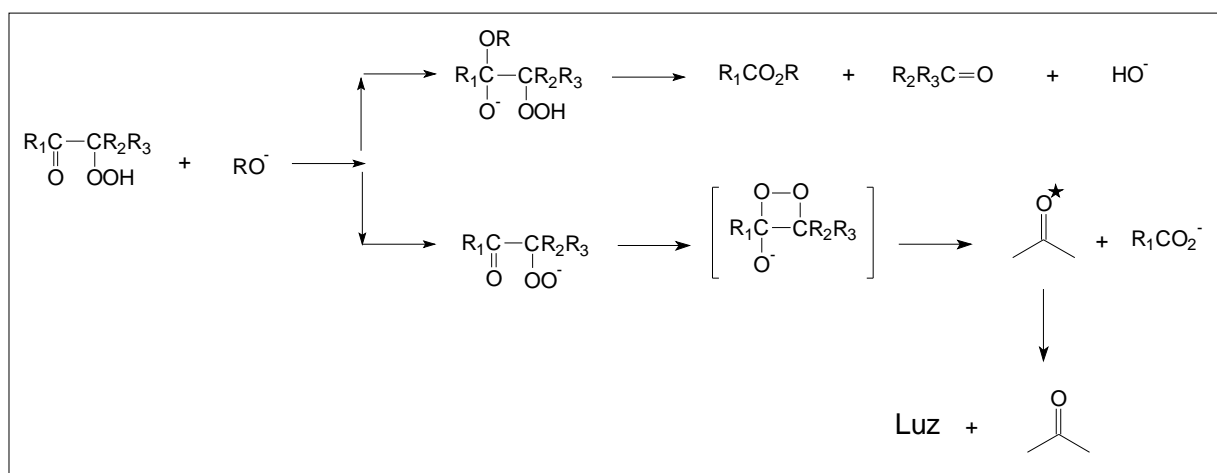
Observou-se quimiluminescência também quando indol e triptofano foram submetidos a eletrólise (quimiluminescência eletrogerada). Novamente um mecanismo intermediado por dioxetano levando à clivagem do anel pirrólico foi proposto como responsável pela quimiluminescência⁽⁵⁴⁾.

Sistemas oxidantes geradores de ânion superóxido, como o sistema enzimático xantina/xantina-oxidase ou peróxido de hidrogênio em meio alcalino, especialmente quando catalisados por hemina, promovem a clivagem oxidativa do anel pirrólico de diversos derivados indólicos de relevância biológica. Para a melatonina em particular observou-se quimiluminescência associada a estas clivagens^(55,56,57).

A HRP, como foi descrito anteriormente, também catalisa a clivagem oxidativa do anel pirrólico do éster etílico do ácido 2-(indol-3-il)acético. A formação deste produto em estado excitado pode ser um dos responsáveis pela quimiluminescência observada⁽³⁵⁾.

1.6- Quimiluminescência de compostos α -hidroperóxi-carbonílicos

Compostos α -hidroperóxi-carbonílicos como α -hidroperóxi-cetonas, α -hidroperóxi-ésteres ou congêneres como α -hidroperóxi-nitrilas, que podem ser preparados por auto-oxidação em meio aprótico alcalino e baixa temperatura, têm sido isolados e são estáveis em meio neutro^(58,59). Suas decomposições em meio alcalino geram quimiluminescência de baixa intensidade e que pode ser intensificada na presença de 9,10-dibromoantraceno (DBA), o que evidencia a formação de compostos carbonílicos em estado excitado triplete, via anéis.1,2-dioxetânicos. No entanto, deve-se mencionar que este mecanismo não é exclusivo, pois na verdade estudos cinéticos e de formação de produtos mostraram que a decomposição das α -hidroperóxi-cetonas ocorre preferencialmente via um mecanismo acíclico não quimiluminescente⁽⁵⁹⁾ (esquema 1.18).



Esquema 1.18- Mecanismos cíclico e acíclico de decomposição de α -hidroperóxi-cetonas

Ao contrário das α -hidroperóxi-cetonas, α -hidroperóxi-aldeídos nunca foram isolados, o que poderia ser esperado, devido a sua maior susceptibilidade a ataques nucleofílicos. No entanto, estes derivados, protegidos na função peroxídica, tiveram a sua primeira síntese em 1989 por Catalani e colaboradores. A desproteção dos mesmos em meio neutro, catalisada por íons fluoreto, novamente resultou em quimiluminescência⁽⁶⁰⁾.

1.7- Aplicações de reações bio e quimiluminescentes

Muito mais do que um assunto meramente acadêmico, o fenômeno da bioluminescência e quimiluminescência vem despertando o interesse dos cientistas ao longo das últimas décadas, também pelas inúmeras possibilidades de aplicação analíticas que estes propiciaram, principalmente em áreas biomédicas. Para se ter uma idéia da amplitude desse campo, bastaria dizer que a cada dois anos realiza-se um congresso, sobre bio e quimiluminescência⁽⁶¹⁾ (atualmente na 10^o edição), onde são apresentados centenas de novas aplicações ou avanços em técnicas já conhecidas. São três as características principais que tornam as reações quimiluminescentes tão úteis em metodologias analíticas:

- i) **Alta sensibilidade.** Uma comparação entre as sensibilidades alcançadas pelas técnicas espectrofotométricas da ordem de $1\mu\text{M}$, fluorimétricas de 1-10 nM e quimiluminescentes que podem alcançar limites abaixo de 1 fM, ou seja 1 amol (10^{-18} mol) em 0,1 mL, mostra a superioridade dessa última. O principal fator que limita a sensibilidade de uma técnica é o sinal inerente ao branco, (mistura de reação completa sem o analito), que estará sempre presente em metodologias analíticas. No caso de técnicas espectrofotométricas ou fluorimétricas, este sinal seria causado pela absorção ou fluorescência dos reagentes. Em técnicas bio e quimiluminescentes, a menos que exista uma reação lateral que produza luz, a limitação causada pelo sinal do branco estará bastante diminuída⁽⁷⁾;
- ii) **Reações bio e quimiluminescentes podem facilmente ser associadas a reações de interesse biológico.** Sendo os sistemas bioluminescentes obviamente reações bioquímicas, tornou-se muito fácil associar o sinal de luz à concentração

de metabólitos e enzimas envolvidas em alguma etapa das mesmas. Além disso, estas aplicações iniciaram-se muito antes do conhecimento dos mecanismos dessas reações. Beijerinck, por exemplo, em 1902 associou a bioluminescência produzida por bactérias à produção de oxigênio por fotossíntese⁽⁶²⁾. Outro exemplo importante pode ser dado pelo trabalho de McElroy em 1947, que ao descobrir a necessidade de ATP na reação bioluminescente do vagalume⁽⁶³⁾ deu início à aplicação desse sistema na determinação de ATP e, conseqüentemente, a uma vasta gama de aplicações analíticas envolvendo o mesmo;

iii) Bio e quimiluminescência possibilita a detecção, quantificação e visualização de eventos químicos em células vivas.

A seguir são explorados, com mais detalhes, algumas áreas que têm se beneficiado das metodologias analíticas bio e quimiluminescentes.

1.7.1- Luminescência celular: *burst* oxidativo

Em 1961 Tarusov detectou uma quimiluminescência de ultra-baixa-intensidade *in situ* proveniente de fígado de rato e, desde então, uma grande variedade de órgãos intactos, tecidos, células isoladas de vertebrados, de invertebrados ou plantas têm mostrado esta propriedade⁽⁷⁾. Dentro deste campo, destaca-se a quimiluminescência nativa que acompanha o mecanismo de defesa por fagócitos estimulados. Em essência, a estimulação, ou seja, a presença de organismos estranhos, resulta na ativação de oxidases que catalisam a redução de oxigênio, via $\text{NADPH} \Rightarrow \text{NAD}^+$ à ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). Outras espécies reativas de oxigênio (ROS) poderão então ser formadas a partir deste por diferentes meios, como formação de peroxinitrito (ONOO^-) por reação com óxido nítrico (NO); redução do $\bullet\text{O}_2^-$ a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via ação enzimática da superóxido dismutase (SOD); formação do ácido hipocloroso (HOCl) pela oxidação de cloreto (Cl^-) por meio da ação catalítica da enzima mieloperoxidase (MPO). Estas ROS além de destruir microorganismos invasores, podem também causar danos as células, sendo responsáveis por exemplo pela destruição de tecidos associado a reações inflamatórias⁽⁶⁴⁾. Estes produtos da redução do oxigênio podem levar à oxigenação de substratos biológicos que, por sua vez, podem levar a geração de estados eletronicamente excitados e, conseqüentemente, à fraca emissão observada nestes

processos⁽⁶⁵⁾. Esta quimiluminescência tem sido aplicada como uma técnica para estudar o processo de fagocitose e para auxiliar no diagnóstico de algumas doenças. Um exemplo clássico é o caso dos pacientes com doença granulocítica crônica, caracterizado pela pré-disposição a infecções por bactérias e fungos. Os neutrófilos destes pacientes não produzem, ou produzem pouco, ânion superóxido e, conseqüentemente, não se observa a quimiluminescência^(66,67).

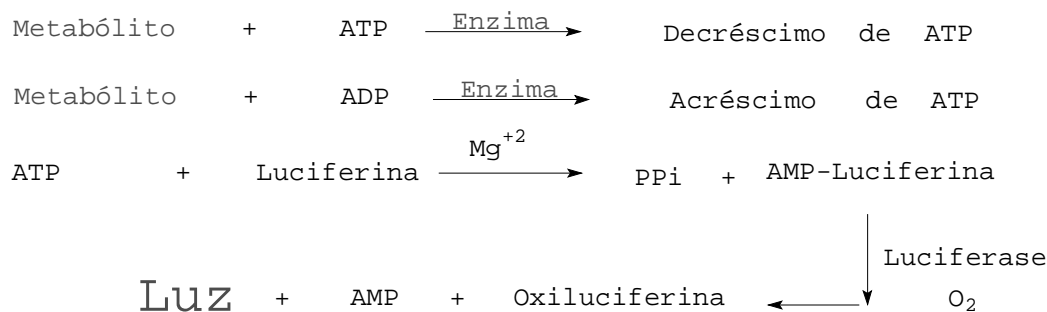
Ainda mais interessante é a possibilidade de intensificação dessa emissão nativa através de substratos orgânicos, cuja oxidação leva à geração de quimiluminescência com alto rendimento quântico. Para este propósito são utilizados principalmente luminol, isoluminol e lucigenina. Além de intensificar, estes substratos atuam de forma mais ou menos seletiva e assim, podem medir diferentes espécies reativas de oxigênio em diferentes locais da célula. A seletividade que estes substratos possuem sobre as espécies reativas de oxigênio são de grande valor na elucidação e diagnóstico de males associados às células fagocíticas. Um bom exemplo é o caso de pacientes que apresentam neutrófilos deficientes em mieloperoxidase. Nestes casos, apesar de haver formação de $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 , o que pode ser medido por outras técnicas, não se verifica a quimiluminescência quando é adicionado luminol, sendo que, após a adição de mieloperoxidase externa, ocorre o restabelecimento da quimiluminescência⁽⁶⁸⁾.

1.7.2- Luciferases e luciferinas: aplicações de bioluminescência

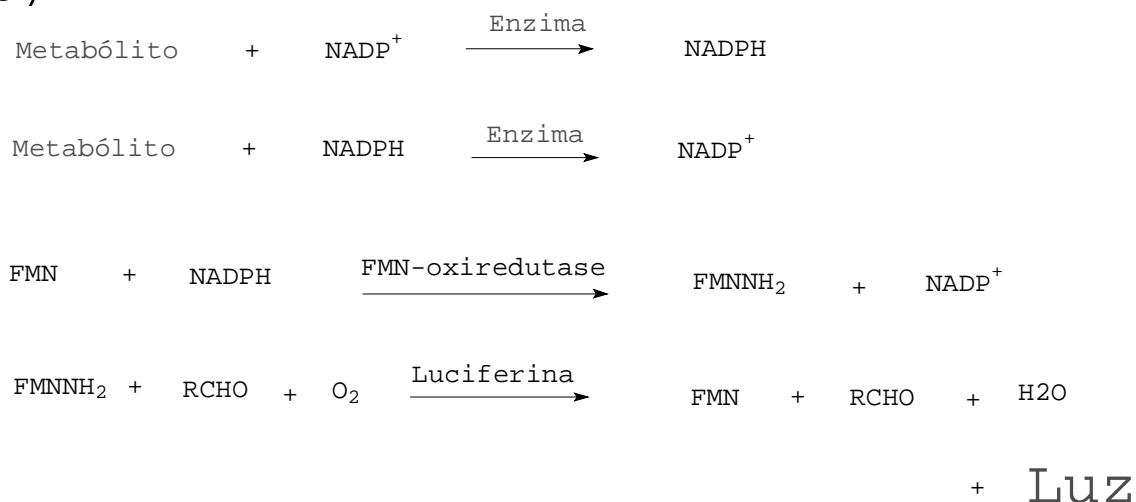
Luciferinas e luciferases são, como foi dito anteriormente, nomes genéricos para os substratos e as enzimas envolvidas em bioluminescência. Estes sistemas propiciam técnicas simples, rápidas e altamente sensíveis para determinar uma extensa classe de substâncias. Os dois sistemas luciferina/luciferase mais utilizados são os do vagalume e de bactérias marinhas. No caso da reação bioluminescente do vagalume há o consumo de ATP, assim, qualquer reação ou sistema de reações acopladas, que envolvam em alguma etapa a produção ou o consumo do mesmo pode ser, em princípio, monitorada pela luminescência característica desse sistema. No caso da reação bioluminescente das bactérias marinhas há o consumo de NADPH e o exposto acima também é válido neste caso (esquema 1.19). Atualmente são comercializados kits contendo luciferina e luciferase de vagalumes e bactérias

prontos para uso, sendo que a sensibilidade dos ensaios pode alcançar 0,1-100 pmol em 10-100 μL de amostra.

a)



b)



Esquema 1.19- Esquema geral para a utilização dos sistemas luciferina/luciferase para determinar enzimas e metabólitos. a) vagalumes; b) bactérias bioluminescentes

São inúmeras as aplicações destes sistemas bioluminescentes, principalmente nas áreas de: microbiologia (análises de alimentos, bebidas, etc.); ensaios de enzimas, substratos e cofatores (desidrogenases, β -D-galactosidase, creatina Kinase, enolase, L-alanina, ATP, FAD, NAD, NADH, glicose, lactato, ácidos biliares, creatinina, lactado, etanol, etc.); imunoenaios; Blot de proteínas e ensaios de DNA⁽⁶⁹⁾.

1.7.3- Imunoensaios e quimiluminescência

A combinação da sensibilidade de detecção dos ensaios que utilizam como princípio a radiação emitida por isótopos radioativos com a especificidade característica de uma reação antígeno-anticorpo, resultou em um dos principais métodos de diagnósticos *in vitro* utilizados em medicina. Esta técnica, conhecida como radioimunoensaio, foi introduzida no final da década de 50 por Yalow e Berson⁽⁷⁰⁾ e hoje é rotineiramente utilizada nos laboratórios clínicos para detectar substâncias endógenas e exógenas (por exemplo, hormônios, bactérias, vírus, toxinas, drogas, etc.). Um ensaio imunológico consiste, basicamente, na utilização de um anticorpo específico para a substância que se deseja detectar, ligado em um “rótulo” (molécula fluorescente, quimiluminescente, enzima, etc.) que será responsável pela revelação do complexo antígeno-anticorpo, se este for formado. No caso dos radioimunoensaios, este rótulo é um isótopo radioativo como, por exemplo, ¹²⁵I (iodo isótopo 125).

Apesar do enorme sucesso alcançado pelos radioimunoensaios, estes também apresentam desvantagens importantes, como o tempo de vida útil dos conjugados anticorpo-isótopo, a necessidade de licença oficial para a utilização de compostos radioativos, o alto custo e os cuidados com o manuseio e descarte. Estas desvantagens levaram à busca de novos métodos de marcação dos anticorpos e dentre estes a utilização de **enzimas como “rótulo”** foi considerada como primeira alternativa ao uso de substâncias radioativas. A utilização desse tipo de rótulo originou os chamados **enzimaimunoensaios (EIA)**. A idéia básica era realmente promissora, pois não se tratava de usar um composto gerador de sinal, mas sim uma enzima cuja detecção poderia ser alcançada utilizando-se diferentes técnicas e, conseqüentemente, uma porta abriu-se para o desenvolvimento de diferentes procedimentos, visando maior eficiência (limite de detecção), menor custo e facilidade de manuseio⁽⁷¹⁾.

As três mais importantes enzimas utilizadas como rótulos em EIA são a peroxidase de raiz forte (HRP), fosfatase alcalina (ALP) e a β -D-galactosidase (GAL). A peroxidase é uma enzima altamente estável e a menor entre as três (PM aprox.

40000), como resultado, apresenta menores problemas estéricos. Por outro lado, é sensível a agentes antimicrobicidas como azida, que são freqüentemente utilizados. A fosfatase alcalina possui peso molecular de aproximadamente 100.000 e maior atividade catalítica, mas é inibida por fosfato e EDTA. A galactosidase apresenta peso molecular de 500.000 e, conseqüentemente, maiores problemas estéricos.

A utilização de enzimas como “rótulos” nos chamados enzimaímunoensaios, como já foi exposto, levou ao surgimento de uma enorme classe de substratos para detecção dessas enzimas. Dentre estes, que podem ser cromogênicos, fluorogênicos ou quimiluminescentes, destacam-se estes últimos, com os quais foi alcançado, e em alguns casos superado, a sensibilidade antes só atribuída aos radioímunoensaios ⁽⁷²⁾. A figura 1.7 esquematiza o princípio de um enzimaímunoensaio do tipo “sanduíche” A seguir será apresentado alguns desses importantíssimos substratos, dando especial atenção aos substratos das enzimas HRP e ALP, visto que são estas as enzimas cuja detecção estão dentro dos objetivos primários dessa tese.

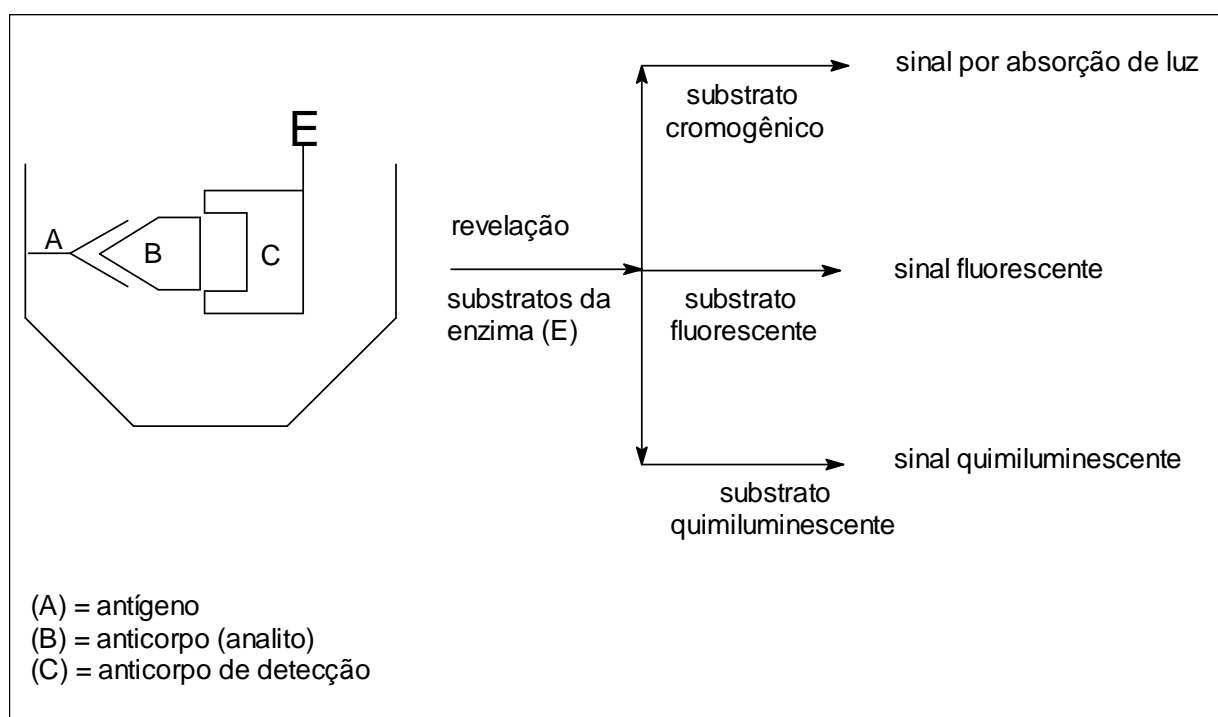
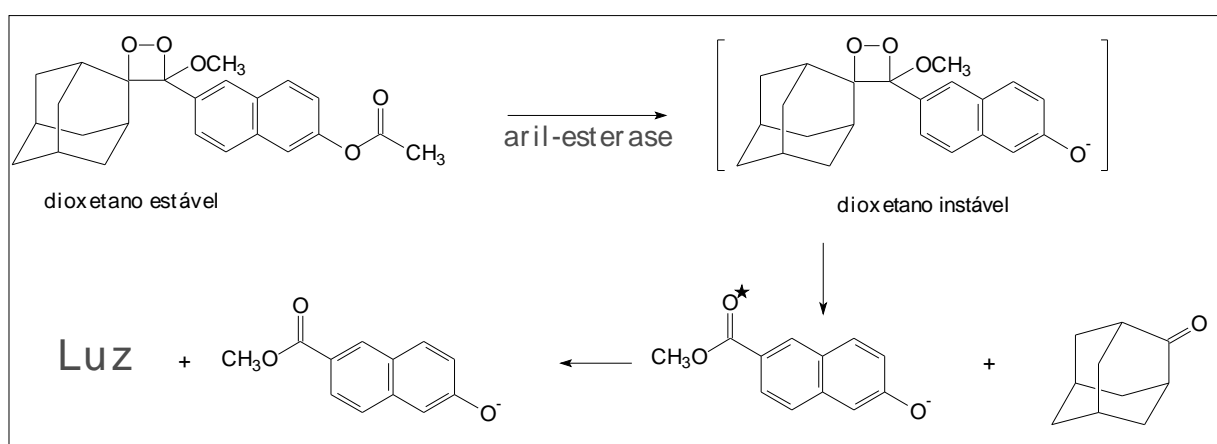


Figura 1.7- princípio de um enzimaímunoensaio do tipo “sanduíche”

1.7.3.1- Enzimaímunoensaios e dioxetanos sintéticos

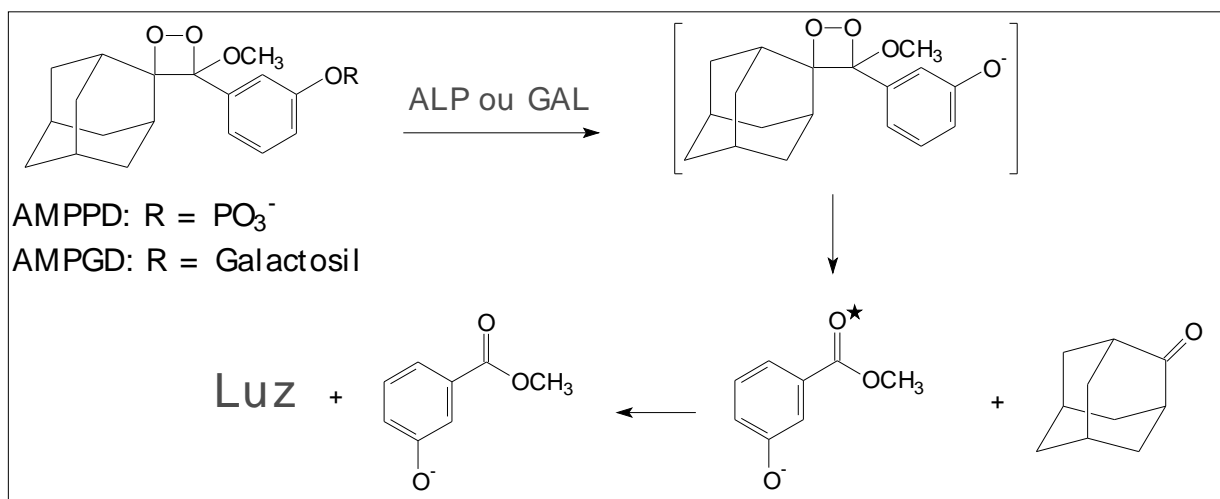
A primeira utilização de um derivado dioxetânico sintético para quantificar a atividade de uma enzima foi descrita em 1987 por Schaap e col.⁽⁷³⁾. Tomando como

base seu próprio trabalho de 1982, em que um dioxetano contendo um grupo fenólico podia ter a sua quimiluminescência disparada pela desprotonação do mesmo (vide item 1.2.3), foi sintetizado um dioxetano em que um grupo acetila poderia ser removido via hidrólise catalisada pela enzima aril-esterase (esquema 1.21). A adição dessa enzima de fato produziu quimiluminescência e foi possível correlacionar a concentração da mesma ao sinal obtido. É importante salientar que se obteve uma perfeita correlação entre os espectros de quimiluminescência da reação e fluorescência do produto 6-hidroxinaftoato de metila, o que significa que este último foi gerado em estado eletronicamente excitado singlete, como seria esperado, supondo que o mecanismo CIEEL estivesse operando.



Esquema 1.21- Substrato desenvolvido por Schaap e col. para determinação da atividade enzimática da aril-esterase

A partir deste primeiro exemplo, diversos novos substratos dioxetânicos foram desenvolvidos visando aumentar o limite de detecção e ampliar os tipos de enzimas a serem detectadas. Dentre estes, os substratos 3-(2'-spiroadamantil)-4-metóxi-4-(3"-fosforilóxi)fenil-1,2-dioxetano (AMPPD) e o 3-(2'-spiroadamantil)-4-metóxi-4-(3"-galactosil)fenil-1,2-dioxetano (AMPGD) são atualmente considerados os mais importantes substratos para detecção quimiluminescente de fosfatase alcalina e β -D-galactosidase, alcançando limite de detecção da ordem de zeptomol (10^{-21} mol) (esquema 1.22) ^(74,75,76). Estes compostos já são comercializados na forma de kits Tropix (Bedford, MA, USA) e largamente aplicados em diversas áreas como imunologia, medicina forense, análise ambiental, seqüenciamento de DNA, etc.

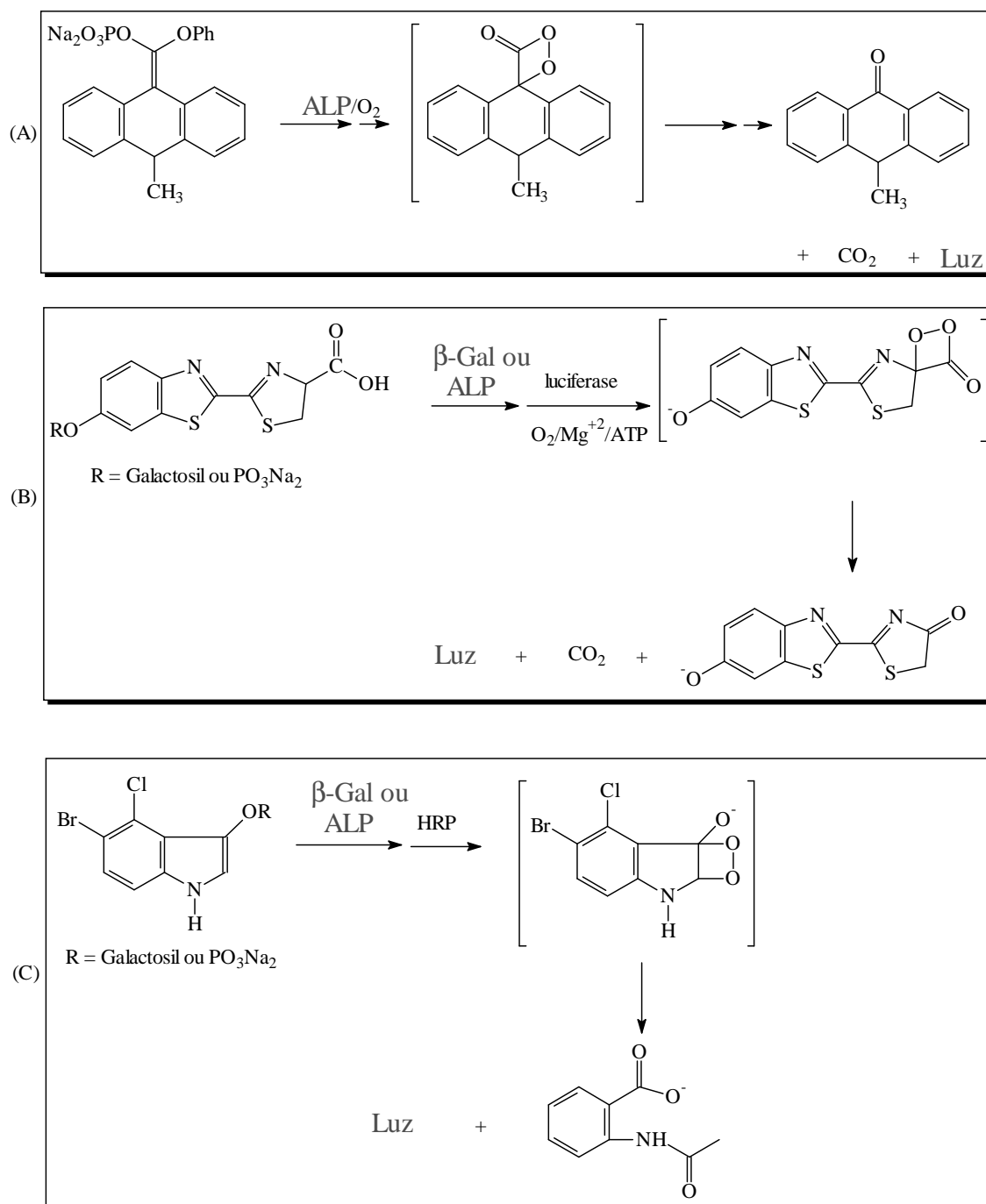


Esquema 1.22- Substratos AMPPD e AMPGD para determinação quimiluminescente de fosfatase alcalina (ALP) e β -D-galactosidase (Gal)

1.7.4- Detecção de fosfatase alcalina livre e em conjugados por quimiluminescência

Além das aplicações como rótulo em enzima-anticorpos (conjugados de imunoglobulina com ALP, (ALP-IgG)), quando determinada livre no soro sanguíneo a enzima fosfatase alcalina é um importante sinalizador de diversas doenças. Altos níveis de ALP no soro sanguíneo são normalmente encontrados em pessoas que têm doenças ósseas ou hepáticas^(77,78,79). Também tem sido proposta a determinação de sua atividade como marcadores secundário de doenças como: tumor de ovário⁽⁸⁰⁾, infecções bacterianas em pacientes aids⁽⁸¹⁾ e leucemia⁽⁸²⁾.

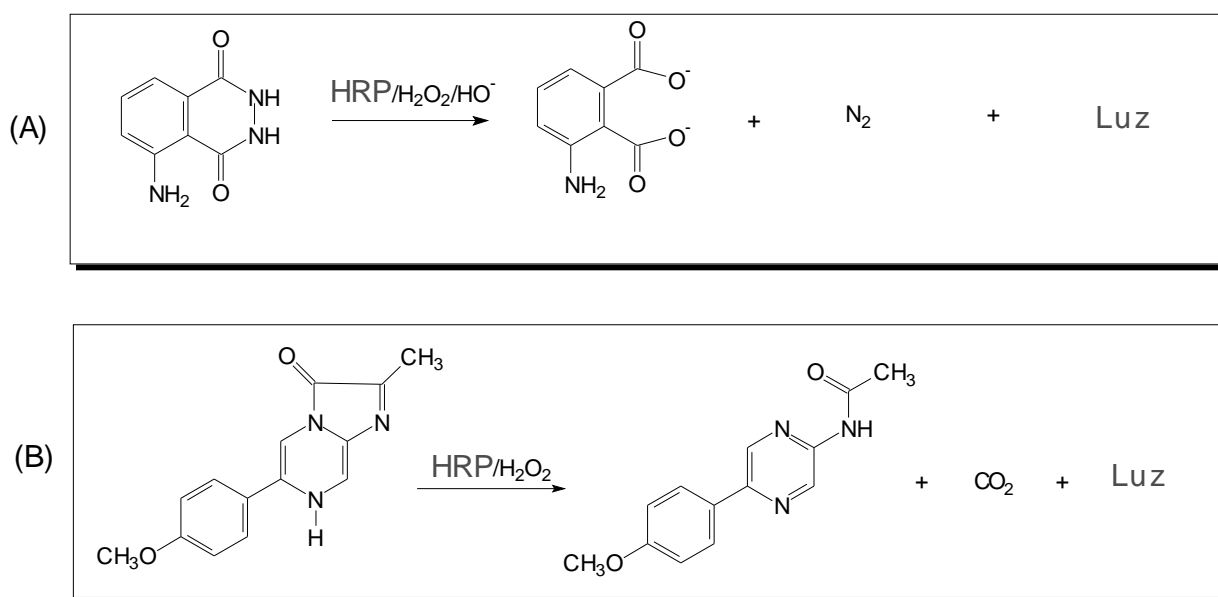
Além dos substratos dioxetânicos, vários compostos têm sido utilizados para determinação quimiluminescente da ALP. A seguir serão mostrados alguns desses substratos desenvolvidos nos últimos anos para determinar essa importante enzima. Embora não sejam dioxetanos, a presença destes como intermediários foi proposta para a maioria dos casos. Em alguns casos, o mesmo tipo de composto pode ser utilizado tanto para fosfatase alcalina quanto para a β -D-galactosidase, bastando apenas trocar o grupo a ser reconhecido pelas enzimas (esquema 1.23).



Esquema 1.22- Alguns substratos quimiluminescentes não dioxetânicos para determinação de ALP e β -Gal. a) Lumigen™ APS, substrato baseado na formação de *N*-metilacridona em estado excitado (substrato comercialmente disponível)⁽⁸³⁾ b) o sistema quimiluminescente de vagalume pode ser disparado via hidrólise catalisada por várias enzimas. Além do grupo fosfato e galactose, luciferinas protegidas por sulfato, arginina e grupos ésteres foram sintetizadas visando outras enzimas⁽⁸⁴⁾. c) substrato baseado na hidrólise de um derivado de indoxil. Neste caso foi proposto um passo inicial onde há a formação de peróxido de hidrogênio via formação de indigo^(85,86)

1.7.5- Detecção de HRP por quimiluminescência

O principal método para determinação quimiluminescente de peroxidase de raiz forte, seja livre, seja na forma de conjugados (HRP-IgG), é por meio do sistema Luminol/ H_2O_2 / OH^- . Esta técnica foi ainda melhorada pelo uso de intensificadores de emissão, como *p*-iodofenol, *p*-fenilfenol⁽⁸⁷⁾, derivados de ácido borônico⁽⁸⁸⁾, etc. Outros métodos têm sido propostos com este fim, como, por exemplo, utilizando pirogalou⁽⁸⁹⁾ ou um composto análogo à luciferina da cipridina⁽⁹⁰⁾ (esquema 1.23).



Esquema 1.23- Alguns substratos quimiluminescentes para determinação de HRP.

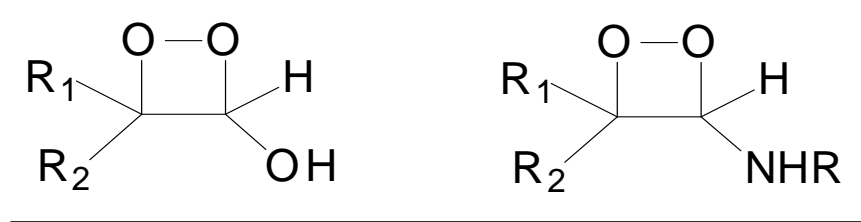
A) sistema luminol; b) derivado da luciferina da cipridina

2- Objetivos

Considerando que sistemas bio e quimiluminescentes possuem larga aplicação como ferramentas analíticas em diversas áreas bioquímicas e biomédicas, tanto em nível acadêmico quanto tecnológico, como:

- i) quantificação de atividade de uma grande variedade de enzimas e metabólitos;
- ii) monitoração de processos bioquímicos;
- iii) sistemas reveladores em ensaios imunoenzimáticos, etc.,

explorou-se este campo, sintetizando e estudando novos substratos enzimáticos potencialmente quimiluminescentes. Estávamos interessados em substratos que pudessem produzir, **após ação enzimática**, intermediários instáveis do tipo hidróxi-dioxetano ou amino-dioxetano (esquema 2.1), que, como foi mostrado na introdução, são reconhecidamente geradores de estados excitados após clivagem do anel peroxídico.



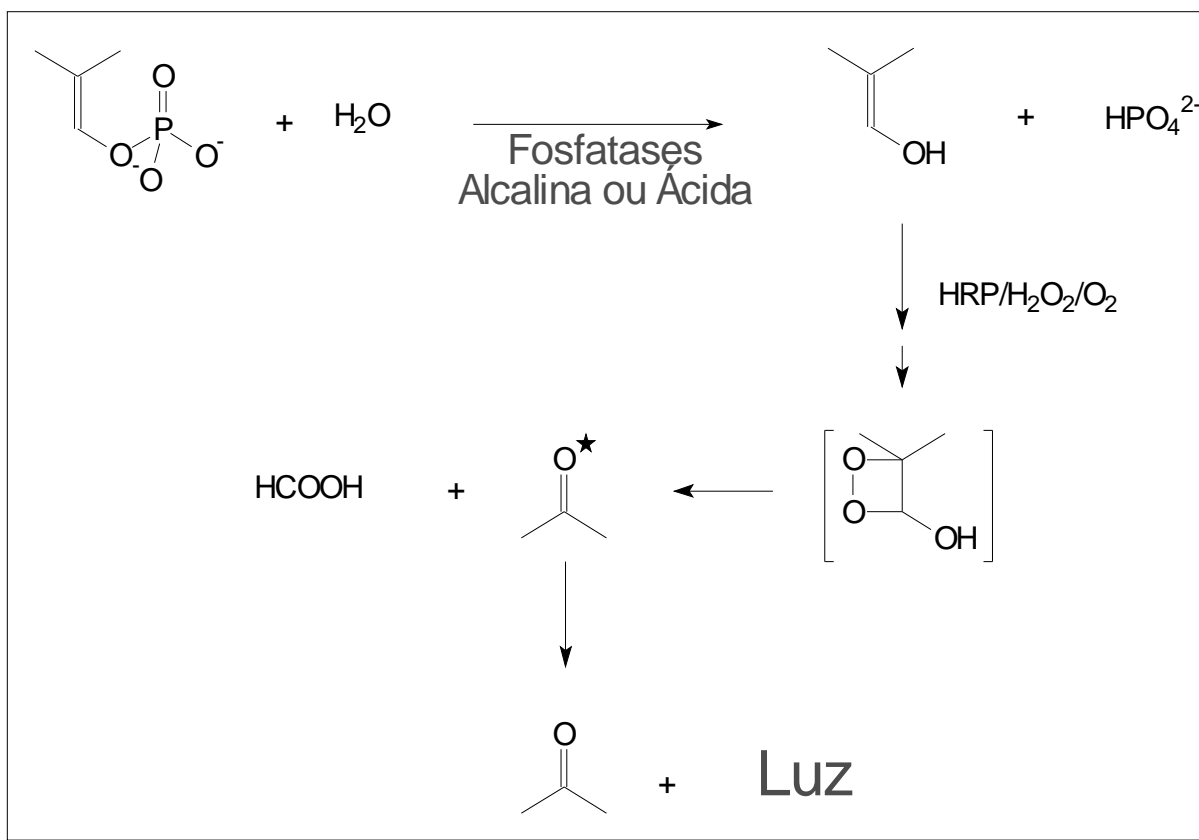
Esquema 2.1- Intermediários geradores de estados excitados

Utilizou-se quatro abordagens para produzir indiretamente os intermediários acima e correlacioná-los à atividade de enzimas:

i) Hidrólise de enóis protegidos e posterior oxidação catalisada por HRP: desenvolvimento de metodologia quimiluminescente para determinação quantitativa da atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida.

É sabido que alguns compostos carbonílicos podem ser oxidados, gerando estados excitados por meio da ação catalítica da peroxidase de raiz forte (HRP). O mecanismo proposto para estas reações indica que a forma enólica, gerada a partir do equilíbrio ceto-enólico, é o verdadeiro substrato da peroxidase⁽⁴⁰⁾. Seguindo esta

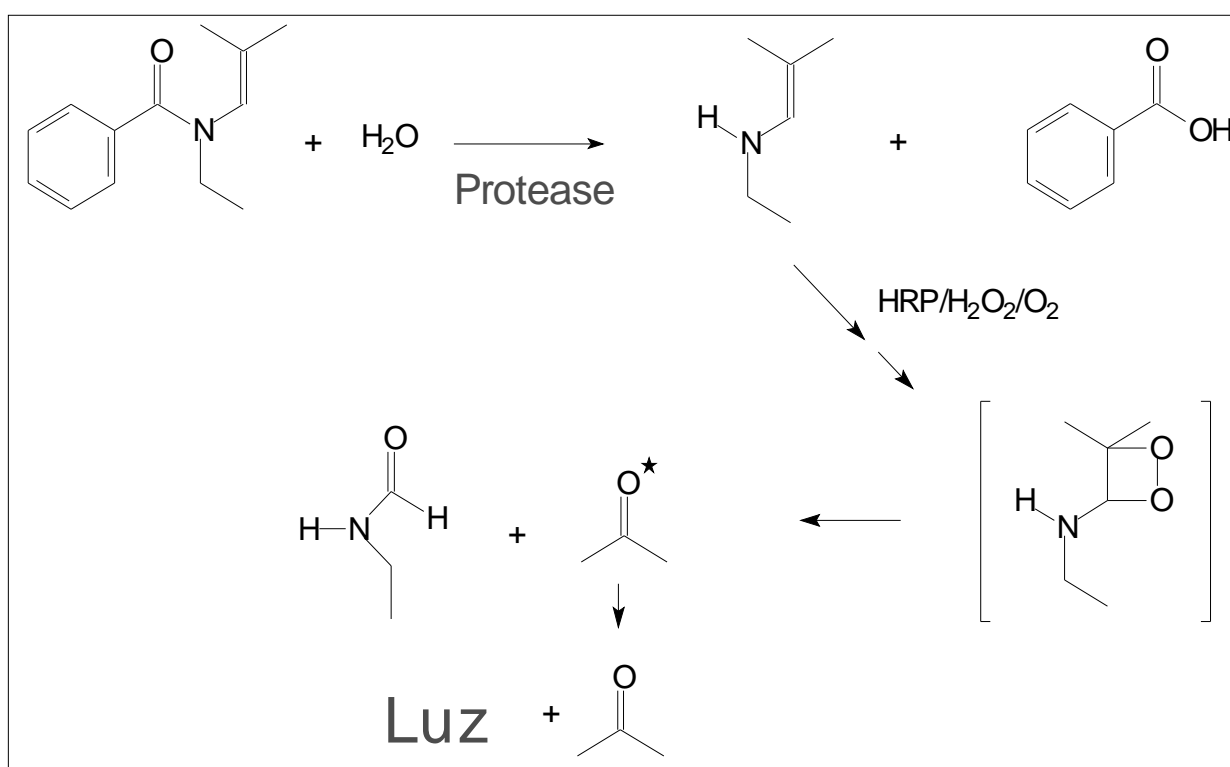
propriedade foi sintetizado um enol protegido por um grupo fosfato, a fim de que o mesmo pudesse ser hidrolisado via ação catalítica das enzimas fosfatase alcalina e ácida e, como resultado, gerar quimiluminescência após oxidação (esquema 2.2).



Esquema 2.2- Proposta de desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente para análise de fosfatases alcalina e ácida

ii) **Hidrólise de enaminas protegidas e posterior oxidação catalisada por HRP: desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente para determinação quantitativa de proteases.**

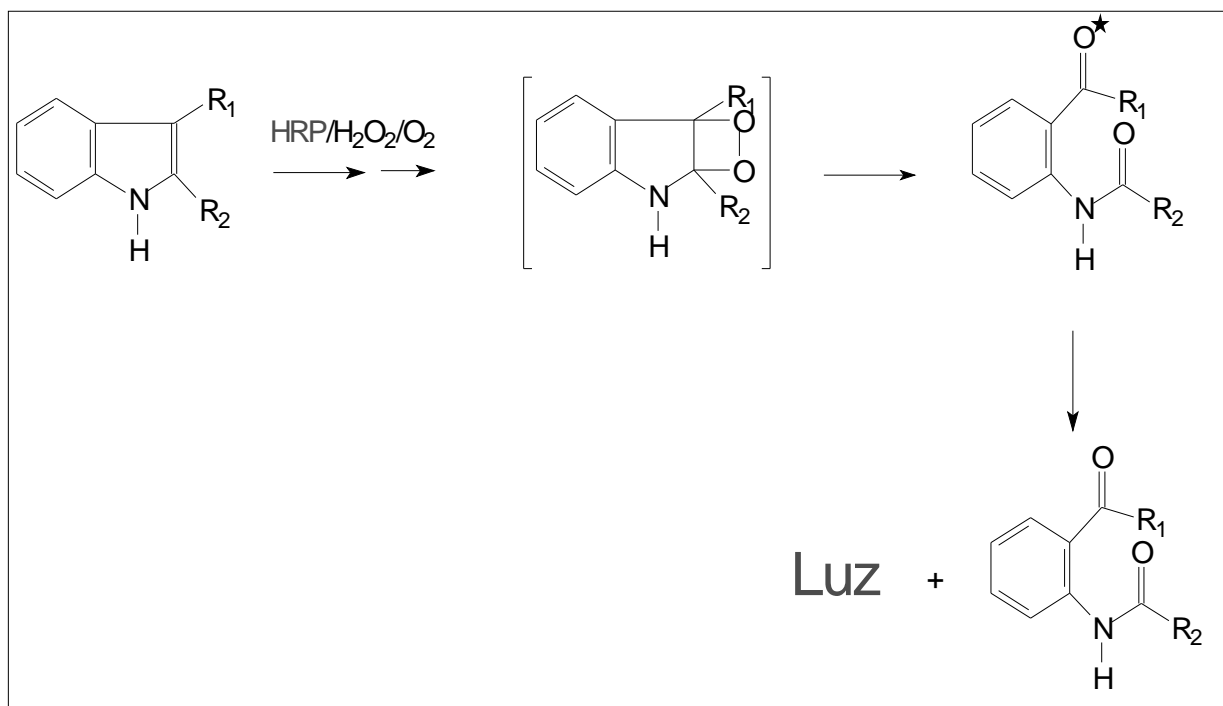
Assim como no caso dos aldeídos, enaminas, que seriam geradas através do equilíbrio imina-enamina, foram propostas como substratos da HRP⁽³⁷⁾. Partindo do mesmo princípio do primeiro item, realizou-se a síntese de uma enamina protegida. A hidrólise desse composto, catalisada por proteases, visto tratar-se de uma ligação amídica, produziria uma enamina que então seria oxidada via HRP. O substrato *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida foi escolhido para testar a viabilidade da metodologia e, caso o resultado fosse positivo, novos substratos com cadeias polipeptídicas específicas poderiam ser sintetizados, visando proteases específicas. O esquema 2.3 a seguir mostra o princípio da técnica.



Esquema 2.3- Proposta de desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente para análise de proteases

iii) **Oxidação de derivados indólicos: desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente para determinação quantitativa da peroxidase de raiz forte (HRP).**

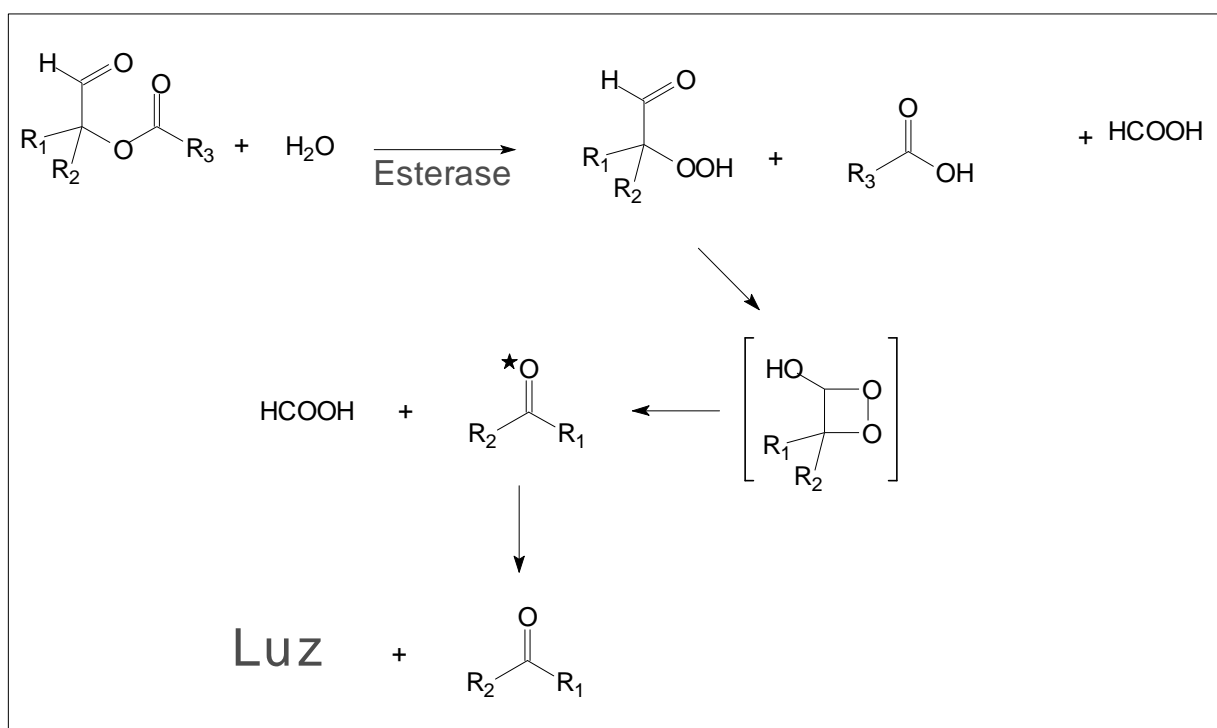
A similaridade estrutural entre o núcleo pirrólico dos derivados indólicos e as enaminas alifáticas, o conhecimento das características quimiluminescentes da oxidação dessas últimas via HRP/H₂O₂, o conhecimento das propriedades quimiluminescentes dos derivados indólicos quando submetidos a oxidação química^(49,50,51) e, finalmente, a proposta de que um produto do tipo quinurenínico (abertura do anel pirrólico) poderia estar entre os produtos de oxidação do éster etílico do ácido 2-(3-indolil)acético⁽³⁵⁾, levou-nos a um estudo do potencial quimiluminescente da oxidação de uma série de derivados indólicos catalisada por peroxidase de raiz forte (esquema 2.4). Aqui buscávamos metodologias quimiluminescentes para determinação de atividade de peroxidases, como a própria HRP ou outras peroxidases como a mieloperoxidase presentes em neutrófilos.



