



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

MAIDILEYVIS CASTRO CABELLO

**Estudos sobre o Mecanismo de Geração de
Estados Eletronicamente Excitados em
Diferentes Meios Aquosos**

Versão Corrigida da Tese Defendida

São Paulo

Data do depósito na SPG:

10/11/2020

MAIDILEYVIS CASTRO CABELLO

**Estudos sobre o Mecanismo de Geração de
Estados Eletronicamente Excitados em
Diferentes Meios Aquosos**

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

Orientador: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader

**São Paulo
2020**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C114e Cabello, Maidileyvis
Estudos sobre o Mecanismo de Geração de Estados Eletronicamente Excitados em Diferentes Meios Aquosos / Maidileyvis Cabello. - São Paulo, 2020. 159 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Baader, Josef Wilhelm

1. sistema peroxioxalato. 2. quimiexcitação. 3. meio aquoso. 4. cumarinas. 5. microesferas quimiluminescentes. I. T. II. Baader, Josef Wilhelm, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Estudos sobre o mecanismo de geração de estados eletronicamente excitados em diferentes meios aquosos"

MAIDILEYVIS CASTRO CABELLO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - no Programa de Química.

Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader
(Orientador e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Thiago Carita Correra
IQ - USP

Prof. Dr. Fernando Heering Bartoloni
UFABC

Dr. Marc Kostag
IQ - USP

SÃO PAULO
09 de dezembro de 2020

Agradecimentos

Ao Prof. Willi, pela orientação, confiança e oportunidade que me ofereceu ao longo de 6 anos de trabalho em conjunto. Obrigada por me ensinar quão fascinante pode ser uma reação química que emite luz!

À minha família, sobretudo à minha mãe, por sempre estar atenta a mim apesar de estar longe de casa e por me apoiar em todos os momentos importantes da minha vida.

Aos meus amigos que sempre estiveram perto para fornecer apoio quando necessário: Yuniór, Aleinnys, Loubry, Janet, José, Argel, Alia, Ana, Liena, Yendry e Marcos. Obrigada pelas tantas risadas!

Aos meus colegas de laboratório, funcionários do IQ, e pessoal da seção de pós-graduação, em especial para Milton, por todo tipo de ajuda prestada.

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa

A **Deus** por ter estado sempre comigo.

"Let there be light: and there was light"

Genesis 1:3

RESUMO

Cabello, M. C. **Estudos sobre o Mecanismo de Geração de Estados Eletronicamente Excitados na Reação Peroxioxalato em Diferentes Meios Aquosos**. 2020. 159p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A reação peroxioxalato está sendo amplamente utilizada para as mais variadas aplicações analíticas e bioanalíticas, porém, esta transformação é muito pouco estudada em meios aquosos, importante principalmente para aplicações bioanalíticas, onde se obtém baixos rendimentos quânticos. Neste sentido, propõem-se estudar a reação peroxioxalato em diferentes meios aquosos para entender o mecanismo de quimiexcitação nestes ambientes e verificar os fatores que determinam a eficiência de quimiexcitação.

Primeiramente foram realizados estudos cinéticos de hidrólise e peridrólise do oxalato de bis(2,4,6-triclorofenil) (TCPO) em diferentes misturas de água e solventes orgânicos a partir dos quais se obtiveram evidências que a reação aparentemente é pouco sensível a efeitos do meio. Além disso, foi estudado o mecanismo da reação peroxioxalato usando ésteres oxálicos de diferente reatividade em vários meios de reação na presença de pequenas quantidades de água. Foi observado que os rendimentos quânticos singlete aumentam até uma concentração de água igual a $0,7 \text{ mol L}^{-1}$. Após essa concentração os rendimentos quânticos diminuem significativamente com o aumento da concentração de água. Foi verificado que esta diminuição não é apenas devido à hidrólise do éster, mas é causada pela menor eficiência do passo de quimiexcitação na presença de concentrações molares de água.

Para obter informações mecanísticas detalhadas sobre a etapa de quimiexcitação da reação peroxioxalato, os rendimentos quânticos da transformação em 1,2-dimetoxietano contendo pequenas quantidades de água foi determinado usando diferentes ativadores hidrofílicos e hidrofóbicos. Através de gráficos duplo recíprocos foram obtidos os

parâmetros quimiluminescente do sistema em diferentes frações molares de água e foi observado que ativadores hidrofílicos mostram rendimentos quânticos mais baixos do que os derivados hidrofóbicos correspondentes.