Esquema 2.4- Proposta de desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente para análise de peroxidases

iv) **Hidrólise de α -hidroperóxi-aldeídos protegidos: desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente para determinação quantitativa de esterases.**

Como foi exposto na introdução, α -hidroperóxi-aldeídos protegidos por um grupo silila foram sintetizados e as suas desproteções geraram quimiluminescência. Partindo deste princípio, um composto desse tipo, protegido por um grupo acila, foi sintetizado. O objetivo, neste caso era que o mesmo pudesse ser hidrolisado via ação catalítica de esterases e, conseqüentemente, atuar como uma sonda quantitativa de sua atividade (esquema 2.5).



Esquema 2.5- Proposta de desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente para análise de esterases

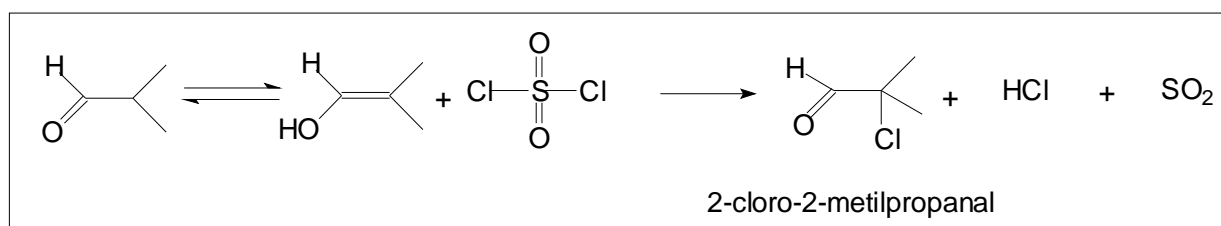
3- Desenvolvimento de uma Metodologia Quimiluminescente para Análise de Atividade de Fosfatase Alcalina e Fosfatase Ácida

3.1- Resultados

Tendo como objetivo último desenvolver uma metodologia quimiluminescente para quantificação de atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida, os trabalhos foram iniciados com a síntese dos sais de anilínio e de sódio do fosfato de 2-metilpropen-1-ila, que serão designados como anilina-MPP e sódio-MPP respectivamente, e que seriam possíveis substratos das fosfatases. Abaixo descreve-se, passo a passo, como estes compostos foram obtidos.

3.1.1- Preparação do 2-cloro-2-metilpropanal⁽⁹¹⁾

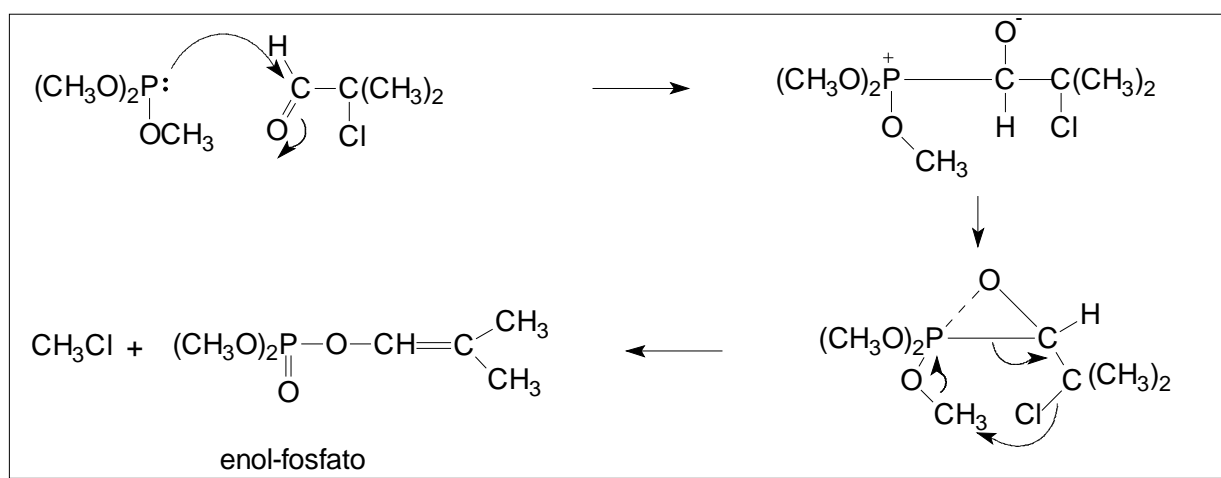
Preparou-se este composto por meio da α -halogenação do 2-metilpropanal. Trata-se de uma reação de halogenação de compostos carbonílicos cujo princípio é o ataque nucleofílico do enol sobre o átomo de cloro do cloreto de sulfurila. (esquema 3.1). O rendimento foi de 49%.



Esquema 3.1- Preparação do 2-cloro-2-metilpropanal

3.1.2- Preparação do fosfato de dimetila e 2-metilpropen-1-ila⁽⁹²⁾

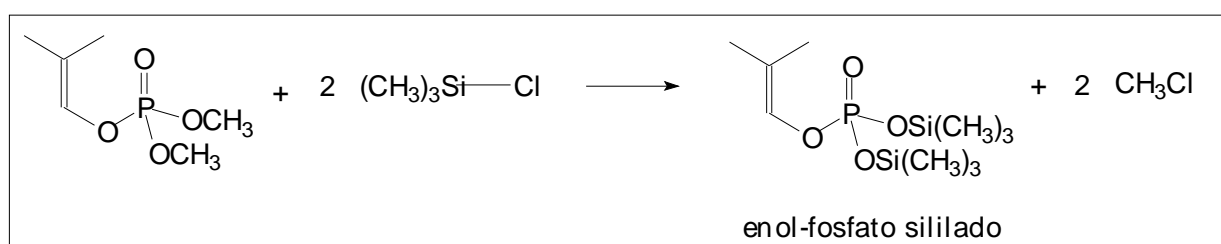
Preparou-se este enol-fosfato por meio da reação de Perkov⁽⁹³⁾, que consiste na reação entre um composto carbonílico α -halogenado (aldeídos, cetonas e alguns ésteres e amidas) e ésteres de fósforo trivalente (neste trabalho, utilizou-se fosfito de metila). Trata-se de uma reação de ótimo rendimento e que tem como possível mecanismo a formação de um intermediário cíclico. O rendimento obtido foi de 82% (esquema 3.2).



Esquema 3.2- Preparação do fosfato de dimetila e 2-metilpropen-1-ila

3.1.3- Preparação do fosfato de bis(trimetilsilila) e 2-metilpropen-1-ila⁽⁹⁴⁾

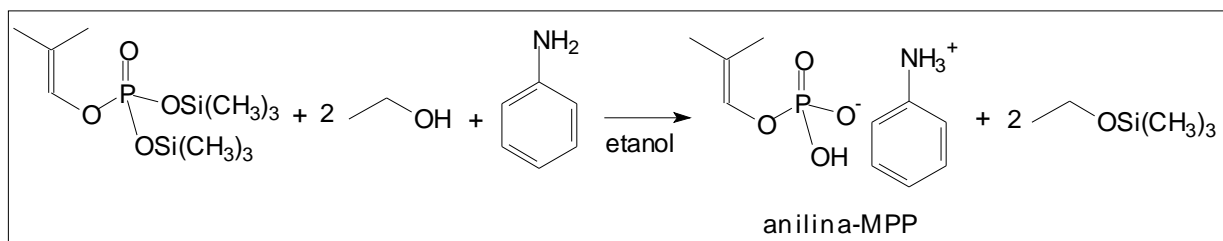
Para tornar o enol-fosfato solúvel em meio aquoso, este deveria ser transformado no seu sal correspondente. Para isso, o primeiro passo foi realizar a sua de-metilação através da reação com cloreto de trimetilsilano. O rendimento foi de 56% (esquema 3.3).



Esquema 3.3- Preparação do fosfato de bis(trimetilsilila) e 2-metilpropen-1-ila

3.1.4- Preparação do hidrogenofosfato de anilínio e 2-metilpropen-1-ila⁽⁹⁴⁾

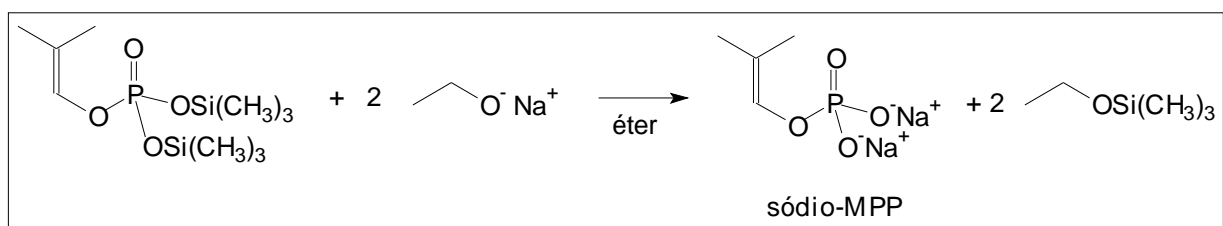
Este passo final, para síntese do substrato anilina-MPP, foi realizado utilizando-se etanol em excesso para desproteção do grupo fosfato, e anilina como base necessária à formação do sal. O rendimento foi de 70% (esquema 3.4).



Esquema 3.4- Preparação do hidrogenofosfato de anilínio e 2-metilpropen-1-ila

3.1.5- Síntese do fosfato dissódico de 2-metilpropen-1-ila⁽⁹⁵⁾

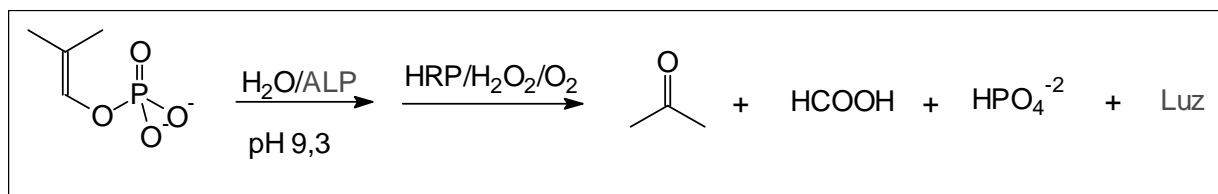
Para preparação do substrato sódio-MPP utilizou-se um técnica adaptada de um procedimento para síntese de fosfoenolpiruvato, que consiste em desproteger o enol-fosfato sililado com etóxido de sódio (esquema 3.5). O rendimento foi de 77%.



Esquema 3.5- Síntese do fosfato dissódico de 2-metilpropen-1-ila

3.2- Desenvolvimento do protocolo analítico

Uma vez preparados os substratos, iniciaram-se os testes para verificar a viabilidade do sistema e, se o resultado fosse positivo, buscar as condições de maior eficiência. A reação em estudo (esquema 3.6) e o perfil de emissão (figura 3.1), obtido após otimização do sistema estão apresentados abaixo.



Esquema 3.6- Reação quimiluminescente para determinação de fosfatase alcalina (ALP)

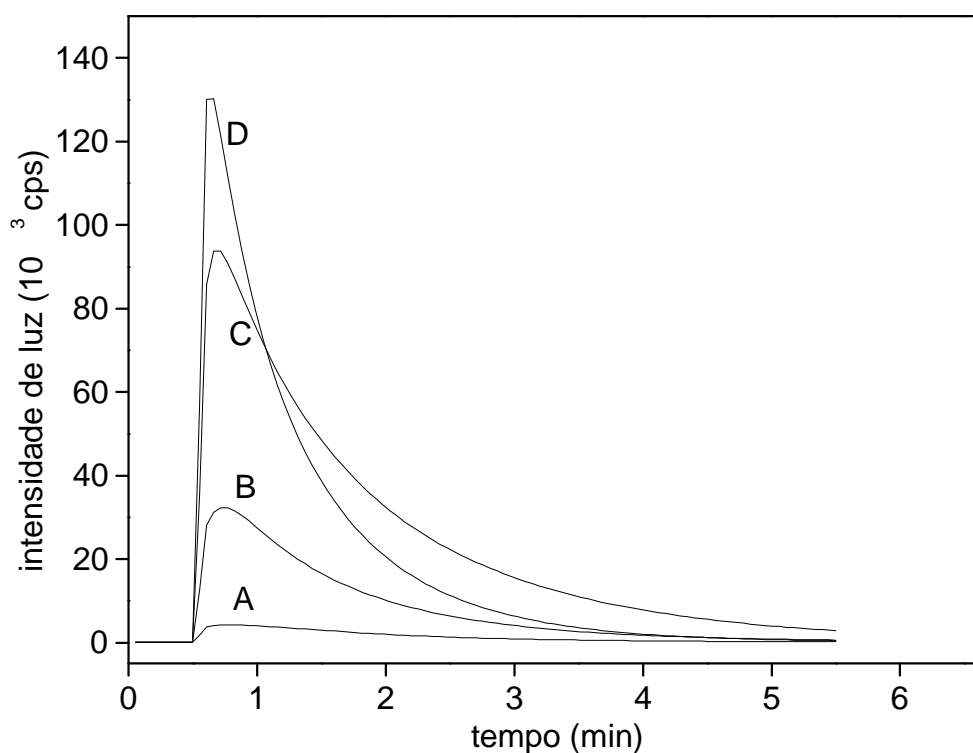


Figura 3.1- Perfil do sinal quimiluminescente em função da atividade da enzima fosfatase alcalina. Concentrações finais: [H₂O₂] = 0,10 mmol/L, [HRP] = 2 μmol/L, [MgCl₂] = 1 mol/L, [sódio-MPP] = 1,0 mmol/L, [AMP] = 0,15 mol/L, pH 9,3, 37°C. [DBAS] = 40 μmol/L. **[ALP] = A 0,09 u/mL, B 0,18 u/mL, C 0,27 u/mL, D 0,36 u/mL**

Embora tenha sido indicado a preparação simultânea dos dois substratos, na verdade o substrato anilina-MPP foi o primeiro a ser sintetizado e estudado. A seguir serão mostrados os ensaios realizados com este substrato para encontrar as melhores condições de análise e eficiência quântica de quimiluminescência. Estes ensaios foram realizados em triplicatas ou duplicatas e para alguns parâmetros, como concentração de peróxido de hidrogênio, concentração de HRP e a concentração de substrato, foram tomados como ponto de partida as condições ótimas obtidas no estudo cinético da quimiluminescência do enol-sililado, realizado por Baader e colaboradores (vide introdução item 1.4.1)⁽⁴¹⁾. Para os parâmetros como concentração de tampão e pH foram tomados como base os valores utilizados em metodologias comuns de determinação de ALP ou ACP⁽⁹⁶⁾. Os testes abaixo foram realizados em um contador de fótons em um volume total de 3 mL e a reação disparada pelo substrato.

Tabela 3.1- Efeito do tipo de tampão sobre a intensidade máxima de luz

| <i>Tampão</i> | <i>Intensidade de luz (V)</i> |
|---------------------------------|-------------------------------|
| 2-amino-2-metil-propanol | 0,19 ± 0,03 |
| Carbonato | 0,08 ± 0,02 |
| Glicina | 0,15 ± 0,02 |

Concentrações finais: [H₂O₂] = 0,10 mmol/L, [HRP] = 2 µmol/L, [ALP] = 18 u/mL, [MgCl₂] = 1 mmol/L, [DBAS] = 30 µmol/L, [anilina-MPP] = 30 mol/L, [tampões] = 0,90 mol/L, pH 10,4, 37°C

Tabela 3.2- Efeito da concentração do tampão 2-amino-2-metil-propanol (AMP) sobre a intensidade máxima de luz

| <i>[AMP] (mol/L)</i> | <i>Intensidade (V)</i> |
|----------------------|------------------------|
| 0,90 | 0,17 ± 0,02 |
| 0,45 | 0,20 ± 0,02 |
| 0,15 | 1,25 ± 0,16 |
| 0,10 | 1,01 ± 0,14 |

Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10 \text{ mol/L}$, $[HRP] = 2 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $[ALP] = 18 \text{ u/mL}$, $[MgCl_2] = 1 \text{ mmol/L}$, $[DBAS] = 30 \text{ } \mu\text{mol/L}$; [anilina-MPP] = 30 mmol/L, pH 10,4, 37°C

Tabela 3.3- Efeito da concentração do substrato [anilina-MPP] sobre a intensidade máxima de luz

| <i>Anilina-MPP (mM)</i> | <i>Intensidade (V)</i> |
|-------------------------|------------------------|
| 30 | $1,27 \pm 0,25$ |
| 10 | $3,20 \pm 0,17$ |
| 5 | $3,90 \pm 0,27$ |
| 2.5 | $2,80 \pm 0,10$ |

Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10 \text{ mmol/L}$, $[HRP] = 2 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $[ALP] = 18 \text{ u/mL}$, $[MgCl_2] = 1 \text{ mmol/L}$, $[DBAS] = 30 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $[AMP] = 0,15 \text{ mol/L}$, pH 10,4; 37°C

Tabela 3.4- Efeito do pH do tampão sobre a intensidade máxima de luz

| <i>pH do tampão [AMP] 0,15 M</i> | <i>Intensidade (V)</i> |
|----------------------------------|------------------------|
| 8,5 | $1,15 \pm 0,21$ |
| 9,3 | $4,05 \pm 0,22$ |
| 9,8 | $3,70 \pm 0,20$ |
| 10,4 | $2,75 \pm 0,06$ |
| 11,0 | $1,40 \pm 0,14$ |

Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10 \text{ mmol/L}$; $[HRP] = 2 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[ALP] = 10 \text{ u/mL}$; $[MgCl_2] = 1 \text{ mol/L}$; $[DBAS] = 30 \text{ } \mu\text{mol/L}$; [anilina-MPP] = 5,0 mmol/L; [AMP] = 0,15 mol/L; 37°C

Tabela 3.5- Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sobre a intensidade máxima de luz

| <i>$[H_2O_2]$ mM</i> | <i>Intensidade (V)</i> |
|---------------------------------|------------------------|
| 0.05 | $3,30 \pm 0,20$ |
| 0.10 | $3,87 \pm 0,08$ |
| 0.20 | $4,00 \pm 0,10$ |

| | |
|-------------|-----------------|
| 0.30 | $3,45 \pm 0,05$ |
|-------------|-----------------|

Concentrações finais: [HRP] = 2 $\mu\text{mol/L}$; [ALP] = 10 u/mL, [MgCl₂] = 1 mmol, [DBAS] = 30 $\mu\text{mol/L}$, [anilina-MPP] = 5,0 mmol/L, [AMP] = 0,15 mol/L, pH 9,3, 37°C

Tabela 3.6- Efeito da concentração de peroxidase de raiz forte (HRP) sobre a intensidade máxima de luz

| <i>[HRP] μM</i> | <i>Intensidade (V)</i> |
|---------------------------------------|------------------------|
| 0,5 | $1,98 \pm 0,17$ |
| 1,0 | $2,42 \pm 0,32$ |
| 2,0 | $3,27 \pm 0,24$ |
| 4,0 | $3,50 \pm 0,30$ |

Concentrações finais: [H₂O₂] = 0,10 mmol/L, [ALP] = 10 u/mL, [MgCl₂] = 1 mmol/L, [DBAS] = 30 $\mu\text{mol/L}$, [anilina-MPP] = 5,0 mmol/L, [AMP] = 0,15 mol/L, pH 9,3, 37°C

3.2.1- Sal de anilínio *versus* sal de sódio

Objetivando aumentar a sensibilidade da metodologia, resolveu-se trocar o contra-íon do sal de enol-fosfato. A idéia era avaliar a interferência do íon anilínio no meio de reação, pois é conhecido o efeito supressor que as aminas exercem sobre estados excitados. Além disso, sendo os sais sódicos, em geral, bastante solúveis em meio aquoso, haveria a possibilidade de um aumento da solubilidade do substrato, tornando-o mais adequado a uma reação enzimática. O resultado foi excelente, pois ao contrário do substrato anilina-MPP, a solução estoque de sódio-MPP pode ser preparada em meio aquoso e foi obtido um aumento significativo no rendimento quântico de quimiluminescência.

Foram realizados alguns ensaios semelhantes aos anteriores (não mostrados) e concluiu-se que, de modo geral, as condições ótimas obtidas para o substrato anilina-MPP eram também verificadas para o substrato sódio-MPP. Uma exceção foi a concentração ótima do substrato. Neste caso, obteve-se os melhores resultados utilizando-se 1 mmol/L como concentração final para o mesmo. Abaixo é apresentado uma comparação entre os sinais quimiluminescentes obtidos com

ambos os substratos. Observe que agora foram utilizados apenas 0,5 u/mL de ALP e 5 $\mu\text{mol/L}$ de DBAS (figura 3.2).

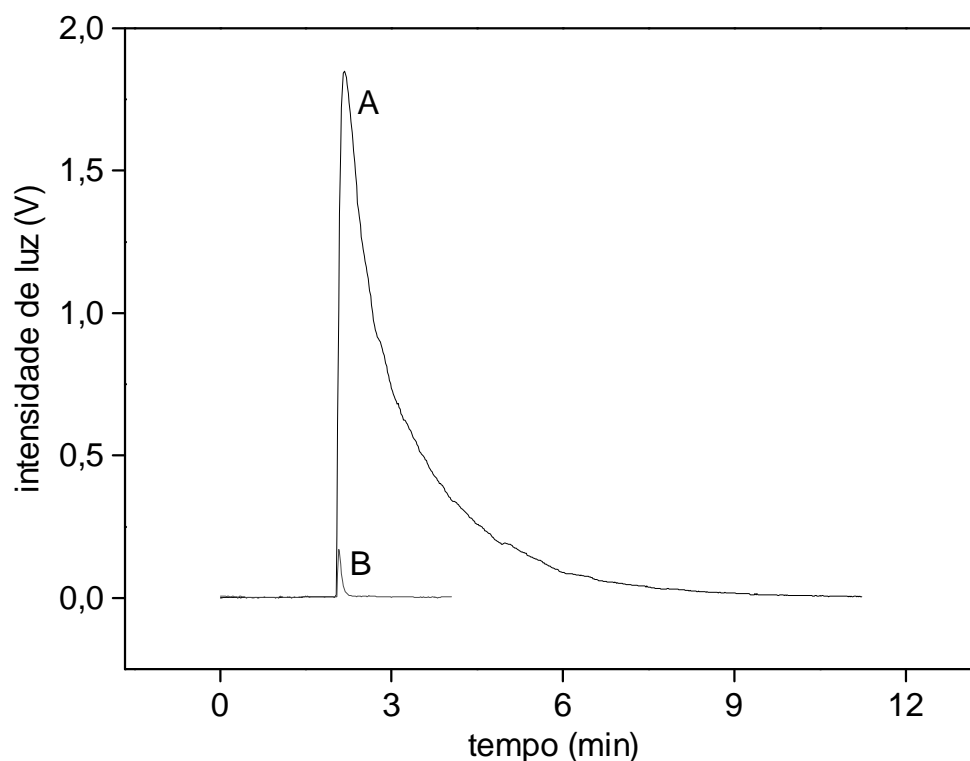


Figura 3.2- Comparação entre os sinais quimiluminescentes dos substratos anilina-MPP e sódio-MPP. Concentrações finais: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,10 \text{ mmol/L}$, $[\text{HRP}] = 2 \mu\text{mol/L}$, $[\text{ALP}] = 0,5 \text{ u/mL}$, $[\text{MgCl}_2] = 1 \text{ mmol/L}$, $[\text{DBAS}] = 5 \mu\text{mol/L}$, $[\text{anilina-MPP}] = 1,0 \text{ mmol/L}$, $[\text{sódio-MPP}] = 1,0 \text{ mmol/L}$, $[\text{AMP}] = 0,15 \text{ mol/L}$, pH 9,3, 37°C. (A) substrato sódio-MPP; (B) substrato anilina-MPP

3.2.2- Efeito da concentração de DBAS e DMSO na atividade da fosfatase alcalina e quimiluminescência

Se por um lado o uso de DBAS intensifica o sinal de luz por sensibilização das carbonilas tripletes formadas, por outro lado nada se conhecia sobre a ação que o mesmo poderia exercer sobre a atividade catalítica da fosfatase alcalina. Resolveu-se, então, estudar o efeito do mesmo e também o efeito do solvente utilizado para preparar as soluções estoques sobre a atividade da enzima. Para investigar estas possibilidades foi estudado como o consumo de oxigênio dissolvido, característica básica dessa reação, estava sendo afetado por estes reagentes. A vantagem em se

utilizar como parâmetro de medida a velocidade do consumo de oxigênio está no fato de que se monitora o papel desses reagentes diretamente sobre a atividade da fosfatase e não a possível supressão ou sensibilização do produto em estado excitado, o que poderia gerar resultados falsos. Em outras palavras, a reação é monitorada passos antes da geração de estados excitados. Como mostra a tabela 3.7, estes reagentes realmente provocam um decréscimo de até 50% na velocidade de consumo de oxigênio e, assumindo que a etapa lenta da reação é a hidrólise do substrato catalisada pela ALP, estes resultados indicam uma inibição dessa enzima.

Tabela 3.7 Efeito da concentração de DMSO e DBAS na velocidade relativa de consumo de oxigênio

| [DMSO] (mmol/L) | [DBAS] ($\mu\text{mol/L}$) | Vel. Rel. Cons .O₂ |
|----------------------------|--|--------------------------------------|
| 0 | 0 | 1 |
| 0,35 | 10 | 0,41 |
| 0,35 | 0 | 0,55 |
| 0,18 | 10 | 0,56 |
| 0,18 | 0 | 0,59 |
| 0,035 | 10 | 0,84 |
| 0,035 | 0 | 0,88 |

Concentrações finais: [H₂O₂] = 0,10 mmol/L, HRP = 2 $\mu\text{mol/L}$, [ALP] = 0,11 u/mL, [MgCl₂] = 1 mmol/L, [sódio-MPP] = 1,0 mmol/L, [AMP] = 0,15 mol/L, pH 9,3, 37°C. Os valores de concentração indicados na tabela representam as concentrações finais. As velocidades de consumo de oxigênio foram medidas dividindo o decréscimo na concentração do mesmo em função de um intervalo de tempo fixado. O teste controle sem DMSO ou DBAS foi tomado como referencial

Uma vez verificado o significativo efeito inibidor que o DMSO exercia sobre a atividade ALP, passou-se a utilizar uma solução estoque o mais concentrada possível de DBAS em DMSO, a fim de diminuir o efeito do solvente. A seguir será mostrada a correlação entre a intensidade de luz e a concentração do sensibilizador (figura 3.3). A saturação foi alcançada para concentrações de DBAS em torno de 50 $\mu\text{mol/L}$. Acima desta concentração observou-se um decréscimo na intensidade de luz, o que pode ser fruto do efeito inibidor mencionado acima sobre a ALP.

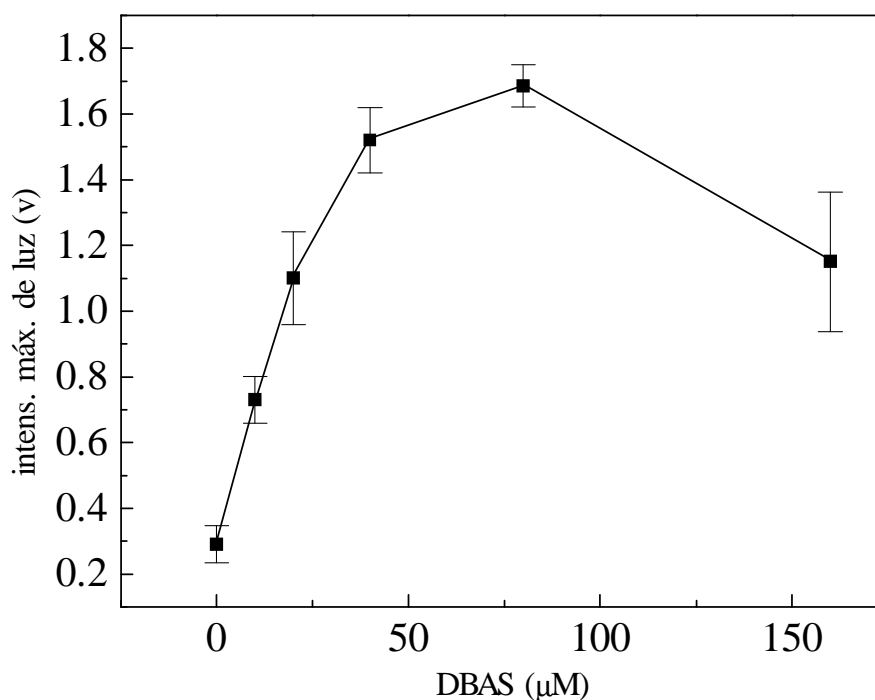


Figura 3.3- Efeito da concentração de DBAS sobre a intensidade máxima de luz. Concentrações finais: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,10 \text{ mmol/L}$, $[\text{HRP}] = 2 \mu\text{mol/L}$, $[\text{ALP}] = 0,011 \text{ u/mL}$, $[\text{MgCl}_2] = 1 \text{ mmol/L}$; [sódio-MPP] = $1,0 \text{ mmol/L}$, [AMP] = $0,15 \text{ mol/L}$, pH 9,3, 37°C

3.2.3- Correlação [ALP] *versus* intensidade máxima de luz

Após alcançar as condições ótimas para o ensaio quimiluminescente de detecção de fosfatase alcalina, determinou-se as curvas de calibração [ALP] x intensidade de luz a fim de avaliar a correlação existente e também o limite de detecção alcançado pela técnica. Como está mostrado abaixo (figura 3.4), o eixo das abscissas está projetado em log de mols de ALP, que embora não seja comum para expressar atividade enzimática, é usual quando se deseja expressar o limite de detecção alcançado por alguma técnica ou substrato. Para obter estes valores a massa de proteína (enzima) foi dividida pelo seu peso molecular. Supondo que a enzima tenha perdido parcialmente a sua atividade, o limite de detecção real pode ser menor do que o aqui apresentado. Na figura abaixo são apresentados quatro curvas de calibração em função da quantidade de DBAS utilizada. Embora isto tenha sido feito devido a estreita faixa de detecção do contador de fótons utilizado, este resultado mostra que a concentração de DBAS poderá, em princípio, ser ajustada para cobrir uma determinada faixa de concentração de enzima, conforme a necessidade.

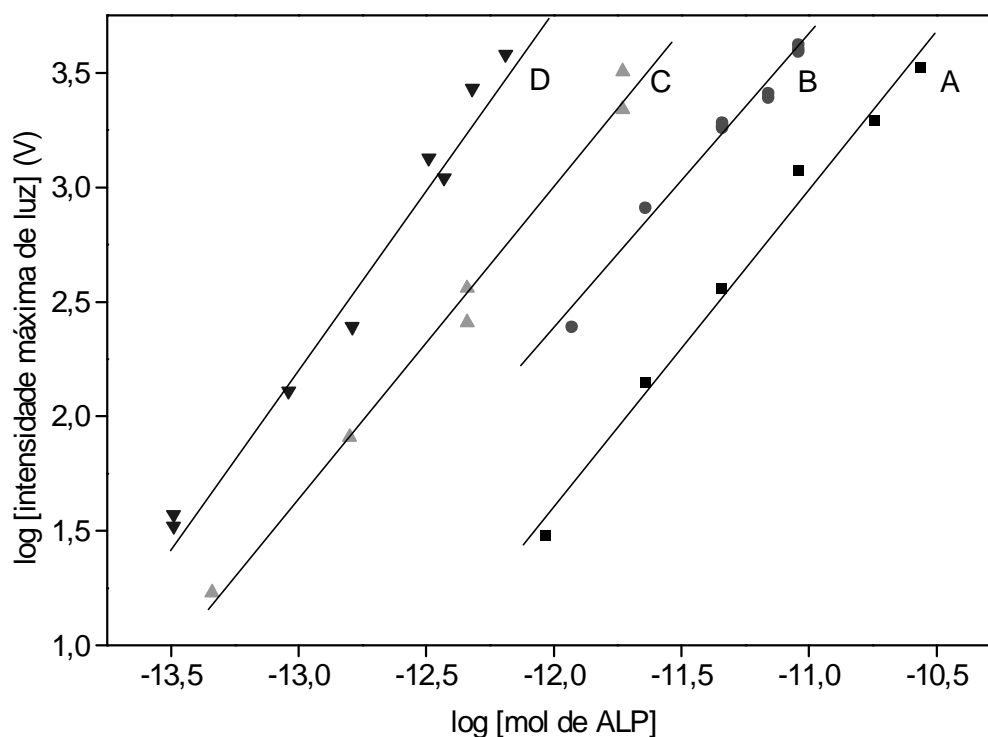


Figura 3.4- Curvas de calibração, [ALP] *versus* Intensidade máxima de luz em várias concentrações de DBAS, obtido em um contador de fótons. Concentrações

finais: $[H_2O_2] = 0,10 \text{ mmol/L}$, $[HRP] = 2\mu\text{mol/L}$, $[MgCl_2] = 1 \text{ mmol/L}$, $[\text{sódio-MPP}] = 1,0 \text{ mmol/L}$, $[AMP] = 0,15 \text{ mol/L}$, pH 9,3, 37°C. **[DBAS] ($\mu\text{mol/L}$): A = 0, B= 1, C= 10, D =**

40

Após a aquisição de um luminômetro comercial, capacitado para leituras em microplacas utilizadas em testes imunológicos, repetiu-se os ensaios de determinação da curva [ALP] x Luz. Este novo aparelho, além de mais sensível (cerca de uma ordem de grandeza quando comparado ao contador de fótons utilizado), possui uma faixa de operação bastante superior, não sendo necessário utilizar várias concentrações de DBAS. O limite de detecção alcançado foi da ordem de 10^{-15} mol de ALP em 0,3 mL (figura 3.5).

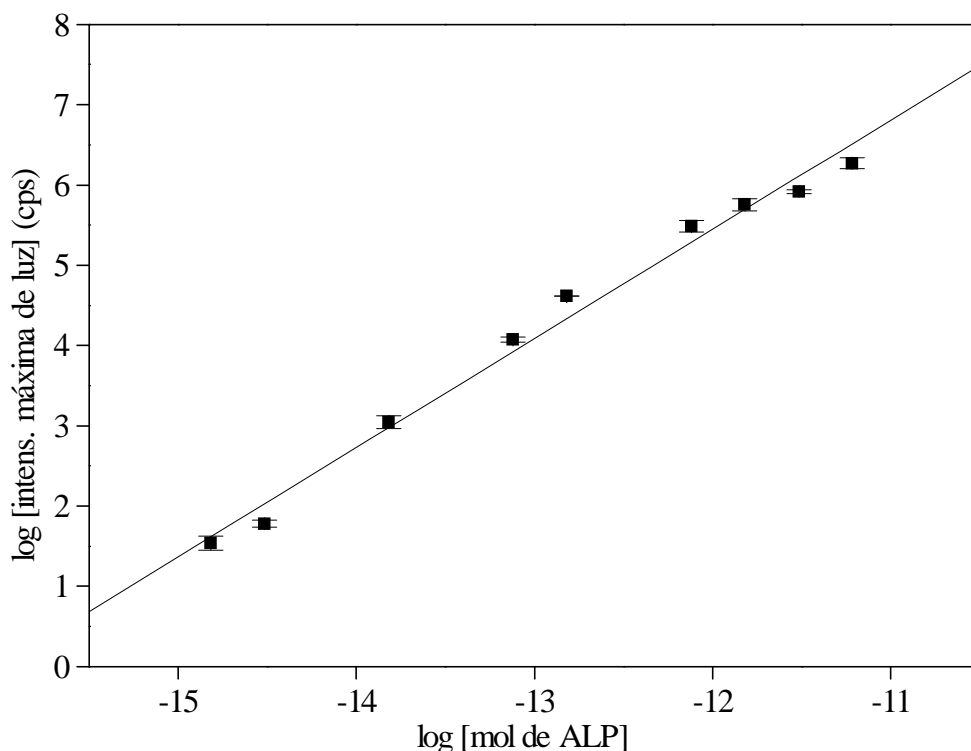
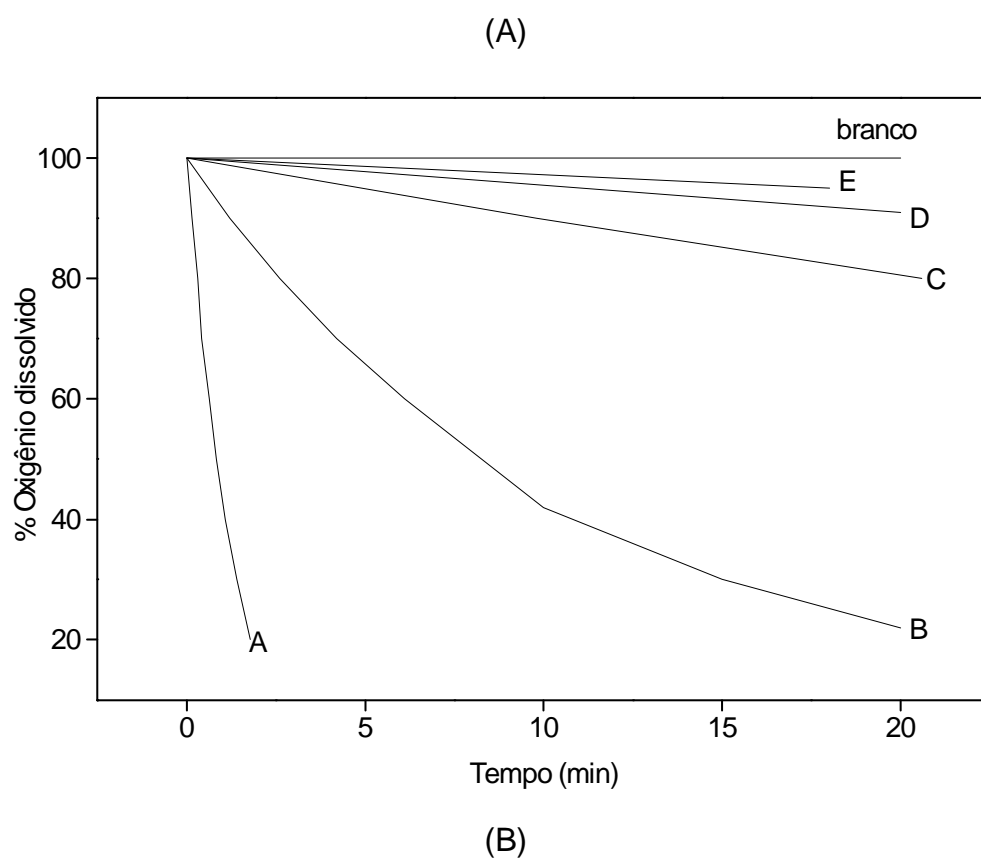


Figura 3.5- Curva de calibração [ALP] x intensidade máxima de luz obtido em um luminômetro de placas ($r = 0,994$, desvio padrão = $\pm 0,21$, $N = 18$).

Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10 \text{ mmol/L}$, $[HRP] = 2\mu\text{mol/L}$; $[MgCl_2] = 1 \text{ mmol/L}$; $[\text{sódio-MPP}] = 1,0 \text{ mmol/L}$, $[AMP] = 0,15 \text{ mol/L}$, pH 9,3, 37°C. **[DBAS] 40 $\mu\text{mol/L}$.**

3.2.4- Correlação [ALP] versus consumo de oxigênio

Também foi possível fazer uma correlação entre a concentração de enzima e a velocidade de consumo do oxigênio dissolvido no meio de reação. A seguir será mostrado o perfil de consumo e a curva de calibração obtida (figura 3.6 (A) e (B)). Como pode ser observado, o limite de detecção alcançado foi praticamente o mesmo que se observou quando se utiliza a quimiluminescência como sinal analítico.



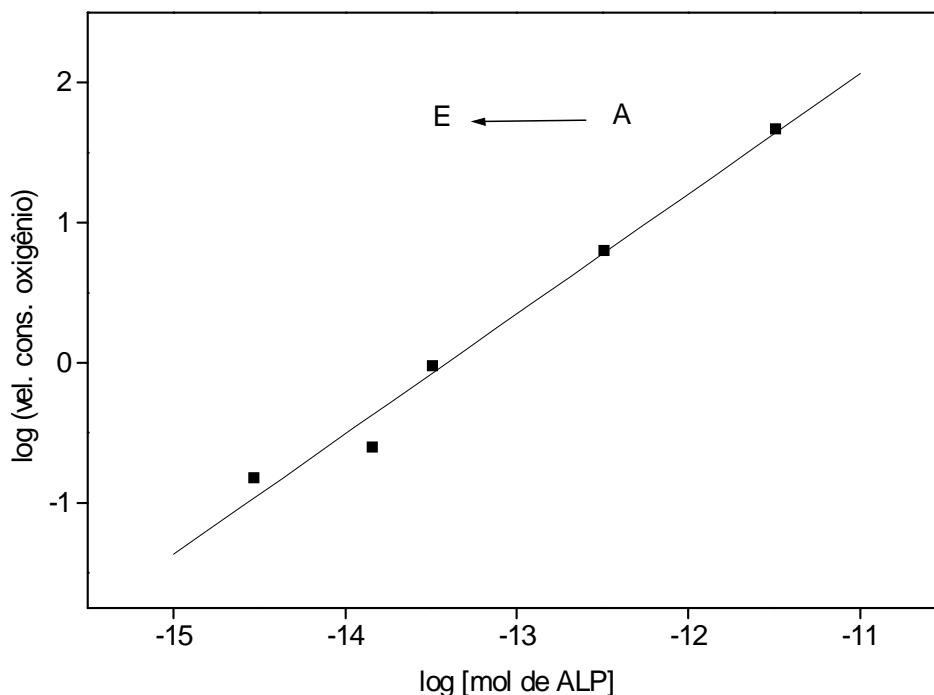


Figura 3.6- (a) Perfil de consumo de oxigênio em função da concentração de ALP. (b) Curva de calibração velocidade de consumo de oxigênio *versus* [ALP] ($r = 0,991$, desvio padrão = $\pm 0,16$, $N = 5$). Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10$ mmol/L; $[HRP] = 2$ μ mol/L; $[MgCl_2] = 1$ mmol/L; [sódio-MPP] = $1,0$ mmol/L, $[AMP] = 0,15$ mol/L, pH 9,3, $37^\circ C$.

3.2.5- Aplicação em análise de atividade de ALP em soro sanguíneo humano

Uma das possíveis aplicações da metodologia quimiluminescente em desenvolvimento é a determinação da atividade da ALP em soro sanguíneo humano, que, como foi apresentado na introdução, é utilizada no diagnóstico de doenças ósseas e hepáticas. Para testar esta possibilidade, foram colhidos soros sanguíneos de pacientes que apresentavam esta enzima alterada ou normal (material cedido pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário). Fez-se então uma comparação entre os resultados obtidos com a metodologia quimiluminescente em desenvolvimento, e os valores encontrados por meio de uma metodologia comercial. Para isso, os soros sanguíneos foram submetidos ao ensaio convencional (método espectrofotométrico, vide parte experimental); obteve-se assim os valores de ALP segundo esta técnica, os quais foram projetados na abscissa. A seguir, as mesmas amostras foram submetidas a metodologia quimiluminescente e os valores, projetados na ordenada. A figura 3.7 mostra que uma boa correlação foi observada.

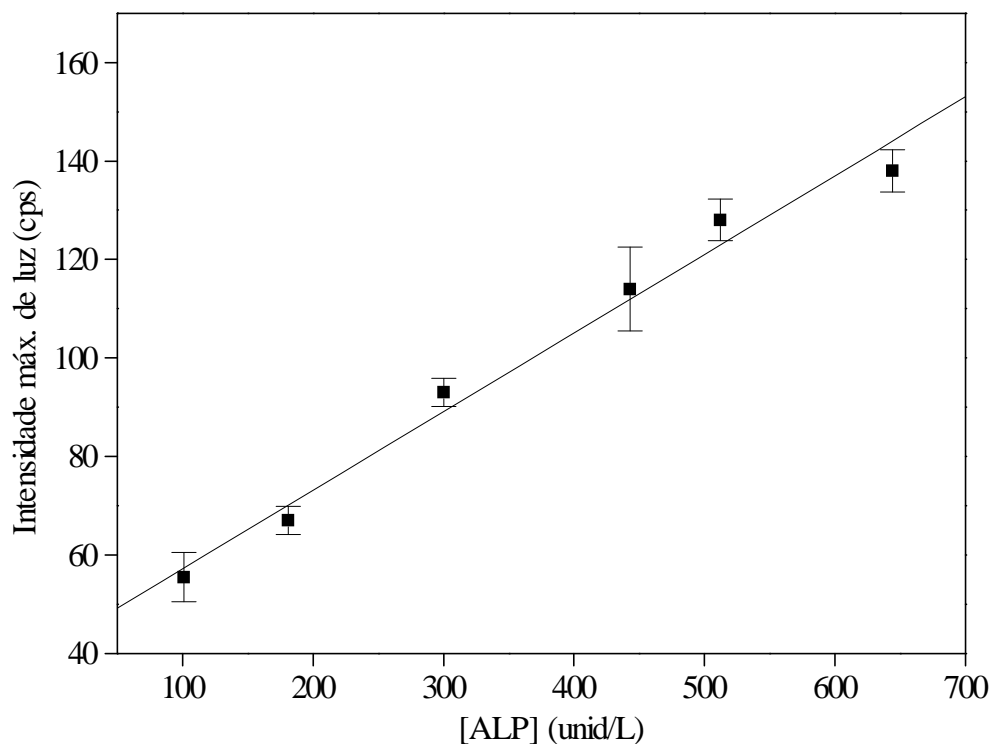


Figura 3.7- Comparação entre os métodos quimiluminescente e espectrofotométrico de análise de atividade de ALP. Abscissa = método espectrofotométrico, ordenada = método quimiluminescente. ($r = 0,991$, desvio padrão = $\pm 4,85$, $N = 12$). Concentrações finais: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,10 \text{ mmol/L}$, $[\text{HRP}] = 2 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $[\text{MgCl}_2] = 1 \text{ mmol/L}$; $[\text{sódio-MPP}] = 1,0 \text{ mmol/L}$, $[\text{AMP}] = 0,15 \text{ mol/L}$, pH 9,3, 37°C , $[\text{DBAS}] = 40 \text{ } \mu\text{mol/L}$

3.2.6- Aplicação em técnicas de imunoenaios (conjugados de ALP)

A segunda possível aplicação desta metodologia quimiluminescente está na determinação quantitativa de conjugados de fosfatase alcalina, que como foi exposto anteriormente, são largamente utilizados em enzimaímunoensaios (EIA). Para isso, adquiriu-se um conjugado do tipo ALP-IgG anti-humano (Sigma nº 9919). É comum, quando se trata de ensaios imunológicos, expressar o limite de detecção por meio do máximo de diluição do conjugado onde ainda se obtém sinal analítico. Abaixo está apresentado a correlação entre a diluição do conjugado e a intensidade máxima de luz (Figura 3.8).

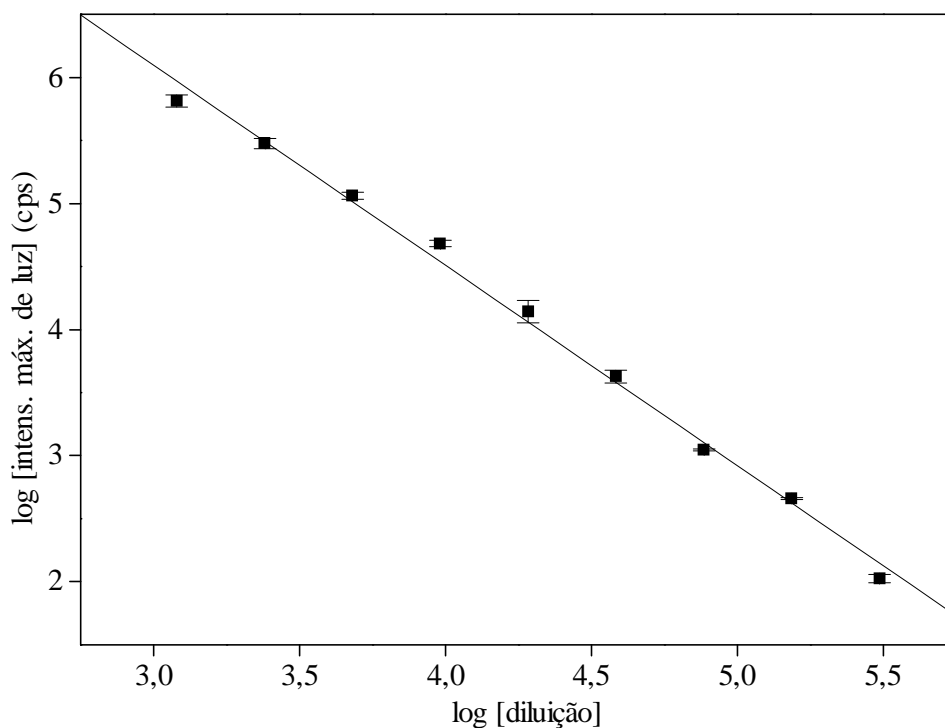


Figura 3.8- Aplicação da metodologia quimiluminescente para quantificação da concentração de um conjugado de ALP (ALP-IgG) $r = 0,997$, desvio padrão = $\pm 0,10$, $N = 18$). Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10$ mmol/L, $[HRP] = 2$ μ mol/L, $[MgCl_2] = 1$ mmol/L, $[s\acute{o}dio-MPP] = 1,0$ mmol/L, $[AMP] = 0,15$ mol/L, pH 9,3, 37°C, $[DBAS] = 40$ μ mol/L

3.2.7- Aplicação do ensaio quimiluminescente como revelador em um ensaio completo para determinar a infecção pelo vírus Epstein-Barr em soro sangüíneo

O ensaio quimiluminescente como sistema revelador em aplicações de EIA foi também testado em um kit comercial para determinação semi-quantitativa de anticorpos anti-Epstein-Barr em soro sangüíneo. Trata-se de um ensaio do tipo “sanduíche”, capaz de detectar espectrofotometricamente a presença e o nível de infecção por este vírus. Basicamente, o kit consta de uma placa com 96 poços nos quais os antígenos estão aderidos. A incubação com o soro sangüíneo positivo permite a formação do complexo antígeno-anticorpo que fica aderido à placa. Depois de uma série de lavagens (vide parte experimental) é adicionado o conjugado anti-humano ALP-IgG, que-se complexa aos anticorpos humanos presentes. O último passo é a adição do revelador, que neste kit é *p*-nitrofenolfosfato. Este reagente sofre hidrólise catalisada por ALP, gerando *p*-nitrofenol que apresenta uma absorbância a 405 nm maior do que o fosfato original.