Derivados de cumarina e a curcumina são utilizados como sondas de fluorescência em várias aplicações analíticas e bioanalíticas. Por tanto, também relatamos nossos resultados sobre a utilização desses derivados como ativadores na quimiluminescência de peroxioxalato, tanto em 1,2-dimetoxietano anidro, quanto em misturas aquosas deste solvente. Estudos cinéticos, realizados para caracterizar o sistema, mostraram que os ativadores não interferem na cinética da reação e podem ser obtidos resultados reproduzíveis. A correlação linear das constantes de transferência de elétron com os potenciais de oxidação dos ativadores leva a coeficientes de transferência de elétron relativamente baixos, indicando um estado de transição precoce neste processo. Os rendimentos quânticos são mais altos no meio orgânico em comparação com as condições aquosas em cerca de uma ordem de magnitude; no entanto, os valores das constantes de transferência de elétron são mais altos no meio aquoso, supostamente devido a sua maior polaridade.

Por último, relatamos resultados preliminares de nossos estudos sobre microesferas de derivados de celulose quimiluminescentes, baseadas no sistema peroxioxalato. Foi observado que os rendimentos determinados para esses sistemas são pelo menos uma ordem de magnitude maiores que os obtidos em meio aquoso em condições diretamente comparáveis. Estes resultados indicam que o encapsulamento de reagentes do sistema peroxioxalato pode ser uma abordagem interessante para a sua utilização vantajosa em ensaios analíticos e bioanalíticos em meios aquosos.

Palavras-chaves: quimiluminescência, sistema peroxioxalato, etapa de quimiexcitação, efeito de solvente, meio aquoso, cumarinas, curcumina, microesferas quimiluminescente.

ABSTRACT

Cabello, M. C. **Studies on the Mechanism of Electronically Excited States Generation in the Peroxyoxalate Reaction in Different Aqueous Media.** 2020. 159p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The peroxyoxalate reaction is being widely used for a variety of analytical and bioanalytical applications, however, this transformation is very little studied in aqueous media, important mainly for bioanalytical applications, where low quantum yields are obtained. In this sense, we propose to study the peroxyoxalate reaction in different aqueous media to understand the mechanism of chemiexcitation in these environments and to verify the factors that determine the efficiency of chemiexcitation.

First, kinetic studies of the hydrolysis and perhydrolysis of bis(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate (TCPO) were performed in different mixtures of water and organic solvents from which evidence was obtained that the reaction is apparently insensitive to medium effects. Besides, the peroxyoxalate reaction mechanism was studied using oxalic esters of different reactivity in various reaction media in the presence of small amounts of water. It was observed that the singlet quantum yields increase up to a water concentration equal to 0.7 mol L^{-1} . After this concentration, quantum yields decrease significantly with increasing water concentrations. It was found that this decrease is not only due to ester hydrolysis, but is caused by the lower efficiency of the chemiexcitation step in the presence of molar concentrations of water.

To obtain detailed mechanistic information about the chemiexcitation step of the peroxyoxalate reaction, the quantum yields of the transformation in 1,2-dimethoxyethane containing small amounts of water were determined using different hydrophilic and hydrophobic activators. The system's chemiluminescence parameters in the presence of different molar fractions of water were obtained through double reciprocal graphs and it

was observed that hydrophilic activators show lower quantum yields than the corresponding hydrophobic derivatives.

Coumarin derivatives and curcumin are widely used as fluorescence probes in various analytical and bioanalytical applications. Therefore, we also report our results on the use of these derivatives as activators in peroxyoxalate chemiluminescence, both in anhydrous 1,2-dimethoxyethane, and in aqueous mixtures of this solvent. Kinetic studies, performed to characterize the system, showed that the activators do not interfere with the reaction kinetics and reproducible results can be obtained. The linear correlation of the electron transfer rate constants with the oxidation potential of the activators leads to relatively low electron transfer coefficients, indicating an early transition state in this process. Quantum yields are higher in the organic medium compared to aqueous conditions by about an order of magnitude; however, the values of the electron transfer constants are higher in the aqueous medium, supposedly due to its higher polarity.

Finally, we report preliminary results of our studies on chemiluminescent microspheres of cellulose derivatives, based on the peroxyoxalate system. The yields determined for these systems are at least an order of magnitude higher than those obtained in aqueous medium under comparable conditions. These results indicate that the encapsulation of reagents of the peroxyoxalate system can be an interesting approach for its advantageous use in analytical and bioanalytical assays in aqueous media.