Para testar a metodologia quimiluminescente, realizou-se todos os passos até a adição do revelador, quando, então, este foi substituído pelo sódio-MPP e por todas as demais condições do ensaio. A seguir, a figura 3.9 apresentará os resultados obtidos utilizando-se os calibradores e um soro controle fornecidos pelo fabricante.

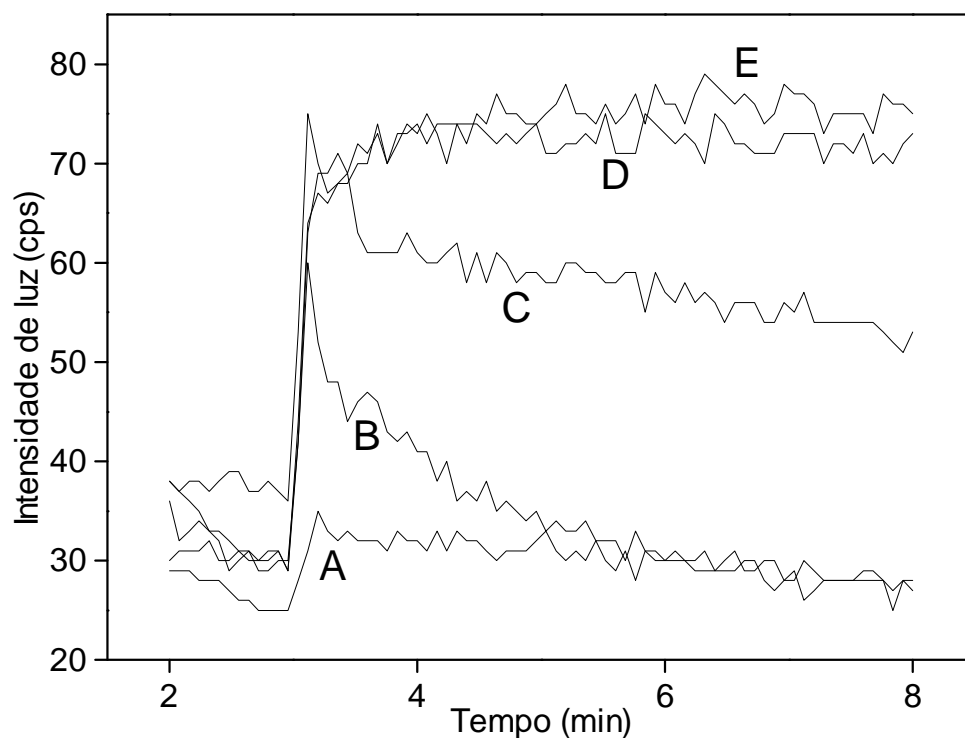


Figura3.9- Enzimaimunoensaio para determinar a infecção pelo vírus Epstein-Barr e revelado pela metodologia quimiluminescência em desenvolvimento. Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10 \text{ mmol/L}$, $[HRP] = 2 \mu\text{mol/L}$, $[MgCl_2] = 1 \text{ mmol/L}$, $[\text{sódio-MPP}] = 1,0 \text{ mmol/L}$, $[AMP] = 0,15 \text{ mol/L}$, pH 9,3, 37°C , $[DBAS] = 40 \mu\text{mol/L}$. **(A) = branco; (B) = calibrador com 15 unidades arbitrárias (Au)/ mL; (C) idem com 210 Au/mL; (D) = idem com 485 Au/mL; (E) = soro controle com 350-600 Au/mL.**

3.2.8- Determinação da atividade da enzima fosfatase ácida prostática

Além da fosfatase alcalina, uma outra forma isoenzimática das monofosfatases, cuja determinação é bastante útil em diagnósticos de doenças, é a fosfatase ácida (ACP). Esta enzima, que apresenta atividade ótima em pH levemente ácido (em torno de 5,0), existe sob duas formas: ACP total no soro e ACP-prostática. A determinação dessa última, como foi descrito na introdução, é de extrema importância no diagnóstico de enfermidades da próstata. Para testar a potencialidade da metodologia em desenvolvimento na determinação de fosfatase ácida adquiriu-se ACP-Prostática comercial, que pode ser submetida ao ensaio sendo apenas necessário alterar o pH para 4,8 (figuras 3.10 e 3.11).

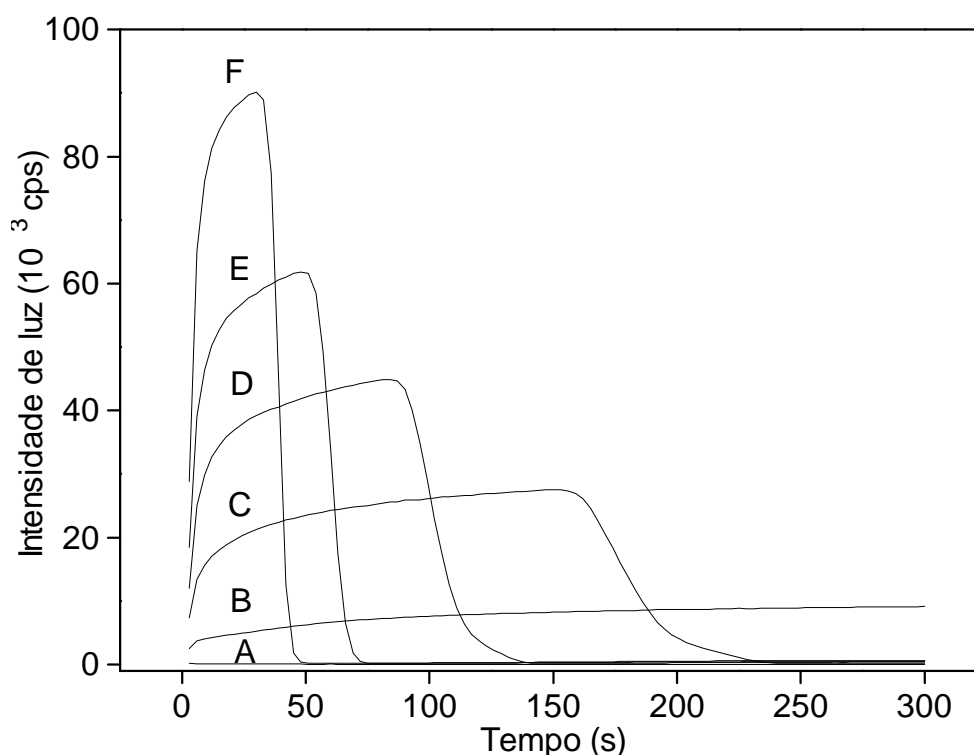


Figura 3.10- Perfil do sinal quimiluminescente em função da atividade da enzima fosfatase ácida prostática. Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10$ mmol/L, $[HRP] = 2$ μ mol/L, $[MgCl_2] = 1$ mmol/L; $[s\acute{o}dio-MPP] = 1,0$ mmol/L $[Tamp\tilde{a}o\ citrato] = 0,05$ mol/L, pH 4,8, 37°C. $[DBAS] = 40$ μ mol/L. **(A) 0,09, (B) 0,023, (C) 0,045, (D) 0,067, (E) 0,090, (F) 0,135 unid/mL**

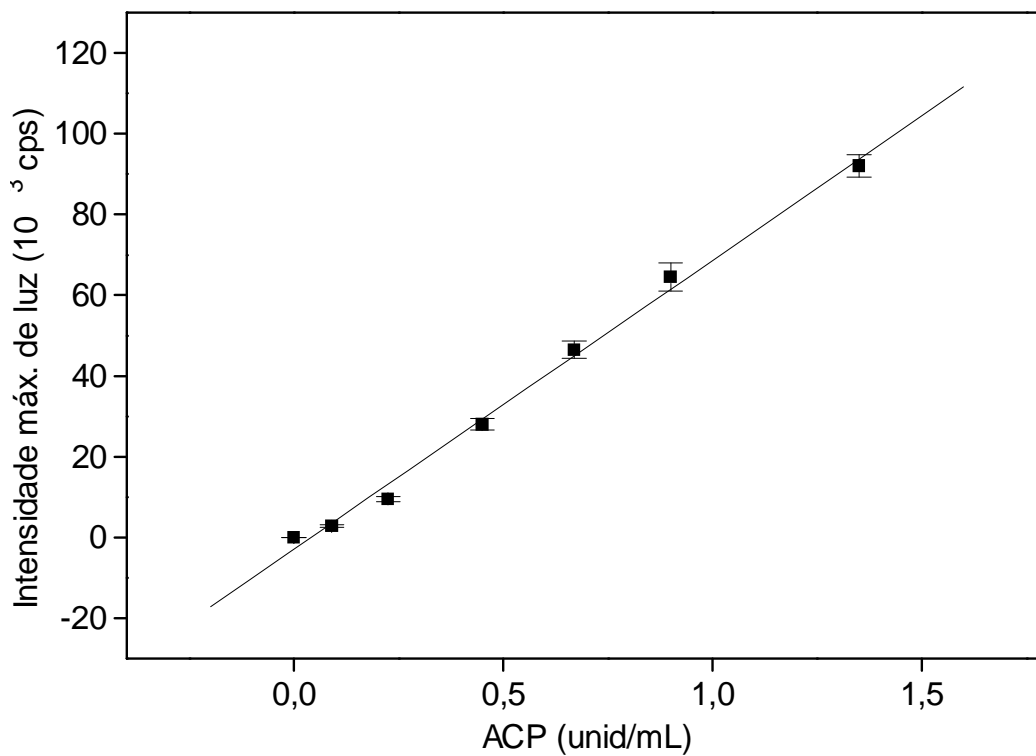
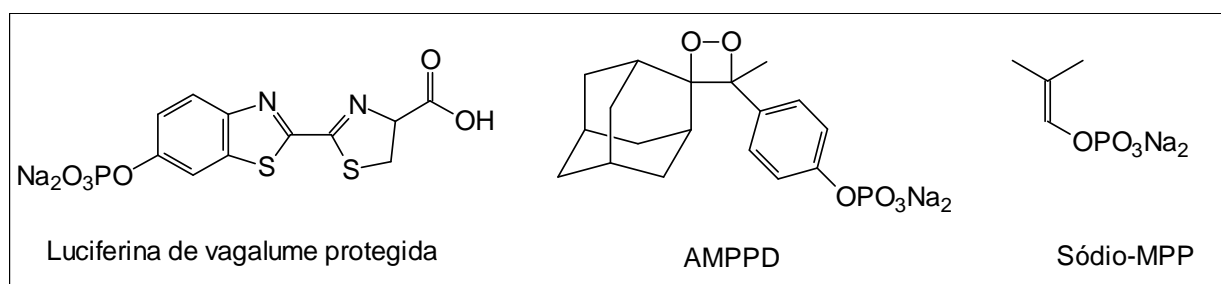


Figura 3.11- Curva de calibração [ACP] *versus* intensidade máxima de luz. Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10$ mmol/L, $[HRP] = 2$ μ mol/L, $[MgCl_2] = 1$ mmol/L; [sódio-MPP] = 1,0 mmol/L [Tampão citrato] = 0,05 mol/L, pH 4,8, 37°C. [DBAS] = 40 μ mol/L ($r = 0,9973$, desvio padrão = ± 2700 , N = 18)

3.3- Discussão e conclusões

O substrato quimiluminescente (sódio-MPP) aqui desenvolvido, pode ser encarado como simples e de baixo custo (do ponto de vista de sua preparação), quando comparado a substratos como o AMPPD ou a luciferina de vagalume protegida por fosfato (esquema 3.6), utilizados em metodologias semelhantes^(74,75,76,84). Sua preparação envolve quatro passos relativamente simples e a única etapa que mostrou uma maior dificuldade foi a silição do enol-fosfato, que exigiu três tentativas para alcançar o produto desejado. Nas primeiras tentativas obteve-se apenas a silição de um dos grupos metóxi. Para obter a silição completa foi necessário fazer um acompanhamento (cromatografia gasosa) por seis dias, sob refluxo, até que todo composto mono-sililado desaparecesse.



Esquema 3.6- Comparação entre as estruturas moleculares de alguns substratos quimiluminescentes para determinação de ALP e o substrato sódio-MPP

A condição primária para que esta metodologia analítica obtivesse sucesso, era, obviamente, a possibilidade de correlação entre a concentração ou a atividade da ALP com o sinal quimiluminescente. Isto seria possível se a hidrólise do substrato fosse a etapa lenta da reação, pois assim a correlação poderia ser feita com a concentração do catalisador (enzima). Nos trabalhos desenvolvidos por Baader⁽⁴¹⁾ estudou-se a cinética da decomposição quimiluminescente de um enol protegido pelo grupo trimetilsilano e constatou-se que a etapa lenta da reação era, de fato, a desproteção do enol catalisada por fluoreto. Assim, como era esperado, para o enol protegido pelo grupo fosfato também foi obtida uma ótima correlação entre a atividade enzimática e a intensidade máxima de luz. Por outro lado, não se verificou uma correlação entre a atividade enzimática e a área integrada total de luz.

De fato, deveria-se esperar que a intensidade integrada total de luz se mantivesse constante e independente da concentração da enzima, visto que foi alterado apenas a concentração do catalisador da reação. No entanto, observou-se que a intensidade integrada de luz não se manteve nem mesmo constante, seja quando utilizada a fosfatase alcalina (figura 3.1), seja quando utilizada a fosfatase ácida (figura 3.10). Isto pode ser fruto de reações laterais como, por exemplo, a decomposição do peróxido de hidrogênio. Realmente, observou-se que as re-adições de peróxido podiam restabelecer parcialmente a quimiluminescência e o consumo de oxigênio.

Para o desenvolvimento do protocolo analítico partiu-se de condições usuais, tanto para oxidações quimiluminescentes catalisadas por HRP de isobutanal ou seu enol sililado, quanto para ensaios comerciais de ALP. Obviamente, o desafio era encontrar uma condição ótima de reação para duas enzimas que possuem comportamentos bastante diferentes. No caso da fosfatase alcalina, cujo pH de máxima atividade está na faixa de 9,0 a 10,5, os métodos analíticos descritos mostram uma larga variedade de condições, seja do tipo e concentração do tampão, seja da temperatura do ensaio, seja da concentração dos reagentes⁽⁹⁶⁾. Assim, a condição inicial utilizada (tampões 0,90 mol/L, pH 10,4, etc) foi um valor arbitrariamente escolhido entre os vários encontrados. Outro ponto importante com relação aos ensaios de fosfatase alcalina é a utilização, em todos os casos, de Mg^{+2} como um cofator da mesma. Embora não tenha sido observado um aumento significativo de quimiluminescência com a utilização de magnésio, resolveu-se manter a adição do mesmo. A enzima HRP, por sua vez, apresenta atividade catalítica em uma larga faixa de pH, sendo que em cerca de pH 11,0 a enzima perde em torno de 50% de sua capacidade catalítica⁽⁷⁾. Nos estudos aqui desenvolvidos encontrou-se o ponto ótimo de pH em 9,3. Para as concentrações de HRP e H_2O_2 partiu-se também dos valores ótimos encontrados por Baader no estudo cinético da oxidação do enol sililado, que são respectivamente 2 $\mu\text{mol/L}$ e 0,1 mmol/L. A propósito, este valor de concentração de H_2O_2 é metade da concentração de oxigênio dissolvido (0,2 mmol/L) no meio tamponado, sendo que na estequiometria da reação há o consumo de 0,5 mols de H_2O_2 para cada mol de O_2 . Também neste estudo verificou-se que estes valores estavam muito próximos do ideal. Assim decidiu-se manter os valores de concentração em 2 $\mu\text{mol/L}$ e 0,1 mmol/L respectivamente para HRP e H_2O_2 .

Os primeiros ensaios realizados (tabela 3.1) mostraram sinais extremamente baixos, tendo em vista a alta concentração de ALP utilizada (18 u/mL). Ao diminuir a concentração daquele que se mostrava como o melhor tampão (AMP, 2-amino-2-metilpropanol) de 0,90 mol/L para 0,15 mol/L, obteve-se um aumento de cerca de 10 vezes no sinal analítico. O efeito supressor que aminas possuem sobre estados excitados tripletes pode estar por trás dessa constatação experimental. Entretanto, o tampão carbonato, apesar de não apresentar o problema citado acima, mostrou-se menos eficiente do que o tampão AMP. No entanto, é preciso lembrar que a condição ótima do ensaio não depende apenas da eficiência de desativação radiativa do produto em estado excitado, mas também do efeito dos vários reagentes, inclusive os tampões, sobre a atividade catalítica das enzimas.

O substrato anilina-MPP foi inicialmente utilizado devido a facilidade com que poderia ser preparado pela precipitação após a adição da anilina em meio de etanol. No entanto, a baixa sensibilidade do ensaio alcançada com a utilização do mesmo, que também pode ser fruto do efeito supressor das aminas, levou-nos a troca do contra íon. Para isto, tomou-se como base a síntese de um enol-fosfato derivado do ácido pirúvico, onde a retirada do grupo trimetilsilila foi conseguida através de metóxido de sódio em meio etérico. O primeiro resultado positivo encontrado com este novo composto foi a sua total solubilidade em meio aquoso. O substrato anilina-MPP era pouco solúvel em meio aquoso, sendo necessário dissolvê-lo em DMSO antes do uso.

A eficiência de quimiluminescência alcançada com este novo substrato superou as nossas expectativas. A figura 3.2 ilustra uma comparação entre os dois substratos. A maior solubilidade desse substrato favoreceu também o manuseio do mesmo. Para entender esta afirmativa deve-se esclarecer que o disparo da reação, quando utilizado o contador de fótons, era realizado através de uma cânula (1 m de comprimento) de modo a evitar a exposição da fotomultiplicadora à luz externa. Assim, soluções viscosas, como a solução de anilina-MPP em DMSO, apresentavam uma grande dificuldade para ser introduzida no meio de reação.

Para este novo substrato também realizou-se alguns testes para a otimização do ensaio, obtendo-se resultados semelhantes aos obtidos com o substrato anilina-MPP. Uma exceção foi a concentração do substrato que, neste caso, mostrou

melhores resultados quando utilizado 1mmol/L do mesmo contra 5 mmol/L do substrato anilina-MPP.

Uma vez alcançadas as condições ótimas de pH, tipo e concentração de tampão, melhor substrato, etc., realizou-se ensaios para verificar a correlação [ALP] *versus* sinal quimiluminescente e avaliar o limite de detecção da metodologia. Uma inspeção da figura 3.1 mostra qualitativamente e foi comprovado quantitativamente por integração que não era possível estabelecer uma correlação entre [ALP] e a área integrada de luz. De fato, como foi exposto anteriormente, a área integrada de luz deveria ser constante e independente da quantidade de enzima. Por outro lado, uma ótima correlação foi encontrada com a intensidade máxima da luz, o que tornou a metodologia potencialmente útil. Outro ponto importante é que este pico máximo é alcançado dentro de poucos segundos, o que torna a metodologia interessante do ponto de vista de ensaios automatizados, em que o tempo de análise é de grande importância.

Como era esperado supondo a geração de acetona em estado excitado triplete, o sensibilizador (DBAS)⁽²⁷⁾ utilizado na reação intensificou a emissão de luz. Por outro lado, a diminuição da velocidade de consumo de oxigênio causada por ele e principalmente pelo seu solvente mostrou o efeito inibidor que eles exercem sobre a fosfatase alcalina.

Um ponto interessante sobre as curvas obtidas alterando a concentração de DBAS (figura 3.4) é que, a princípio, um protocolo analítico em desenvolvimento poderia ser “modulado”, de acordo com a sensibilidade desejada. Na figura 3.5, agora utilizando um luminômetro adaptado para leituras em microplacas, foi detectado em torno de 10^{-15} mol de ALP dissolvidos em 0,3 mL de solução.

Outra característica interessante dessa metodologia é a possibilidade de correlação entre a atividade de ALP e a velocidade de consumo de oxigênio dissolvido. Embora não seja um ensaio quimiluminescente, esta possibilidade pode abrir um novo campo de aplicação desse tipo de substrato em sistemas opacos, em que medidas de emissão de luz não seriam viáveis (figura 3.6).

A primeira aplicação da metodologia foi a análise de ALP presente em soro sangüíneo humano. Embora tenham sido submetidos à comparação apenas 5 amostras, sendo que para o estabelecimento de uma nova técnica seriam necessário pelo menos 200 amostras, os resultados obtidos indicam a potencialidade da técnica

neste campo de aplicação (figura 3.7). Seguindo a proposta de usar a velocidade de consumo de oxigênio como sinal analítico, foram submetidas amostras de soro sanguíneo a este método de análise. Embora tenha sido observado consumo de oxigênio, não se obteve uma correlação entre [ALP] e a velocidade de consumo do oxigênio. Testes controles mostraram consumo de O_2 mesmo na ausência do substrato sódio-MPP, quando apenas HRP e H_2O_2 estavam presentes. Este fato evidencia a existência de substratos presentes comumente em soros sanguíneos, capazes de serem oxidados via HRP/ H_2O_2 sem, entretanto, ter sido detectado quimiluminescência nestes controles. Além do mais, este consumo não era constante, dependendo da amostra utilizada. Portanto, não foi possível padronizá-lo como “branco”.

A segunda, e até mais importante, potencial aplicação dessa metodologia quimiluminescente de detecção de concentração de ALP é o seu uso como revelador em ensaio imunoenzimático (EIA). Para testar esta possibilidade adquiriu-se um conjugado do tipo ALP-IgG que foi submetido à análise. Com este conjugado, diluições finais de até 300.000 do mesmo puderam ser detectadas (figura 3.8).

Dando um passo adiante, adaptou-se uma metodologia de ensaio imunoenzimático colorimétrico para a metodologia em desenvolvimento. Foi possível distinguir o controle negativo (até 15 u/mL) dos positivos baixo e alto e do soro controle infectado. Pode-se observar na figura 3.9 que, embora satisfatório a quimiluminescência obtida nestes testes foi bastante baixa. No entanto, trata-se de uma adaptação de uma metodologia colorimétrica comercial, onde reagentes desconhecidos (tampão, reagente de lavagem, entre outros e que são adaptados à técnica) foram adicionados antes da troca do substrato colorimétrico pelo substrato sódio-MPP. Além disso, a microplaca utilizada era transparente, o que é próprio de um ensaio colorimétrico, e totalmente inadequado a um ensaio quimiluminescente. De fato, testes posteriores com a enzima purificada, utilizando estas microplacas transparentes, revelaram um perda de sensibilidade de uma ordem de grandeza quando comparado às placas brancas e opacas. Assim, acreditamos que uma melhora significativa poderá ser alcançada com o desenvolvimento de uma técnica do tipo EIA própria para este substrato. Isto passa, obviamente, pelo processo de

aderir os antígenos ou anticorpos nas microplacas e, portanto, fora do nosso campo de atuação.

A terceira potencial aplicação dessa metodologia é na determinação da atividade de fosfatase ácida em soro sangüíneo, também de grande utilidade no auxílio de diagnóstico de enfermidades como câncer de próstata. As condições do ensaio foram as mesmas utilizadas no caso da ALP, exceto o tampão e pH do mesmo (citrato 0,1mol/L, pH 4,8). A figura 3.10 mostra a boa correlação obtida entre a atividade de ACP-prostática e intensidade máxima de quimiluminescência. Verifica-se também uma mudança no perfil cinético do sinal quimiluminescente em relação aos ensaios com fosfatase alcalina. O perfil do decaimento de quimiluminescência obtido na hidrólise do substrato sódio-MPP, catalisada pela fosfatase ácida, mostrou uma maior semelhança com os perfis obtidos no estudo do enol-sililado ou mesmo da oxidação do isobutiraldeído. Nestes casos observa-se uma subida rápida seguida de um platô ascendente devido ao consumo do oxigênio do meio, que atua como supressor de estados excitados tripletes, e posterior queda rápida, devido ao término do oxigênio (reagente limitante).

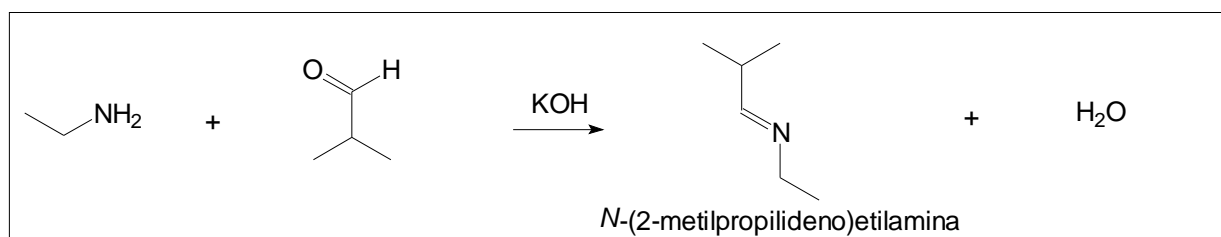
4- Tentativa de Desenvolvimento de uma Metodologia Quimiluminescente para Análise da Atividade de Proteases

4.1- Resultados

Tendo como objetivo último desenvolver uma metodologia quimiluminescente para quantificação de atividade de proteases, os trabalhos foram iniciados preparando uma enamina protegida. Escolheu-se como modelo o composto *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida, cuja síntese será descrita a seguir.

4.1.1- Preparação da *N*-(2-metilpropilideno)etilamina⁽⁹⁷⁾

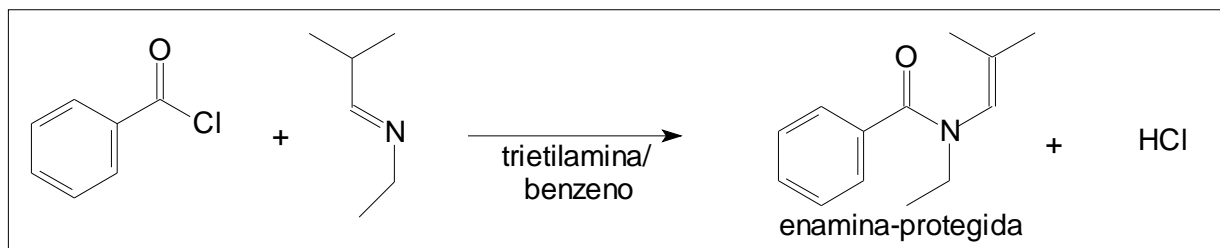
Preparou-se esta imina por meio da reação entre isobutanal e etilamina em meio alcalino (esquema 4.1). O rendimento obtido foi de 48%.



Esquema 4.1- Preparação da *N*-(2-metilpropilideno)etilamina

4.1.2- Preparação da *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida⁽⁹⁸⁾

Preparou-se este composto por meio da reação entre a *N*-(2-metilpropilideno)etilamina e cloreto de benzoíla (esquema 4.2). O rendimento foi de 51%.



Esquema-4.2- Preparação da *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida

4.1.3- Medidas de consumo de oxigênio e quimiluminescência na oxidação da *N*-(2-metilpropilideno)etilamina

Embora seja conhecida a propriedade quimiluminescente das iminas quando submetidas à oxidação pela ação catalítica da HRP (vide introdução)⁽³⁷⁾, alguns testes foram realizados com a *N*-(2-metilpropilideno)etilamina. As figuras 4.1 e 4.2 mostram os perfis de consumo de oxigênio e quimiluminescência respectivamente em tampão fosfato e tris. Escolheu-se o tampão tris pH 8,0 para os testes com a imina e a enamina protegida, pois são estas as condições utilizadas para detectar a atividade da quimiotripsina por meio de uma técnica comercial fluorimétrica que estava disponível neste laboratório.

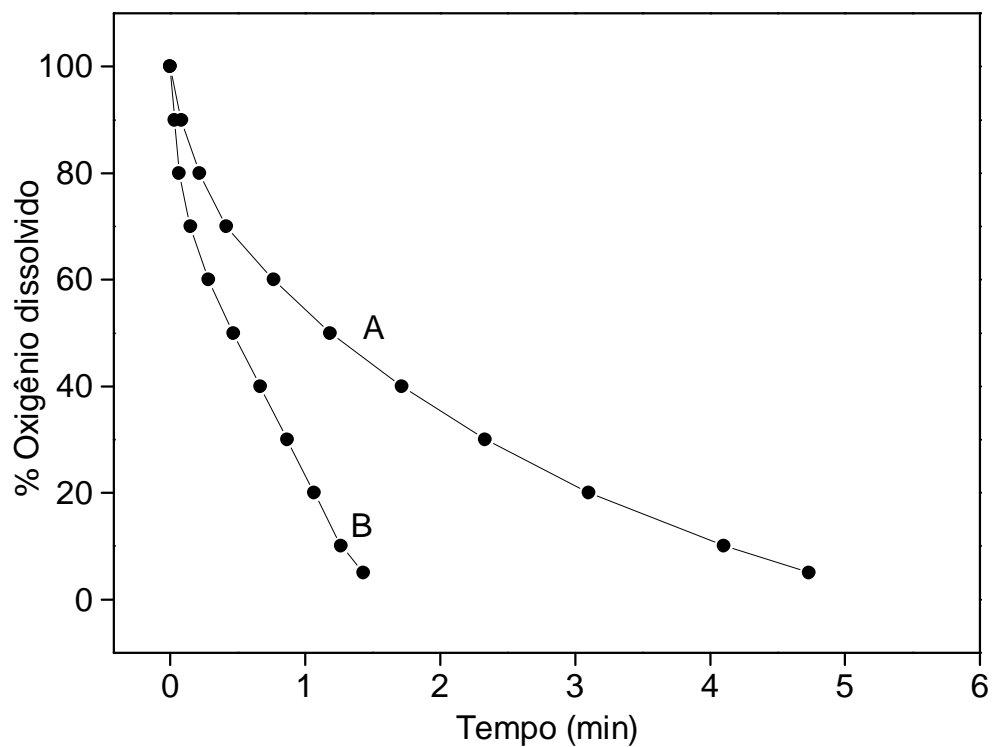


Figura 4.1- Consumo de oxigênio na oxidação da *N*-(2-metilpropilideno)etilamina. Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10$ mmol/L, $[HRP] = 2$ μ mol/L, $[imina] = 30$ mmol/L, $[tamp\tilde{a}o\ fosfato] = 0,05$ mol/L, pH 7,4, $[tamp\tilde{a}o\ Tris] = 0,05$ mol/L, pH 8,0, 37°C. **(A) tampão tris; (B) tampão fosfato**

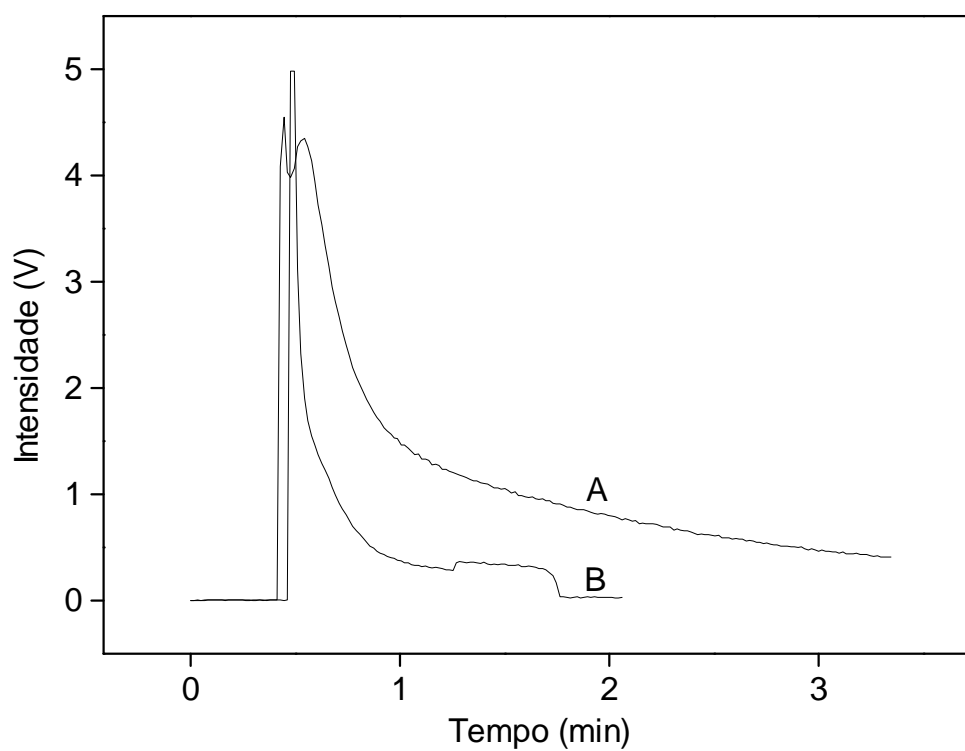
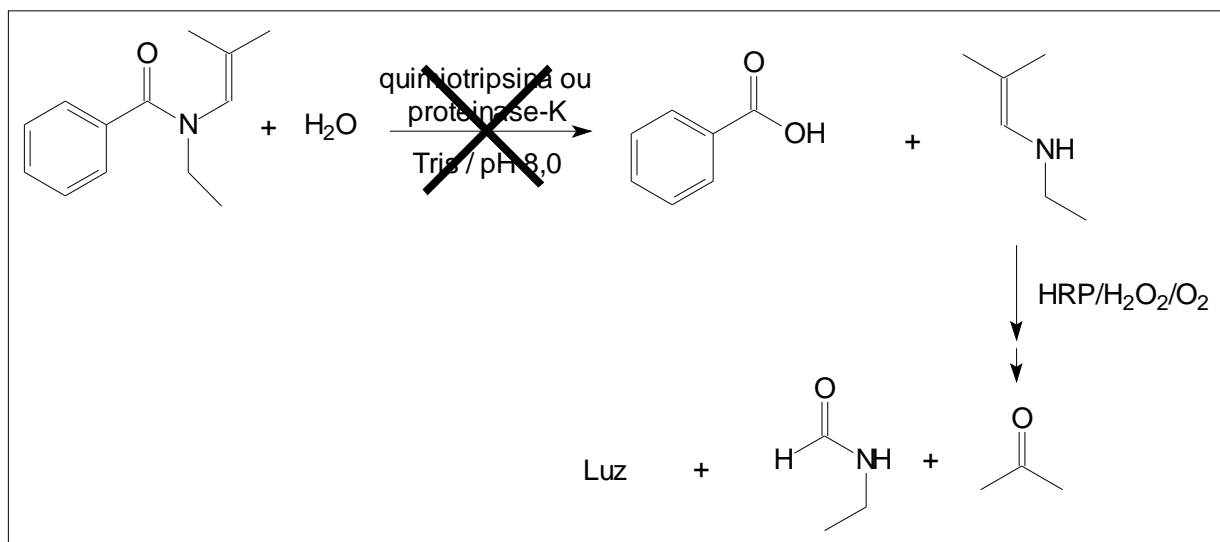


Figura 4.2- Quimiluminescência na oxidação da *N*-(2-metilpropilideno)etilamina. Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,10$ mmol/L, $[HRP] = 2$ μ mol/L, $[imina] = 30$ mmol/L, $[tamp\tilde{a}o\ fosfato] = 0,05$ mol/L, pH 7,4, $[tamp\tilde{a}o\ Tris] = 0,05$ mol/L, pH 8,0, 37°C. **(A) tampão tris; (B) tampão fosfato**

4.1.4- Medidas de consumo de oxigênio e quimiluminescência na oxidação da *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida

Para testar a potencialidade da técnica utilizou-se a enzima quimiotripsina para hidrolisar o substrato *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida. Após diversas tentativas para se obter indícios de quimiluminescência, medidas de consumo de oxigênio e controles de consumo ou formação de produtos por cromatografia gasosa, constatou-se que este composto não era reconhecido como substrato da quimiotripsina. Uma mistura usada para digestão de proteínas (proteínase-k) também foi testada e novamente não foi constatado hidrólise da enamina protegida (esquema 4.3).



Esquema 4.3- Proposta de uma metodologia quimiluminescente para análise de proteases. Concentrações finais: [enamina protegida] = 30 mmol/L, [tampão Tris] = 0,05 mol/L, pH 8,0, 37°C, [quimiotripsina] = $2,5 \cdot 10^{-5}$ mg/mL

Na tentativa de explicar a ausência de quimiluminescência quando a enamina protegida foi submetida à hidrólise enzimática, foram realizados ensaios para avaliar o efeito que a quimiotripsina teria sobre a peroxidase e vice-versa. Para isso, esta enzima foi adicionada a um ensaio quimiluminescente já estudado e que utiliza HRP como catalisador. Trata-se do uso do sistema HRP/H₂O₂/O₂/acetato de 2-metipropen-1-ila, que gera quimiluminescência quando na presença de esterases⁽⁹⁹⁾ (figura 4.3). O oposto também foi verificado, ou seja, o efeito da peroxidase sobre a atividade catalítica da quimiotripsina. Neste caso foi utilizado uma metodologia fluorimétrica para medida de atividade da quimiotripsina e então foi adicionado

HRP/H₂O₂ ao meio de reação (figura 4.4). Em ambos os casos não foi detectada a inativação de uma enzima sobre a outra.

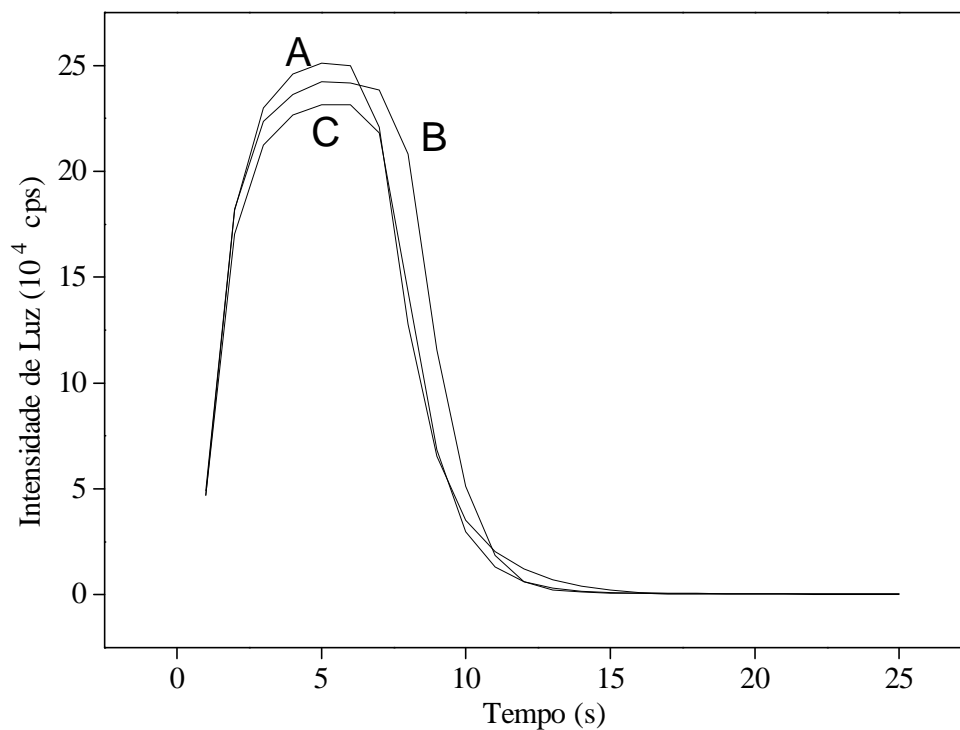


Figura 4.3- Influência da quimiotripsina nos ensaios quimiluminescentes catalisados por HRP. Concentrações finais: [H₂O₂] = 0,10 mmol/L, [HRP] = 2 μmol/L, [acetato de 2-metilpropen-1-ila] = 30 mmol/L, [esterase] = 5 u/L, Tris 0,05 mol/L, pH 8,0, 37°C. **(A) controle; (B) adicionando 25 mg/mL de quimiotripsina; adicionando 50 mg/mL de quimiotripsina**

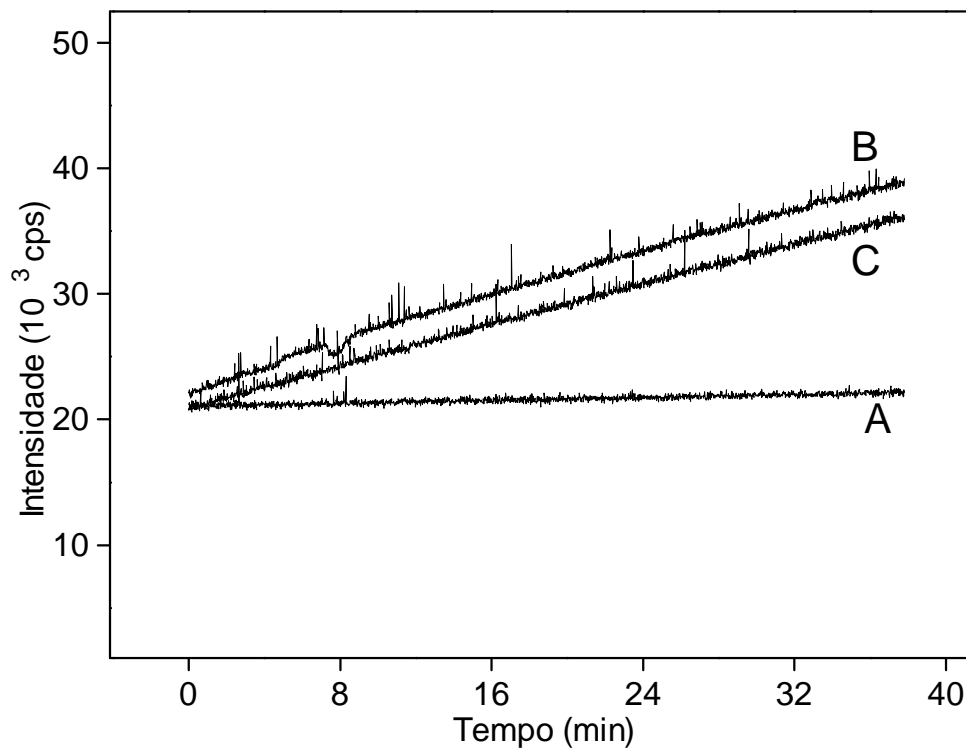


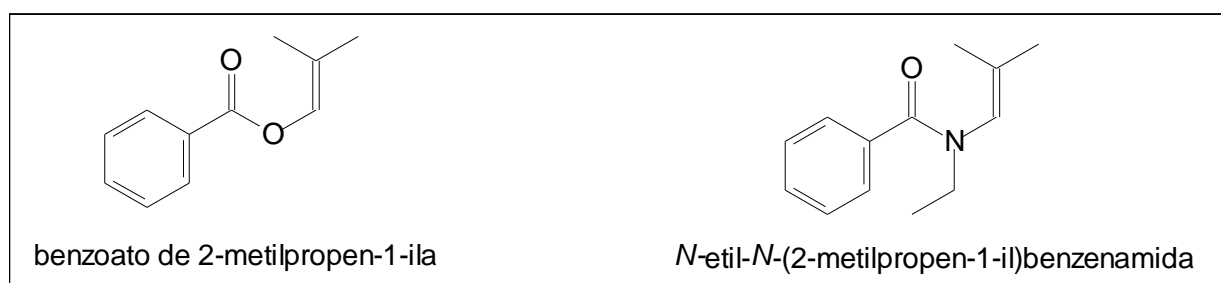
Figura 4.4- Influência da peroxidase na atividade catalítica da quimiotripsina. Concentrações finais: substrato [Pro-Phe-Phe-MCA] = 0,01 mg/mL, [quimiotripsina] = 0,25 μ M, tris 0,05 mol/L, pH 8,0, 37°C, λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 480. **(A) branco sem quimiotripsina, (B) controle, (C) em presença de [HRP] = 2 μ mol/L e [H₂O₂] = 0,1 mmol/L**

4.2- Discussão e conclusões

Os resultados de consumo de oxigênio e quimiluminescência comprovam a potencialidade das iminas como substratos do sistema oxidante HRP/H₂O₂/O₂ (figuras 4.1 e 4.2). A maior velocidade de consumo de oxigênio e o decaimento da emissão de luz, quando o tampão fosfato foi utilizado *versus* o tampão tris é compatível com o efeito catalítico sobre o equilíbrio imina-enamina, desempenhado por este tampão⁽¹²⁹⁾. Similarmente, a reação de oxidação do isobutanal por meio de HRP/H₂O₂/O₂ requer tampão fosfato (vide introdução)⁽³⁸⁾.

A escolha do substrato *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida para estudo das potencialidades da técnica baseou-se na maior facilidade de síntese do mesmo e, principalmente, pela sua semelhança com o benzoato de 2-metilpropen-1-ila, cuja hidrólise, pela ação catalítica de esterases, já foi extensamente estudado⁽¹⁰⁰⁾ (esquema 4.3).

A quimiotripsina catalisa a hidrólise de ligações peptídicas próximas de aminoácidos aromáticos⁽¹⁰¹⁾. Assim, a presença do anel aromático no substrato desenvolvido poderia ajudar no reconhecimento do mesmo.



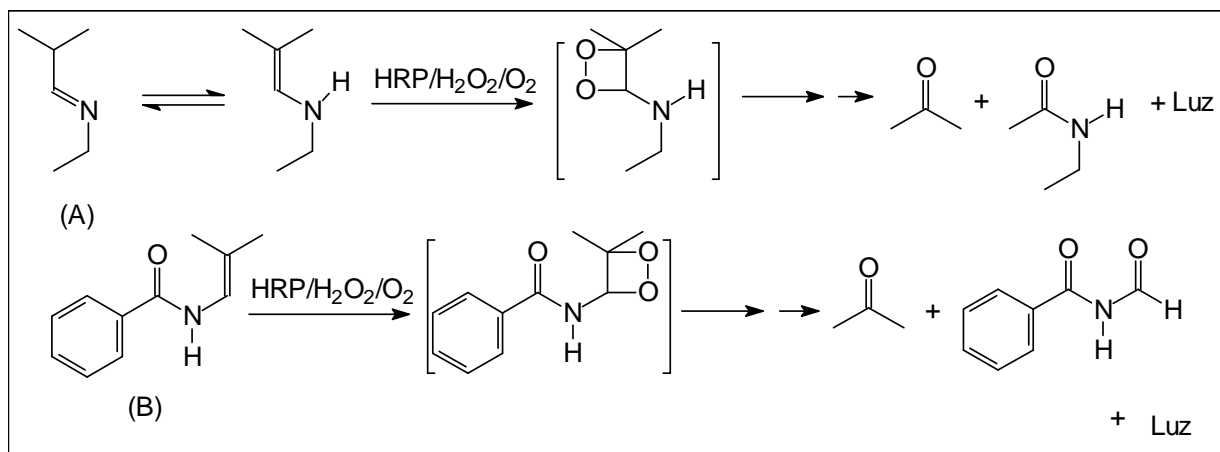
Esquema 4.3- Semelhança estrutural entre o benzoato de 2-metilpropen-1-ila e *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida

Como foi dito anteriormente, não se detectou quimiluminescência ou consumo de oxigênio quando a enamida protegida (*N*-(2-metilpropen-1-il)-*N*-etilbenzenamida) foi submetida ao sistema quimiotripsina/HRP/H₂O₂/O₂. Uma primeira explicação para as evidências experimentais seria a perda de atividade da HRP que, sendo uma proteína, poderia ser inativada na presença da enzima proteolítica. Os resultados não confirmaram esta proposta (figura 4.3). Poderia também estar ocorrendo a inibição da quimiotripsina pelo sistema HRP/H₂O₂. Para avaliar esta possibilidade

foram realizados ensaios fluorimétricos comerciais de determinação da atividade da quimiotripsina, e então adicionado HRP e peróxido de hidrogênio ao meio de reação. Novamente não foi observado uma alteração significativa na atividade catalítica da enzima (figura 4.4).

Sabendo-se que não há inibição de uma enzima sobre a outra e que a enamina, que seria gerada por hidrólise do substrato, poderia certamente ser oxidada pelo sistema HRP/H₂O₂/O₂, gerando quimiluminescência, então a única possibilidade que restava era o não reconhecimento do substrato *N*-etil-*N*-(2-metilpropenil)benzenamida pela quimiotripsina. Para avaliar esta possibilidade foram realizados controles de consumo de substrato por cromatografia gasosa, e de fato, não se verificou consumo do mesmo. O mesmo teste foi realizado utilizando-se uma mistura proteolítica (proteínase-k), usada para digestão de proteínas e portanto de baixa especificidade pelo substrato. Após várias horas de reação não foi detectado qualquer consumo do substrato também neste caso.

Acreditamos que o não reconhecimento do substrato *N*-etil-*N*-(2-metilpropen-1-il)benzenamida pelas proteases testadas seja devido ao nitrogênio terciário presente no mesmo. De fato, um levantamento posterior sobre substratos artificiais de proteases⁽¹⁰¹⁾ mostrou em todos os casos a presença grupos ésteres ou amidas secundárias e nunca terciária, como é o caso do substrato aqui desenvolvido. Obviamente não seria possível, na metodologia aqui empregada, desenvolver um substrato que tivesse as propriedades desejadas e ainda ser uma amida secundária. Certamente, a formação de -NH vinílico na etapa de desproteção é o passo fundamental para a oxidação quimiluminescente. Sem esta etapa a quimiluminescência não seria disparada pela hidrólise, inabilitando o método. Em outras palavras, tendo o substrato o grupo -NH livre, que é o ponto de ataque das formas ativas de peroxidase, não haveria necessidade de desproteção do mesmo e, como resultado, a enzima hidrolítica não seria o disparador da reação (esquema 4.5).