Keywords: chemiluminescence, peroxyoxalate system, chemiexcitation step, solvent effect, aqueous medium, coumarins, curcumin, chemiluminescent microspheres.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AcCel	Acetato de celulose
ACN	Acetonitrila
ACT	Ativador
CAG	Catálise ácida geral
CBG	Catálise básica geral
CIEEL	<i>Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence</i> , Luminescência quimicamente induzida por troca de elétron.
DLS	Dynamic Light Scattering (espalhamento dinâmico de luz)
DME	1,2-dimetoxietano
DNP	2,4-dinitrofenol
DNPC	Carbonato de bis(2,4-dinitrofenila)
DNPO	Oxalato de bis(2,4-dinitrofenila)
DPA	9,10-difenilantraceno
E_{ox}^{1/2}	Potencial de oxidação de meia-onda
Es	Energia do estado singlete
EtOAc	Acetato de etila
ΔG_{RTE}	Energia livre de retro-transferência de elétron
IAE	Intermediário de alta energia
IMI-H	Imidazol
k₁₍₂₎	Constante de velocidade bimolecular
k₁₍₃₎	Constante de velocidade trimolecular
k_{CAT}/k_D	Relação entre a constante de velocidade do processo catalisado do IAE pelo ACT a constante de velocidade de decomposição unimolecular do IAE
k_{hid}	Constante de velocidade da reação de hidrólise
k_{obs}	Constante de velocidade observada
k_{per}	Constante de velocidade da reação de peridrólise
PER	Perileno
PO	Peroxioxalato
PO-QL	Quimiluminiscência de Peroxioxalato
PPO	2,5-difeniloxazol
QL	Quimiluminiscência
ROD	Rodamina 6G
RUB	Rubreno
RUB sulf	Rubreno sulfonado
SM	Solvente molecular
TCP	2,4,6-triclorofenol
TCPO	Oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila)
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
Φ_{CL}	Rendimento quântico de quimiluminiscência
Φ_s	Rendimento quântico de formação de estados excitados singlete

Φ_s^∞

Rendimento quântico singlete na concentração infinita de ativador

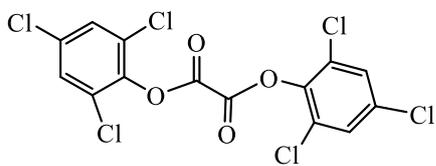
α

Coeficiente de transferência de elétron

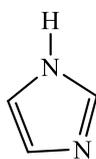
χ_{H_2O}

Fração molar de água

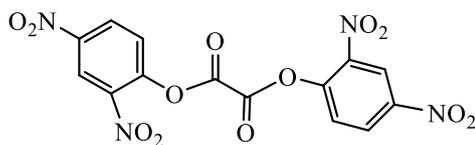
LISTA DE ESTRUTURAS RELEVANTES



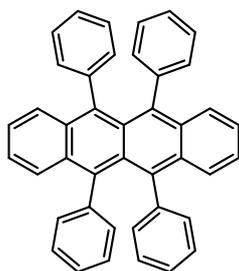
TCPO



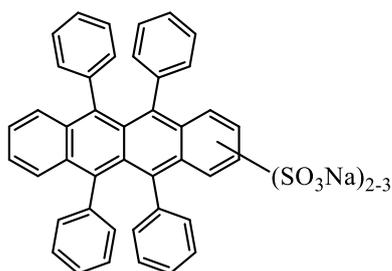
IMI-H



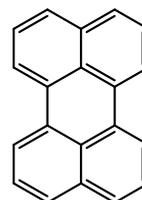
DNPO



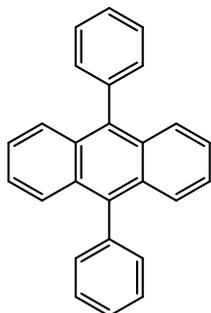
RUB



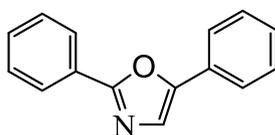
RUB sulf



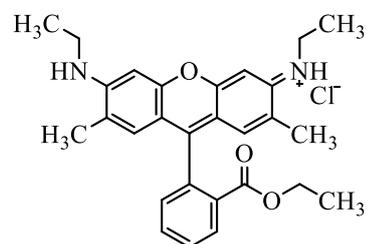
PER



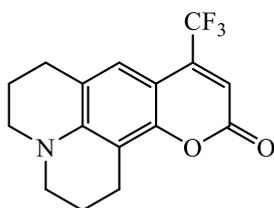
DPA



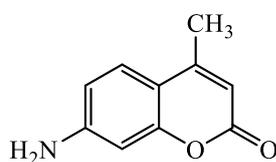
PPO



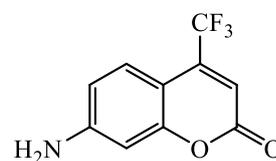
ROD 6G



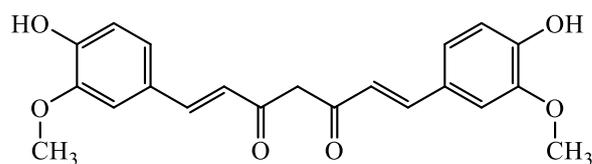
Cum 153



Cum 120



Cum 151



Curcumina

Sumário

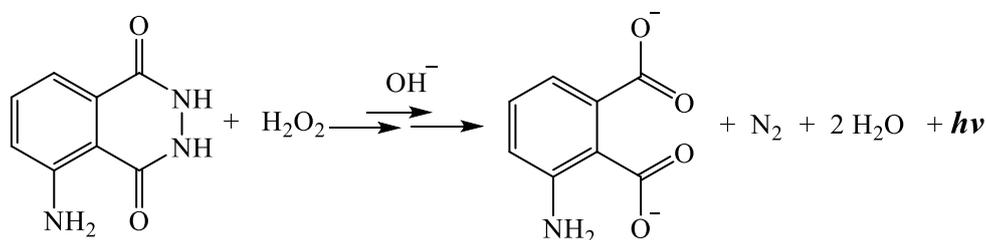
1. Introdução	15
1.1 Quimiluminescência: definição e aspectos gerais	15
1.2 Decomposição unimolecular e catalisada de peróxidos cíclicos	18
1.3 O sistema peroxioxalato: mecanismo CIEEL	20
1.3.1 Aplicações do sistema peroxioxalato	23
1.3.2 Estudos mecanísticos do sistema peroxioxalato em meios aquosos	25
1.3.3 Sistema peroxioxalato em meios organizados.....	31
2. Objetivos	34
3. Resultados	35
3.1 Hidrólise de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) em diferentes misturas de solventes moleculares e água.	35
3.2 Reação do oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) com H ₂ O ₂ em SM : H ₂ O ([H ₂ O] = 3 mol L ⁻¹)	37
3.3 Estudo cinético do sistema peroxioxalato em misturas 1,2-dimetoxietano: água	42
3.4 Efeito da água sobre o passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato	48
3.5 Parâmetros de quimiluminescência da reação peroxioxalato em 1,2-dimetoxietano (DME) e em várias misturas de DME : H ₂ O	53
3.6 Estudos cinéticos com TCPO em 1,2-dimetoxietano (DME) anidro e em misturas DME : H ₂ O 1:1 (v/v) usando cumarinas e a curcumina como ativadores.....	58
3.7 Estudos de microesferas baseadas no sistema peroxioxalato	60
4. Discussão.....	80
4.1 Hidrólise de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) em diferentes misturas de solventes moleculares e água.	80
4.3 Estudo cinético do sistema peroxioxalato em misturas 1,2-dimetoxietano: água	88
4.3.1 Mecanismo da reação de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) com H ₂ O ₂ catalisada por IMI-H em misturas 1,2-dimetoxietano: água	88
4.3.2 Mecanismo da reação de oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) com H ₂ O ₂ catalisada por IMI-H em misturas 1,2-dimetoxietano: água.....	93
4.4 Efeito da água no passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato	95
4.5 Parâmetros de quimiluminescência da reação peroxioxalato em várias misturas de DME:H ₂ O.....	100
4.6 Estudos cinéticos com TCPO em 1,2-dimetoxietano (DME) anidro e em misturas DME:H ₂ O 1:1 (v/v) usando cumarinas e a curcumina como ativadores.....	111
4.7 Estudos de microesferas baseadas no sistema peroxioxalato	117
5. Conclusões	130
6. Parte Experimental	133
6.1 Reagentes e solventes.....	133

6.1.1 Reagentes	133
6.1.2 Solventes	134
6.2 Procedimentos experimentais.....	135
6.2.1 Solução estoque de peróxido de hidrogênio.....	135
6.2.2 Determinação da concentração das soluções estoque de peróxido de hidrogênio....	135
6.2.3 Medidas de pH e soluções tampão borato	136
6.2.4 Estudo solvatocrômico	136
6.2.5 Preparação das frações molares de água nas misturas binárias.....	137
6.2.6 Preparação das microesferas	137
6.3 Equipamentos.....	137
6.4 Ensaio Cinéticos	138
6.4.1 Medidas cinéticas de emissão ou absorção de luz do sistema peroxioxalato	138
6.4.2 Medidas cinéticas de emissão de luz das microesferas baseadas no sistema peroxioxalato.....	140
6.4.3 Calibração do fluorímetro para cálculos de rendimentos quânticos singletes (Φ_s) ..	140
6.4.4 Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{FL}).....	143