Esquema 4.5- Assim como iminas (A) são oxidadas via HRP/H₂O₂/O₂, uma amida secundária (B), como por exemplo a acima descrita, também poderia ser oxidada independente de sua hidrólise.

Certamente o problema também poderia estar na estrutura bastante simples do substrato e talvez fosse necessário, além do grupo amídico, uma cadeia peptídica ou pelo menos a presença de alguns aminoácidos, como no substrato comercial que utilizamos (Pro-Phe-Phe-MCA), para que o mesmo fosse reconhecido pela quimiotripsina. No entanto, desenvolver substratos com as características citadas seria um trabalho extremamente laborioso e acreditando que o problema principal esteja na estrutura amídica, que não poderia ser resolvido, resolvemos não investir mais nesta linha de trabalho.

5- Estudo do Potencial Quimiluminescente da Oxidação de Derivados Indólicos Catalisada por HRP: Desenvolvimento de Metodologia para Determinação Quantitativa de HRP

5.1- Resultados

Tendo como objetivo estudar o potencial quimiluminescente da oxidação de derivados indólicos e a aplicação desses compostos no desenvolvimento de metodologias para análise de enzimas, os trabalhos tiveram início testando a oxidação do indol frente ao sistema HRP/H₂O₂/O₂ e, como era esperado, verificou-se quimiluminescência. As reações foram realizadas em tampão alcalino e as concentrações de HRP e H₂O₂ inicialmente testadas foram as mesmas utilizadas na oxidação dos enóis. As reações foram disparadas pela adição de HRP após 2 minutos de incubação, tempo necessário para termostatização a 37°C. O 2-metilindol destacou-se pela sua intensidade de quimiluminescência, obtida já nos primeiros testes, cerca de 50 vezes maior do que os demais derivados testados. A seguir serão mostrados os perfis cinéticos de emissão de luz para alguns derivados indólicos (figura 5.1).

Após a otimização das condições de reação, mediu-se o rendimento total de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol, utilizando o padrão de luminol para calibração do espectrofluorímetro e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da quantidade de substrato consumido. O rendimento encontrado foi de $(9,1 \pm 0,8) \times 10^{-5}$ E/mol.

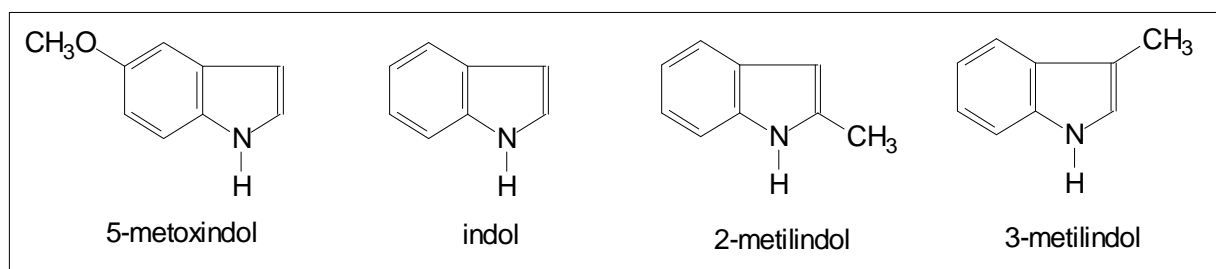
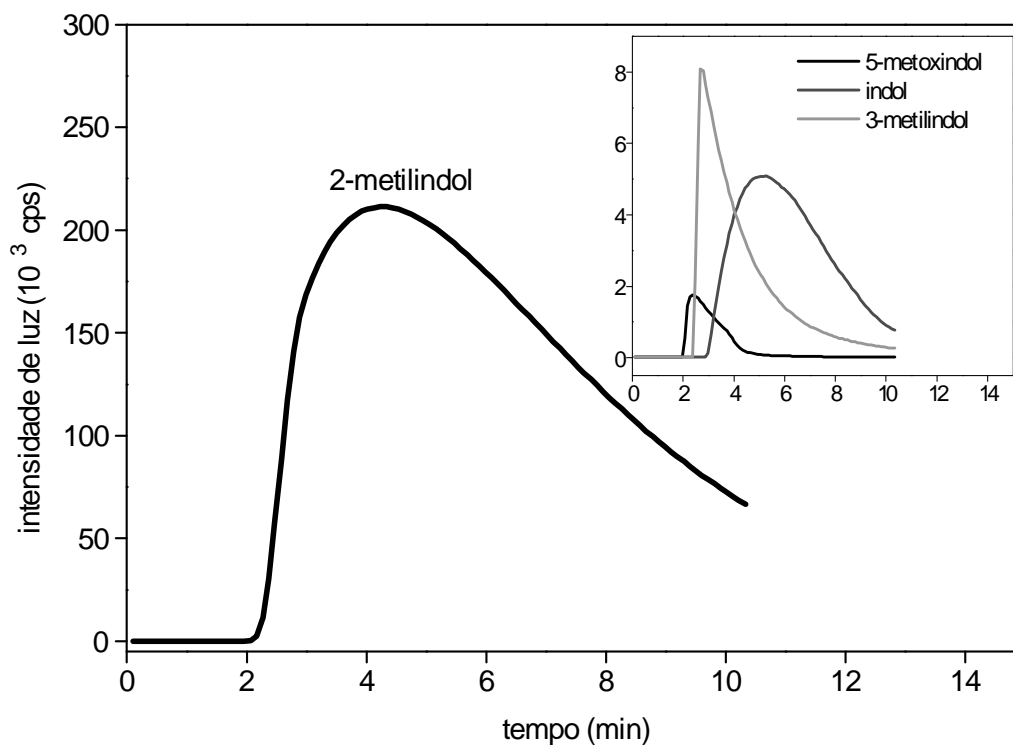


Figura 5.1- Oxidação de derivados indólicos catalisada por HRP:

Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,1 \text{ mmol/L}$, $[HRP] = 2 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $[\text{derivados indólicos}] = 0,5 \text{ mmol/L}$, $[\text{tampão AMP}] = 0,15 \text{ mmol/L}$, pH 9,3, 37°C

O resultado positivo obtido com o indol e seus derivados levou-nos a testar a oxidação de alguns indóis biologicamente ativos como triptofano, serotonina, ácido 2-(indol-3-il)acético, melatonina, entre outros. Dos compostos testados apenas a melatonina mostrou significativa quimiluminescência quando submetida a oxidação via HRP/H₂O₂/O₂. Este resultado confirma o importante papel dos substituíntes no núcleo indólico no que diz respeito a eficiência de quimiluminescência, o que já havia sido observado com os indóis não biológicos. A seguir serão mostrados os perfis cinéticos de emissão de luz para os compostos serotonina, melatonina, 6-hidroximelatonina, 5-metoxitriptamina e ácido 2-(indol-3-il)acético, quando oxidados (figura 5.2).

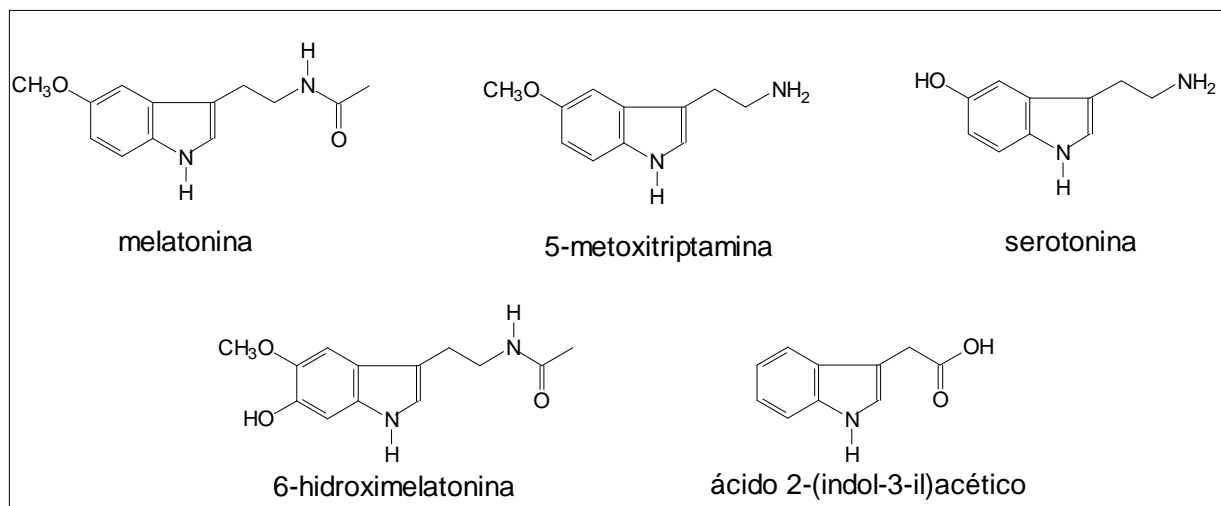
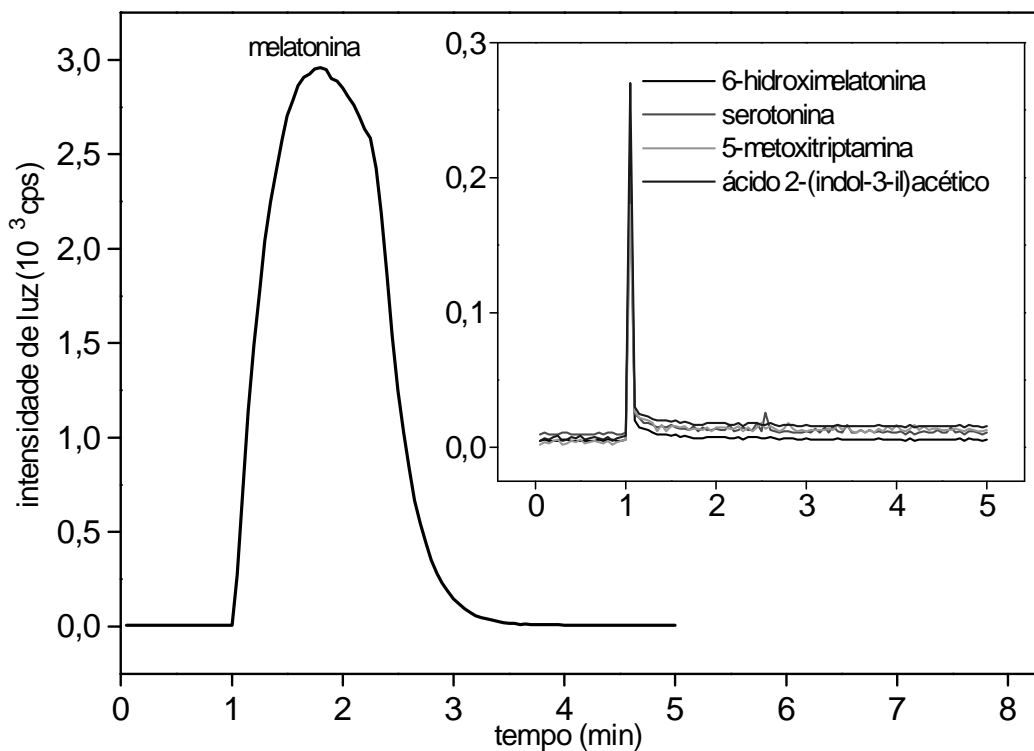


Figura 5.2- Oxidação de alguns derivados indólicos biologicamente ativos catalisada por HRP. Concentrações finais: $[H_2O_2] = 0,1$ mmol/L, $[HRP] = 2$ μ mol/L; $[\text{derivados indólicos}] = 0,5$ mmol/L, $[\text{tampão AMP}] = 0,15$ mmol/L, pH 9,3, 37°C.

O maior rendimento quântico de quimiluminescência obtido na oxidação do 2-metilindol, quando comparado aos demais derivados, levou-nos a investigar mais profundamente as características da oxidação deste composto. Trata-se de um comportamento inesperado em que, pelo contrário, tanto o 3-metilindol quanto o 2,3-dimetilindol quando submetidos à oxidação não enzimática⁽⁴⁹⁾ (DMSO/KOH/O₂), produzem maior quimiluminescência do que o 2-metilindol. Realizou-se uma comparação entre o 2-metilindol e o 2,3-dimetilindol, utilizando-se este meio oxidante e o resultado foi confirmado (figura 5.3). Deve-se ressaltar, também, que a intensidade relativa de quimiluminescência obtida na oxidação química do 2-metilindol foi cerca de 4 ordens de grandeza menor do que aquela obtida na oxidação catalisada por HRP.

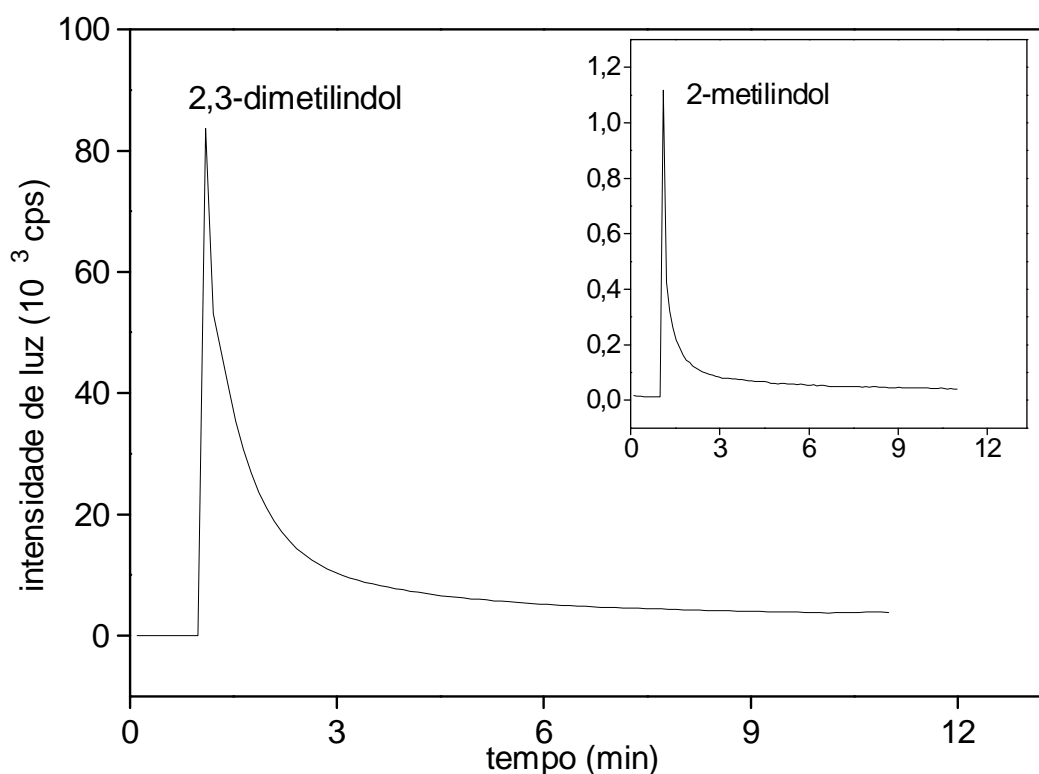


Figura 5.3- Comparação entre os sinais quimiluminescentes obtidos na oxidação do 2-metilindol e 2,3-dimetilindol quando oxidados via DMSO/KOH/O₂.

Concentrações finais: [substratos] = 1 mmol/L em DMSO, [KOH] = 5 mol/L

A seguir serão mostrados estudos em que se buscou um melhor conhecimento do sistema quimiluminescente 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂.

5.1.1- Efeito da concentração do tampão, tipo de tampão e pH na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂

Os primeiros ensaios já mostraram a importância do uso de tampões alcalinos na oxidação dos derivados indólicos, principalmente para o 2-metilindol e 2,5-dimetilindol. A figura 5.4 mostra o efeito da concentração do tampão 2-amino-2-metilpropanol (AMP) na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol. Utilizou-se este tampão por conveniência, sendo que outros tampões alcalinos testados, como carbonato ou dietanolamina, produziram resultados semelhantes. Ao contrário do verificado na oxidação de iminas, não se observou o efeito catalítico do tampão fosfato. Isto seria esperado já que não há o equilíbrio imina-enamina envolvido.

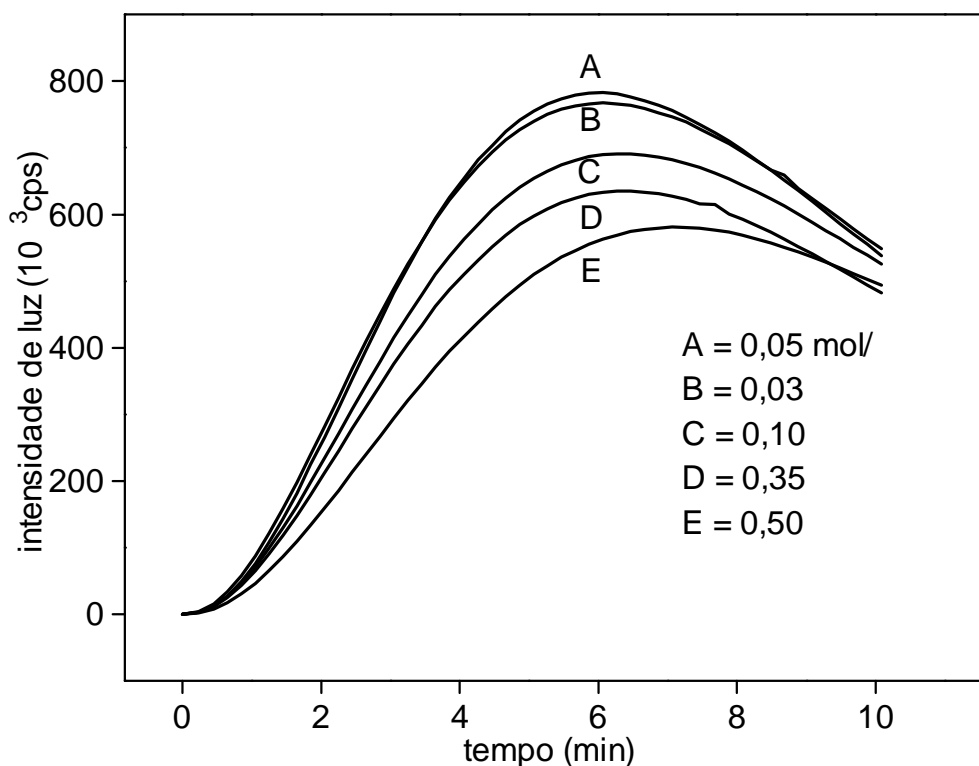


Figura 5.4- Efeito da concentração do tampão (2-amino-2-metilpropanol) na oxidação quimiluminescente do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂. Concentrações finais: [HRP] = 2 μmol/L, [2-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 1,5 mmol/L, pH 9,3, temp. 37°C

O pH exerceu profunda influência sobre a intensidade de quimiluminescência e sobre a cinética da reação de oxidação do 2-metilindol (figura 5.5), sendo que a intensidade integrada de quimiluminescência aumenta de 2 a 3 ordens de grandeza quando em pH alcalino comparado ao pH próximo do neutro. Por exemplo, a intensidade de quimiluminescência da reação realizada em pH 11,6 (tampão fosfato) foi cerca de 500 vezes maior do aquela observada em pH 7,4 (tampão fosfato). A maior eficiência de quimiluminescência em pH alcalino foi acompanhada pela diminuição na velocidade da reação. Esta alteração cinética também pode ser notada através do perfil de consumo de oxigênio (figura 5.6).

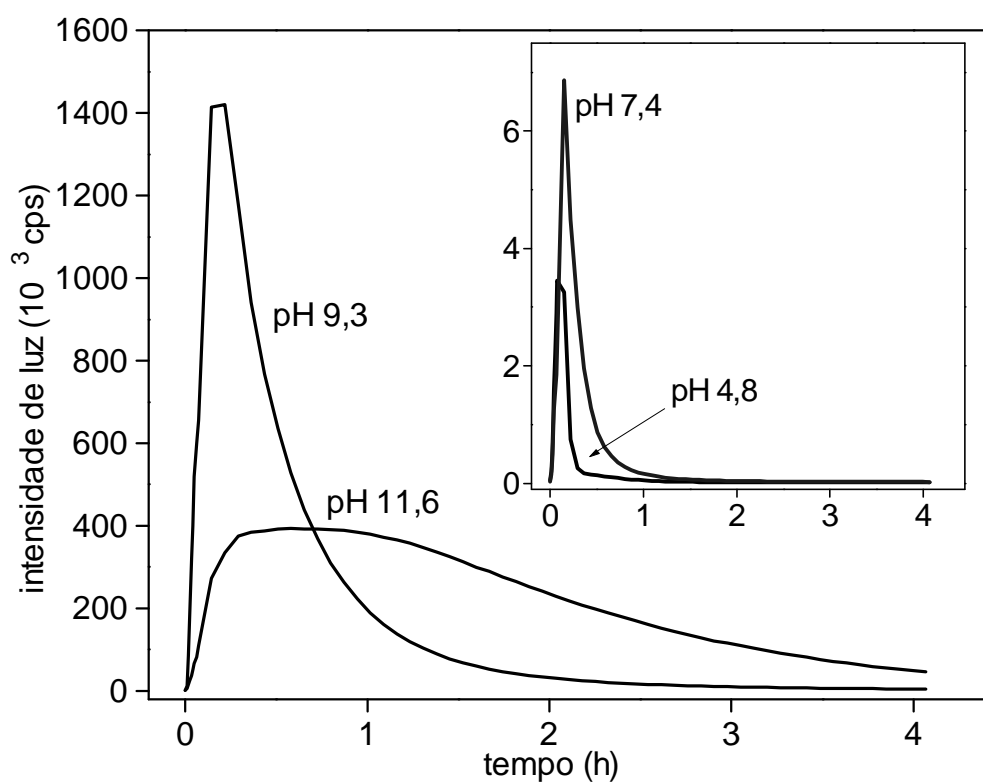


Figura 5.5- Perfil cinético de quimiluminescência na oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂ em diferentes pHs. Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μmol/L, [2-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, 37°C, [tampões] = 50 mmol/L. Tampão citrato pH 4,8, tampão fosfato pH 7,4, tampão AMP pH 9,3, tampão fosfato pH 11,6

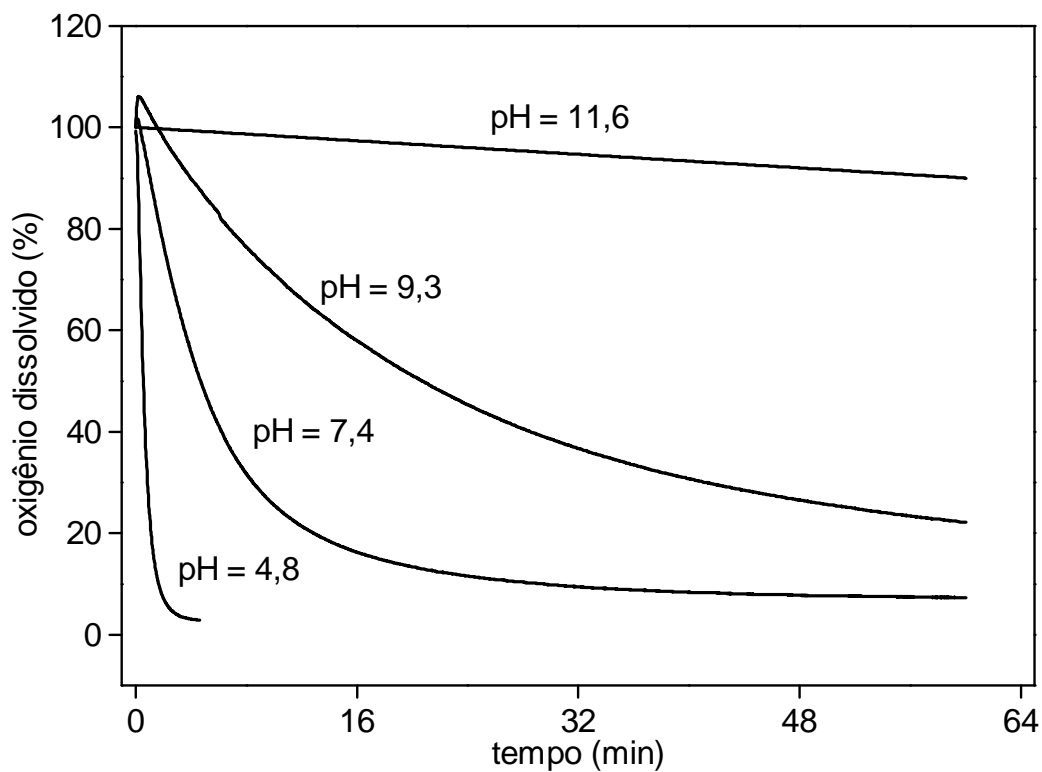


Figura 5.6- Consumo de oxigênio na oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂ em diferentes pHs. Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μmol/L, [2-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, 37°C, [tampões] = 50 mmol/L. Tampão citrato pH 4,8, tampão fosfato pH 7,4, tampão AMP pH 9,3, tampão fosfato pH 11,6

Esta significativa diferença no rendimento de quimiluminescência em função do pH do meio observou-se apenas para o 2-metilindol e 2,5-dimetilindol, que são aqueles que produziram um maior rendimento de quimiluminescência. Para outros derivados observou-se apenas pequenos acréscimos. A seguir, os efeitos de pH nas oxidações do 3-metilindol, 2,3-dimetilindol e 2,5-dimetilindol (figuras 5.7, 5.8 e 5.9).

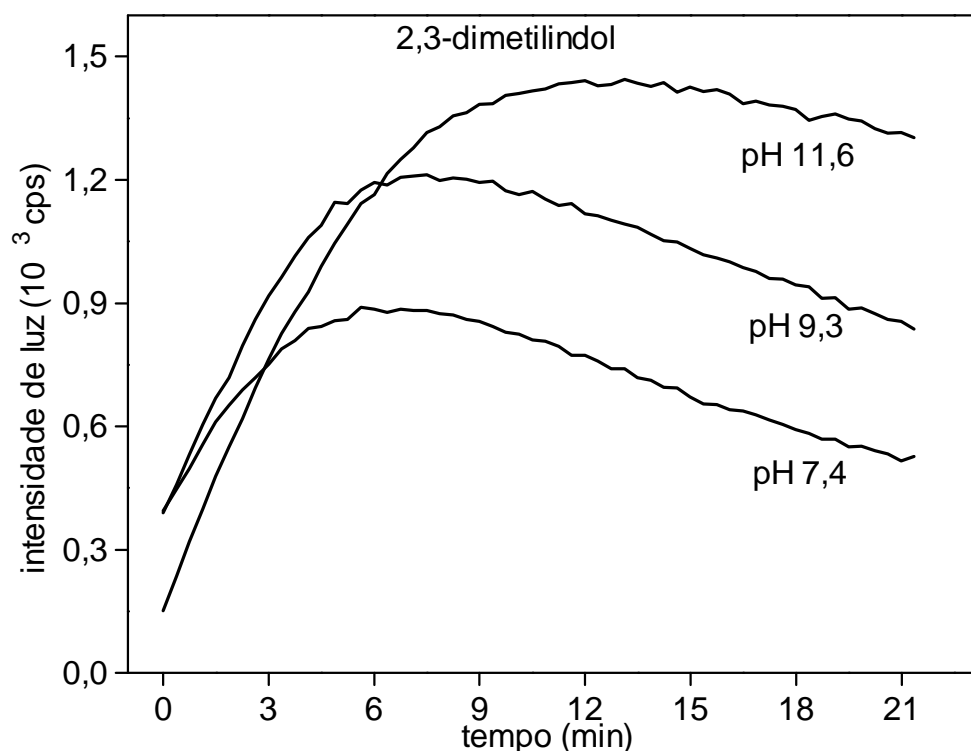


Figura 5.7- Perfil de quimiluminescência do 2,3-dimetilindol em função do pH do meio de reação. Concentrações finais: [HRP] = 0,1 $\mu\text{mol/L}$, [2,3-dimetilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, 37°C, [tampões] = 50 mmol/L, tampão fosfato pH 7,4; tampão AMP pH 9,3; Tampão fosfato pH 11,6

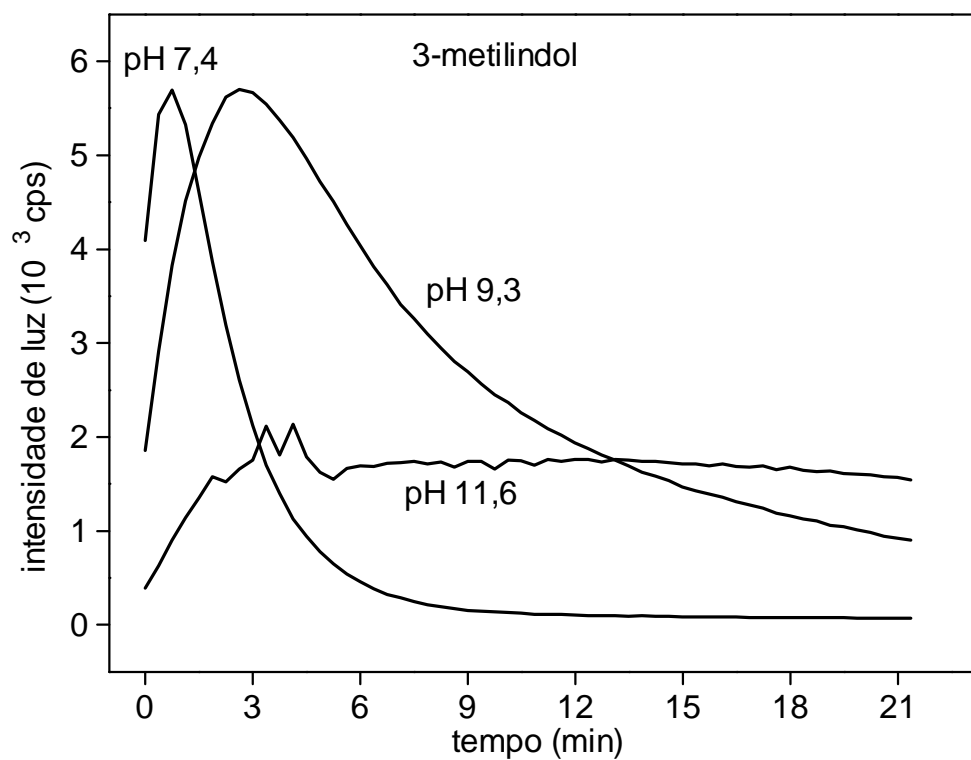


Figura 5.8- Perfil de quimiluminescência do 3-metilindol em função do pH do meio de reação. Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μ mol/L, [3-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, 37°C, [tampões] = 50 mmol/L, tampão fosfato pH 7,4; tampão AMP pH 9,3; Tampão fosfato pH 11,6

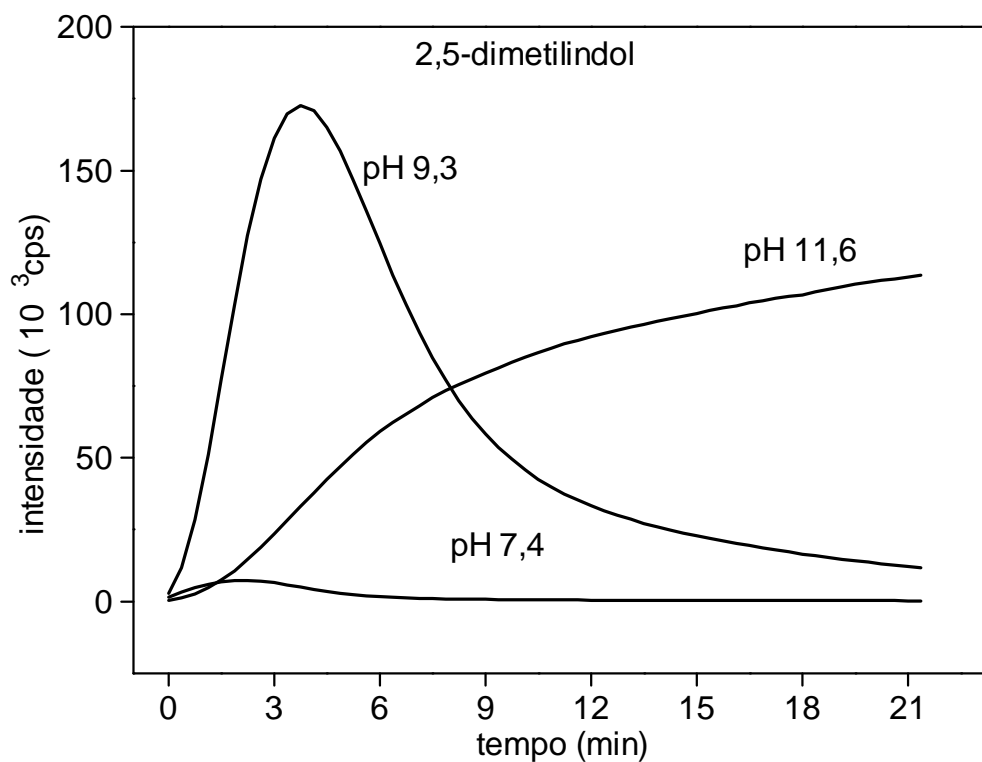


Figura 5.9- Perfil de quimiluminescência do 2,5-dimetilindol em função do pH do meio de reação. Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μ mol/L, [2,5-dimetilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, 37°C, [tampões] = 50 mmol/L, tampão fosfato pH 7,4; tampão AMP pH 9,3; Tampão fosfato pH 11,6

5.1.2- Efeito da concentração do substrato na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂

Para uma faixa de variação de 3 ordens de grandeza na concentração do 2-metilindol (0,01 até 1 mmol/L) observou-se um aumento proporcional da intensidade máxima e da área integrada de luz. Acima de 1 mmol/L parece ocorrer saturação do substrato (figura 5.10).

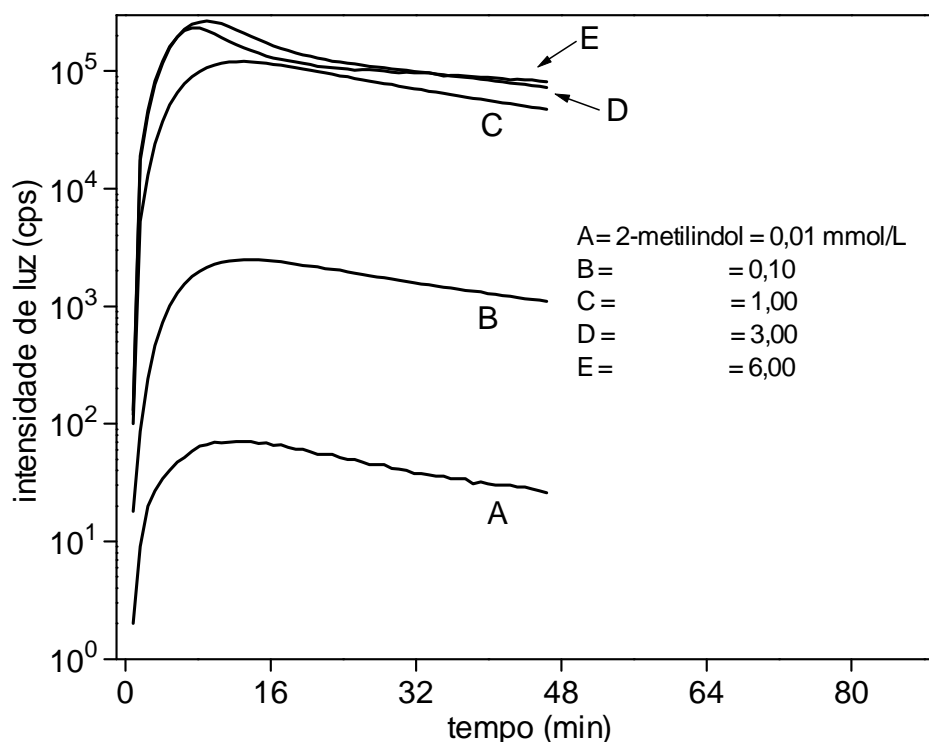


Figura 5.10- Efeito da concentração do 2-metilindol na eficiência de quimiluminescência. Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μ mol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, 37°C, [MAP] = 50 mmol/L, pH 9,3. Obs. Aqui utilizou-se uma microplaca preta para a realização dos ensaios e, como conseqüência, observou-se um decréscimo de cerca de 1 ordem de grandeza na eficiência de quimiluminescência

5.1.3- Efeito da concentração de HRP na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂

Embora tenha sido evidente o efeito catalítico desempenhado pela HRP, existia a possibilidade de que apenas o conteúdo férrico (grupo heme) da enzima fosse o responsável pelo mesmo. De fato, a oxidação de alguns derivados indólicos já foi conduzida utilizando-se o íon Fe⁺³ como catalisador em meio alcalino oxidante⁽¹⁰²⁾. Para descartar esta hipótese, realizaram-se ensaios em que a enzima foi inativada por aquecimento (figura 5.11). Em outros ensaios foi utilizado o sistema oxidante Fe⁺³/NaOH/H₂O₂ e novamente não se detectou quimiluminescência significativa seja para o 2-metilindol, seja para o 3-metilindol ([Fe⁺³] = 5 x 10⁻⁴ mol/L, [NaOH] = 0,11 mol/L, [H₂O₂] = 0,21 mol/L⁽¹⁰²⁾).

Obteve-se a maior eficiência de quimiluminescência utilizando-se em torno de 0,1 µmol/L de peroxidase. Um aumento na concentração da mesma, em uma ordem de grandeza, causou um acréscimo tanto na velocidade da reação quanto na intensidade máxima de luz mas, por outro lado, provocou uma perda sensível no rendimento total de quimiluminescência, o que sugere a existência de uma reação competitiva e que estaria sendo favorecida em altas concentrações de HRP (figura 5.12). Um reação competitiva que deveria ser levada em consideração é a dismutação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por meio da ação “catalática” da HRP, ou seja, esta enzima estaria atuando como a enzima catalase^(103,104).

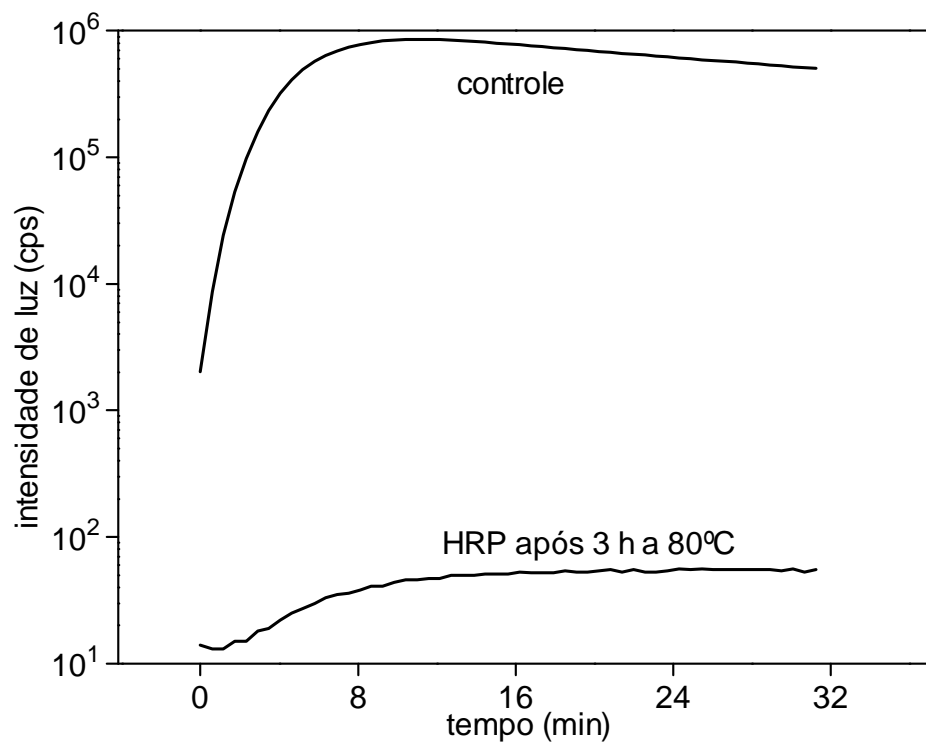


Figura 5.11- Inativação da HRP por aquecimento. Concentrações finais: [2-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, [HRP] = 0,1 μmol/L, [AMP] = 50 mmol/L, pH 9,3, 37°C.

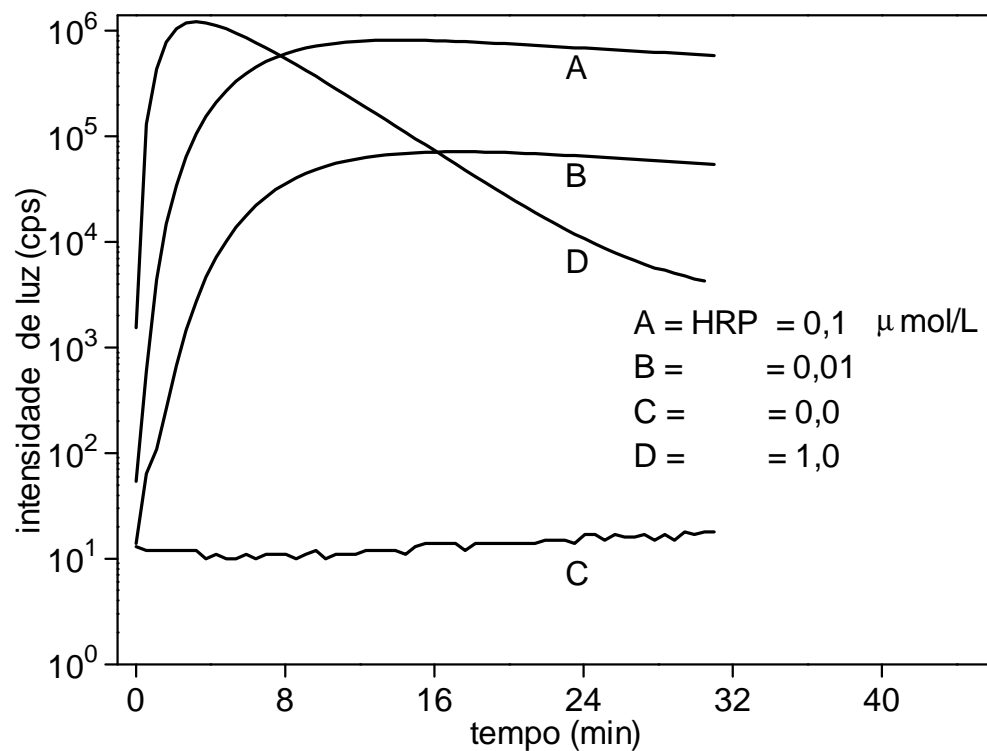


Figura 5.12- Efeito da concentração de HRP na eficiência do sistema 2-MI/HRP/H₂O₂/O₂. Concentrações finais: [2-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, [AMP] = 50 mmol/L, pH = 9,3, 37°C

5.1.4- Consumo ou produção de oxigênio na reação 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂

Como pode ser visto nas figuras 5.5 e 5.6, não se observou uma perfeita correlação entre a cinética de emissão e de consumo de oxigênio dissolvido no meio de reação. Pelo contrário, verificou-se que a velocidade de consumo ou produção de oxigênio dependia da relação entre as concentrações dos reagentes. A figura 5.13 mostra o perfil de consumo ou produção de oxigênio em função da concentração de 2-metilindol. Nota-se claramente a decomposição do peróxido de hidrogênio no ensaio controle (sem 2-metilindol), o que comprova o efeito do tipo “catalase” desempenhado pela HRP.

Embora mesmo sem a correlação esperada entre o consumo de oxigênio e o decaimento do sinal quimiluminescente, era incontestável a participação de oxigênio na reação. Isto foi comprovado pela retirada de oxigênio do meio de reação, seja através da desaeração pela saturação com nitrogênio, seja pelo uso do sistema enzimático glicose/glicose-oxidase, que é capaz de consumir o oxigênio do meio ao oxidar a glicose. Em ambos os casos houve uma intensa supressão da quimiluminescência e, além disso, intensificação da quimiluminescência quando oxigênio foi borbulhado no sistema (figura 5.14). A intensificação da quimiluminescência pelo borbulhamento de oxigênio mostra também que a multiplicidade dos estados excitados gerados na oxidação do 2-metilindol, ao contrário dos enóis, não deve ser tripleto.

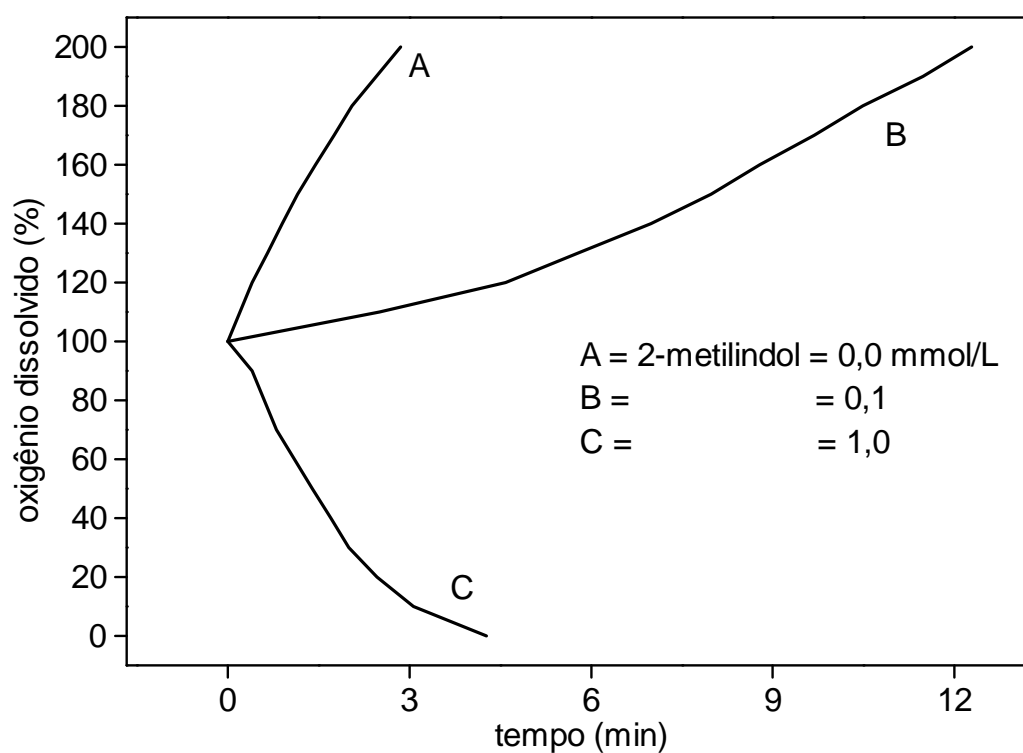


Figura 5.13- Produção ou consumo de oxigênio na reação 2-MI/HRP/H₂O₂/O₂.
Concentrações finais: [HRP] = 1 μmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, [AMP] = 50 mmol/L, pH =
9,3, 37°C. **(A) sem 2-metilindol, (B) 0,1 mmol/L, (C) 1 mmol/L.**

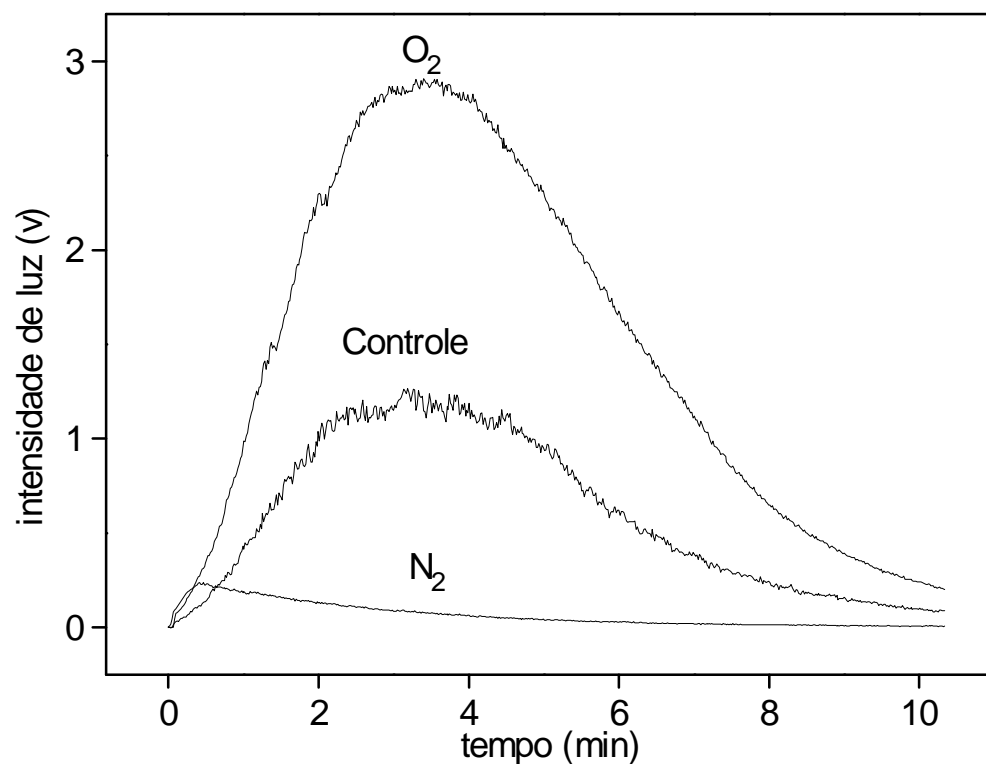


Figura 5.14- Efeito de borbulhamento de oxigênio ou nitrogênio na oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂. Concentrações finais: [HRP] = 1 μmol/L, [H₂O₂] = 0,05 mmol/L, [2-metilindol] = 0,3 mmol/L, 37°C, [AMP] = 50 mmol/L, pH 9,3

5.1.5- Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂

Como era esperado, considerando-se a perda de peróxido de hidrogênio por decomposição, re-adições do mesmo podiam restabelecer parcialmente o sinal quimiluminescente de uma reação já esgotada. De fato, a eficiência quântica de quimiluminescência do sistema 2-MI/HRP/H₂O₂/O₂ mostrou-se bastante dependente da concentração de peróxido de hidrogênio, sendo alcançado a eficiência máxima utilizando-se em torno de 5 mmol/L desse reagente (figura 5.15).