1. Introdução

1.1 Quimiluminescência: definição e aspectos gerais

O processo de emissão de luz por reações químicas continua sendo um dos fenômenos mais fascinantes da química. Foi E. Wiedemann quem definiu pela primeira vez, em 1888, que essa emissão de luz deveria ser chamada de **quimiluminescência** (QL).¹ A primeira reação quimiluminescente caracterizada quimicamente foi a oxidação do luminol com H₂O₂ em meio básico descrita por Albrecht em 1928 (**Esquema 1**).² Constatou-se que esta reação ocorre de forma imediata na presença de metais de transição que agem como catalisadores. Conseqüentemente, a partir de estudos realizados, observou-se que o sangue pode agir como catalisador desta reação, por possuir ferro em sua composição. Após essa descoberta, a Polícia Forense adotou a utilização do luminol para detectar sangue latente em locais de crime, visto que esse composto possui extrema sensibilidade e eficiência para tal finalidade.^{3,4}

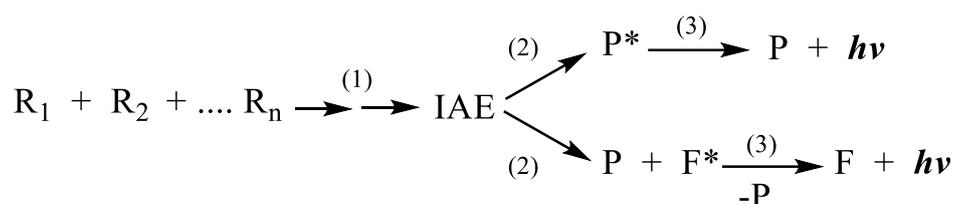


Esquema 1: Reação quimiluminescente do luminol com peróxido de hidrogênio, em meio alcalino.

A quimiluminescência é um dos fenômenos mais incompreendidos no sentido de como uma reação química é capaz de emitir luz quando determinados reagentes são misturados. A principal característica desse processo é que a excitação ocorre através de uma reação química, e a intensidade de emissão é uma função da concentração das espécies químicas envolvidas na reação de quimiluminescência, por conseguinte, as medidas da intensidade de emissão podem ser usadas para fins analíticos. Uma vantagem das técnicas de QL é

que elas permitem que uma instrumentação básica bastante simples seja usada, uma vez que o sistema óptico não requer uma fonte externa de excitação.

Esquemáticamente as reações quimiluminescentes envolvem três passos principais: (i) reação química no estado fundamental que leva a formação de um intermediário de alta energia (IAE), (ii) decomposição unimolecular do IAE ou sua reação com outros reagentes, formando um produto em seu estado eletronicamente excitado, (iii) decaimento deste estado excitado ao estado fundamental acompanhado de emissão de luz (**Esquema 2**).⁵ A luz emitida por esse processo pode ser em forma de fluorescência, quando envolve estados eletrônicos de mesma multiplicidade (singlete-singlete) ou fosforescência quando envolve estados eletrônicos de multiplicidades diferentes (tripleto-singlete).



Esquema 2: Mecanismo geral de emissão quimiluminescente.

A etapa de quimiexcitação, passo elementar onde ocorre a conversão da energia química da reação em energia de excitação eletrônica, de um ponto de vista energético, exige que (i) o produto formado da reação seja capaz de receber a energia de quimiexcitação para gerar um estado excitado, como ocorre com compostos carbonílicos e hidrocarbonetos aromáticos,⁶ (ii) a energia liberada deve ser suficiente para levar à formação do estado excitado de tal produto, (iii) a soma da entalpia da reação com a entalpia de ativação deve ser maior, ou igual, à energia de excitação e (iv) alguns fatores de geometria, relacionados com o princípio de Franck-Condon, sejam obedecidos. Nesse último ponto, pode-se citar que uma transformação do estado fundamental para o estado excitado, ocorre mais facilmente quando a geometria do estado de transição é parecida

com a do estado excitado.⁷ Além disso, outros fatores baseados na teoria de Marcus, para reações de transferência de elétron, também são importantes.⁸⁻¹⁰

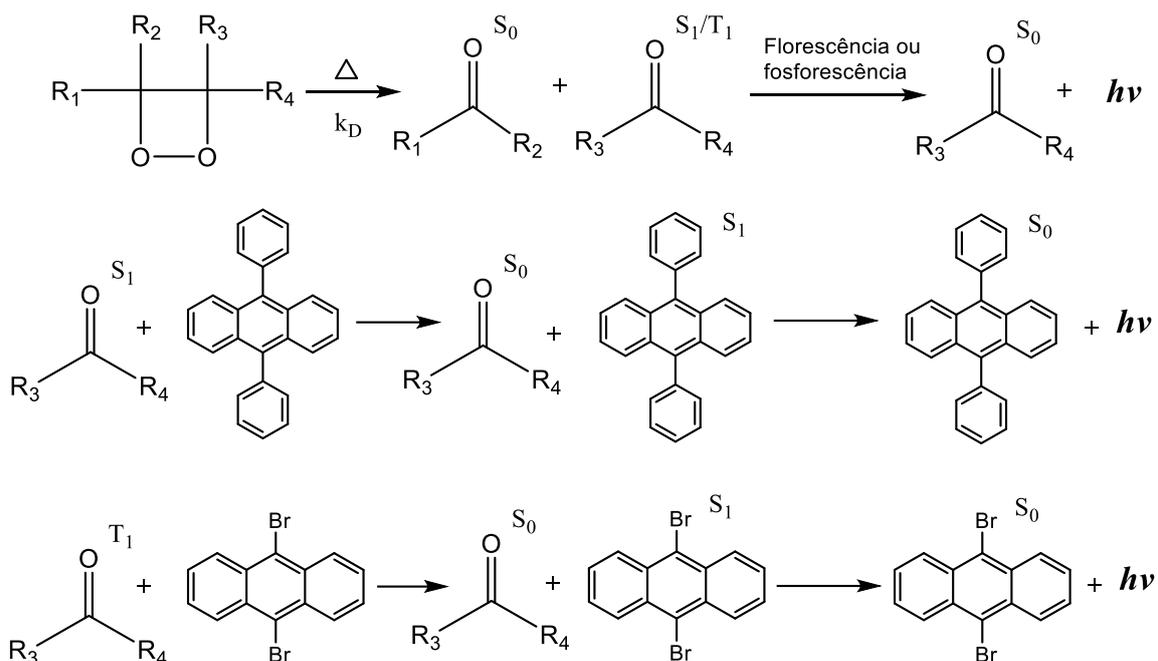
Em todos os processos luminescentes, a intensidade da emissão produzida depende da eficiência da geração de moléculas no estado excitado, representado pela eficiência quântica (rendimento quântico) e pela velocidade da reação. As medições de QL são fortemente influenciadas por fatores experimentais que afetam o rendimento quântico e a velocidade de reação, como:

- A estrutura química do precursor quimiluminescente, não apenas a parte que contém o grupo eletronicamente excitado, mas também as cadeias laterais.
- A natureza e concentração de outras substâncias que afetam o processo de QL e favorecem outros processos competitivos não radiantes.
- O catalisador selecionado.
- A presença de íons metálicos, especialmente metais de transição envolvido no processo de oxidação.
- A temperatura
- pH e força iônica
- A hidrofobicidade do solvente e a composição da solução
- A presença de aceptores da energia transferida

Reações quimiluminescentes eficientes possuem rendimentos quânticos de quimiluminescência (Φ_{CL}) que variam entre 1,0 e 60%,⁵ sendo que, desses sistemas, a maioria envolve a formação de peróxidos, muitas vezes, em cadeias cíclicas de quatro membros.

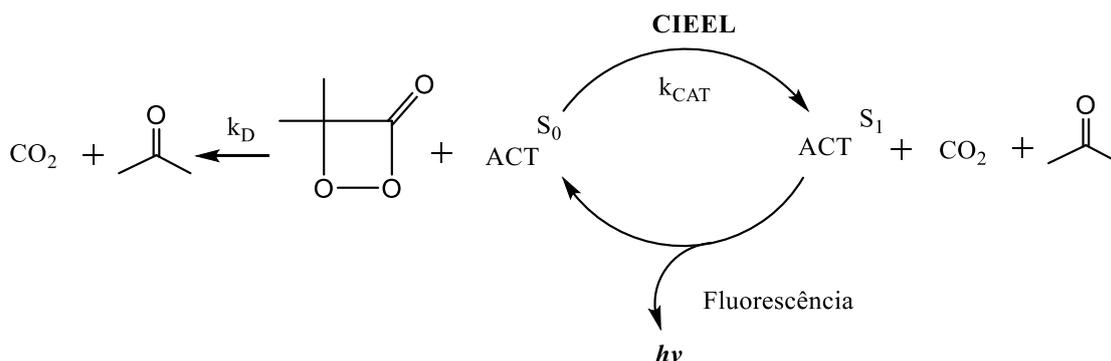
1.2 Decomposição unimolecular e catalisada de peróxidos cíclicos