A adição da enzima catalase produziu um efeito interessante, pois além de levar à supressão da quimiluminescência, já que causa a perda de peróxido de hidrogênio, provocou também um aumento de eficiência quando pequenas quantidades dessa enzima foram adicionadas (figura 5.16). No entanto, este resultado não é totalmente inesperado, considerando-se que o acréscimo na concentração de oxigênio, provocado pela ação da catalase, aumenta a eficiência de quimiluminescência, como foi verificado pelo borbulhamento de O₂ no meio de reação.

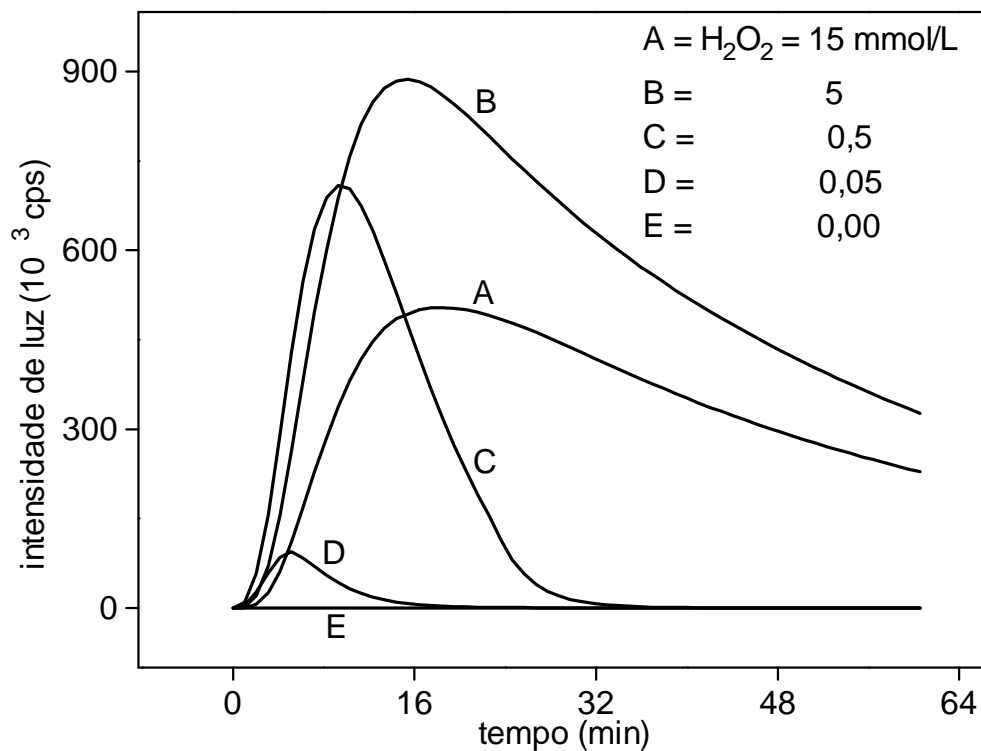


Figura 5.15- Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na oxidação do 2-metilindol via HRP/ H_2O_2/O_2 . Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μ mol/L, [2-metilindol] = 1 mmol/L, 37°C. [AMP] = 50 mmol/L, pH 9,3

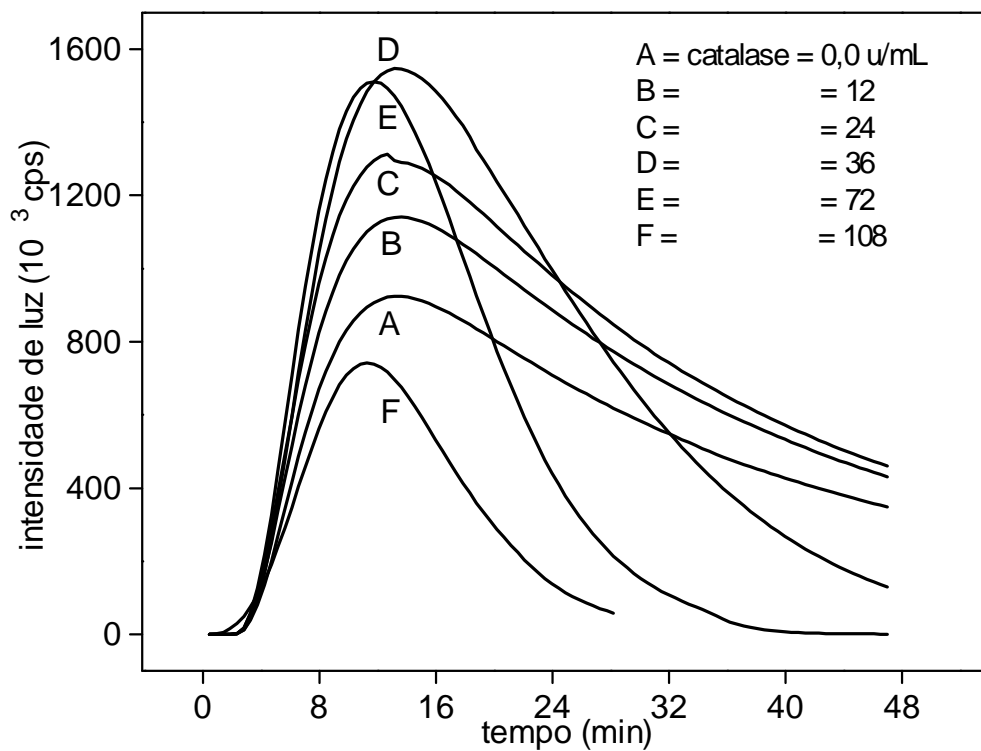


Figura 5.16- Efeito da adição de catalase sobre a oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂. Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μmol/L, [2-metilindol] = 1 mol/L, [H₂O₂] = 5 mol/L, [AMP] = 50 mmol/L, pH 9,3, 37°C

5.1.6- Envolvimento de ânion superóxido na oxidação do 2-metilindol via HRP/H₂O₂/O₂

Estudou-se também o envolvimento de ânion superóxido no mecanismo da reação de oxidação do 2-metilindol, visto que nas condições de reação aqui empregadas (peróxido de hidrogênio em grande excesso em relação a peroxidase) é esperado a formação de composto III de peroxidase (HRP-III)⁽⁴⁶⁾. O envolvimento dessa forma ativa de peroxidase, considerada como um complexo entre a HRP nativa e o ânion superóxido ($\text{Fe}^{+3} - \text{O}_2^{-\bullet}$), pode ser investigado estudando-se o efeito que a enzima superóxido dismutase (SOD) exerce sobre estes sistemas. Esta enzima, conhecida por sua capacidade de reduzir ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, provocou supressão da quimiluminescência do sistema (figura 5.17).

A participação de ânion superóxido na quimiluminescência observada durante a reação de oxidação do 2-metilindol pôde ser adicionalmente comprovada quando se adicionou superóxido de potássio (KO₂) ao meio de reação em pH 7,4. Neste caso, houve um aumento na quimiluminescência (10 vezes) sem qualquer alteração no seu perfil cinético (figura 5.18).

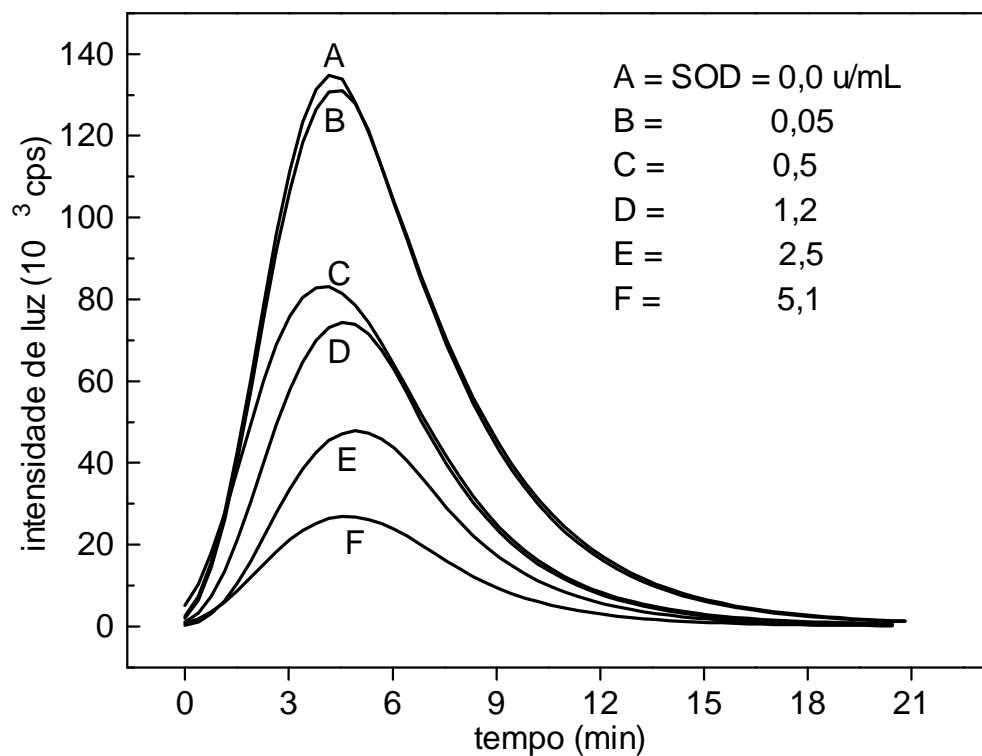


Figura 5.17- Supressão de quimiluminescência do sistema 2-MI/H₂O₂/HRP/O₂ pela adição de superóxido dismutase. Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μ mol/L, [H₂O₂] = 0,05 mmol/L, [2-metilindol] = 1 mmol/L, [AMP] = 50 mmol/L, pH 9,3

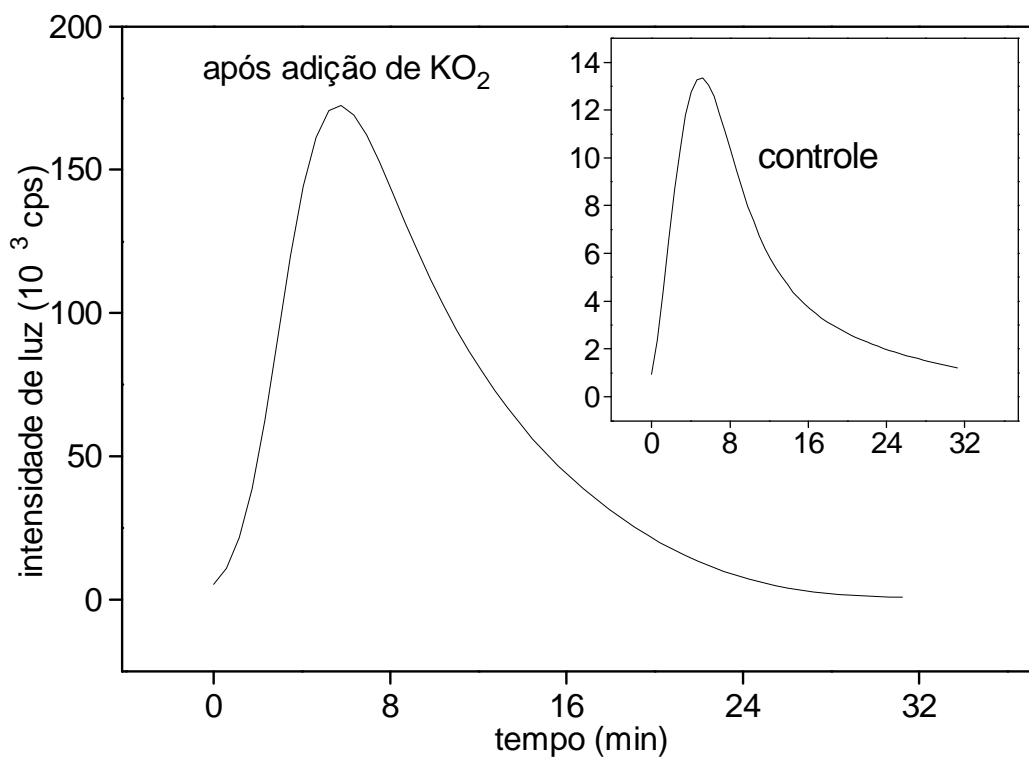


Figura 5.18- Efeito da adição de KO_2 no sistema 2-MI/HRP/ H_2O_2/O_2 .

Concentrações finais: [HRP] = 0,1 μ mol/L, [2-metilindol] = 1 mmol/L, [tampão fosfato] = 50 mmol/L, pH 7,4. Controle: [H_2O_2] = 10 mmol/L. Ensaio com superóxido de potássio: [H_2O_2] = 5 mmol/L + KO_2 5 mmol/L

5.1.7- Comparação da eficiência de quimiluminescência na oxidação de vários derivados indólicos via HRP/H₂O₂/O₂

De posse de 22 derivados indólicos realizou-se uma nova comparação de eficiência de quimiluminescência, mas usando aquelas que pareciam ser as melhores concentrações dos reagentes. A tabela 5.1 mostra a intensidade integrada de luz obtida em 20 minutos na oxidação dos 22 derivados escolhidos para estudo. Uma figura mostrando o perfil do sinal quimiluminescente para alguns dos compostos também está demonstrado (figura 5.19). As reações foram disparadas pelos substratos. Como existe um *flash* de quimiluminescência característico do sistema HRP/H₂O₂, possivelmente originada da produção de oxigênio singlete ⁽¹⁰⁵⁾, fez-se a adição do substrato após a incubação prévia dos demais reagentes por 2 minutos. Para os valores de quimiluminescência listados na tabela 5.1 foram descontados a emissão originária do sistema HRP/H₂O₂.

Os derivados indólicos foram escolhidos de modo a auxiliar na elucidação da relação entre a eficiência de quimiluminescência e o padrão de substituição dos mesmos. Dos resultados de que dispomos pode-se dizer que efeitos eletrônicos não parecem influenciar nesta eficiência. Isto pode ser evidenciado comparando-se o indol e os derivados substituídos pelo grupo metóxila ou fenila (doadores de elétrons), ou comparando-se a melatonina e seus derivados halogenados (sacadores de elétrons) 6-cloromelatonina e 2-iodomelatonina. A tabela 5.1 mostra também que a alta eficiência de quimiluminescência não está relacionada apenas à presença do grupo metila na posição 2 do núcleo indólico, mas também à ausência de substituintes na posição 3. Como pôde ser observado, o 2,5-dimetilindol ao contrário do 2,3-dimetilindol, apresentou uma destacada eficiência de quimiluminescência.

Tabela 5.1 Intensidade de luz integrada durante 20 minutos obtida na oxidação dos derivados indólicos

| DERIVADO INDÓLICO | (INTENSIDADE DE LUZ INTEGRADA POR 20 MINUTOS) X 10 ⁻⁵ (CPS X S) |
|--|---|
| Indol | 4.9 |
| <i>N</i> -metilindol | 1.5 |
| 2-metilindol | <u>8194</u> |
| 2,5-dimetilindol | <u>1082</u> |
| 2,3-dimetilindol | 11.1 |
| 3-metilindol | 25.1 |
| 5-metilindol | 2,3 |
| 4-metoxindol | 4.7 |
| 5-metoxindol | 0.4 |
| 6-metoxindol | 4.8 |
| 7-metoxindol | 1.0 |
| 2-fenilindol | 0,2 |
| Ácido 2-(indol-3-il)acético | 0,9 |
| Ácido 2-(5-metoxindol-3-il)acético | 1,5 |
| Ácido 2-(2-metil-5-metóxindol-3-il)acético | 1,0 |
| Melatonina | 6.9 |
| 6-cloromelatonina | 5,2 |
| 2-iodomelatonina | 3,3 |
| 6-hidroxi-melatonina | 0 |
| 5-hidroxitriptamina (serotonina) | 0 |
| 5-metoxitriptamina | 0 |
| Triptofano | 0 |

Concentrações finais: [derivado indólico] = 1 mmol/L, [HRP] = 0,1 μ mol/L,
[H₂O₂] = 5 mmol/L, [AMP] = 50 mmol/L, pH 9,3, 37 °C.

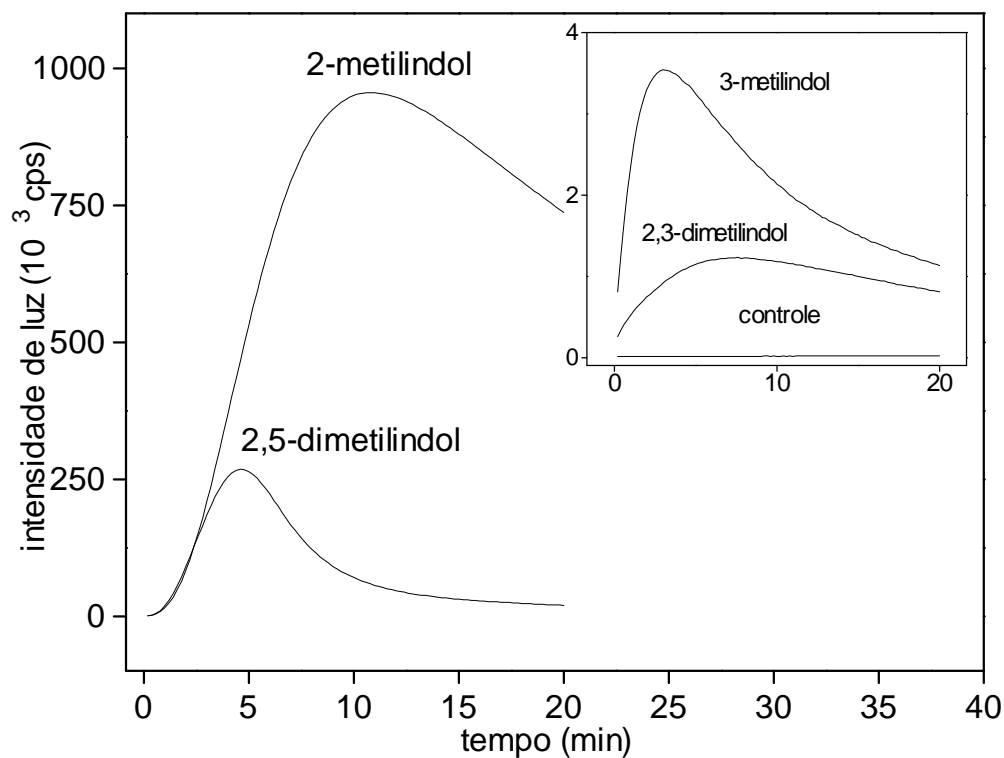


Figura 5.19- Perfil de quimiluminescência de alguns derivados indólicos:
Concentrações finais: [derivados indólicos] = 1 mmol/L, [HRP] = 0,1 μ mol/L, [H₂O₂] =
5 mmol/L, [AMP] = 50 mmol/L, temperatura 37°C, pH 9,3, volume total 0,3 mL. **○**
controle possui apenas 2-metilindol, H₂O₂ e tampão

5.1.8- Espectros de quimiluminescência, fluorescência e caracterização de produtos

Com o objetivo de elucidar a relação entre a estrutura dos derivados indólicos e a eficiência de quimiluminescência das reações, realizou-se uma investigação que tinha como base comparar os espectros de quimiluminescência das reações com os espectros de fluorescência dos produtos e assim identificar o produto emissor. Escolheu-se para estudo e comparação os substratos 2-metilindol, 2,5-dimetilindol e 2,3-dimetilindol. Para o 2-metilindol e 2,5-dimetilindol observou-se uma distribuição espectral de quimiluminescência com máximos em 500 nm e 525 nm, respectivamente, quando estes substratos foram oxidados. Devido a relativamente alta eficiência de emissão da oxidação desses compostos, os espectros foram facilmente obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro (figuras 5.24 e 5.25). Por outro lado, para determinar a distribuição espectral da oxidação do 2,3-dimetilindol foi necessário usar um contador de fótons (maior sensibilidade), ao qual foram adaptados filtros de luz. Devido a baixa eficiência de quimiluminescência dessa reação e aos poucos filtros disponíveis, foi possível apenas avaliar a região aproximada onde encontrava-se o máximo de emissão que foi entre 400-440 nm (figura 5.23).

A investigação dos produtos de oxidação foi realizada por HPLC, em que se procurou comparar os produtos formados por meio de características como tempo de retenção e propriedades espectroscópicas (fluorescência e absorção). Além de um detector de UV/visível (255 nm) utilizou-se um detector de fluorescência, que foi ajustado de modo evidenciar produtos com máximo de fluorescência em 500 nm (λ_{ex} 300-400 e λ_{em} 500). Foram submetidos à análise os compostos 3-metilindol, 2,3-dimetilindol, 2,5-dimetilindol, 2-metilindol, melatonina, indol e 4-metoxindol. Em todos os casos constatou-se a formação

de um produto principal (chamaremos de pico1), sendo que os tempos de retenção entre eles eram próximos. Observou-se um máximo de fluorescência entre 400-450 nm para estes produtos ($\lambda_{ex} = 310$ nm). A figura 5.20 mostra os cromatogramas antes e após a oxidação do 2,3-dimetilindol. Como pode ser observado, não há compostos que apresentem fluorescência em 500 nm. Por outro lado, exclusivamente para o 2-metilindol e 2,5-dimetilindol, além do produto principal (pico 1), constatou-se um segundo produto que apresentou intensa fluorescência em 500 nm (chamaremos de pico 2) (figuras 5.21 e 5.22).

Uma vez identificados os possíveis produtos (picos) responsáveis pelas emissões de luz das reações de oxidação dos derivados indólicos, estes foram coletados e, então, espectros de fluorescência puderam ser obtidos. Para a oxidação do 2-metilindol nota-se claramente que a distribuição espectral de fluorescência do pico 2 correlaciona-se com o espectro de quimiluminescência da reação (figura 5.24). Resultado idêntico foi obtido para a oxidação do 2,5-dimetilindol (figura 5.25). Como era esperado para a oxidação do 2,3-dimetilindol, a correlação foi observada com o pico 1 (figura 5.23).

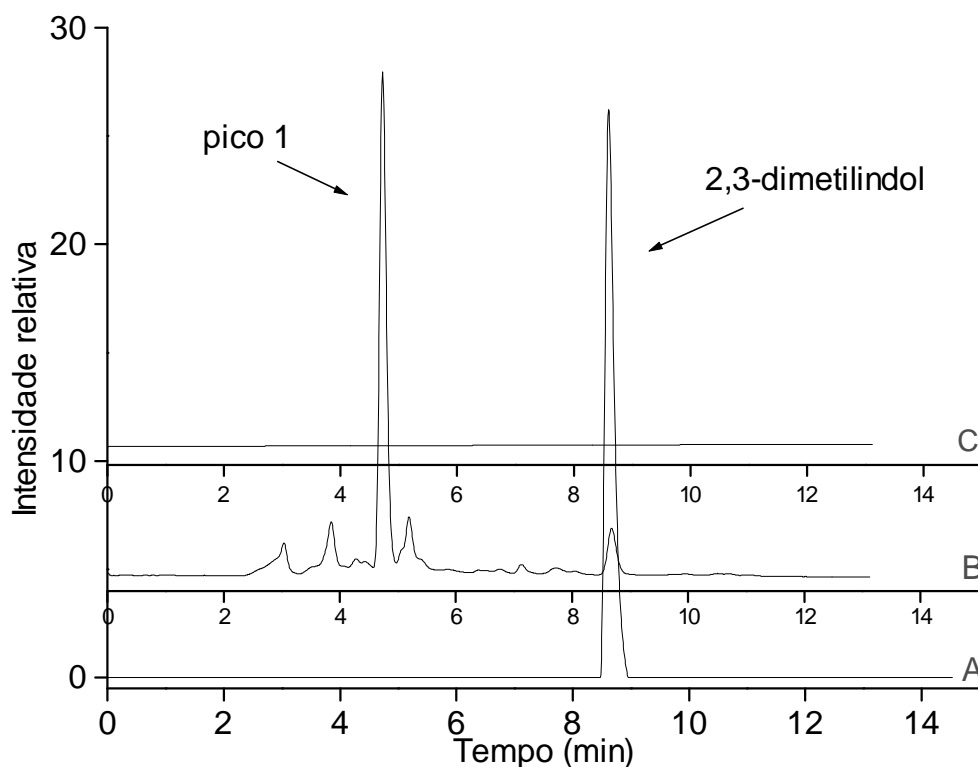


Figura 5.20- Cromatogramas antes e após oxidação do 2,3-dimetilindol. (A) 2,3-dimetilindol (detector UV/visível, $\lambda = 255$ nm); (B) após oxidação do 2,3-dimetilindol (detector UV/visível, $\lambda = 255$ nm); (C) após oxidação do 2,3-dimetilindol (detector de fluorescência $\lambda_{ex} = 330$, $\lambda_{em} = 500$)

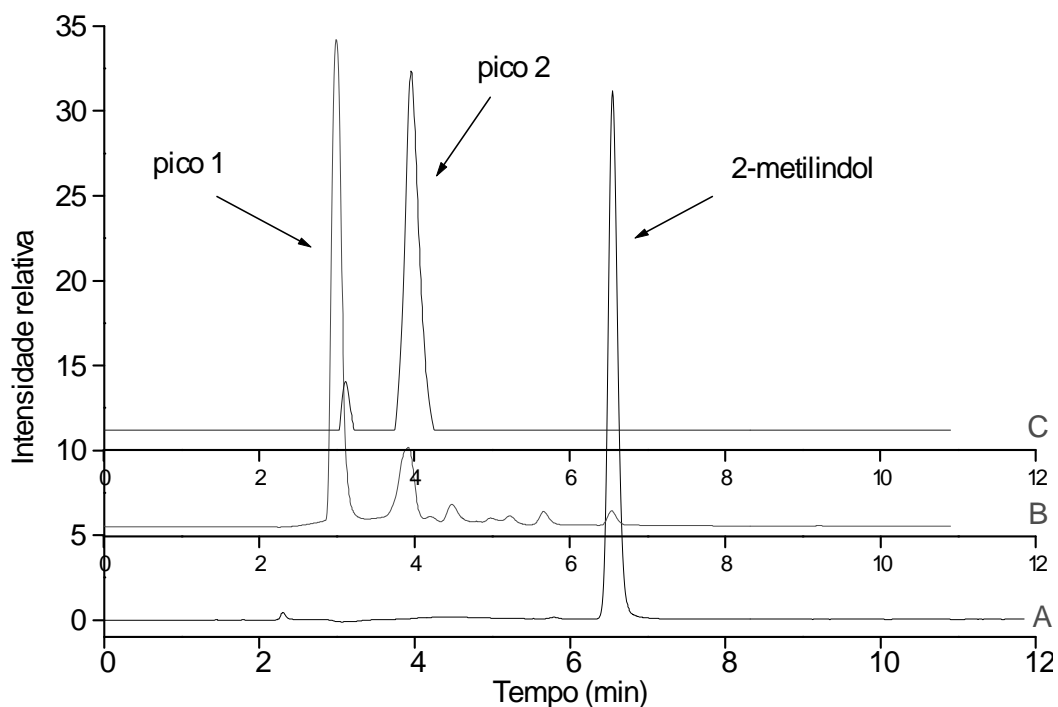


Figura 5.21- Cromatogramas antes e após oxidação do 2-metilindol. (A) 2-metilindol (detector UV/visível, $\lambda = 255$ nm); (B) após oxidação do 2-metilindol (detector UV/visível, $\lambda = 255$ nm); (C) após oxidação do 2-metilindol (detector de fluorescência $\lambda_{ex} = 330$, $\lambda_{em} = 500$)

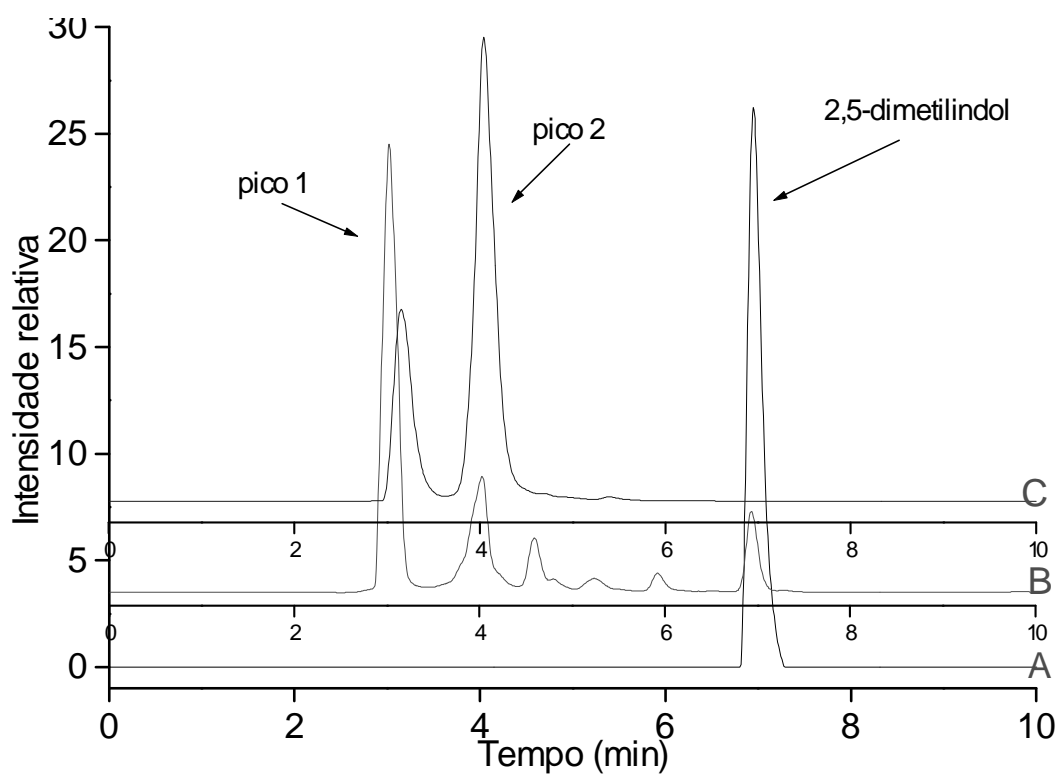


Figura 5.22- Cromatogramas antes e após oxidação do 2,5-dimetilindol. (A) 2,5-dimetilindol (detector UV/visível, $\lambda = 255$ nm); (B) após oxidação do 2,5-dimetilindol (detector UV/visível, $\lambda = 255$ nm); (C) após oxidação do 2,5-dimetilindol (detector de fluorescência $\lambda_{ex} = 330$, $\lambda_{em} = 500$)

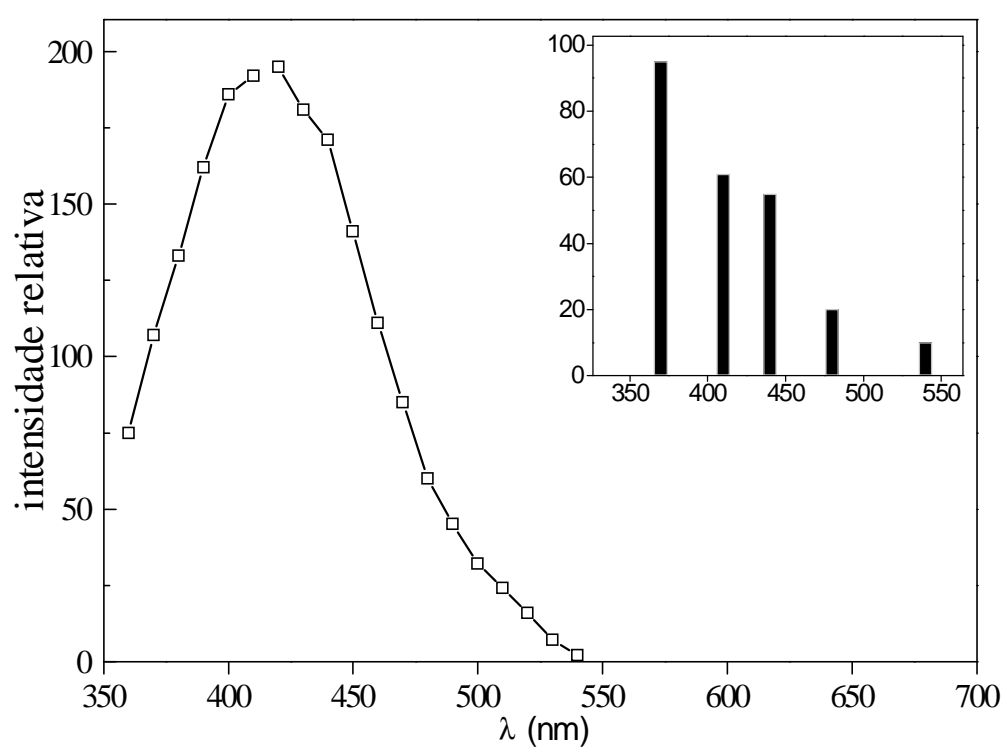


Figura 5.23- Espectro de fluorescência do produto de oxidação do 2,3-dimetilindol (pico 1) $\lambda_{ex} = 320$ nm. Figura inserida: distribuição espectral de quimiluminescência da oxidação do 2,3-dimetilindol obtida através de filtros de corte. Os valores indicados nas barras representam a porcentagem da emissão total (sem filtro) obtida acima do comprimento de onda indicado

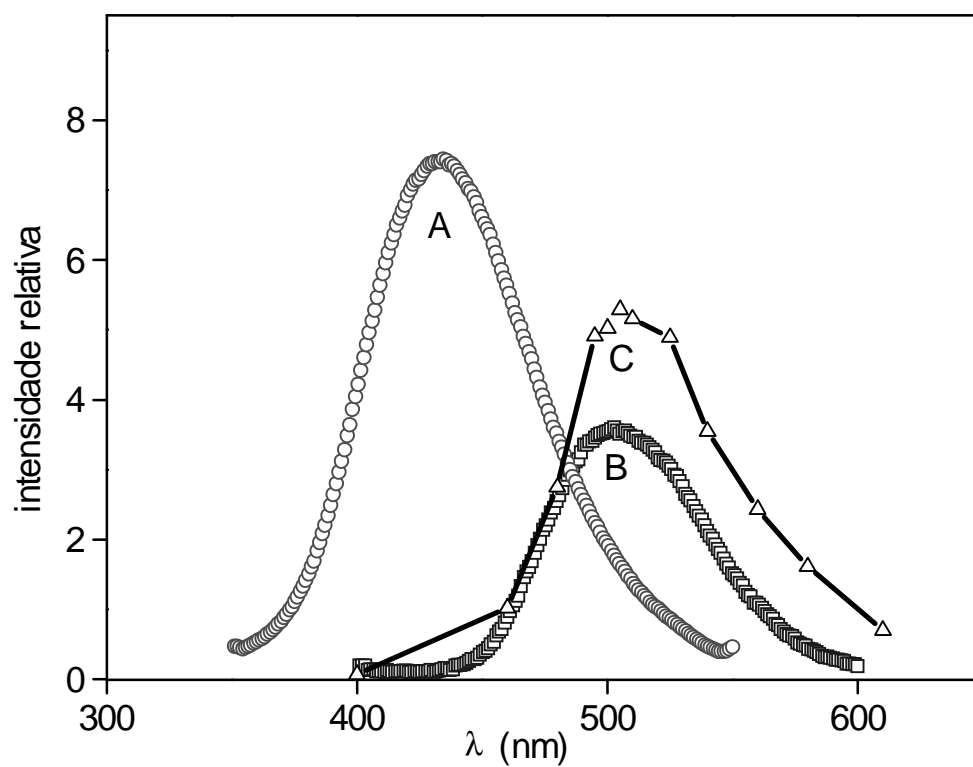


Figura 5.24- Espectro de quimiluminescência do 2-metilindol *versus* fluorescência dos produtos de oxidação. (A) pico 1, $\lambda_{ex} = 320$ nm; (B) pico 2 $\lambda_{ex} = 380$ nm; (C) espectro de quimiluminescência da reação

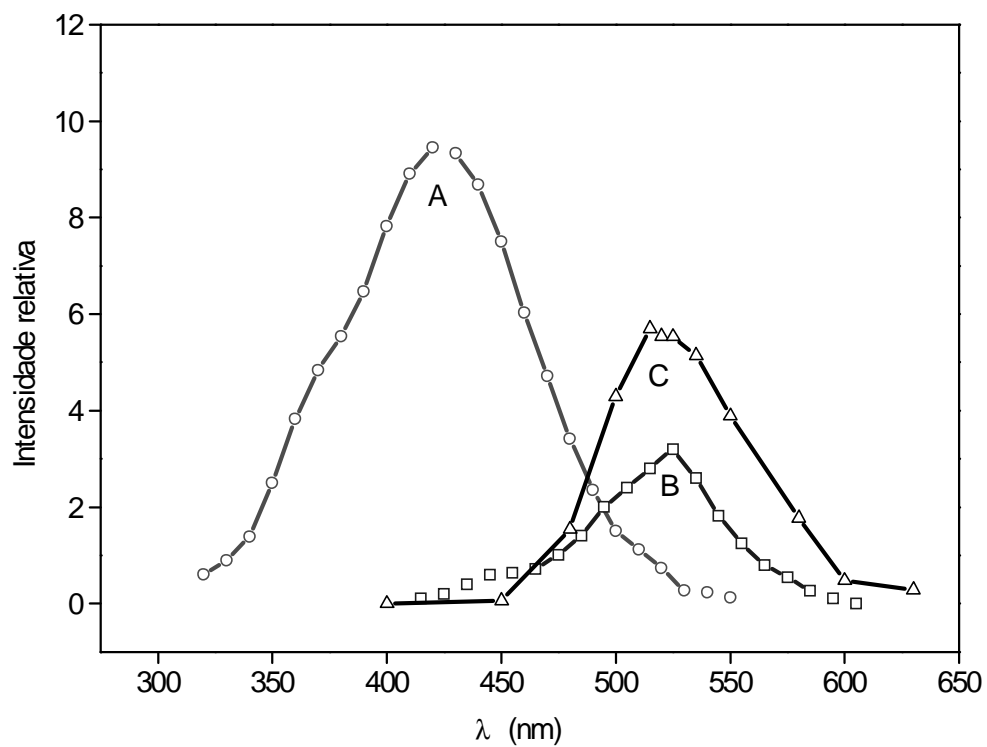
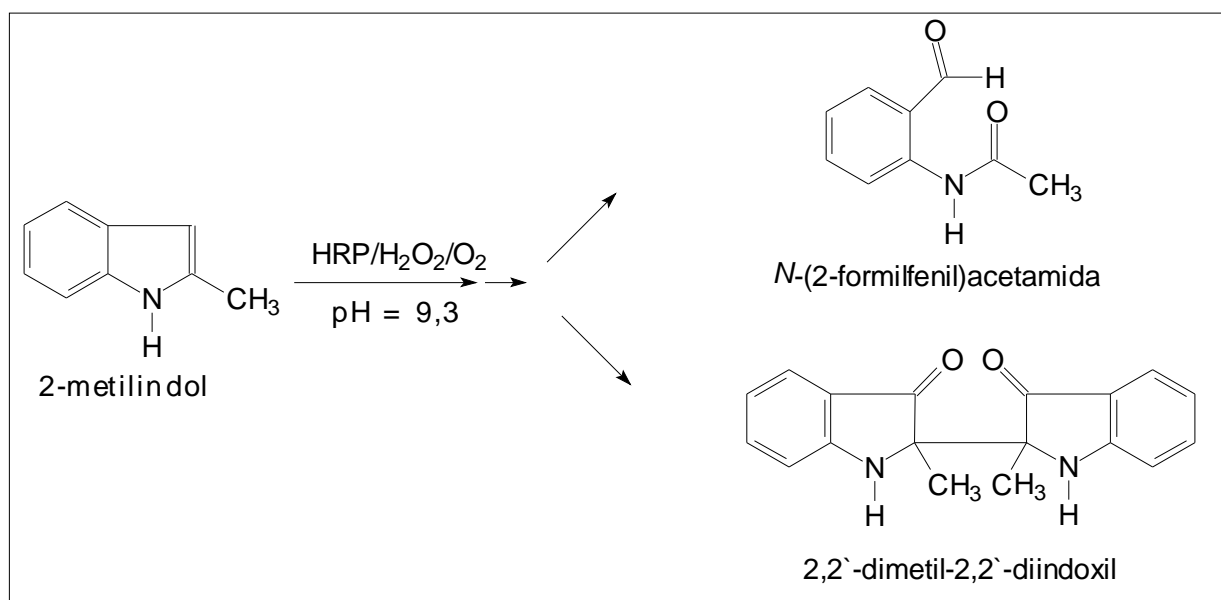


Figura 5.25- Espectro de quimiluminescência do 2,5-dimetilindol *versus* fluorescência dos produtos de oxidação. (A) pico 1, $\lambda_{ex} = 320$ nm; (B) pico 2 $\lambda_{ex} = 380$ nm; (C) espectro de quimiluminescência da reação

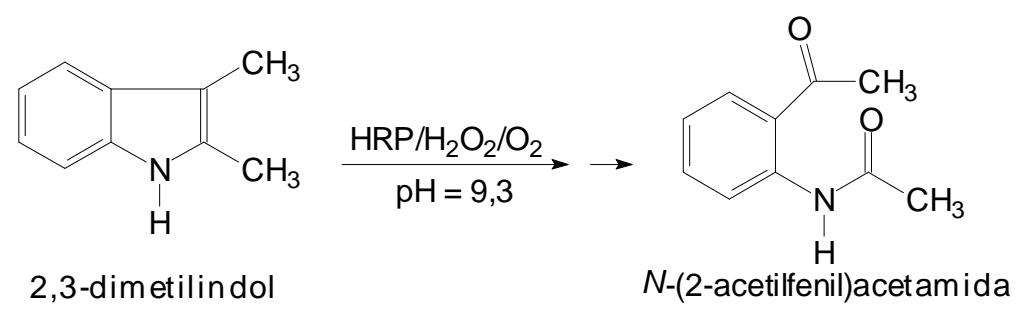
Os resultados obtidos indicavam claramente que a destacada eficiência dos substratos 2-metilindol e 2,5-dimetilindol estava relacionada à formação de um produto fluorescente somente verificado na oxidação desses dois compostos. Assim, resolveu-se fazer uma caracterização dos dois produtos principais da oxidação do 2-metilindol e, para efeito de comparação, do produto principal obtido na oxidação do 2,3-dimetilindol.

Para o 2-metilindol realizou-se a oxidação em larga escala (300 mL de solução), liofilização para concentração e isolamento dos produtos por cromatografia rotatória preparativa de camada fina (chromatotron). Por espectrometria de massa o pico 1 foi identificado como sendo *N*-(2-formilfenil)acetamida (m/z : 163 (M^+ , 15%); 135 ($M^+ - CO$, 16%); 121 ($M^+ - H_2C=C=O$, 12%); 93 ($M^+ - CH_2=C=O - CO$, 100%), **espectro 25**). Para o pico 2 os resultados de espectrometria de massa (m/z : 290 ($M^+ - 2 H$, 53%); 146 ($M^+/2$, 100%), **espectro 26**) e RMN de 1H (1,56 (s, 6 H); 7,62-6,90 (m, 8 H), **espectro 27**) mostraram uma boa correlação com o composto 2,2'-dimetil-2,2'-diindoxil⁽¹⁰⁶⁾, apesar de ainda existir impureza no composto isolado. O esquema 5.1 mostra as estruturas dos compostos citados.



Esquema 5.1- Principais produtos identificados após oxidação do 2-metilindol

Procedimento semelhante foi realizado para o 2,3-dimetilindol. Neste caso, após a oxidação (300 mL de solução), o produto (pico 1) foi isolado por extração com solvente (acetato de etila) concentrado e então submetido à espectrometria de massa (m/z : 177 (M^+ , 18%); 162 ($M^+ - CH_3$, 6%); 145 ($M^+ - CH_2=C=O$, 3%); 134 ($M^+ - H_3CCO$, 19%); 120 ($M^+ - CH_3 - H_2C=C=O$, 100%); 92 ($C_6H_5NH_2$, 19%) **espectro-24**). Os dados de massa indicaram claramente tratar-se da *N*-(2-acetilfenil)acetamida. O esquema 5.2 mostra a estrutura do composto citado.



Esquema 5.2- Produto principal obtido após oxidação do 2,3-dimetilindol

Como foi mostrado, tanto para a oxidação do 2-metilindol quanto para a oxidação do 2,3-dimetilindol, os produtos (pico 1) correspondem ao esperado supondo um mecanismo intermediado por um derivado dioxetânico. Na oxidação química de derivados indólicos, diversas vezes foi proposto a formação desses intermediários como responsáveis pelo passo de quimi-excitação dessas reações. Além disso, a boa correlação verificada entre o espectro de fluorescência do composto *N*-(2-acetilfenil)acetamida (pico 1) e o espectro de quimiluminescência da oxidação do 2,3-dimetilindol vai ao encontro dessa proposta (figura 5.23). Por outro lado, tanto a oxidação do 2-metilindol quanto a oxidação do 2,5-dimetilindol, o espectro de quimiluminescência correlacionou-se perfeitamente com o espectro de fluorescência do pico 2 (2,2'-dimetil-2,2'-diindoxil no caso do 2-metilindol). Considerando-se que a formação direta desse diindoxil em estado excitado não pode

ser facilmente racionalizada, tomando-se como base os conhecidos passos de quimi-excitação, resolveu-se estudar o possível envolvimento do mesmo como um sensibilizador da reação.

5.1.9- Diindoxil atuando como um sensibilizador da reação 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂

Com o intuito de verificar se o diindoxil formado na reação de oxidação do 2-metilindol poderia estar atuando como um acceptor fluorescente de energia, após isolamento, adicionou-se este composto às oxidações de alguns derivados indólicos. Para os derivados indol, 5-metilindol e 5-metóxindol, observou-se um aumento de cerca de uma ordem de grandeza na intensidade de quimiluminescência quando este composto foi adicionado. A figura 5.26 mostra o resultado obtido com o indol.

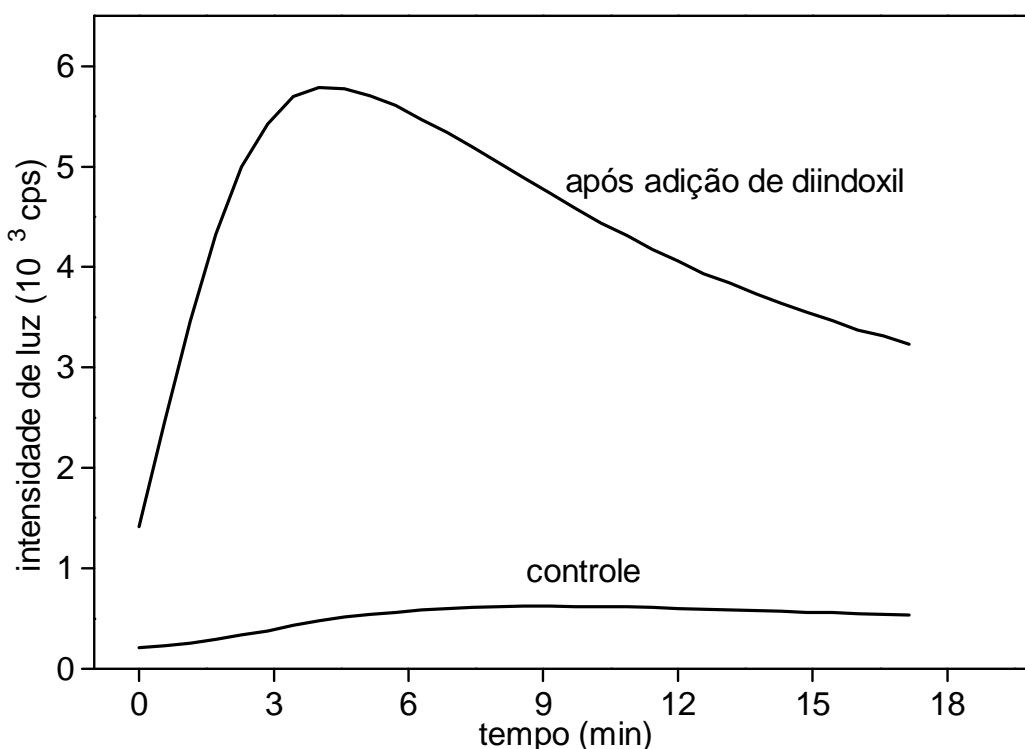


Figura 5.26- Adição do diindoxil na oxidação do indol: Concentrações finais: [indol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, [HRP] = 0,2 μmol/L, [MAP] = 50 mmol/L, pH 9,3, 37°C, diindoxil isolado 20 μL (concentração não determinada)

Verificou-se resultado semelhante quando o 2-metilindol foi oxidado juntamente com os derivados indólicos citados acima. A figura 5.27 mostra a amplificação da quimiluminescência do 2-metilindol quando foi adicionado 5-metilindol ao meio de reação.