Como descrito anteriormente, os peróxidos cíclicos têm sido frequentemente descritos como intermediários de alta energia, uma vez que a decomposição desses gera energia suficiente para produzir produtos em um estado eletronicamente excitado.¹¹ Ao contrário da maioria das reações quimiluminescentes, a decomposição unimolecular de 1,2-dioxetanos representa um sistema simples, onde uma molécula relativamente estável leva à formação de dois compostos carbonílicos, um dos quais pode ser formado no estado excitado singlete ou triplete (**Esquema 3**). Esta decomposição, entretanto, não representa um bom modelo para reações com altos rendimentos de emissão, já que o rendimento quântico dos estados tripletes é muito maior do que dos estados singlete, sendo que o rendimento de emissão de fosforescência em meios líquidos oxigenados é, geralmente, muito baixo.^{5,12-14} De forma a se aumentar esse rendimento, pode-se utilizar um bom acceptor de energia como 9,10-difenilantraceno (acceptor de estados excitados singlete), ou 9,10-dibromoantraceno (acceptor de estados excitados triplete devido ao efeito do átomo pesado^{15,16}) (**Esquema 3**). Para esse sistema de quimiluminescência indireta, o rendimento quântico de emissão é maior do que o obtido na quimiluminescência direta de 1,2-dioxetanos. Entretanto, não há uma decomposição catalisada do peróxido, somente uma transferência de energia do produto excitado para o acceptor, já que a constante observada neste processo equivale à constante de decomposição térmica unimolecular do 1,2-dioxetano.



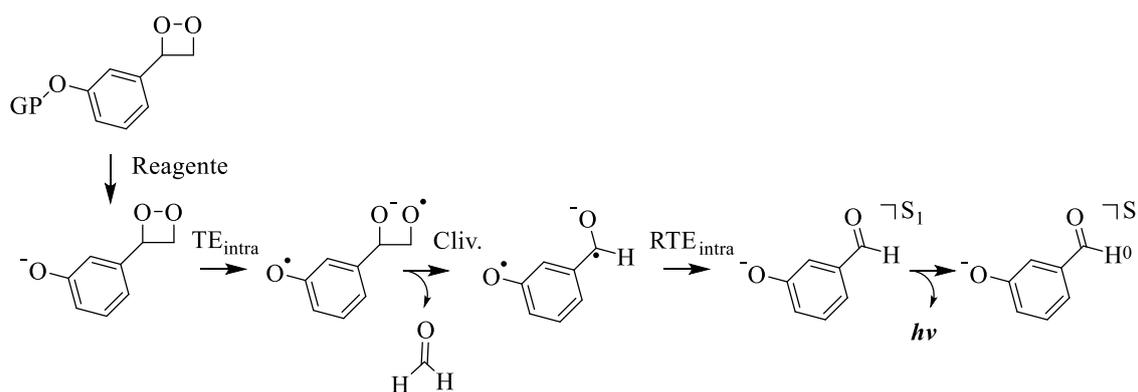
Esquema 3: Decomposição térmica unimolecular de 1,2-dioxetano.

Porém, Schuster e colaboradores relataram que certos hidrocarbonetos aromáticos fluorescentes, conhecidos como ativadores, são capazes de catalisar a decomposição do peróxido de difenoíla e da 3,3-dimetil-1,2-dioxetanona.^{6,17,18} A constante de velocidade bimolecular desta transformação de quimiluminescência ativada aumenta com o aumento da concentração do ativador e depende do seu potencial de oxidação.^{5,6,19} Com base nesta evidência experimental, Schuster propôs que a reação entre o ACT e esses peróxidos envolve uma transferência de elétron do ativador para o peróxido e chamou este mecanismo de “Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence” (CIEEL), ou seja, luminescência quimicamente iniciada por troca de elétrons (**Esquema 4**).¹⁹ Entretanto, embora esta decomposição catalisada forme, preferencialmente, produtos no estado excitado singlete, o rendimento quântico obtido é baixo.^{20,21}



Esquema 4: Decomposição unimolecular e catalisada da 3,3-dimetil-1,2-dioxetanona por um ativador (ACT) através do mecanismo CIEEL.

A decomposição de peróxidos cíclicos por um mecanismo intramolecular CIEEL forma estados excitados singlete muito mais eficientemente que os sistemas intermoleculares. As reações de CIEEL intramoleculares, como a decomposição induzida de 1,2-dioxetanos contendo substituintes fenoxila, são modelos mais apropriados para reações bioluminescentes (**Esquema 5**).²²⁻²⁵ Nessa via totalmente intramolecular não ocorre a separação dos íons-radicais por difusão, o que explica de maneira adequada a grande diferença nos rendimentos quânticos obtidos em sistemas CIEEL com transferência de elétron inicial intermolecular ou intramolecular.