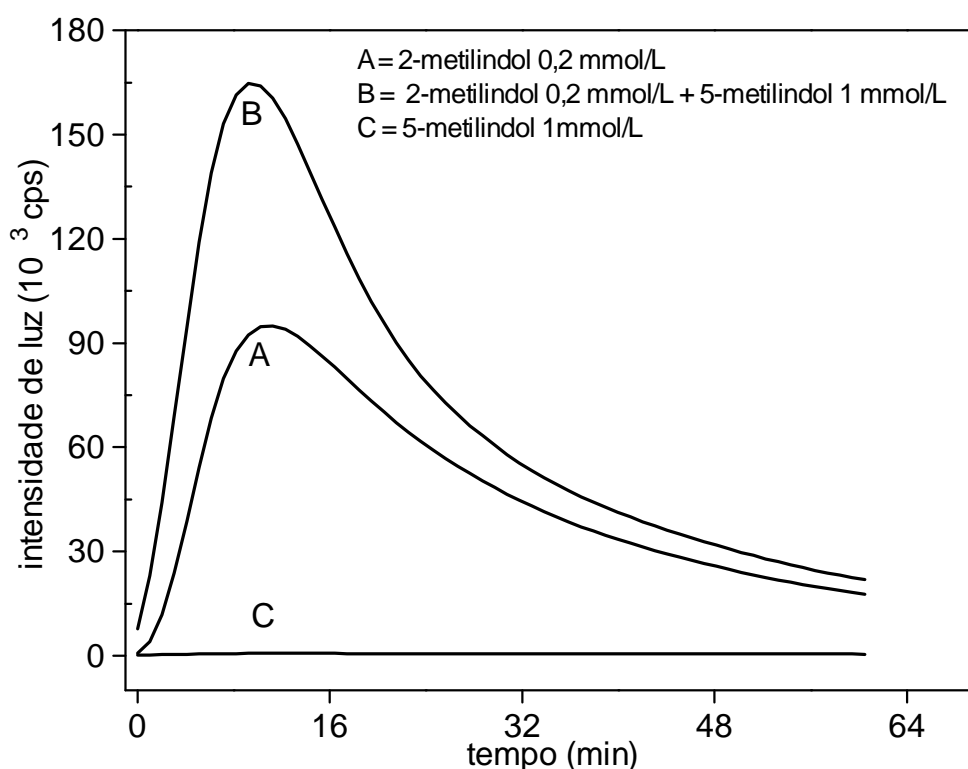


Figura 5.27- Adição de 5-metilindol na oxidação do 2-metilindol: $[H_2O_2] = 5$ mmol/L, $[HRP] = 0,2 \mu\text{mol/L}$, $[MAP] = 50$ mmol/L, pH 9,3, 37°C

Por outro lado, para derivados indólicos em que a posição três do anel pirrólico está substituída, como o 3-metilindol, 2,3-dimetilindol e melatonina, não se observou efeito de sensibilização, seja com a adição do diindoxil, seja com a oxidação conjunta destes com o 2-metilindol.

A adição do diindoxil na oxidação do próprio 2-metilindol ou do 2,5-dimetilindol também não causou alteração significativa na intensidade de quimiluminescência.

5.1.10- Relação entre produtos de oxidação e eficiência de quimiluminescência da reação 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂

Verificou-se que a eficiência de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol em função do pH do meio de reação podia ser qualitativamente correlacionada com a relação dos produtos (diindoxil (pico 2) / produto de clivagem do anel (pico 1)). Este resultado novamente apontou para o diindoxil como responsável pela surpreendente quimiluminescência do 2-metilindol, seja atuando como um acceptor fluorescente, seja como o próprio produto primário no estado excitado (tabela 5.2).

Tabela 5.2- Relação entre os produtos de oxidação do 2-metilindol e eficiência de quimiluminescência

| H | Rendimento relativo de quimiluminescência | Relação de picos (Diindoxil/prod de clivagem) fluorescência 500 nm |
|-----|---|--|
| ,8 | 0,0007 | 0,84 |
| ,4 | 0,0020 | 0,91 |
| ,3 | 0,85 | 2,35 |
| 1,6 | 1,00 | 3,64 |

Concentrações finais: [HRP] = 0,2 $\mu\text{mol/L}$, [2-metilindol] = 1 mmol/L , [H_2O_2] = 5 mmol/L , 37°C, [tampões] = 50 mmol/L . Tampão citrato pH 4,8; tampão fosfato pH 7,4; tampão MAP pH 9,3; tampão fosfato pH 11,6

Também observou-se um aumento da razão diindoxil/produto de clivagem do anel, quando da adição de KO_2 , e diminuição, quando da adição de SOD (tabela 5.3), indicando que o ânion superóxido favorece a formação do diindoxil e consequentemente a eficiência de quimiluminescência da reação.

Tabela 5.3- Efeito de SOD e KO_2 na relação de produtos de oxidação e eficiência de quimiluminescência.

| | Intensidade Relativa de Quimiluminescência | Relação de Picos (Diindoxil/Prod. De Clivagem) |
|------------------------|--|--|
| Controle 1 | 1 | 2,3 |
| SOD 5,1 μmL | 0,2 | 1,4 |
| Controle 2 | 0,09 | 1,1 |

| | | |
|-----------------------------|---|-----|
| KO ₂ 5 mmol/L | 1 | 2,2 |
|-----------------------------|---|-----|

Controle 1: [HRP] = 0,2 µmol/L, [2-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, 37°C, [MAP] 50 mmol/L, pH 9,3.

Controle 2: [HRP] = 0,2 µmol/L; [2-metilindol] = 1 mmol/L; [fosfato] 50 mmol/L; pH 7,4, [H₂O₂] = 5 mmol/L.

5.1.11- Potenciais Aplicações do Sistema 2-metilindol/HRP/H₂O₂/O₂

Visto que a peroxidase de raiz forte é largamente utilizada como marcador em ensaios imunoenzimáticos (conjugados de HRP), analisou-se a relação entre quimiluminescência e concentração de HRP, utilizando-se o 2-metilindol como substrato. As figuras 5.28 e 5.29 mostram que a área integrada de quimiluminescência pode ser correlacionada com as concentrações de HRP e HRP-IgG respectivamente, o que viabiliza a utilização dessa metodologia analítica nestes campos de aplicação.

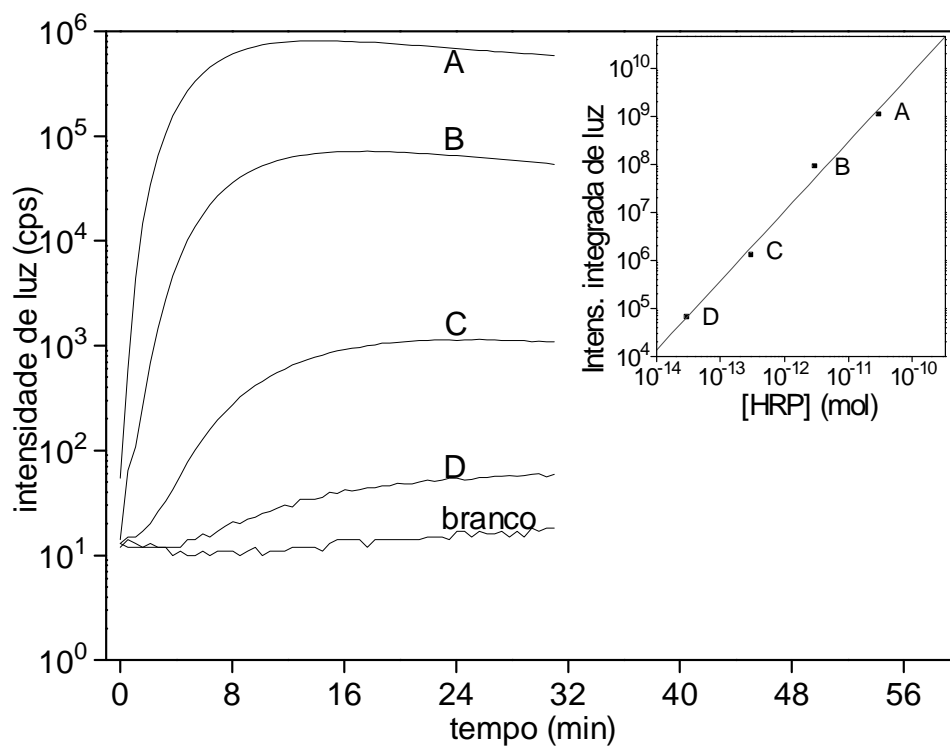


Figura 5.28- Correlação entre [HRP] e intensidade de luz. Concentrações finais: [2-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, [AMP] = 0,05 mmol/L, pH 9,3, 37°C

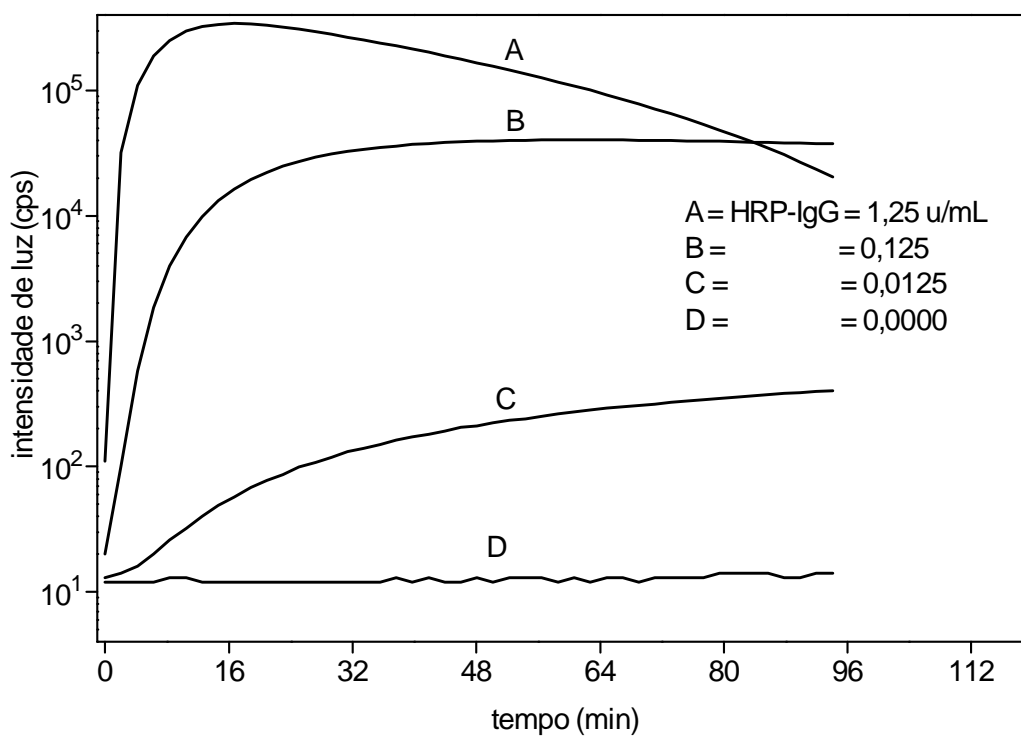


Figura-5.29- Correlação entre [HRP-IgG] e intensidade de luz. Concentrações finais: [2-metilindol] = 1 mmol/L, [H₂O₂] = 5 mmol/L, [AMP] = 0,05 mmol/L, pH 9,3, 37°C

Outra potencial aplicação da oxidação quimiluminescente de indóis é o estudo qualitativo ou quantitativo de outras peroxidases. Neste campo merece destaque os estudos da quimiluminescência nativa ou ativada em neutrófilos onde a enzima mieloperoxidase exerce um papel fundamental⁽⁶⁸⁾. Neste contexto foi testado a ação catalítica de mieloperoxidase comercial extraída de neutrófilos na oxidação do 2-metilindol. O resultado foi positivo e abre as portas para novas aplicações desse substrato (figura 5.30).

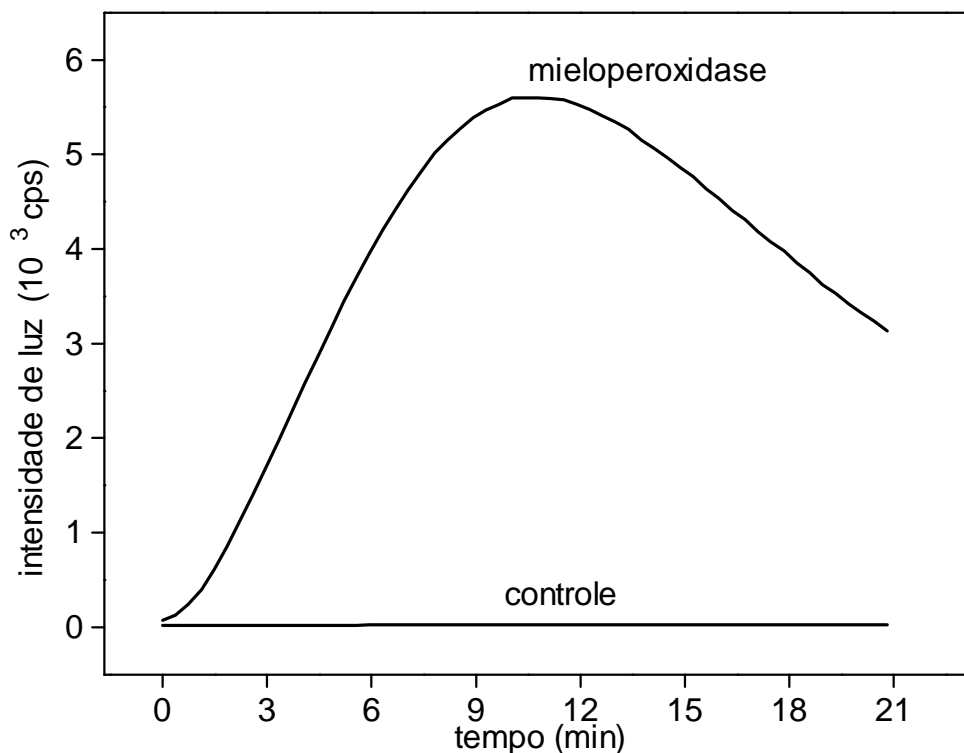


Figura 5.30- Oxidação do 2-metilindol catalisada mieloperoxidase.

Concentrações por finais: [2-metilindol] = 1 mmol/L, [MPO] = 1 u/mL, [H₂O₂] = 5 mmol/L, [AMP] = 50 mmol/L, pH 9,3, 37°C

5.2- Discussão e Conclusões

Observou-se uma grande variação no rendimento total de quimiluminescência em função dos substituintes no núcleo indólico. Dos 22 derivados estudados, destacaram-se o 2,5-dimetilindol e principalmente o 2-metilindol, cujo decaimento da emissão pode durar até quatro horas, e sua eficiência quântica é em média 1000 vezes maior do que a dos demais derivados. O rendimento quântico de quimiluminescência encontrado $((9,1 \pm 0,8) \times 10^{-5} \text{ E/mol})$ para a oxidação do 2-metilindol coloca o sistema entre as reações quimiluminescentes consideradas de

moderada eficiência. Como comparação, pode-se citar as reações de auto-oxidação de compostos carbonílicos catalisadas por base (por exemplo, auto-oxidação de cetonas $\phi_{CL} = 10^{-6}$)⁽¹⁰⁷⁾ e a reação de oxidação do luminol ($\phi_{CL} = 10^{-2}$)⁽¹⁰⁸⁾.

Os processos de auto-oxidação, que precedem muitas reações quimiluminescentes não enzimáticas, normalmente são conduzidos em meio fortemente alcalino ou através de iniciadores radicalares. A oxidação do luminol por exemplo, que em meio aprótico fortemente alcalino (*t*-BuOK/DMSO), onde ocorre **dupla desprotonação** do substrato, emite forte quimiluminescência quando apenas aerado (oxidação pelo oxigênio). Por outro lado, em meio aquoso (pH 11,6), onde ocorre apenas **mono desprotonação**, é necessária a adição de peróxido de hidrogênio e catalisadores como complexos férricos ou hemina⁽¹⁰⁸⁾. É também conhecida a oxidação química do indol e seus derivados por agentes oxidantes clássicos, como KOH/H₂O₂/K₃Fe(CN)₆, DMSO/KOH/O₂ ou NaOH/K₂S₂O₈, sendo novamente observado a importância do meio alcalino^(49, 52, 53). Assim, em um primeiro momento, era esperado que de modo geral a maior eficiência de quimiluminescência dos derivados indólicos fosse alcançada em pHs alcalinos. Por outro lado, apenas para a oxidação do 2-metilindol e 2,5-dimetilindol esta intensificação atingia de duas a três ordens de grandeza quando realizada em meio alcalino (figuras 5.5, 5.7, 5.8 e 5.9). Portanto, não há dúvida de que o comportamento diferenciado do 2-metilindol e 2,5-dimetilindol, em relação aos outros derivados indólicos, deve-se a uma característica específica desses compostos e detectada somente nestas condições de reação (oxidação catalisada por HRP em meio alcalino), já que a oxidação química não revela esta característica (figura 5.3); portanto, não encontra precedentes nos trabalhos já desenvolvidos nesta área.

O papel da HRP como catalisador da oxidação destes indóis pode ser assegurado pela ausência de emissão de luz na ausência da enzima ou pela inativação da mesma por aquecimento a 80 °C por 3 horas (figura 5.7). Os testes que utilizam peróxido de hidrogênio em meio alcalino como meio oxidante e Fe⁺³ como catalisador, e que já foi descrito para o estudo das características quimiluminescentes de alguns derivados indólicos, resultaram em uma extremamente baixa quimiluminescência, tanto para o 2-metilindol quanto para o 3-metilindol e não mostraram diferenças significativas entre estes.

O perfil cinético das reações varia em função dos derivados indólicos utilizados. Para o 3-metilindol, por exemplo, verificou-se sempre uma curva de emissão tipo *flash* (subida instantânea seguida de decaimento exponencial), que pode ser entendida supondo-se que a etapa lenta do processo seja a reação entre o 3-metilindol e a peroxidase ou, mais precisamente, com os intermediários ativos da mesma. Diferentemente, para o 2-metilindol verificou-se uma curva de emissão que indica o acúmulo de algum intermediário (subida lenta), sendo a sua decomposição a etapa lenta do processo.

Além de fornecer as espécies ativas que iniciam o processo oxidativo, a peroxidase de raiz forte desempenha um efeito “catalático”, que de fato é conhecido, decompondo peróxido de hidrogênio e fornecendo oxigênio ao meio. Isto foi facilmente comprovado por meio dos controles utilizando-se apenas peroxidase e peróxido de hidrogênio nas condições de reação (figura 5.13).

Outros achados experimentais também podem ser explicados pela ação “catalática” desempenhada pela peroxidase. É o caso, por exemplo, da falta de correlação entre a cinética de consumo de oxigênio e o decaimento do sinal quimiluminescente. Em uma situação análoga, que é a oxidação de enóis via HRP/H₂O₂/O₂, observa-se o oxigênio dissolvido no meio (0,2 mM) como reagente limitante da reação. Entretanto, isto não ocorre no caso de alta concentração de peróxido de hidrogênio, pois a reposição do oxigênio, pela decomposição do peróxido, realimenta a reação. A redução do rendimento total de quimiluminescência observado para concentrações de peroxidase acima de 1 µmol/L pode também ser explicada pela atividade “catalática” da peroxidase. Neste caso, a perda de peróxido de hidrogênio é mais importante do que o ganho com o oxigênio produzido. Este efeito também foi observado no consumo do substrato, monitorado por HPLC, no qual notou-se que a menor eficiência de quimiluminescência, quando altas concentrações de peroxidase foram utilizadas, estava novamente associada ao menor consumo de 2-metilindol.

A alta dependência do rendimento de quimiluminescência do 2-metilindol em função da concentração de peróxido de hidrogênio poderia sugerir o envolvimento do mesmo em outras etapas da reação, além de apenas formar as espécies ativas de peroxidase (HRP-I, HRP-II). Isto foi considerado pois, em reações a princípio semelhantes (oxidação de enol), uma relação estequiométrica de 1 para 2 (0,1

mmol/L da H_2O_2 para 0,2 mmol/L de oxigênio) é normalmente observada⁽⁴¹⁾. A seguir analisaremos algumas possibilidades:

- i) **oxidação direta do 2-metilindol pelo peróxido de hidrogênio em meio alcalino**: esta possibilidade, embora factível, pois como já foi mostrado a oxidação química pode ocorrer em condições semelhantes às aqui empregadas, foi descartada, devido a necessidade da peroxidase como catalisador;
- ii) **reação entre os radicais indoila previamente formados e peróxido de hidrogênio**: supondo o mecanismo peroxidático clássico e a conseqüente formação dos radicais indoila, poderia-se imaginar que o peróxido de hidrogênio atuasse diretamente sobre estes, ou pelo menos houvesse uma competição entre o peróxido de hidrogênio e o oxigênio molecular pelos radicais formados, já que não se pode descartar o consumo de oxigênio. No entanto, esta hipótese foi descartada visto que a desaeração do meio, seja por saturação com nitrogênio, seja pelo uso do sistema enzimático glicose/glicose-oxidase, suprimiu quase totalmente a emissão (figura 5.14), indicando que peróxido de hidrogênio em alta concentração não é condição suficiente para que haja quimiluminescência. Inclusive, o uso de glicose/glicose-oxidase, sistema capaz de consumir oxigênio às custas da oxidação de glicose e **formação de peróxido de hidrogênio**, poderia levar a intensificação da quimiluminescência, caso o peróxido tivesse a função aqui citada.
- iii) **peróxido de hidrogênio atuando como fonte de oxigênio**: os ensaios em que catalase foi adicionada ao sistema mostraram não apenas a supressão, mas também a intensificação da quimiluminescência quando em baixas concentrações da mesma (figura 5.16). Como a enzima catalase decompõe peróxido, deveria ser observada apenas a supressão de quimiluminescência, caso houvesse apenas o desfavorecimento da formação de composto-I de HRP. No entanto, observou-se que, para baixas concentrações de catalase, ocorria o inverso, ou seja, um aumento de eficiência. Isto pode ser explicado considerando-se que a **formação de oxigênio** pela decomposição do peróxido pode, em determinado momento, ser mais importante do que a perda de peróxido de hidrogênio.

Estes resultados indicam que o peróxido de hidrogênio pode ter duas funções principais no mecanismo da reação: (i) **formar as espécies ativas de peroxidase**; (ii) **fornecer oxigênio ao meio de reação por decomposição**. Outra evidência

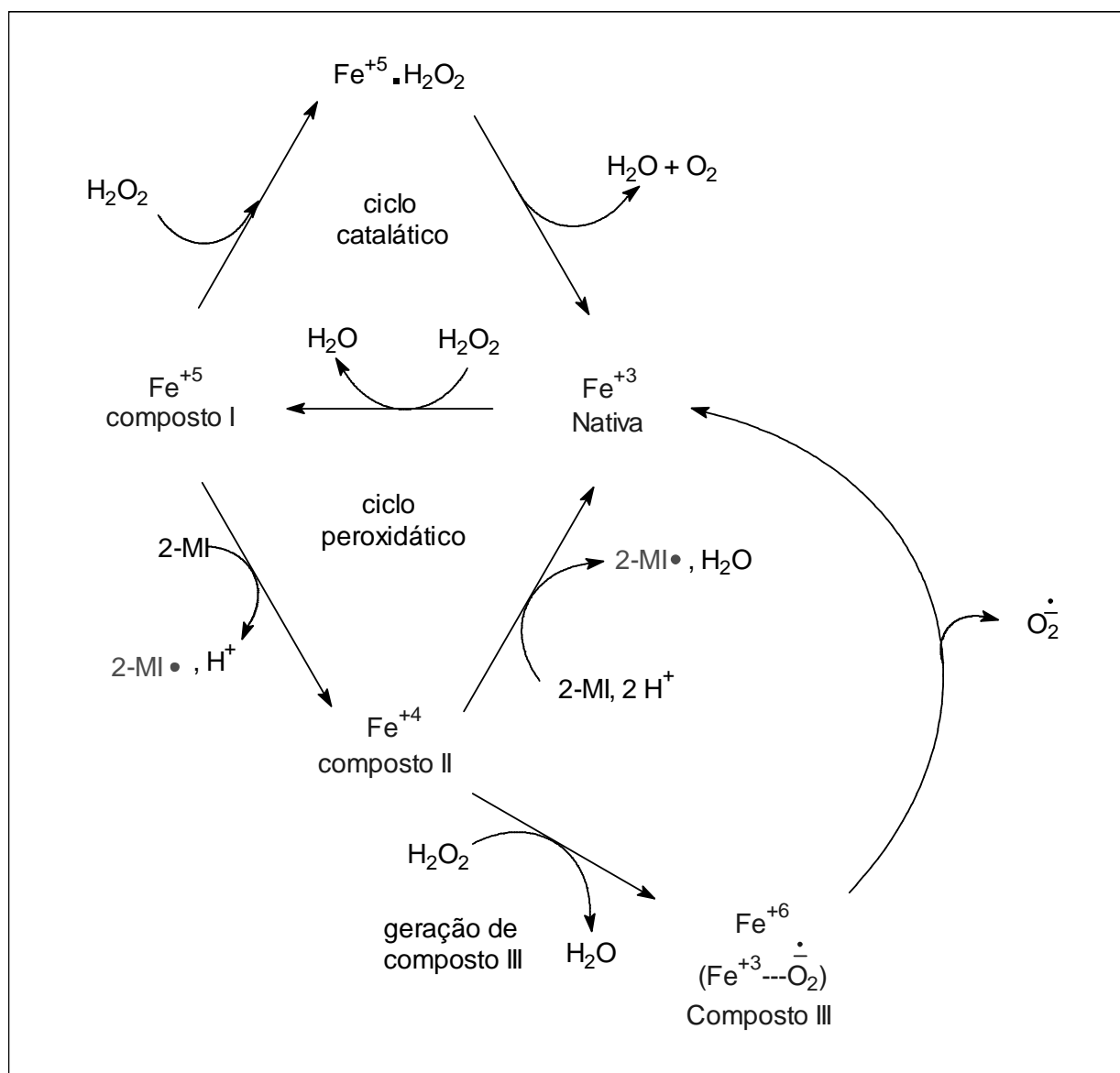
dessa última função, e que explica a menor eficiência de quimiluminescência em concentrações baixas de peróxido de hidrogênio, está na observação de que o mesmo era o reagente limitante da reação. Ficou evidente, com a análise de produtos, que a menor eficiência observada para concentrações mais baixas de peróxido estava relacionada ao baixo consumo do 2-metilindol. Após o decaimento do sinal quimiluminescente, mesmo utilizando 5 mM de peróxido para 1mM de substrato, era possível restabelecê-lo (parcialmente), através de re-adições de peróxido. O esquema 5.3 mostra as possíveis funções do peróxido de hidrogênio na oxidação do 2-metilindol.

A supressão da quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol pela adição de SOD sugere o envolvimento do ânion superóxido no mecanismo da reação. De fato, a formação e estabilização de ânion superóxido podem ser favorecidas nas condições de reação utilizadas neste trabalho. Em primeiro lugar, o ânion superóxido são estabilizados em meio alcalino e em segundo lugar, sua formação poderia ser favorecida nestas condições pela seguinte razão: dentre as possibilidades de compostos ativos de peroxidase, esperados e apresentados no esquema 5.3, é sabido que o potencial de redução do par HRP-II/HRP, ao contrário de HRP-I/HRP-II, é fortemente dependente de pH, variando de aproximadamente 1,0 V em pH 6,0 para 0,5 V em pH 11,0 ⁽¹⁰⁹⁾. Este fato sugere que em pH alcalino haveria o favorecimento da formação de composto-III devido a inibição, total ou parcial, do passo de conversão da HRP-II à HRP nativa. A HRP-III, por sua vez, poderia gerar ânion superóxido por decomposição ⁽¹¹⁰⁾. A relação entre a eficiência e o envolvimento de ânion superóxido foi posteriormente comprovada pela adição de superóxido de potássio (KO₂) na reação em meio neutro, e o conseqüente aumento em uma ordem de grandeza na quimiluminescência (figura 5.18).

A competição entre estes diferentes ciclos da peroxidase também poderia explicar o efeito cinético observado em função do pH na oxidação do 2-metilindol. Observou-se uma diminuição da velocidade da reação em pH alcalino, o que, segundo a nossa proposta, seria devido à inibição da constante de velocidade do passo HRP-II à HRP nativa. Uma comprovação dessa proposta foi verificada no experimento em que se adicionou superóxido de potássio na reação em pH 7,4. Neste caso, apesar da significativa intensificação da quimiluminescência, não houve

uma alteração no perfil cinético da reação. Isto era esperado, visto que não ocorreu mudança no pH e conseqüentemente nos ciclos da peroxidase.

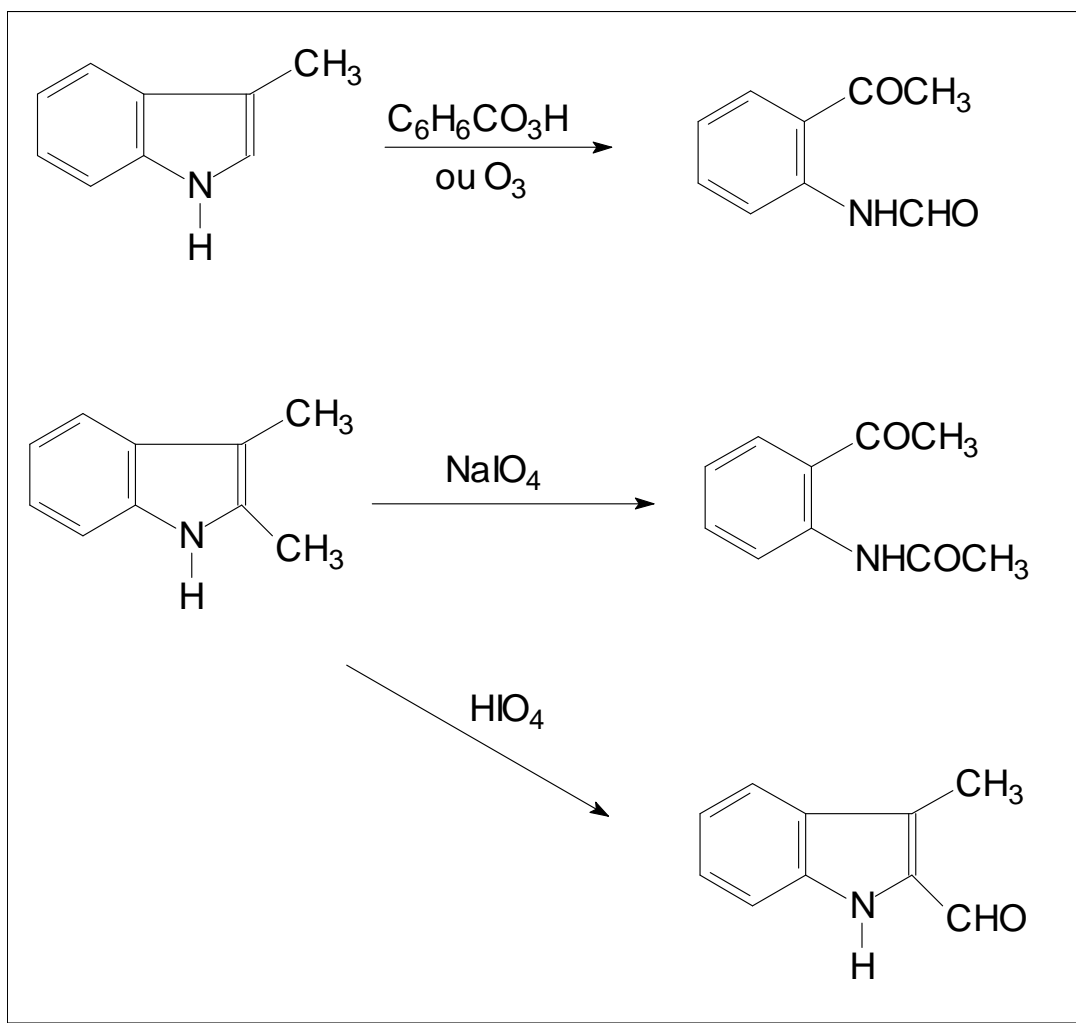
O envolvimento de ânion superóxido foi posteriormente observado na oxidação da melatonina via HRP/H₂O₂/O₂, estudo que encontra-se em andamento em nosso laboratório. O esquema 5.3 mostra os ciclos da peroxidase que podem estar envolvidos na oxidação do 2-metilindol.



Esquema 5.3- Prováveis ciclos da peroxidase na oxidação do 2-metilindol

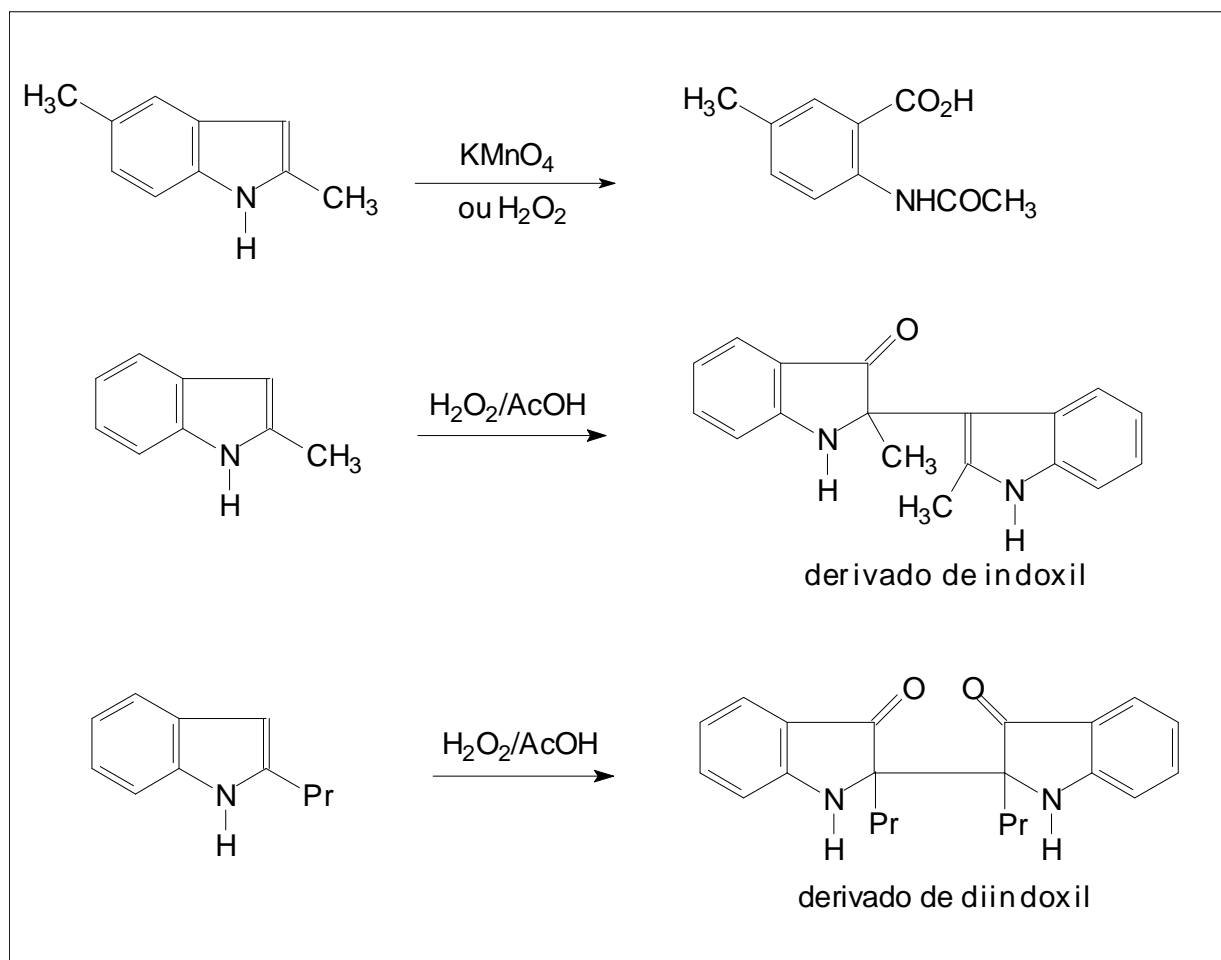
Antes de discutir os resultados obtidos na identificação de alguns produtos de oxidação, cabe ressaltar os produtos normalmente encontrados nas oxidações químicas de alguns indóis.

Derivados indólicos que possuem substituições na posição 3, quando submetidos a diferentes sistemas oxidativos produzem os mais variados compostos e, entre eles, destacam-se aqueles em que o anel pirrólico é clivado. O exemplo abaixo mostra os produtos obtidos na oxidação do 2,3-dimetilindol com ácido periódico ou periodato de sódio e 3-metilindol com ácido perbenzóico ou ozônio (esquema 5.4) ⁽¹¹¹⁾. É importante ressaltar que apesar de o produto final depender do sistema oxidativo, em nenhum dos casos citados em literatura encontram-se produtos do tipo indoxil, como seria esperado, devido à estrutura desses compostos.



Esquema 5.4- Exemplos de oxidações química de indóis substituídos na posição 3

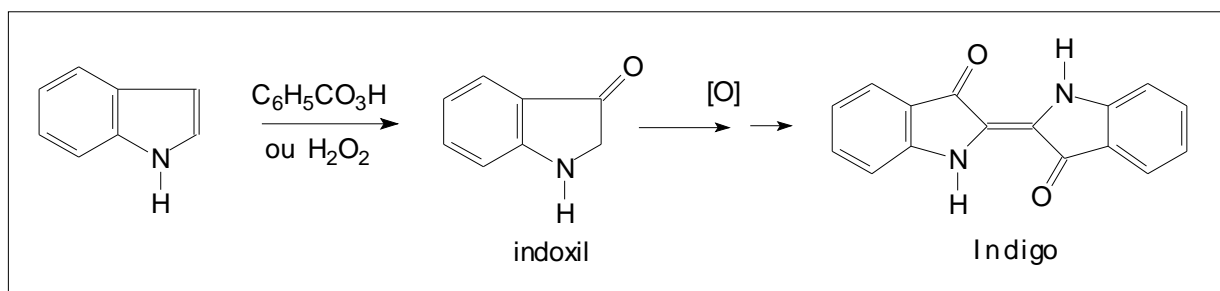
Para a oxidação de derivados indólicos, substituídos na posição 2 por grupos alquílicos e não substituídos na posição 3, além dos produtos de clivagem oxidativa do anel pirrólico, formam-se derivados de indoxil e diindoxil^(111,112). Alguns exemplos são mostrados abaixo (esquema 5.5).



Esquema 5.5- Exemplos de oxidações química de indóis substituídos na posição 2

A formação de derivados de diindoxil parece ser exclusiva para derivados indólicos substituídos por grupos alquílicos na posição 2 e livres de substituição na posição 3. Quando derivados indólicos com ambas posições livres são oxidados, formam-se principalmente indoxils que posteriormente serão re-oxidados a derivados do corante indigo (esquema 5.6)⁽¹¹¹⁾. De fato, no presente estudo, para os derivados indol, 5-metilindol, 4-metoxindol entre outros, que

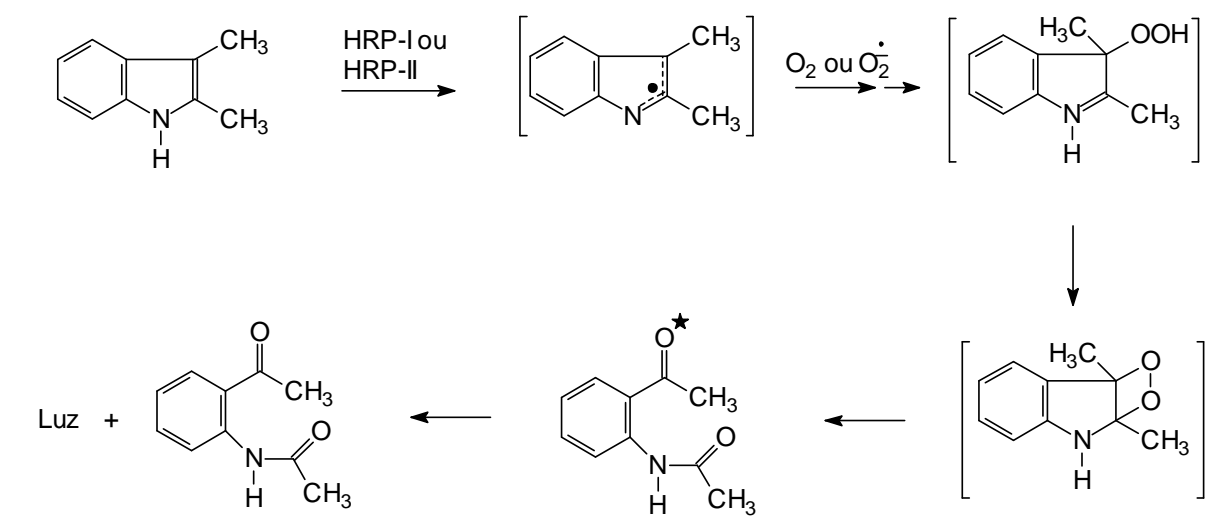
apresentam as posições 2 e 3 livres, verificou-se a formação de compostos coloridos que não foram identificados.



Esquema 5.6- Exemplo de oxidação química do indol

Neste trabalho, durante a oxidação do indol, 2,5-dimetilindol, 2,3-dimetilindol, 2-metilindol, 3-metilindol, 4-metoxiindol e melatonina, ocorreu a formação de um composto principal, provavelmente tratam-se dos produtos formados pela abertura oxidativa do anel pirrólico desses compostos. A comprovação dessa hipótese foi obtida através do isolamento e identificação dos produtos oriundos da oxidação do 2-metilindol (*N*-(formilfenil)acetamida), e do 2,3-dimetilindol (*N*-(acetilfenil)acetamida) por espectrometria de massa. Para os demais derivados não foi realizado identificação de produtos.

Para o 2,3-dimetilindol, a correlação observada entre a distribuição espectral de quimiluminescência e o espectro de fluorescência indica que a formação da o-acetamina-acetofenona em estado excitado deve ser o responsável pela quimiluminescência (figura 5.23). Uma proposta mecanística para a quimiluminescência observada na oxidação do 2,3-dimetilindol, e que poderia ser generalizada para a maioria dos derivados indólicos, é apresentada no esquema 5.7.



Esquema 5.7- Esquema reacional proposto para oxidação do 2,3-dimetilindol via HRP/ H_2O_2/O_2

Como seria esperado para indóis substituídos por grupos alquílicos na posição 2 e hidrogênio na posição 3 (esquema 5.5), também neste sistema oxidativo, para o 2-metilindol e 2,5-dimetilindol, observou-se a provável formação de derivados de diindoxil. Para o 2-metilindol as evidências analíticas apontam para o composto 2,2'-dimetil-2,2'-diindoxil. Obteve-se este composto na década de 60 quando se tentava sintetizar a 2-metilindolinona, descrita como sendo um composto instável e nunca isolado⁽¹⁰⁶⁾.

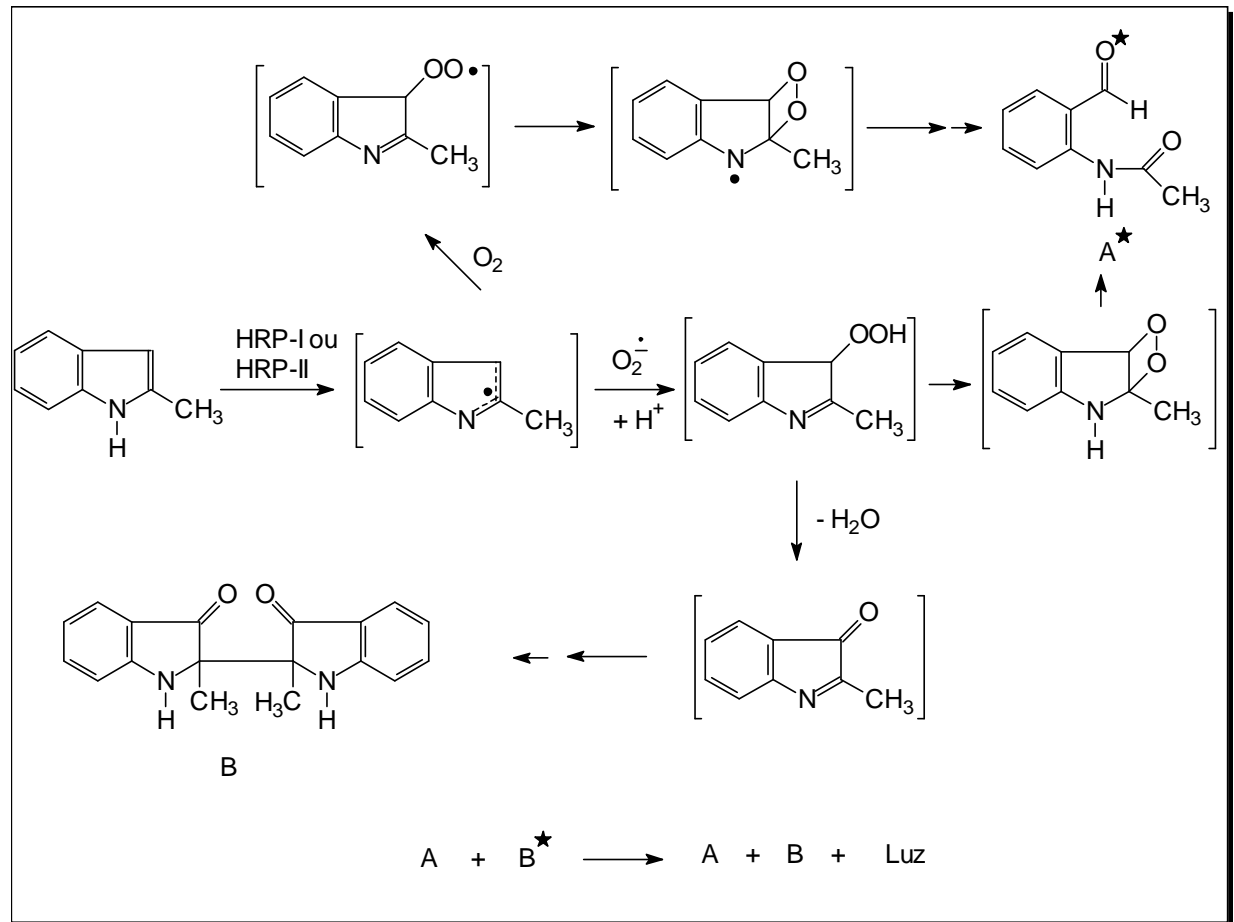
A perfeita correlação entre a distribuição espectral de quimiluminescência do 2-metilindol e o espectro de fluorescência do diindoxil, não deixa dúvida de que a alta eficiência de quimiluminescência obtida na oxidação desse derivado indólico deve-se à formação do mesmo (figura 5.24). O mesmo pode ser dito para o 2,5-dimetilindol, embora não tenha sido feita a caracterização estrutural do possível diindoxil formado (figura 5.25).

A correlação existente entre o aparecimento do diindoxil com o aumento dramático da quimiluminescência mostrou-se evidente em vários ensaios. O maior rendimento quântico de quimiluminescência observado em pH alcalino ou promovido pela adição de KO_2 coincide com o aumento relativo na formação da diindoxil (tabelas 5.2 e 5.1). Na mesma direção apontam a diminuição da quimiluminescência e a diminuição do diindoxil quando se faz adição de superóxido dismutase.

São duas as possibilidades de envolvimento do diindoxil na quimiluminescência do 2-metilindol e 2,5-dimetilindol. Uma possibilidade é a sua formação diretamente em estado excitado, no entanto, não temos uma proposta que explique qual seria o passo de quimi-excitação dessa reação. A segunda possibilidade é a formação do produto de abertura do anel indólico (*N*-(formilfenil)acetamida) no estado excitado seguido da transferência de sua energia para o diindoxil. De fato, esta hipótese foi parcialmente confirmada pela intensificação de quimiluminescência quando da adição do diindoxil durante a oxidação do indol, 5-metilindol e 5-metoxindol. Na oxidação conjunta de derivados indólicos não substituídos com 2-metilindol também observou-se a intensificação (figuras 5.20 e 5.21). Por outro lado, este efeito só foi observado nas oxidações de derivados indólicos livres de substituições na posição 3, ou seja, para compostos como o 3-metilindol ou o 2.3-dimetilindol não foi observado a intensificação. Mesmo para a oxidação do 2-metilindol e 2,5-dimetilindol não se observou sensibilização quando da adição do diindoxil. Assim, embora esta proposta não possa ser descartada, ela sozinha não explica de forma definitiva o alto rendimento de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol. No caso da não sensibilização do próprio 2-metilindol, quando da adição do diindoxil isolado, é possível que a quantidade adicionada (concentração não determinada) seja inferior ao mesmo produzido na própria reação de oxidação do 2-metilindol.

O destino do radical indoíla pode determinar o tipo de produto e, conseqüentemente, a eficiência de quimiluminescência. Nossos resultados estabelecem de forma inequívoca o envolvimento de oxigênio molecular e ânion superóxido, uma vez que ambos podem ser adicionados aos radicais indoíla, produzindo um intermediário peróxido ou peróxido radical. No esquema 5.8, o hidroperóxido formado pela adição do ânion superóxido poderia ciclizar à um intermediário dioxetânico por um ataque nucleofílico intramolecular. A decomposição deste dioxetano levaria ao *N*-(formilfenil)acetamida. Alternativamente, o hidroperóxido pode desidratar-se a uma indolinona, uma reação factível para hidroperóxidos secundários ⁽¹¹³⁾. Como já foi dito, tentativas de síntese desse composto levaram à produção de dímeros (diindoxil). Por outro lado, a adição de oxigênio levaria exclusivamente ao radical alquilperoxila e, por ciclização, a um radical dioxetânico e, posteriormente, ao *N*-(formilfenil)acetamida. De fato, em um

caso similar foi detectado, por experimentos de EPR, a ciclização de um radical alquilperóxil a um radical dioxetânico intermediário⁽¹¹⁴⁾.

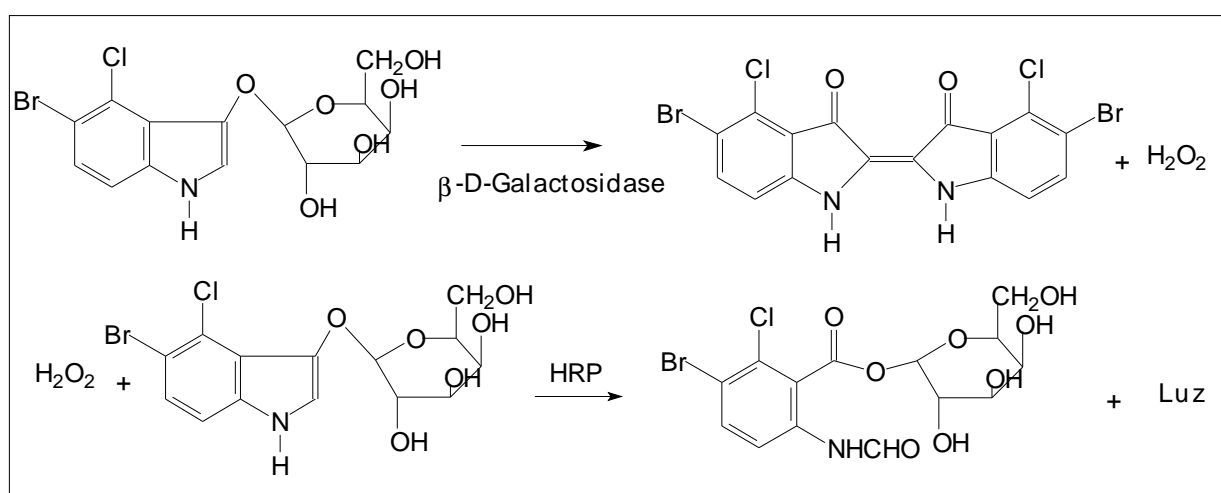


Esquema 5.8- Esquema reacional proposto para oxidação do 2-metilindol

Como já foi exposto na introdução, a peroxidase de raiz forte é uma das enzimas mais utilizadas nos chamados ensaios imunoenzimáticos. O 2-metilindol é um novo substrato quimiluminescente para a revelação desses ensaios, que além de eficiente e barato, está disponível comercialmente. A figura 5.28 mostra que mesmo quando ligada em imunoglobulina, a peroxidase é capaz de catalisar a reação, viabilizando o seu uso nesta área.

Derivados de indoxil O-protégidos foram utilizados como substratos para o desenvolvimento de metodologias quimiluminescentes para determinação de várias enzimas. O princípio dessa técnica é a geração do indoxil livre após a

hidrólise enzimática e então sua oxidação via HRP, gerando quimiluminescência^(85,86). Trata-se de um ensaio interessante em que o peróxido de hidrogênio, gerado juntamente com o indigo, pode ser utilizado tanto para oxidar luminol quanto o próprio substrato, ambos por meio da ação catalítica da peroxidase (esquema 5.9). Acreditamos que, neste caso, a substituição do substrato derivado do 6-bromo-5-cloroindol pelo equivalente do 2-metilindol poderá resultar em um enorme ganho na sensibilidade dessas técnicas, configurando-se assim como mais uma importante aplicação desse composto. Esta possibilidade será explorada em um projeto futuro em nosso laboratório.



Esquema 5.9- Utilização de derivados indólicos na determinação de β -D-Galactosidase

Outra potencial aplicação do 2-metilindol ou algum outro derivado indólico poderá ser o uso como sonda alternativa ao uso de luminol e lucigenina no estudo de *burst* oxidativo. Como foi descrito na introdução, há um grande interesse por métodos analíticos que possam distinguir as diferentes espécies reativas de oxigênio geradas pelos neutrófilos estimulados. Além do 2-metilindol ser reconhecido como substrato quimiluminescente de mieloperoxidase de neutrófilos (figura 5.29), existe uma clara evidência de sua especificidade por ânion superóxido, o que poderá ser de grande valia na distinção entre as espécies reativas de oxigênio.

Derivados indólicos biológicos

Em pH fisiológico, diversos compostos indólicos, biologicamente relevantes, podem sofrer oxidação catalisada por dioxigenases. Na via metabólica do triptofano o primeiro passo compreende sua oxidação catalisada pela triptofano 2,3-dioxigenase⁽¹¹⁵⁾. A dioxigenase inespecífica indoleamina 2,3-dioxigenase atua sobre outros indóis, incluindo melatonina e serotonina⁽¹¹⁶⁾. Em todos estes casos, ocorre a quebra do anel indólico, o que pode facilmente ser formulado imaginando o envolvimento de um intermediário dioxetânico, embora não tenham sido relatado indícios de quimiluminescência nestas reações.

Em trabalhos recentes diversos derivados indólicos biológicos foram submetidos à oxidação por meio de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^-$ e hemina como catalisador^(55,57). Nestes trabalhos foram descritos a formação de produtos de abertura oxidativa do anel (produtos quinurenínicos). Particularmente para a melatonina obteve-se quimiluminescência nessas reações, o que sugere o envolvimento de um intermediário dioxetânico como responsável pela quimiluminescência. Como já descrito na introdução, o hormônio vegetal ácido 2-(indol-3-il)acético quando submetido ao sistema HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$ também sofre oxidação quimiluminescente^(34, 35).

Nas condições de reação aqui empregadas, dos indóis biológicos testados apenas a melatonina e alguns de seus derivados, como a 6-cloromelatonina, mostraram-se quimiluminescentes quando submetidos à oxidação (figura 5.2 e tabela 5.1). Comparando a estrutura dos compostos melatonina, 6-hidroximelatonina, 5-metoxitriptamina e serotonina, pode-se supor que a presença de grupos hidróxi ou amino livres seja o responsável pela ausência de quimiluminescência quando os mesmos foram submetidos à oxidação. Realmente é sabido que substratos fenólicos podem ser oxidados pela ação catalítica da HRP através de um mecanismo “escuro” produzindo quinonas⁽¹¹⁷⁾. De fato, no presente trabalho, observou-se um escurecimento do meio de reação quando substratos com grupos hidroxila livres foram submetidos à oxidação, indicando a ocorrência de reação, embora sem emissão. É também conhecido o efeito supressor que as aminas exercem sobre estados excitados, assim a presença de grupos aminos livres nos substratos 5-metoxitriptamina e triptofano podem ser suficientes para suprimir a emissão.

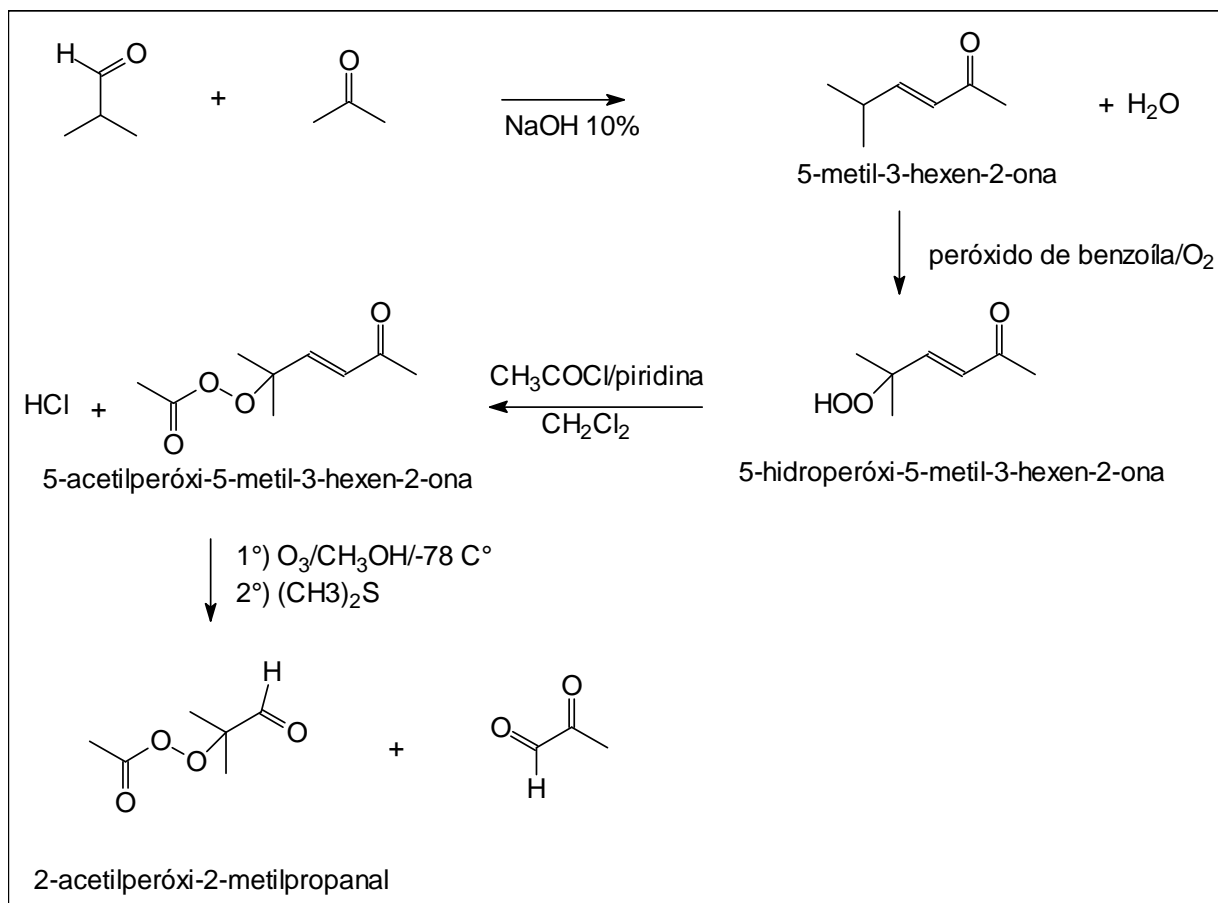
6- Síntese e Estudo de α -Hidroperóxi-aldeídos Protegidos como Substratos Quimiluminescentes de Enzimas

6.1- Resultados

Como já foi dito na introdução, muitos compostos α -hidroperóxi-carbonílicos já foram sintetizados por meio de auto-oxidação, e suas decomposições em meio alcalino geram quimiluminescência^(57, 58). Assim, com o objetivo de desenvolver uma metodologia quimiluminescente para quantificação de esterases, os trabalhos foram iniciados sintetizando-se um α -hidroperóxi-aldeídos protegido por um grupo acila. A seguir será descrito como este composto foi obtido.

6.1.1- Tentativa de síntese de 2-acetilperóxi-2-metilpropanal

Em um projeto de pós-doutoramento realizado neste laboratório, desenvolveu-se uma rota sintética para produção de um α -hidroperóxi-aldeído protegido por um grupo acila (esquema 6.1). Das etapas propostas apenas para a ozonólise não se obteve sucesso. Segundo o autor, apesar da ozonólise ter ocorrido, o que foi comprovado pela ausência de prótons olefínicos na mistura final de produtos (análise por RMN H^1), houve decomposição do produto final⁽¹¹⁸⁾.

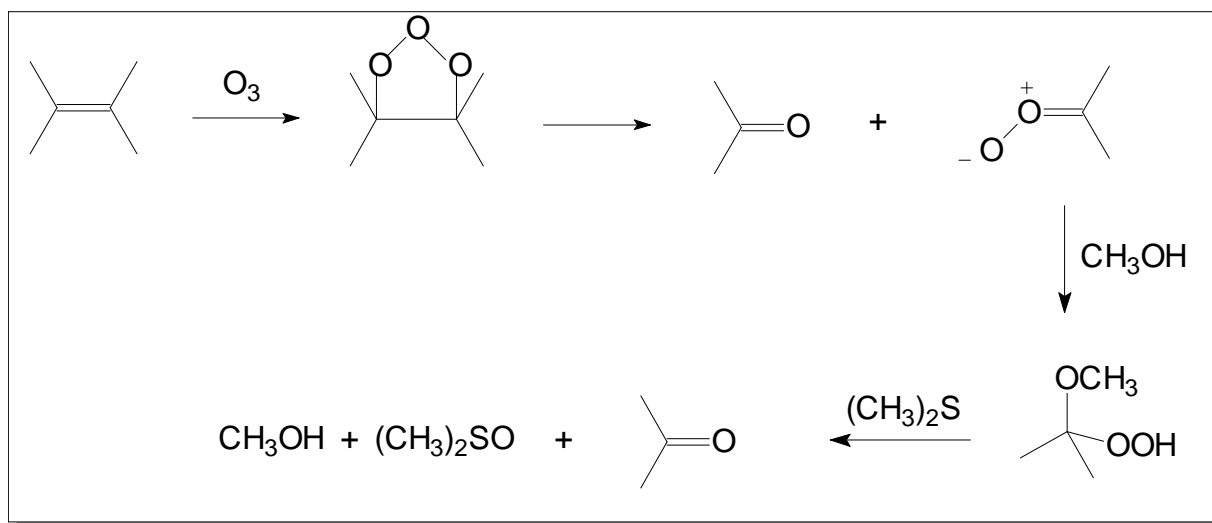


Esquema 6.1- Rota sintética para preparação do 2-acetilperóxi-2-metilpropanal

Acreditando que o problema poderia estar na etapa de redução dos produtos da ozonólise, iniciou-se esta parte do trabalho reproduzindo a rota esquematizada acima e alterando as condições de ozonólise. A seguir será apresentado um pequeno estudo sobre as reações de ozonólise.

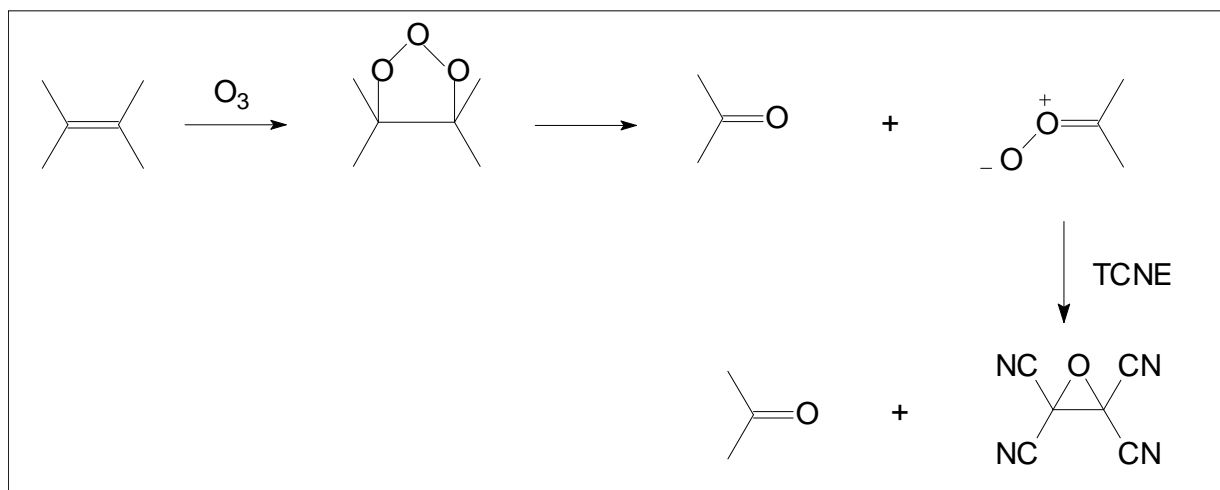
Uma grande variedade de compostos têm sido utilizados como agentes redutores nas reações de ozonólise. A redução, quando reagentes como trifetilfosfina, uréia, dimetilsulfeto, etc., são utilizados, tem como mecanismo proposto o ataque nucleofílico destes sobre o intermediário ozonídio ou sobre o carbonil-óxido formado pela sua decomposição⁽¹¹⁹⁾. Em particular, a utilização de solventes próticos pode levar à geração de hidroperóxidos a partir do carbonil-óxido intermediário. Este, então, pode ser reduzido com os reagentes já mencionados. Assim, o mais conveniente e eficiente método utilizado para ozonólise de olefinas emprega metanol como solvente e dimetilsulfeto como agente redutor⁽¹²⁰⁾ (esquema

6.2). Nessas reações, inicialmente o ozônio é injetado no meio de reação à baixa temperatura e os agentes redutores são adicionados posteriormente.



Esquema 6.2- Mecanismo proposto para ozonólises em metanol e dimetilsulfeto como agente redutor

Esta rota propõe a redução de um hidroperóxido e, conseqüentemente, poderia ser este o motivo da decomposição do α -hidroperóxido-aldeído, visto que este possui uma função química análoga. Outra técnica para realizar-se uma ozonólise utiliza solventes apróticos e o agente redutor é adicionado no início da introdução de ozônio. Trata-se do uso de tetracianoetileno (TCNE), o qual não reduz funções peroxídicas e assim foi proposto que o mesmo atuasse diretamente sobre o carbonil-óxido intermediário (esquema 6.3). De fato, foram realizados testes agitando-se o composto 5-acetilperóxi -5-metil-3-hexen-2-ona na presença de TCNE e, realmente, não houve perda de sua atividade peroxídica (teste com iodeto de potássio em meio ácido).



Esquema 6.3- Mecanismo proposto para ozonólises utilizando solventes apróticos e tetracianoetileno como agente redutor

Iniciando-se, então, as preparações (esquema 6.1), o composto 5-metil-3-hexen-2-ona foi preparado a partir da condensação aldólica do isobutanal com a propanona em meio alcalino⁽¹²¹⁾. O rendimento dessa reação foi de 21%. A auto-oxidação desse composto, promovida pelo iniciador radicalar peróxido de benzoíla, resultou no composto 5-hidroperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona com um rendimento de 41%⁽¹²²⁾. A reação desse hidroperóxido com cloreto de acetila e piridina resultou no produto acilado 5-acetilperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona com um rendimento de 25%⁽¹²³⁾.

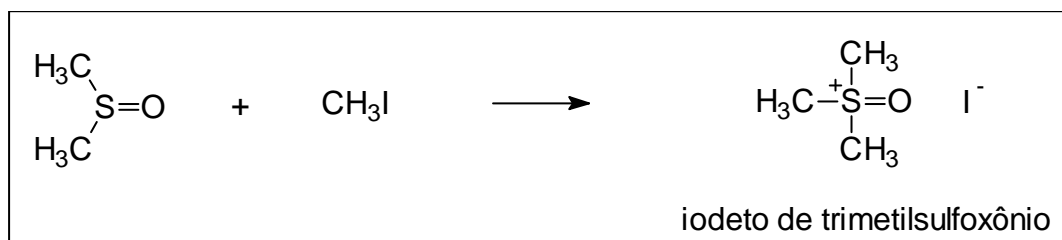
A ozonólise do 5-acetilperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona foi então realizada utilizando-se acetato de etila como solvente, temperatura de $-78^{\circ}C$ e TCNE como agente redutor. A capacidade do ozonizador, determinada por titulação do ozônio produzido, foi de $2,5 \times 10^{-3}$ mol/h. A partir desse valor, pelo qual foi possível calcular o tempo mínimo de reação, várias tentativas foram realizadas, sem sucesso. A análise por RMN H^1 do produto final isolado indicou a decomposição do α -hidroperóxi-aldeído desejado.

6.1.2- Preparação de 2-acetilperoxiadamantano-2-carboxialdeído

Buscando novas alternativas para a preparação de um α -hidroperóxi-aldeído partiu-se para a síntese do 2-acetilperóxiadamantano-2-carboxialdeído. Este composto foi sintetizado em um trabalho sobre a reatividade de oxigênio singlete frente a enóis-éteres⁽¹²⁴⁾. Aqui foram feitas alterações nos passos iniciais até a obtenção do adamantano-2-carboxialdeído⁽¹²⁵⁾. A seguir será descrito como este composto foi obtido.

6.1.2.1- Preparação do iodeto de trimetilsulfoxônio

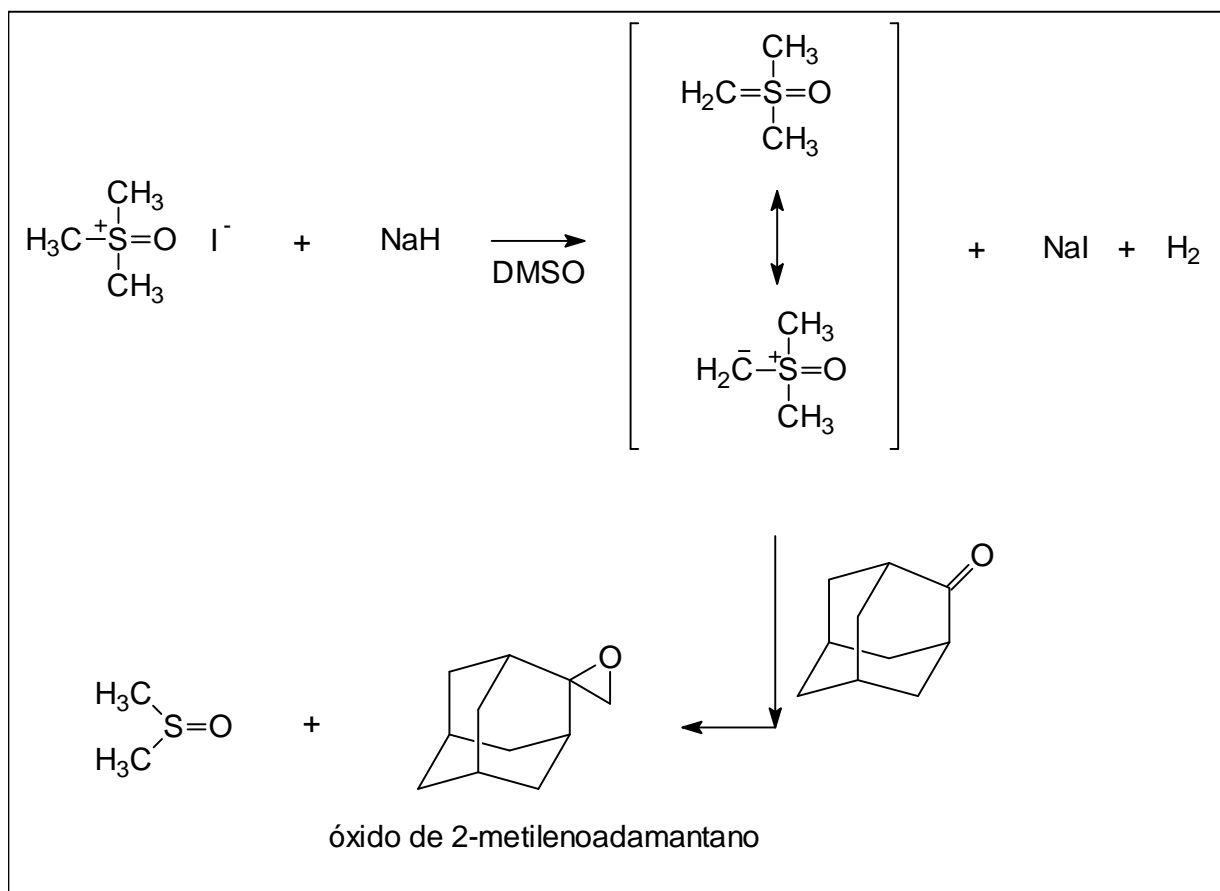
Preparou-se este composto através da reação entre iodeto de metila e dimetilsulfóxido (DMSO). O rendimento foi de 70% (esquema 6.4).



Esquema 6.4- Preparação de iodeto de trimetilsulfoxônio

6.1.2.2- Preparação do óxido de 2-metilenoadamantano

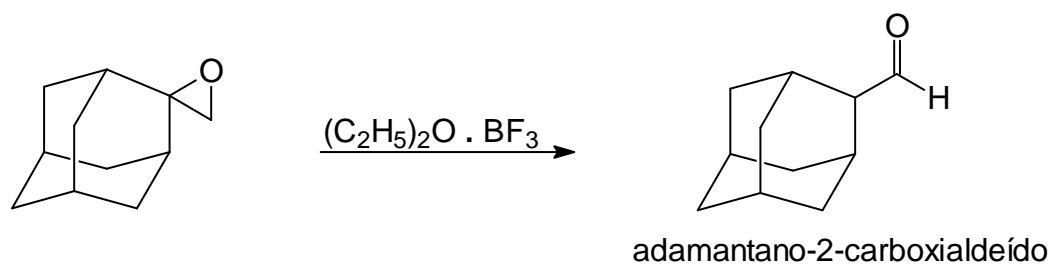
O iodeto de trimetilsulfoxônio foi convertido em um ilida de enxofre (metilideno-dimetilsulfoxônio) através da desprotonação por hidreto de sódio em meio de DMSO seco. Este composto atua como um doador de grupo metileno a grupos carbonílicos, não enolizáveis, gerando epóxidos. Assim, 2-adamantanona foi adicionada ao meio de reação gerando o óxido de 2-metilenoadamantano (esquema 6.5). O rendimento foi de 52%.



Esquema 6.5- Preparação do óxido de 2-metilenoadamantano

6.1.2.3- Preparação do adamantano-2-carboxialdeído

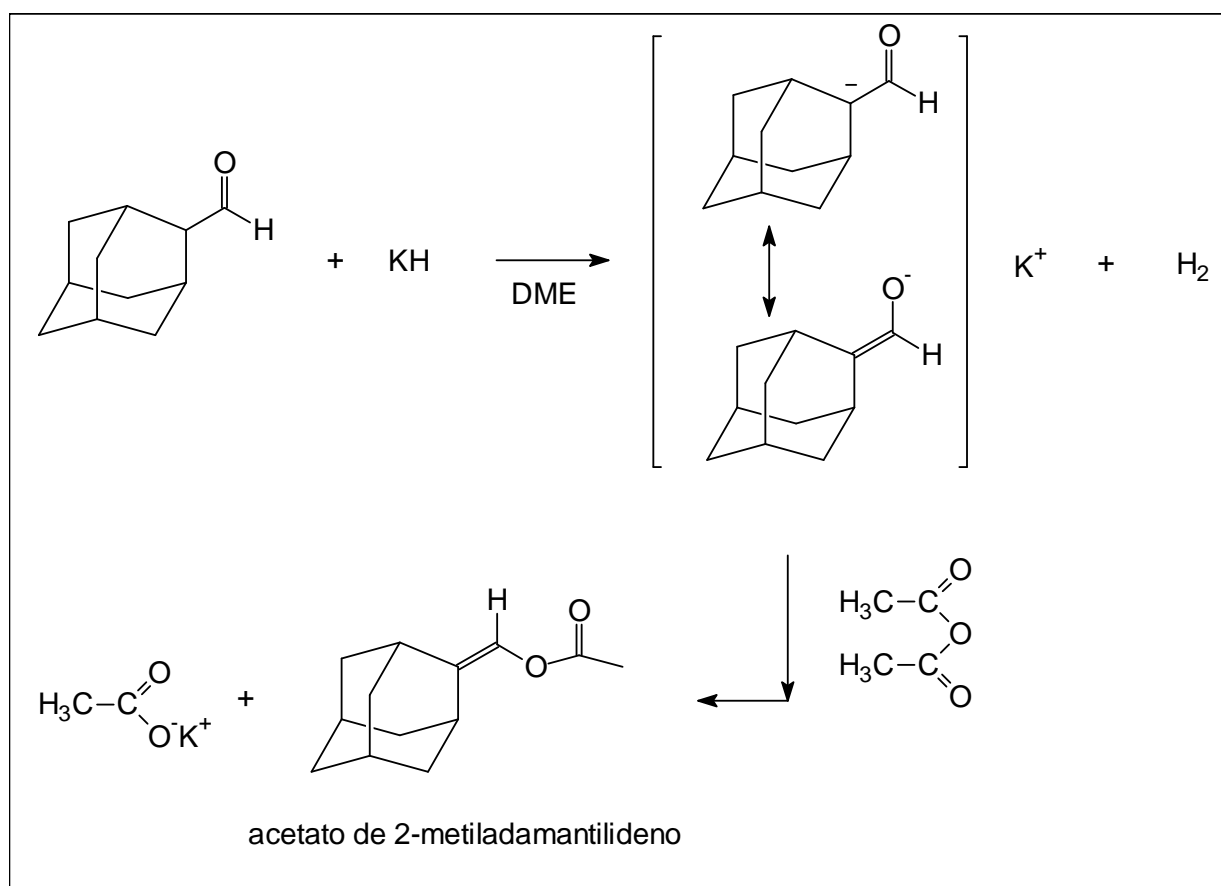
O passo seguinte foi a conversão do óxido de 2-metilenoadamantano em adamantano-2-carboxialdeído por meio de um rearranjo catalisado pelo ácido de Lewis trifluoreto de boro eterado (esquema 6.6). Este composto não foi isolado, pois poderia ser oxidado a ácido, mas por cromatografia gasosa observou-se conversão quase quantitativa do epóxido. Assim, após lavagem para retirada do trifluoreto de boro, o aldeído foi mantido em benzeno, que foi evaporado no momento da realização do passo seguinte.



Esquema 6.6- Preparação de adamantano-2-carboxialdeído

6.1.2.4- Preparação do acetato de 2-metiladamantilideno

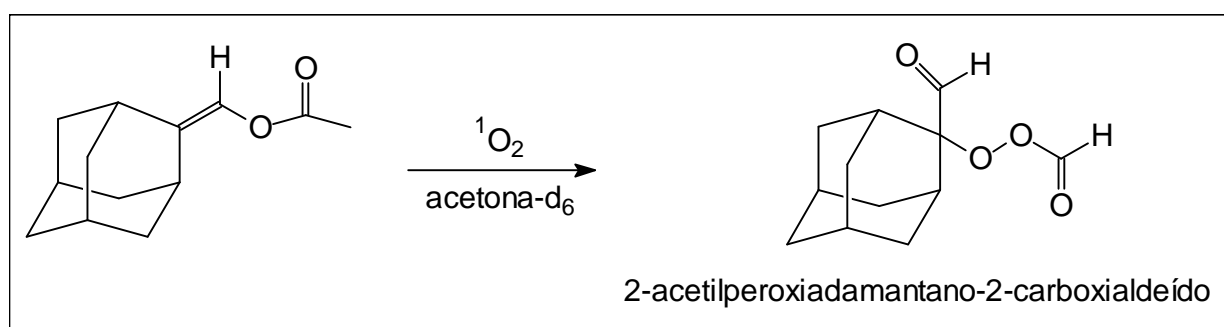
O aldeído foi convertido em acetato de 2-metiladamantilideno pela formação inicial de seu enolato, utilizando-se hidreto de potássio em meio de dimetoxietano (DME) anidro. A reação desse enolato com excesso de anidrido acético conduziu a formação do composto desejado (esquema 6.7).



Esquema 6.7- Preparação de acetato de 2-metiladamantilideno

6.1.2.5- Preparação do 2-acetilperoxidamantano-2-carboxialdeído

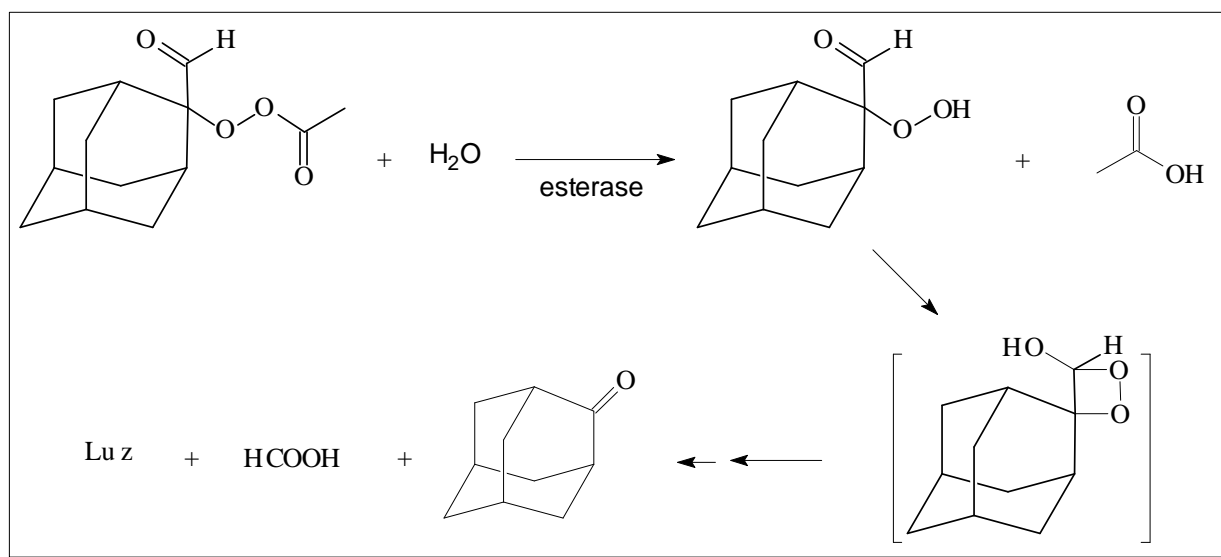
Finalizando esta rota sintética, o acetato de 2-metiladamantilideno foi submetido à reação de foto-oxigenação utilizando-se como solvente acetona- d_6 e azul de metileno como sensibilizador (esquema 6.8). Trata-se de uma reação com oxigênio singlete semelhante a uma reação do tipo “ene”, caracterizada pelo deslocamento 1-3 do grupo acila. O uso de solvente deuterado justifica-se pelo maior tempo de vida que o oxigênio singlete apresenta nestes meios. O isolamento desse composto, embora tenha sido realizado em uma coluna cromatográfica de sílica a -35°C , provocou a sua parcial decomposição, como pode ser observado pelo espectro de RMN H^1 . Mesmo assim, ele foi submetido aos testes de quimiluminescência.



Esquema 6.8- Preparação de 2-acetilperoxidamantano-2-carboxialdeído

6.1.3- Estudo do potencial quimiluminescente do 2-acetilperoxiadamantano-2-carboxialdeído

Os testes com o α -hidroperóxi-aldeído derivado do adamantano foram iniciados submetendo-o à hidrólise catalisada por esterase de fígado de porco comercial, em meio tamponado pH 7,4 (esquema 6.9).



Esquema 6.9- Proposta de uso do 2-acetilperoxiadamantano-2-carboxialdeído como substrato quimiluminescente para esterases

Nestas condições, este composto mostrou-se instável gerando quimiluminescência mesmo na ausência de enzima. Além disso, a adição da enzima provocou um aumento na velocidade de decomposição do α -hidroperóxi-aldeído, sem, no entanto, aumentar a intensidade de quimiluminescência (figura 6.1).

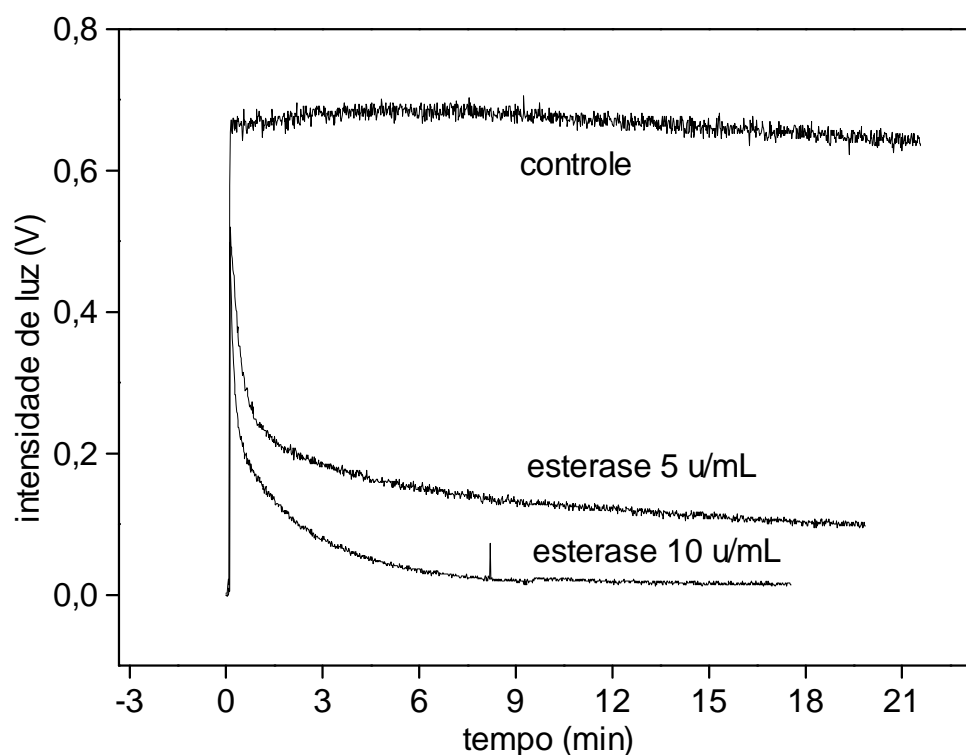


Figura 6.1- Ação de esterase sobre a intensidade de quimiluminescência do 2-acetilperoxidamantano-2-carboxialdeído. Concentrações finais: [tampão fosfato] = 0,1 mol/L, pH 7,4, [α -hidroperóxi-aldeído] \approx 0,1 mmol/L, 37°C

Obteve-se resultado semelhante quando foi alterado o pH do meio de reação na ausência da enzima (figura 6.2). Estes resultados mostraram a existência de uma reação “escura” competitiva, o que inviabilizou a técnica.

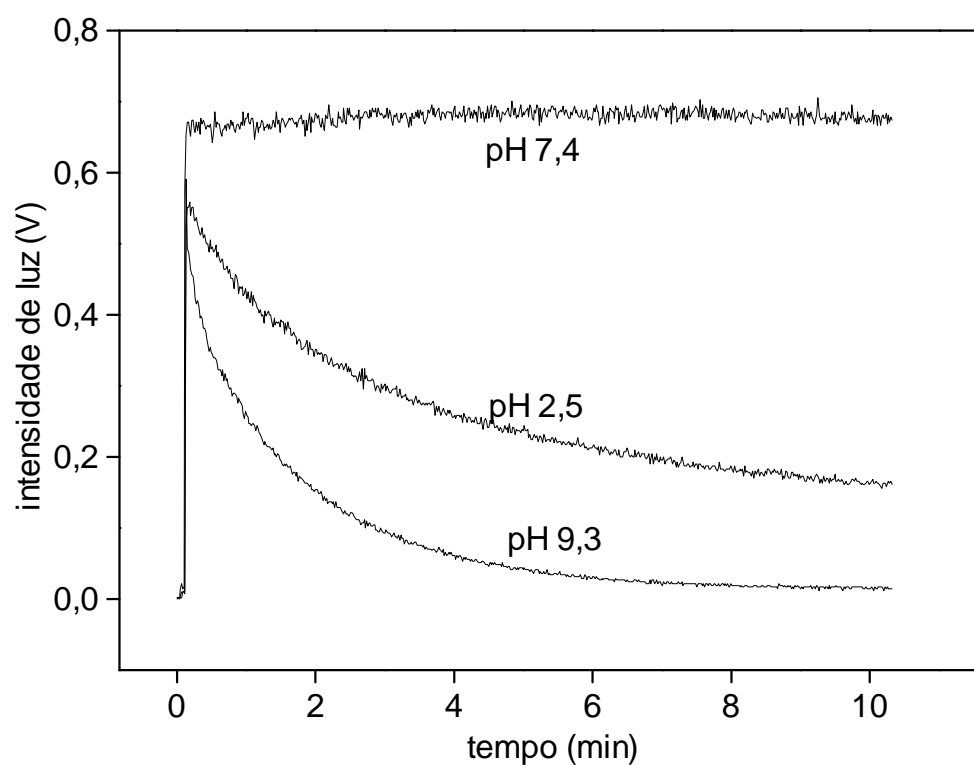


Figura 6.2- Hidrólise 2-peracetóxi-2-adamantanocarboxialdeído em diferentes pHs. Concentrações finais: [tampão fosfato] = 0,1 mol/L, pH 7,4; [tampão fosfato] = 0,1 mol/L, pH 2,5; [tampão AMP] = 0,1 M, pH 9,4; [α -hidroperóxi-aldeído] \approx 0,1 mM, 37°C

6.2- Discussão e Conclusões

A rota sintética que tem como etapa final uma reação de ozonólise para obtenção dos α -hidroperóxi-aldeídos não se mostrou eficaz. O problema parece estar na necessária etapa de redução dos produtos da ozonólise, visto que o produto desejado também pode ser reduzido. Seja utilizando dimetilsulfeto como já foi descrito, seja utilizando tetracianoetileno, que não reduz peróxidos, observou-se total decomposição do produto final. Esta decomposição foi concluída com base nas seguintes evidências:

- i) perda de atividade peroxídica do produto (teste com iodeto de potássio);
- ii) análise do espectro de RMN de H^1 que revelou (espectro 17):
 - a) ausência do próton aldeídico;
 - b) ausência das metilas que deveriam aparecer em torno de 1,4 ppm, conforme produto de partida (espectro 16);

A rota para a preparação do α -hidroperóxi-aldeído derivado do adamantano (2-acetilperoxiadamantano-2-carboxialdeído) mostrou-se eficaz, apesar da dificuldade de isolamento do mesmo devido a sua instabilidade. Quando este composto foi dissolvido em tampão fosfato pH 7,4, observou-se a sua decomposição gerando quimiluminescência mesmo na ausência de enzima. Somente este fato seria suficiente para comprometer esta metodologia, visto que seria difícil estabelecer um protocolo analítico com um composto tão instável. Além disso, e totalmente ao contrário do esperado, a adição de esterase provocou uma drástica queda no sinal de luz (figura 6.1). Obteve-se o mesmo resultado quando alterado o pH do meio de reação, seja para a faixa ácida, seja para a faixa alcalina (figura 6.2). Em ambos os casos, tanto pela adição da enzima, quanto alterando o pH (catálise ácida ou básica geral), há o favorecimento da remoção do grupo acila, portanto, os resultados são

compatíveis. Estes resultados sugerem a existência de um mecanismo “escuro” de decomposição do α -hidroperóxi-aldeído, favorecido pela desproteção do mesmo. É importante ressaltar que também para as α -hidroperóxi-cetonas foi proposto um mecanismo acíclico e não quimiluminescente de decomposição quando estas eram submetidas a meio alcalino⁽⁵⁹⁾. Assim, algo semelhante deve estar ocorrendo também para os α -hidroperóxi-aldeídos. Estes resultados poderão ser objeto de um estudo mecanístico em um projeto futuro em nosso laboratório, no entanto estão fora dos objetivos imediatos desse trabalho.

Estes resultados, aliados às dificuldades de síntese e à instabilidade desses compostos fizeram-nos abandonar esta linha de trabalho.

7- Parte Experimental

7.1- Reagentes

Todos os reagentes a seguir são de grau analítico e, com exceção daqueles usados nas preparações, foram utilizados sem tratamento prévio:

- ácido clorídrico, hidróxido de sódio, ácido cítrico, fosfato monoácido de potássio, fosfato diácido de potássio, fosfato de potássio e carbonato de sódio foram obtidos da Cinética Química; 2-amino-2-metil-1-propanol, bicarbonato de sódio, dietanolamina, sulfato de magnésio e sulfato de sódio foram obtidos da Ecibra; Tris, cloreto de magnésio e superóxido de potássio foram obtidos da Merck;
- indol, 2-metilindol, 3-metilindol, 5-metilindol, 4-metóxindol, 5-metóxindol ácido 2-(indol-3-il)acético, ácido 2-(2-metil-5-metóxindol-3-il)acético, melatonina, 6-hidroximelatonina, 2-iodomelatonina, 6-cloromelatonina, triptofano, serotonina, 5-metoxitriptamina foram obtidos da Sigma;
- *N*-metilindol, 2,5-dimetilindol e 2,3-dimetilindol foram obtidos da ACROS;
- peróxido de benzoíla, 2-adamantanona, tetracianoetileno foram obtidos da Aldrich;
- peróxido de hidrogênio 60% foi obtido da INTEROX;
- HRP (EC 1.11.1.7, tipo IV), SOD (EC 1.15.1.1, de eritrócitos bovino), catalase (EC 1.11.1.6, de fígado bovino), glicose oxidase (EC 1.1.3.4), esterase (EC 3.1.1.1, de fígado de porco), ALP (EC 3.1.3.1, de mucosa de intestino bovino), ACP (EC 1.11.1.7, de sêmen humano), ALP-IgG (conjugado de fosfatase alcalina com imunoglobulina do tipo G, produto nº A 9919), HRP-IgG (conjugado de peroxidase de raiz forte com imunoglobulina do tipo G, produto nº A 6029) e mieloperoxidase (E.C. 1.11.1.7, de leucócitos humano nº M 6908) foram obtidos da Sigma;
- Quimiotripsina (EC 3.4.21.1, Sigma) e o substrato Pro-Phe-Phe-MCA (prolina-fenilalanina-fenilalanina-metilcoumarina) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Jair Chagas da Escola Paulista de Medicina (atualmente Universidade de Mogi das Cruzes);
- kit para determinação qualitativa de anticorpos IgG para vírus Epstein-Barr em soro sanguíneo humano foi obtido da Sigma (nº SIA130-A);
- Kit para determinação de atividade enzimática da fosfatase alcalina em soro sanguíneo humano foi obtido da Boehringer Mannheim;
- dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) foi preparado como descrito por Catalani et al.⁽²⁷⁾;

Os reagentes utilizados em síntese foram tratados, seguindo-se procedimentos usuais⁽¹²⁶⁾:

- cloreto de sulfurila, cloreto de acetila, cloreto de trimetilsilano, piridina, fosfito de metila e iodeto de metila foram obtidos da Aldrich e destilados antes do uso;
- hexano, acetona e acetato de etila foram obtidos da Merck e destilados antes do uso;
- benzeno (Merck) foi destilado, adicionado sódio/benzofenona e destilado no momento de uso;
- anidrido acético (Merck) foi neutralizado com quinolina e destilado;
- DMSO (Merck) foi destilado a pressão reduzida, seco com duas porções de peneira molecular 4A (5% p/v, 12h) e estocado sobre peneira molecular;
- trifluoreto de boro eterado (Aldrich) foi refluxado com hidreto de cálcio e destilado;
- 1,2-dimetoxietano, tetrahidrofurano e éter etílico, todos obtidos da Merck, foram destilados de sódio/benzofenona antes do uso;
- isobutanal (Aldrich) foi destilado sob atmosfera de nitrogênio;
- diclorometano (Merck) foi refluxado sobre hidreto de cálcio e destilado.

7.2- Equipamentos e Métodos

Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro Brucker AC-200-F ou DPX-300. Os deslocamentos químicos foram relatados em ppm, em relação ao padrão tetrametilsilano (TMS);

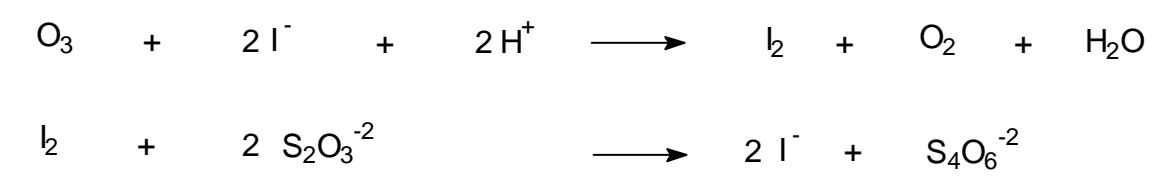
- Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV em um aparelho CG-MS Hewlett Packard 5988A (massa) e 5890 (cromatógrafo);
- O espectro de massa do composto 2,2'-dimetil-2,2'-diindoxil, em particular, foi obtido por injeção direta utilizando o equipamento acima operando a 35 eV.
- O monitoramento das reações e análise de pureza dos compostos sintetizados foram realizados, sempre que possível, por meio de cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo Shimadzu

GC-14A com detector de ionização de chama (coluna megabore apolar CBP1 W25 100 (0,53 mm de diâmetro, 25 m) ou por cromatografia de camada fina;

- As destilações de pequenas massas foram realizadas em um destilador tipo Kugelrohr Buchi GHR-51 (destilações bulbo a bulbo);
- A monitoração dos produtos de oxidação dos derivados indólicos e a obtenção dos espectros de fluorescência dos produtos principais foram realizados, utilizando-se um HPLC SHIMADZU LC-10A com detectores UV-VIS SPD-10A e Fluorescence HPLC Monitor RF535. A coluna utilizada era de fase reversa (SUPERCOSIL LC-18 (25 x 4,6, 5 μ m)) operando em modo isocrático. A fase móvel normalmente utilizada era água-acetonitrila (2:1) em um fluxo de 0,8 mL/min;
- As determinações espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Hitachi U-2000;
- O isolamento e a purificação dos produtos de oxidação do 2-metilindol (reação em grande escala, 300 mL) foi realizado através de cromatografia rotatória preparativa de camada fina (Chomatotron), usando-se uma camada de sílica (Merck, cat. 1.07749) de 2 mm e acetato de etila como eluente;
- Para seguir o curso das reações quimiluminescentes foram utilizados dois aparelhos: **(i)** um luminômetro adaptado para leitura em microplacas (EG&G Berthold LB96V microplate Luminometer). Trata-se de um aparelho automatizado em que parâmetros como temperatura, tempo de medida e adições de reagentes são pré-estabelecidos. O volume final das soluções ensaiadas foi de 0,3 mL e o disparo das reações foi feito pela adição das enzimas ou dos substratos. **(ii)** um contador de fótons composto de um Amplificador-discriminator (EG&G Par 1121A) e uma fotomultiplicadora (Thorn EMI 9658AM) refrigerada a -12°C por um refrigerador (Thorn EMI FACT-50 MKIII thermoelectric cooler). Neste aparelho, o volume final das soluções ensaiadas foi de 3,0 mL e o disparo das reações foi feito através de uma cânula e microseringa. Este aparelho também foi utilizado para obtenção do espectro de quimiluminescência da oxidação do 2,3-dimetilindol (através de filtros de corte colocados em frente da fotomultiplicadora);
- Os espectros de quimiluminescência (oxidação do 2-metilindol e 2,5-dimetilindol) foram obtidos em um fluorímetro SPEX-FLUOROLOG 1681 com fotomultiplicadora refrigerada;
- Os estudos envolvendo detecção e acompanhamento da cinética de consumo de oxigênio foram realizados com a utilização de um sistema polarográfico de monitoração de oxigênio dissolvido (Yellow Spring Instruments 5300);
- O preparo de tampões foi feito utilizando-se um pH-metro (Corning pH meter 430).

7.3- Metodologias Analíticas

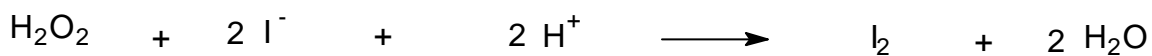
- Titulação do ozônio-** Após pré-estabelecida a potência e o fluxo de entrada de oxigênio no ozonizador, o ozônio foi borbulhado em uma solução de iodeto de potássio em ácido acético (10%)⁽¹¹⁹⁾. O iodo formado foi titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1mol/L (esquema 7.1). O fluxo de ozônio produzida foi de $2,3 \times 10^{-3}$ mol/h.



Esquema 7.1- Esquema de reação para titulação do ozônio

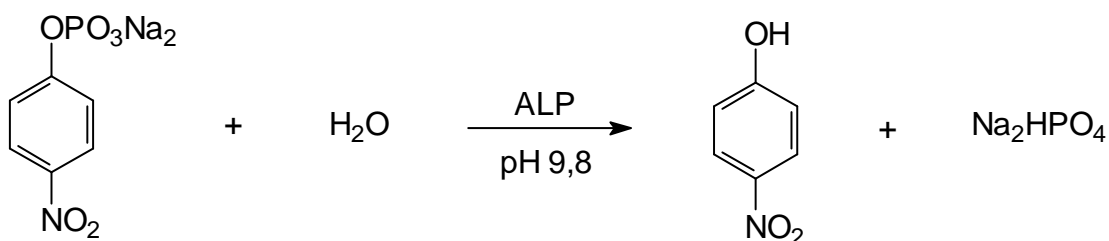
- Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio e atividade peróxidica dos composto sintetizados-** A concentração das soluções de peróxido de hidrogênio foram determinadas por meio da oxidação de iodeto a iodo, segundo técnica descrita (esquema 7.2)⁽¹²⁷⁾. Em uma cubeta contendo solução 0,05 mol/L de iodeto de potássio em tampão ácido acético/acetato (pH 3,8), foi adicionada peroxidase de raiz forte (5 μL , concentração final 10^{-8} mol/L) e uma alíquota de 50 μL de peróxido de hidrogênio (volume final 3 mL). A concentração de peróxido foi encontrada a partir da medida da absorvância medida em 353 nm e calculada tendo como base o coeficiente de absorvidade molar do iodo neste comprimento de onda ($2,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade peróxidica dos compostos sintetizados foi determinada qualitativamente apenas

borrifando uma solução acidificada de iodeto de potássio nas placas de cromatografia de camada fina, onde eram monitorados.



Esquema 7.2- Esquema de reação para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

- Determinação espectrofotométrica de fosfatase alcalina-** A metodologia comercial utilizada para determinação quantitativa de atividade de ALP está baseada na hidrólise do *p*-nitrofenolfosfato a *p*-nitrofenol que absorve em 405 nm (esquema 7.3). Uma alíquota de 50 µL soro foi adicionada em 3 mL de uma solução contendo: tampão dietanolamina 1 mol/L, pH 9,8, MgCl₂ 0,5 mmol/L, *p*-nitrofenolfosfato 10 mmol/L, 37°C. A variação de absorvância por minuto multiplicado por um fator fornecido pelo fabricante do kit, que está relacionado a absorvidade molar do *p*-nitrofenol e as diluições, resulta na atividade de ALP em u/L;



Esquema 7.3- Esquema de reação para medida colorimétrica de fosfatase alcalina (método comercial)

- Determinação qualitativa de anticorpos IgG contra vírus Epstein-Barr em soro sanguíneo humano-** Como já esclarecido anteriormente, esta metodologia foi seguida até o passo de adição do revelador colorimétrico (*p*-nitrofenolfosfato), que foi substituído pelo substrato sódio-MPP e os demais reagentes necessário ao ensaio quimiluminescente em desenvolvimento. Trata se de um kit do tipo ELISA (*enzyme linked immunosorbed assay*) que consta dos seguintes passos: diluição (reagente diluidor) e incubação durante 20 minutos a 20-25°C das amostras a serem ensaiadas (soros e padrões) em cubetas onde os antígenos de Epstein-Barr estão aderidos; lavagem por três vezes (tampão de lavagem); incubação com o conjugado ALP-IgG por 20 minutos; lavagem por três vezes e adição dos reagentes reveladores.

- **Ensaios com a enzima quimiotripsina-** 20 μL de uma solução 1 mg/mL do substrato Pro-Phe-Phe-MCA, dissolvido em DMSO/água (1:1), foram incubados a 37°C em 2 mL de solução tampão (Tris pH 8,0). Adicionou-se 5 μL de uma solução 0,01 mg/mL de quimiotripsina e foi medido a variação de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 360$, $\lambda_{\text{em}} = 480$).

- **Determinação do rendimento quântico de quimiluminescência da oxidação do 2-metilindol-** Para medir o rendimento quântico de quimiluminescência de uma reação é necessário calibrar a fotomultiplicadora (do espectrofluorímetro, neste trabalho) de modo que a unidade arbitrária fornecida pelo aparelho (cps) possa ser transformada em Einstein (1 Einstein = $6,02 \times 10^{23}$ fótons). Foi utilizado o padrão de luminol que ao ser oxidado em pH 11,6, peróxido de hidrogênio em excesso e hemina como catalisador, apresenta um rendimento quântico (ϕ) bem definido e reprodutivo, igual a $(1,14 \pm 0,06) \times 10^{-2} \text{ E/mol}^{(128)}$. Assim, medindo a quantidade de luz (Q) emitida por uma dada quantidade de luminol (n) ao ser oxidado, é possível calcular um fator (f) que transformará a luz emitida (cps) em Einstein. O fator utilizado ($5,045 \times 10^{-17} \text{ E/cps}$) foi gentilmente cedido pela aluna de mestrado Sandra M. da Silva. Para uma reação, volume final 3 mL e utilizando as condições otimizadas (HRP = 0,1 $\mu\text{mol/L}$, $\text{H}_2\text{O}_2 = 5 \text{ mmol/L}$, tampão MAP = 50 mmol/L, pH 9,3, 37°C e 2-metilindol = 1 mmol/L), mediu-se a quimiluminescência durante 3 horas no espectrofluorímetro (tensão da fotomultiplicadora: 750 kV, fenda de 1 mm e grade de difração em posição espelho). Antes e após a reação, alíquotas de 30 μL foram submetidas à análise cromatográfica (HPLC), assim foi possível medir o consumo de substrato que foi de 55%. De posse da intensidade total de luz (integração do gráfico intensidade de emissão *versus* tempo), do fator de conversão e do número de mols de 2-metilindol consumido, calculou-se o rendimento quântico de quimiluminescência utilizando a fórmula:

$$\phi = (Q \times f)/n$$

7.4- Preparo de Soluções Estoque

- **Enzimas-** ALP, ACP, esterase, ALP-IgG e HRP-IgG eram diluídas, a partir de suas soluções originais, no momento do uso em solução fisiológica (NaCl 0,9%);
- **Peróxido de hidrogênio-** Uma solução estoque 1 mol/L (analisada semanalmente) era adequadamente diluída no momento do uso;
- **HRP-** Uma solução estoque (1 mL, 120 $\mu\text{mol/L}$) em água destilada era preparada no dia do uso ou 12 $\mu\text{mol/L}$ para os ensaios com 2-metilindol;

- **DBAS-** A massa adequada era diluída em DMSO;
- **Substratos-** A massa adequada de Sódio-MPP era diluída em água destilada, imina e enamida eram diluídas em álcool etílico, derivados indólicos eram diluídos em álcool etílico.

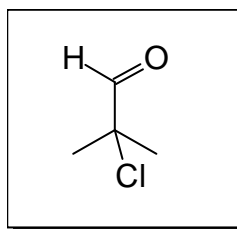
7.5- Preparações

7.5.1- 2-cloro-2-metilpropanal⁽⁹¹⁾

Em um balão de três bocas com capacidade de 250 mL foram adaptados um funil de adição, um termômetro e um condensador de refluxo. Na saída do condensador foi adaptado um sistema para retenção do ácido clorídrico e o dióxido de enxofre formados na reação. Este sistema constava de um tubo de vidro e uma mangueira que levava os gases produzidos para um frasco de segurança e posteriormente para um recipiente com água onde eram borbulhados. Ao balão foram adicionados

36,06 g (0,5 mol) de 2-metilpropanal e, lentamente, sob agitação, 67,5 g (0,5 mol) de cloreto de sulfurila. A temperatura deve ser mantida entre 25-40°C devendo ser resfriado se necessário (obs. reação bastante exotérmica). Após o término da adição, a reação foi aquecida em refluxo por duas horas e então agitada por mais quatro horas. O produto bruto foi submetido à destilação simples e à destilação fracionada (84-86°C) rendendo 26,09 g (0,245 mol) de 2-cloro-2-metilpropanal. Rendimento: 49%.

Dados analíticos:



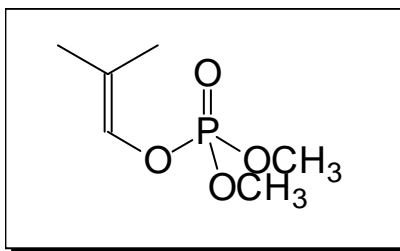
RMN-¹H (δ ppm/CDCl₃)

(Espectro 1): 1,64 (s, 6 H); 9,43 (s, 1 H).

7.5.2- Fosfato de dimetila e 2-metil-1-propenila⁽⁹²⁾

Em um balão de duas bocas com capacidade de 125 mL foram adaptados um funil de adição e um condensador de refluxo munido de tubo secante. No balão foram adicionados 10,6 g (0,1 mol) de 2-cloro-2-metilpropanal e 30 mL de benzeno. Então, lentamente e sob refluxo foram adicionados 12,4 g (0,1 mol) de fosfito de metila. Após a adição, o refluxo foi mantido por mais três horas e então o solvente foi evaporado. O produto bruto foi submetido à destilação (100-105°C, 5 mmHg), rendendo 14,8 g (0,082 mol) de um líquido incolor identificado como fosfato de dimetila e 2-metil-1-propenila. Rendimento: 82%.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/CDCl₃/TMS)

(Espectro 2): 1,61 (s, 3 H); 1,68 (s, 3 H); 3,80 (d, 6 H, J = 11 Hz, P-O-C-H); 6,23 (m, 1 H).

RMN-¹³C (δ ppm/CDCl₃/TMS)

(Espectro 3): 15,07; 19,08; 54,55 (d, J = 6 Hz, C-O-P) ; 120,10 (d, J = 10 Hz, C-C-O-P); 129,90 (d, J = 6 Hz, C-O-P).

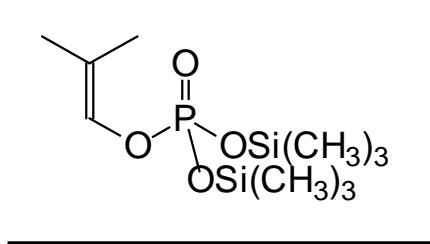
Espectrometria de massa (m/z)

Espectro 4: 180 (M⁺, 28%); 165 (M⁺ - CH₃, 2%); 110 (HOP(OCH₃)₂, 100%); 95 (HOP(OCH₃)₂ - CH₃, 25%); 79 (HOP(OCH₃)₂ - OCH₃, 30%).

7.5.3- Fosfato de bis(trimetilsilila) e 2-metil-1-propenila⁽⁹⁴⁾

Em um balão de duas bocas com capacidade de 50 mL foram adaptados um funil de adição, um condensador de refluxo munido de borbulhador e linha de argônio. No balão foram adicionados 6,0 g (33,3 mmol) de fosfato de dimetila e 2-metil-1-propenila e, lentamente, sob agitação e temperatura ambiente, 7,7 g (73,3 mmol) de cloreto de trimetilsilano. Após a adição, iniciou-se um refluxo mantendo a temperatura entre 60 - 80°C. Após 22 horas, a análise por cromatografia gasosa revelou o consumo de cerca de 50% do reagente de partida e a formação do produto monossililado (conforme análise por CG-MS). Então, foi adicionado 1 g de iodeto de potássio previamente seco, mais 7,7 g (73,3 mmol) de cloreto de trimetilsilila, mantendo-se o refluxo. A reação foi monitorada por CG diariamente e, no fim de seis dias, foi constatado a conversão total do reagente no produto desejado. O solvente foi evaporado e o produto bruto, submetido à destilação (138-141°C/5 mmHg) rendendo 5,5 g (18,6 mmol) de um líquido incolor identificado como fosfato de bis(trimetilsilila) e 2-metil-1-propenila. Rendimento: 56%.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/CDCl₃/TMS)

(Espectro 5): 0,23 (s, 18 H); 1,52 (s, 3 H); 1,58 (s, 3 H); 6,15 (m, 1 H).

RMN-¹³C (δ ppm/CDCl₃/TMS)

(Espectro 6): 0,39; 15,00; 18,94; 118,23 (d, J = 10 Hz, C-C-O-P); 130 (d, J = 5,0 Hz, C-O-P).

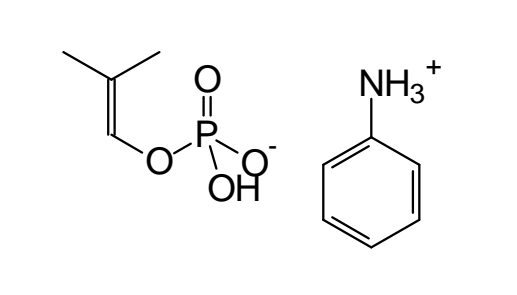
Espectrometria de massa (m/z)

Espectro 7: 296 (M⁺, 10%); 281 (M⁺ - CH₃, 18%); 211 (HOP(OSi(CH₃)₃)₂ - CH₃, 100%); 73 (Si(CH₃)₃, 15%).

7.5.4- Hidrogenofosfato de anilínio e 2-metil-1-propenila⁽⁹⁴⁾

Em um balão de duas bocas com capacidade de 50 mL foram adaptados um condensador de refluxo e um funil de adição. Ao balão foi adicionada uma mistura de 0,74 g (8 mmol) de anilina, 6 mL de etanol e 5 mL de éter etílico. Então, lentamente e sob agitação, foram adicionados 2,37 g (8 mmol) do derivado sililado, dissolvido em 5 mL de éter etílico. O precipitado formado foi filtrado, lavado com éter e seco sobre pentóxido de fósforo em um dessecador a vácuo. O sólido branco obtido, 1,37 g (5,6 mmol), foi identificado como hidrogenofosfato de anilínio e 2-metil-1-propenila. Rendimento: 70%.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/ DMSO-d₆/TMS)

(Espectro 8): 1,52 (s, 3 H); 1,54 (s, 3 H); 4,42 (s, largo); 6,15 (m, 1 H); 6,65 (m, 3 H, H_{ar}); 7,06 (m, 2 H, H_{ar}).

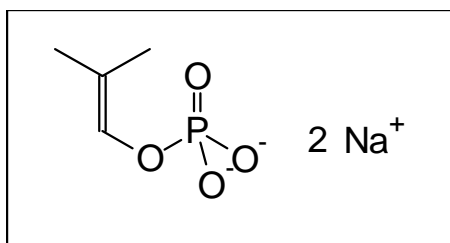
7.5.5- Fosfato dissódico de 2-metil-1-propenila⁽⁹⁵⁾

Em um balão de duas bocas com capacidade de 50 mL foram adaptados um condensador de refluxo e um funil de adição. Ao balão foram adicionados 2,0 g (6,75 mmol) do fosfato de bis(trimetilsilila) e 2-metil-1-propenila dissolvidos em 30 mL de éter etílico seco. Então, lentamente e sob agitação foram adicionados 4,9 mL de uma solução de etóxido de sódio (14,2 mmol) dissolvida em 10 mL de éter seco (preparada e titulada previamente). O precipitado formado foi filtrado, lavado com éter etílico e seco sobre pentóxido de fósforo em um dessecador a vácuo. O sólido obtido, 1,02 g (5,2 mmol), foi identificado como fosfato dissódico de 2-metil-1-propenila. Rendimento: 77%.

Preparação e titulação da solução de etóxido de sódio:

Em um balão totalmente seco e sob atmosfera de argônio foi pesado aproximadamente 0,65 g (28,2 mmol) de sódio metálico. Neste balão foram adicionados 10 mL de etanol seco e colocado sob refluxo. Após 3 horas, todo o sódio foi consumido. Um mililitro da solução resultante foi submetido à evaporação, redissolvido em 20 mL de água destilada e titulada contra uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L e fenolftaleína como indicador. O resultado indicou que a solução original continha 29 mmols de etóxido de sódio.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/ D₂O/TMS)

(Espectro 9): 1,58 (s, 3 H); 1,61 (s, 3 H); 4,81 (sinal de HDO); 6,20 (m, 1 H).

RMN-¹³C (δ ppm/ D₂O/TMS)

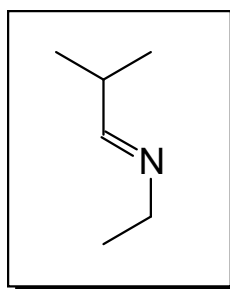
(Espectro 10): 14,73; 18,99; 115,66 (d, $J = 9,0$ Hz, C-C-O-P); 132,64 (d, $J = 5,0$ Hz, C-O-P).

Micro-análise: Calculado C = 20,71, H = 3,02, encontrado C = 21,09, H = 3,42.

7.5.6- *N*-(2-metilpropilideno)etilamina⁽⁹⁷⁾

Em um balão de duas bocas com 125 mL de capacidade foram adaptados um agitador mecânico, um funil de adição e um condensador de refluxo munido de tubo secante. Ao balão foram adicionados 26,2 mL (0,4 mol) de etilamina. Então, mantendo a temperatura a 0 °C e sob agitação foram adicionados 36,3 mL (0,4 mol) de 2-metilpropanal durante 2 horas. Após a adição, esperou-se 15 minutos e então foram adicionados 10 g de hidróxido de sódio em lentilhas. Após cerca de 10 minutos sob agitação apareceram duas fases. Após a separação das fases, foram adicionados 5 g de hidróxido de potássio em pó na fase orgânica e deixado em repouso por 2 dias. O líquido amarelado resultante foi filtrado e submetido a destilação (77 °C). O líquido incolor obtido, 19,4 g (0,196 mol), foi identificado como *N*-(2-metilpropilideno)etilamina. Rendimento: 48%.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/ CDCl₃/TMS)

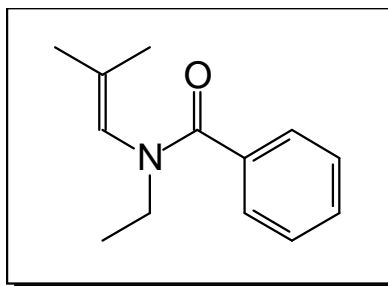
(Espectro 11): 1,06 (d, 6 H, $J = 6,5$ Hz); 1,17 (t, 3 H, $J = 7,5$ Hz); 2,40 (m, 1 H); 3,38 (q, 2 H, $J = 7,5$ Hz); 7,52 (m, 1 H).

7.5.7- *N*-etil-*N*-(2-metil-1-propenil)benzenamida⁽⁹⁸⁾

Em um balão de duas bocas com 125 mL de capacidade foram adaptados um agitador mecânico, um funil de adição e um condensador de refluxo munido de tubo secante. Ao balão foram

adicionados 25 mL de benzeno, 8,3 mL (70,7 mmol) de cloreto de benzoíla e 11,2 mL (80,4 mmol) de trietilamina. Então, lentamente, sob agitação e temperatura controlada (7 a 15 °C), foram adicionados 7,0 g (70,7 mmol) de *N*-(2-metilpropilideno)etilamina dissolvidas em 12 mL de benzeno. Após a adição ter sido completada, a mistura foi refluxada por 1 hora, resfriada e filtrada. O filtrado foi submetido à evaporação, filtrado novamente e destilado (170 - 174°C, 3 mmHg). O líquido incolor obtido, 7,32 g (36,1 mmols), foi identificado como *N*-etil-*N*-(2-metil-1-propenil)benzenamida. Rendimento: 51%.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/ CDCl₃/TMS)

(Espectro 12): 1,13 (t, 3 H); 1,29 (s, 3 H); 1,50 (s, 3 H); 3,60 (q, 2 H); 5,80 (s, 1 H); 7,27-7,49 (m, 5 H, H_{ar}).

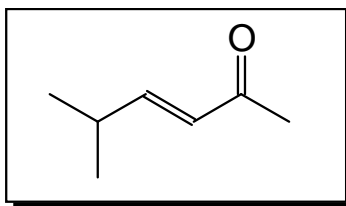
Espectrometria de massa (m/z)

(Espectro 13): 203 (M⁺, 8%); 188 (M⁺ - CH₃, 19%); 105 (C₆H₅CO, 100%); 77 (C₆H₅, 30%).

7.5.8- 5-metil-3-hexen-2-ona⁽¹²¹⁾

Em um balão de 3 bocas com 500 mL de capacidade foram adaptados um agitador mecânico, um funil de adição e um condensador de refluxo. Ao balão foram adicionados 104 mL (1,41 mol) de acetona e 250 mL de uma solução de hidróxido de sódio 10 %. Então, lentamente e sob agitação, foram adicionados 100 g (1,39 mol) de isobutanal. A agitação foi mantida por mais 48 horas e então as fases foram separadas. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (duas porções de 50 mL) e os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de sódio. O solvente foi evaporado e o produto bruto submetido à destilação (65-70 °C/ 30 mmHg). O líquido incolor obtido, 32,6 g (0,29 mols), foi identificado como 5-metil-3-hexen-2-ona. Rendimento: 21%.

Dados analíticos:



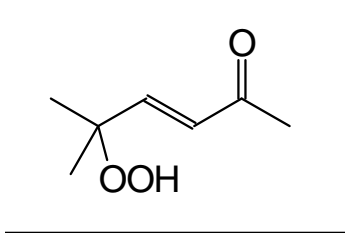
RMN-¹H (δ ppm/ CDCl₃/TMS)

(Espectro 14): 1,08 (d, 6 H, J = 6,5 Hz); 2,25 (s, 3 H); 2,46 (m, 1 H); 6,08 (d, 1 H, J = 17 Hz); 6,78 (dd, 1 H, J = 17 Hz e J = 6,5 Hz).

7.5.9- 5-hidroperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona⁽¹²²⁾

Em um balão de 3 bocas com 125 mL de capacidade foram adaptados um agitador mecânico, um condensador de refluxo e uma cânula, pela qual o oxigênio foi borbulhado no meio de reação. No balão foram adicionados 30 g (0,27 mol) de 5-metil-3-hexen-2-ona e 100 mg de peróxido de benzoíla. Na mistura, agitada vigorosamente e sob temperatura controlada (60°C), foi borbulhado oxigênio durante três dias. A mistura foi então submetida à destilação (60 °C/ 3 mmHg) rendendo 16 g (0,11 mol). O líquido oleoso resultante foi identificado como 5-hidroperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona. Rendimento: 41 %.

Dados analíticos:



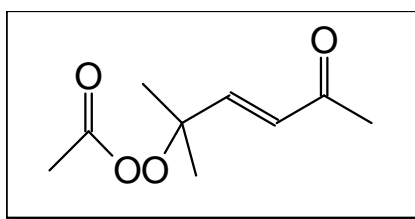
RMN-¹H (δ ppm/ CDCl₃/TMS)

(Espectro 15): 1,41 (s, 6 H); 2,30 (s, 3 H);. 6,22 (d, 1 H, J =16,5 Hz); 6,88 (d, 1 H, J = 16,5 Hz); 8,50 (-OOH).

7.5.10- 5-acetilperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona⁽¹²³⁾

Em um balão de 3 bocas com 50 mL de capacidade foram adaptados um agitador magnético, uma cuba de refrigeração e um condensador de refluxo adaptado à linha de argônio. No balão foram adicionados 0,8 mL (10 mmol) de piridina, 20 mL de diclorometano e 1,44 g (10 mmol) de 5-hidroperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona. A temperatura deve ser mantida em 0 °C. A seguir, adicionou-se 0,73 mL (10 mmol) de cloreto de acetila. A mistura de reação foi agitada por 30 minutos, sendo a seguir vertida em 40 mL de uma solução saturada e fria de bicarbonato de sódio. As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com hexano. Os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de sódio. O solvente foi evaporado e o resíduo submetido à purificação por cromatografia em coluna refrigerada a -10°C (sílica gel e diclorometano/hexano 1:10 como eluente) rendendo 0,47 g (2,5 mmol). O líquido oleoso obtido foi identificado como 5-peracetóxi-5-metil-3-hexen-2-ona. Rendimento: 25%.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/ CDCl₃/TMS)

(Espectro 16): 1,14 (s, 6 H); 2,02 (s, 3 H); 2,30 (s, 3 H); 6,16 (d, 1 H, J = 17 Hz); 6,78 (d, 1 H, J = 17 Hz).

7.5.11- Ozonólise do 5-acetilperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona

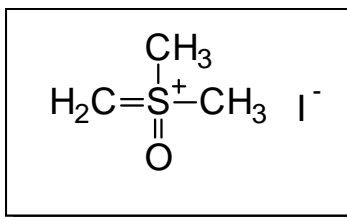
O ozônio produzido pelo ozonizador foi inicialmente titulado como descrito anteriormente.

No frasco de reação do ozonizador foram adicionados 0,186 g (1 mmol) de 5-acetilperóxi-5-metil-3-hexen-2-ona, 0,128 g (1 mmol) de tetracianoetileno e 5 mL de acetato de etila. A mistura de reação foi refrigerada a -78°C e ozônio foi borbulhado por 3 horas. Após o término da reação, o excesso de ozônio foi removido com uma corrente de nitrogênio e em seguida permitiu-se que a temperatura se elevasse até ambiente. O produto bruto foi evaporado e submetido à análise antes e após purificação por destilação à pressão reduzida. Os espectros de RMN revelaram a decomposição do produto (espectro 17, ver item 6.2).

7.5.12- Iodeto de trimetilsulfoxônio⁽¹²⁵⁾

Em um balão de 250 mL adaptado com condensador de refluxo foram adicionados 44 mL (0,62 mol) de dimetilsulfóxido e 90 mL (1,44 mol) de iodeto de metila. A mistura foi refluxada por 56 horas. O sólido formado foi filtrado à vácuo e lavado com clorofórmio. O sólido foi submetido à recristalização, usando água como solvente, resultando em cristais amarelados que foram secos sobre pentóxido de fósforo em um dessecador à vácuo. O rendimento foi de 95,5 g (0,44 mol). Os cristais foram identificados como iodeto de trimetilsulfoxônio. Rendimento: 70%.

Dados analíticos:

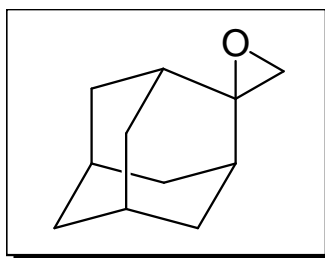


Microanálise: Calculado: C = 16,37%, H = 4,11%, S = 14,57%, I = 57,66%. Encontrado C = 16,14%, H = 3,81%, S = 14,20%, I = 46,90%.

7.5.13- Preparação do óxido de 2-metilenoadamantano⁽¹²⁵⁾

Em um balão de 3 bocas com 50 mL de capacidade foram adaptados um agitador magnético, um condensador de refluxo adaptado a uma linha de argônio e um funil de adição. Ao balão foram adicionados 1,4 g (35 mmol) de uma suspensão de hidreto de sódio em óleo mineral (60%). Esta suspensão foi lavada com 3 porções (20 mL) de pentano. O pentano remanescente foi evaporado pela passagem de argônio. A seguir, foram adicionados 55 mL de dimetilsulfóxido seco e, lentamente (5 minutos), 7,5 g (34 mmol) de iodeto de trimetilsulfoxônio. Quinze minutos após cessar a liberação de hidrogênio, o balão foi resfriado (reação exotérmica) e 4 g (26,6 mmol) de adamantanona, foi adicionada por um período de 5 minutos. A mistura de reação foi agitada por 1 hora à temperatura ambiente e então por mais 1,5 horas a 55 °C. Verteu-se a mistura de reação sobre 150 mL de água gelada, o precipitado formado foi dissolvido em hexano e as fases, separadas. A fase aquosa foi extraída com hexano e os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de sódio. A evaporação do solvente resultou em 2,22 g (13,6 mmol) de um sólido com 96% de pureza (por CG) que foi identificado como óxido de 2-metilenoadamantano. Rendimento: 52%.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/ CDCl₃/TMS)

(Espectro 18): 1,39-2,06 (m, 14 H); 2,64 (s, 2 H).

Microanálise: Calculado C = 80,44 %, H = 10,15%. Encontrado C = 80,22%, H = 9,89%.

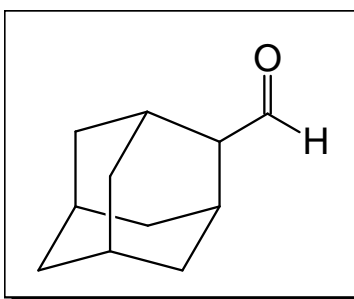
Espectrometria de massa (m/z)

(Espectro 19): 164 (M⁺, 65%); 135 (M⁺ - HCO; 100%).

7.5.14- Adamantano-2-carboxialdeído⁽¹²⁵⁾

Em um funil de separação com 50 mL de capacidade foram adicionados 12 mL de benzeno seco e 1g (6,1 mmol) de óxido de metilenoadamantano. Em seguida adicionou-se 0,45 mL (3,8 mmol) de trifluoreto de boro e a mistura foi agitada vigorosamente. Após agitação, a mistura foi deixada em repouso por dois minutos e então extraída com água gelada. A fase aquosa foi extraída com benzeno e os extratos orgânicos foram combinados e secos com sulfato de sódio. Após filtração, manteve-se o aldeído em solução de benzeno até o momento de uso. A conversão foi de 95% (por CG). O produto foi identificado como adamantano-2-carboxialdeído.

Dados analíticos:



Espectrometria de massa (m/z)

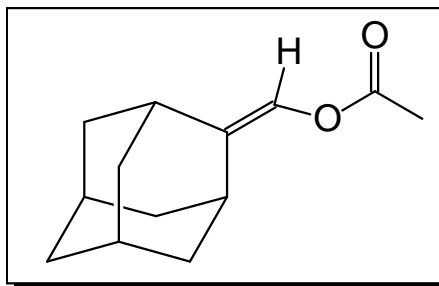
(Espectro 20): 164 (M, 65%); 135 (M - HCO; 100).

7.5.15- Acetato de 2-metiladamantilideno⁽¹²⁴⁾

Em um balão de 3 bocas com 50 mL de capacidade foram adaptados um agitador magnético, um condensador de refluxo adaptado a uma linha de argônio e um funil de adição. Ao balão foram adicionados 0,86 g (75 mmol) de uma suspensão de hidreto de potássio em óleo mineral (35%). Esta suspensão foi lavada com 3 porções (15 mL) de pentano. O pentano remanescente foi evaporado pela

passagem de argônio. Em seguida, lentamente e sob agitação, foi adicionada uma solução de 0,82 g (5 mmol) de adamantano-2-carboxialdeído dissolvidos em 20 mL de DME seco. A suspensão resultante foi agitada por mais 10 minutos e a seguir vertida, lentamente e sob agitação, em outro balão contendo 3,5 mL, 3,78 g (37,1 mmol) de anidrido acético. Após a adição, a mistura foi agitada por mais 10 minutos e ,em seguida, foram adicionados 25 mL de hexano, 25 mL de água e, cuidadosamente, bicarbonato de sódio sólido o suficiente para formar uma solução saturada. Após 15 minutos de agitação as fases foram separadas e a fase aquosa, extraída com 3 porções de 10 mL de hexano. Os extratos orgânicos foram combinados e o resultante, seco com sulfato de magnésio. O solvente foi evaporado e o produto bruto submetido à destilação bulbo-a-bulbo (197-201 °C/ 5 mmHg). O líquido oleoso resultante, 0,34 g (1,65 mmol), foi identificado como acetato de 2-metiladamantilideno. Rendimento: 33%.

Dados analíticos:



RMN-¹H (δ ppm/ CDCl₃/TMS)

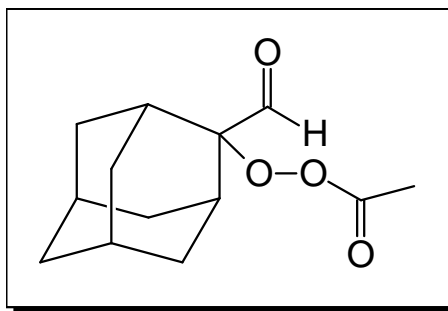
(Espectro 21): 1,73-1,97 (m, 12 H); 2,12 (s, 3 H); 2,37 (s, 1 H); 3,01 (s, 1 H); 6,88 (s, 1 H).

Espectrometria de massa (m/z)

Espectro 22: 206 (M⁺, 10%); 164 (M⁺ - H₂C=C=O, 100%); 135 (M⁺ - H₂C=C=O - HCO, 8%).

7.5.16- 2-acetilperoxiadamantano-2-carboxialdeído⁽¹²⁴⁾

Em um tubo tipo “dedo frio” foi adaptado um tubo de ressonância. No tubo foram adicionados 56 mg (0,28 mmol) de acetato de 2-metiladamantilideno e 0,50 mL de uma solução saturada de azul de metileno em acetona deuterada. A solução resultante foi foto-oxigenada a -10 °C por 4 horas, empregando-se uma lâmpada de tungstênio de 80 W e borbulhando oxigênio através de uma cânula de plástico. A solução resultante foi submetida a cromatografia de coluna a -35 °C (sílica gel e uma solução de acetato de etila 5% em hexano como eluente). Pode-se notar pela inspeção dos espectros 21 e 23 que a conversão do acetato de 2-metiladamantilideno ao aldeído foi quase completa (desaparecimento do próton olefínico em 6,88 ppm e aparecimento do próton aldeídico em 9,46 ppm). Por outro lado, a falta de correlação na integração dos sinais mostrou que este produto foi parcialmente decomposto (espectro 23).



8- Referências Bibliográficas

- 1- Lehninger, A. L., *Bioquímica*, Edgard Blücher LTDA, São Paulo (1976), pp. 418.
- 2- Colepicolo, P. & Bechara, E. J. H., *Arq. Biol. Tecnol.*, **27**, 439 (1984).
- 3- Halliday, D. & Resnick, R., *Física*, 4^aed., vol. 4, Livros técnicos e Científicos, Rio de Janeiro (1983).
- 4- Atkins, P. W., *Physical Chemistry*, 5^aed., Oxford University Press, Oxford (1994), pp. 597.
- 5- Turro, N. J., *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, California (1991).
- 6- Lowry, T.; Richardson, K. S., *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, 3^a ed., Harper Collins Publishers, New York (1987), pp. 985.

- 7- Campbell, A. K., *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*, Ellis Horwood, Chichester (1988).
- 8- Dubois, R., *C. r. Seans. Soc. Biol. Fr.*, **39**, 564 (1887).
- 9- Hasting, J. W. & Wilson, T., *Photochem. Photobiol.*, **23**, 461 (1976).
- 10- White, E. H.; Steinmetz, M. G.; Miano, J. D.; Wildes, P. D. & Morland, R. M. , *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 3199 (1980).
- 11- Shimomura, O. & Johnson, F. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 340 (1971).
- 12- McCapra, F., *Prog. Org. Chem.*, **8**, 231 (1973).
- 13- Kopecky, K. R. & Munford, C., *Can. J. Chem.*, **47**, 709 (1969).
- 14- Wilson, T. & Halpern, A. M., *J. Phys. Org. Chem.*, **8**, 359 (1995).
- 15- Turro, N. J.; Kou-Chang, L.; Chow, M. F. & Lee, P., *Photochem. Photobiol.*, **37**, 523 (1978).
- 16- Richardson, W. H. & O'Neal, H. E., *J Am. Chem. Soc.*, **94**, 8665 (1972).
- 17- Richardson, W. H.; Lovett, M. B. & Olson, L., *J. Org. Chem.*, **54**, 3523 (1989).
- 18- Wilson, T., *Photochem. Photobiol.*, **62** (4), 601 (1995).
- 19- Turro, N. J.; Lechetken, P.; Schore, N. E.; Schuster, G. B.; Steinmetzer, H. C. & Yekta, A., *Acc. Chem. Res.*, **7**, 97 (1974)
- 20- Koo, J. -Y. & Schuster, G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4496 (1978).
- 21- Schimidt, S. P. & Schuster, G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 306 (1980).
- 22- Schaap, A. P. & Gagnon, S. D., *J. Am. Chem. Soc*, **104**, 3504 (1982).
- 23- Koo, J. -Y.; Schmitd, S. P. & Schuster, G. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **75**, 30 (1978).
- 24- White, E. H.; Worther, H.; Seliger, H. H. & McElroy, W. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2015 (1966).
- 25- Shimomura, O., *Chemical and Biological Generation of Excited States*, eds.: Adam, W. & Cilento, G., Academic Press, New York (1982).
- 26- Adam, W., *Chemical and Biological Generation of Excited States*, eds.: Adam, W. & Cilento, G., Academic Press, New York (1982).
- 27- Catalani, L. H.; Wilson, T. & Bechara, E. J. H., *Photochem. Photobiol.*, **45**, 273 (1987).
- 28- Bartlett, P.D. & Schaap, A. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3223 (1970).

- 29- Cilento, G.; Durán, N.; Zinner, K.; Vidigal, C. C. C.; Faria Oliveira, O. M. M.; Haun, M.; Faljoni, A.; Augusto, O.; Casadei de Baptista, R. & Bechara, E. J. H., *Photochem. Photobiol.*, **28**, 445 (1978).
- 30- Kenten, R. H., *Biochem. J.*, **55**, 350 (1953).
- 31- Cilento, G., *Chemical and Biological Generation of Excited States*, eds.: Adam, W. & Cilento, G., Academic Press, New York (1982).
- 32- Kevers, C.; Coumans, M.; DeGreef, W.; Hofinger, M. & Gaspar, T., *Physiol. Plant.*, **51**, 281 ((1981).
- 33- Kobayashi, K. & Mason, R. P., *Biochemistry*, **23**, 4589 (1984).
- 34- Vidigal, C. C. C.; Zinner, K.; Faljoni-Alário, A.; Shimizu, Y. & Cilento, G., *Photochem. Photobiol.*, **30**, 195 (1979).
- 35- Escobar, J. A.; Vasques-Vivar, J. & Cilento, G., *Photochem. Photobiol.*, **55**, 267 (1992).
- 36- Salim-Hanna, M.; Campa, A. & Cilento, G., *Photochem. Photobiol.*, **45**, 849 (1987).
- 37- Bechara, E. J. H. & Medeiros, M. H. G., *Oxygen Radicals in Chem and Biolog.*, 540, (1984).
- 38- Bechara, E. J. H.; Faria Oliveira, O. M. M.; Durán, N.; Casadei de Baptista, R. & Cilento, G., *Photochem, Photobiol.*, **30**, 101 (1979).
- 39- Gallardo, H.; Guillo, L. A.; Durán, N. & Cilento, C., *Biochem. Biophys. Acta*, **789**, 57 (1984).
- 40- Adam, W.; Baader, W. J. & Cilento, G., *Biochem. Biophys. Acta*, **881**, 330 (1986).
- 41- Baader, W. J., *Química Nova*, **12**(4), 325 (1989).
- 42- Ushijima, Y.; Nakano, M.; Takyu, C. & Inaba, H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **128**(2), 936 (1985).
- 43- Khan, A. U., *J. Am. Chem. Soc*, **105**, 7195 (1983).
- 44- Kanofsky, J. R., *J. Biol. Chem.*, **258** (10), 5991 (1983).
- 45- Brunetti, I. L. & Faria-Oliveira, O. M. M., *Rev. Ciênc. Farm. São Paulo*, **16**, 55 (1995).
- 46- Dunford, H. B., *Peroxidases in Chemistry and Biology*, vol. 2, eds.: Everse, J.; Everse, K. E. & Grisham, M. B., CRC Press, Boston (1991).
- 47- Yamazaki, I. & Hayashi, Y., *J. Biol. Chem.*, **254**, 9101 (1979).
- 48- Smith, A. M.; Morrison, W. L. & Milham, P. J., *Biochemistry*, **21**, 4414 (1982).

- 49- Philbrook, G. E.; Ayers, J. B.; Garst, J. F. & totter, J. R., *Photochem. Photobiol.*, **4**, 869 (1965).
- 50- Sugiyama, N.; Akatagawa, M. & Gasha, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **40**, 347 (1967).
- 51- Sugiyama, N.; Akatagawa, M. & Yamamoto, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **41**, 936 (1968).
- 52- Nakagama, T.; Yamada, M. & Suzuki, S., *Anal. Chim. Acta*, **217**, 371 (1989).
- 53- Chen, G. N.; Xù, X. Q.; Duan, J. P.; Zhang, F. & He, M. M., *Analyst*, **120**, 1699 (1995).
- 54- Chen, G. N.; Lin, R. L.; Zhao, Z. F.; Duan, J. P. & Zhang, L., *Anal. Chim. Acta*, **341**, 251 (1997).
- 55- Fuhrberg, B. & Hardeland, R., *Cell. Biol. Problems in Chronobiology*, ed.: Hardeland, R., Univ of Gottingen, Gottingen, (1994).
- 56- Uemura, T. & Kadota, K., *Progress in Tryptofan and Serotonin Research*, eds.: Schlossburger, H. G.; Kochem, W.; Linzen, B. & Steinhart, H., Walter de Gruyter, Berlin. (1984), p. 673.
- 57- Fuhrberg, B. & Hardeland, R., *Cell. Biol. Problems in Chronobiology*, ed.: Hardeland, R., Univ. of Gottingen, Gottingen, (1994).
- 58- Sawaki, Y. & Ogata, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5412 (1977).
- 59- Sawaki, Y. & Ogata, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **42**, 40 (1977).
- 60- Adam, W.; Catalani, L. H.; sahr-Moller, C. H. & Will, B., *Synthesis*, 121 (1989).
- 61- Roda, A.; Pazzagli, M.; Kricka, L. J. & Stanley, P. L., *Bioluminescence and Chemiluminescence: Proceedings for the 10th Intenacional Symposium*, John Willey & Sons, Chichester (1998).
- 62- Beijerinck, M. W., *Proc. Acad. Sci. Amst.*, **4**, 45 (1902).
- 63- McElroy, W. D., *Proc. Natl. Acad. Sci, US*, **33**, 342 (1947).
- 64- Gallin, J. L. & Snyderman, R., *Inflamation. Basic Principles and Clinical Correlates*, Raven Press, New York (1999).
- 65- Allen, R. C., *Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence*, eds.: Kricka, L. J.; Stanley, P. E.; Thorpe, G. H. G. & Whitehead, T. P., Academic Press, London (1984).
- 66- Allen, R. C.; Stjernholm, R. L.; Reed, M. A.; Harper, T. B.; Gupta, S. & Steele, R. H., *J. Infect. Dis.*, **136**, 510 (1977).

- 67- Allen, R. C.; Mills, E. L.; Mcnitt, T. R. & Quie, P. G. , *J. Infect. Dis.*, **144**, 344 (1981).
- 68- Dahlgren, C. & Karlsson, A., *J. Immunol. Meths.*, **232**, 3 (1999).
- 69- Kricka, L. J., *Anal. Biochem.* **175**, 14 (1988).
- 70- Yalow, R. S. & Berson, S. A., *J. Clin. Invest.* **38**, 1996 (1959).
- 71- VAN Weeman, B. K. & Schuurs, A. H. W. M., *FEBS Lett.*, **15**, 232 (1971).
- 72- Mayer, A. & Neuenhofer, S. ,*Angew. Chem, Int. Engl.*, **33**, 1044 (1994)
- 73- Schaap, A. P.; Handley, R. S. & Giri, B. P., *Tetrahedron Lett.*, **28** (9), 935 (1987).
- 74- Edwards, B.; Sparks, A.; Voyta, J. C.; Strong, R.; Murphy, O. & Bronstein, I., *Am. Chem. Soc.*, **55**, 6225 (1990).
- 75- Schaap, A. P.; Akhavan, H. & Romano, L. J., *Clin. Chem.*, **35**, 1863 (1989).
- 76- Schaap, A. P.; DeSilva, R.; Akharan, H. & Handley, R.S., *Bioluminescence and Chemiluminescence Status*, eds.: Stanley, P. E. & Cricka, L. J., John Wiley and Sons, Chichester (1991)
- 77- Fihman, W. H., *Clin. Biochem.*, **20**, 387 (1987)
- 78- Hoshino, H.; Kushida, K.; Takahashi, M.; Kawama, K.; Denda, M.; Yamazaki, T. & Inoue, T., *Endocr. Res.*, **24** 55 (1998).
- 79- Salvatore, F.; Sacchetti, L. & Castaldo, G., *Clin. Chim. Acta*, **257**, 41 (1997).
- 80- Eltabakh, G. H.; belinson, J. L. & Biscotti, C. V., *Int. J. Gynecol. Pathol.* **16**, 76 (1997).
- 81- Benson, C. A., *Clin. Infect. Dis.*, **18**, S218 (1994).
- 82- Anttila, V. J.; Ruutu, P.; Bondestam, S.; Jansson, S. E.; Nordling, S.; Farkkila, M.; Sinoven, A.; Castren, M. & Ruutu, T., *Clin. Infect. Dis.*, **979**, 18 (1994).
- 83- Akhavan-Tafti, H.; Arghavani, Z.; DeSilva, R.; Eickholt, R. A. & Handley, R. S., "Bioluminescence and Chemiluminescence", eds.: Hasting, J. W.; Kricka, L. J. & Stanley, P. E., John Wiley & Sons , Chichester (1996).
- 84- Miska, W. & Geiger, R., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **25**, 23 (1987).
- 85- Arakawa, H.; Maeda, M. & Tsuji, A., *Anal. Biochem*, **199**, 238 (1991)
- 86- Arakawa, H. ; Maeda, M. ; Tsuji, A., *Bioluminescence and Chemiluminescence*, eds.: Hasting, J. W.; Kricka, L. J. & Stanley, P. E., John Wiley & Sons, Chichester (1996).
- 87- Thorpe G. H.; Kricka, L. J.; Moseley, S. B. & Whitehead, T.P., *Clin. Chem.*, **31** (8), 1335 (1985).

- 88- Kricka, L.J. & Ji, X., *J. Biolumin. Chemilumin.*, **10**(1), 49 (1995)
- 89- Velan, B. & Halman, M., *Immunochem.* **15**, 331 (1978).
- 90- Mitani, M.; Yokoyama, Y.; Ichikawa, S. Sawada, H.; Matsumoto, T.; Fujimori, K. & Kosugi, M., *J. Biolumin. Chemilumin.*, **9**, 355 (1994).
- 91- Stevens, C. L. & Bernard, T. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3448 (1957).
- 92- De Selms, R. C. & Iin, T. W., *Tetrahedron*, **23**, 1479 (1967).
- 93- Lichtenthaler, F. W., *Chem. Revs.*, **61**, 607 (1961).
- 94- Gallardo, H.; Guillo, L. A ; Durán, N. & Cilento, G., *Biochem. Biophys. Acta*, **789**, 57 (1984).
- 95- Sekine, M.; Futatisugi, T.; Yamada, K. & Haata, T., *Tetrahedron Lett.*, **21**, 371 (1980).
- 96- Varley, H. B., *Practical Clinical Biochemistry*, 6^a ed., ed.: Gowenlock, A. H., CRC Press Boca Raton, Flórida (1988), p 528.
- 97- Sandler, R. S. & Karo, W., *Organic Funcional Group Preparation*, 2^o ed., vol. 2, ed.: Harry, H. & Wasser B., Academic Press, New York (1986), p. 303.
- 98- Breederveld, H., *Rec. Trav. Chim.*, **79**, 1199 (1960).
- 99- Campa, A.; Andrade, A. C. & Catalani, L. H., *Photochem. Photobiol.*, **63**(6), 742 (1996).
- 100- Yavo, B.; Campa, A. & Catalani, L. H., *Anal. Biochem.*, **234**, 215 (1996).
- 101- Hess, G. P., *The Enzymes*, 3^oed., vol. 3, ed.: Boyer, P. D., Academic Press, New York (1971), pp. 213-218.
- 102- Shen, X.; Eriksen, T. E.; Meenyi, G., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 597 (1990).
- 103- Iwamoto, H.; Kobayashi, T.; Hasegawa, E. & Morita, Y., *J. Biochem.*, **101**, 1407 (1987).
- 104- Sun, W. & Dunford, H. B., *Biochem. Cell. Bioll.*, **72**, 321 (1994).
- 105- Khan, A. U., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 7195 (1983).
- 106- Hassner, A. & Haddadin, M. J., *J Org. Chem.*, **28**, 224 (1963).
- 107- Richardson, W. H.; Hodge, H. F.; Stiggall, D. L.; Yelvigton, M. B. & Montgomery, F. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 6652 (1973).
- 108- Gundemann, K. D. & McCapra, F., *Chemiluminescence in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, New York (1986).
- 109- Yokiko, H. & Yamazaki, I., *J. Biol. Chem.*, **254**(18), 9101 (1979).

- 110- Griffin, B. W., *Peroxidases in Chemistry and Biology*, eds.: Everse, J.; Everse, K. E. & Grisham, M. B., v.2, CRC Press, Boston, 1991, p. 108.
- 111- Remers, W. A., *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, vol. 25, parte 2, ed.: Houllan, W. J., Wiley Interscience, New York (1972), p. 145-159.
- 112- Piozzi, F. & Langella, M. R., *Gazz. Chim. Ital.*, **93**, 1373 (1963).
- 113- Kornblun, N. & DelaMare, H. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 880 (1951).
- 114- Timmins, G. S.; Santos, R. E.; Whitwood, A. C.; Catalani, L. H.; Di Mascio, P.; Gilbert, B. C. & Bechara, E. J. H., *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1090 (1997).
- 115- Kobayashi, K.; Hayashi, K & Sono, M, *J. Biol. Chem.*, **264**(26), 15280 (1989).
- 116- Hayaishi, A., *J. Biochem*, **79**, 13 (1976).
- 117- Job, D. & Dunford, H. B., *Eur. J. Biochem.* **66**, 607 (1976).
- 118- Ebeling, G., Relatório de Atividades de Pós-doutoramento, IQ-USP (1993).
- 119- Bailey, P. S. *Ozonation in Organic Chemistry*, vol.1, Academic Press, New York (1978).
- 120- Gupta, D.& Soman, R, *Tetrahedron*, **38**(20), 3013 (1982).
- 121- Eccott, E. N. & Linstead, R. N., *J. Chem. Soc.*, 905 (1930).
- 122- Volger, H. C.; Brackman, W. & Lemmers, J. W. F., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **84**, 1228 (1965).
- 123- Criegee, R., *Ber. Dtsch. Chem. Ger.*, **77**, 22 (1944).
- 124- Wilson, G. L., *Reaction of Singlet Oxygen with Enol Ethers*, PHD Thesis, University of Illinois (1985).
- 125- Farcasiu, D., *Synthesis*, **11**, 615 (1972).
- 126- Perrin, D. D. & Armarego, W. L., *Purification of Laboratory Chemicals*, 4^a ed. Bath Press, Great Britain (1996).
- 127- Cotton, M. L. & Dunford, H. B., *Can. J. Chem.*, **51**, 582 (1973).
- 128- Lee, J. & Seliger, H. H., *Photochem. Photobiol.*, **4**, 1015 (1965).
- 129- Sollenberger, P. Y. & Martin, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4261 (1970).