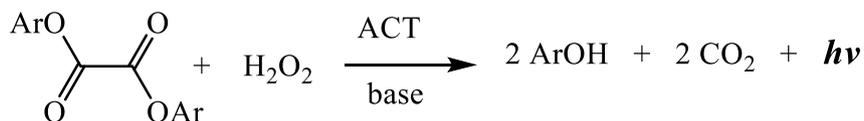


Esquema 5: Sequência mecanística CIEEL intramolecular na decomposição de um derivado de 1,2-dioxetano, contendo um grupo fenoxila protegido.

1.3 O sistema peroxioxalato: mecanismo CIEEL

Embora existam vários sistemas quimiluminescentes intramoleculares do tipo CIEEL altamente eficientes, a reação peroxioxalato é o único sistema conhecido de altos

rendimentos quânticos que envolvem o mecanismo CIEEL intermolecular.⁵ O sistema refere-se à emissão de radiação que ocorre quando o peróxido de hidrogênio reage com um derivado ativo do ácido oxálico, na presença de uma substância fluorescente e de uma base.²⁶⁻²⁸ A reação geral pode ser representada pelo **Esquema 6**.

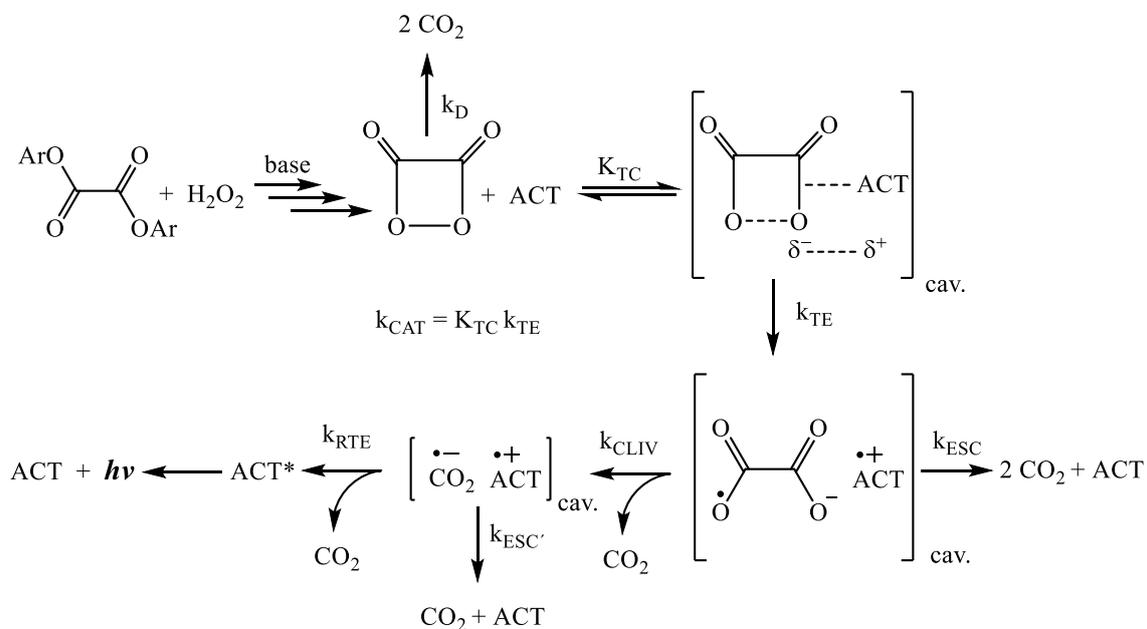


Esquema 6: Equação da reação peroxioxalato de um éster oxálico aromático com peróxido de hidrogênio na presença de uma base e um ativador (ACT).

Um dos principais problemas para propor o mecanismo exato da reação peroxioxalato tem sido a identificação dos possíveis intermediários responsáveis pela excitação do ativador.^{26,29-31} Supondo que este composto intermediário é a 1,2-dioxetanodiona, o **Esquema 7** representa o mecanismo CIEEL para a decomposição catalisada da 1,2-dioxetanodiona no passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato.

O mecanismo CIEEL envolve os seguintes passos: (i) primeiramente o ativador entra em contato com o peróxido formando um complexo de encontro do tipo transferência de carga (K_{TC}) dentro da cavidade de solvente;^{6,17,18} (ii) ativação térmica do peróxido, levando a um alongamento da ligação fraca oxigênio-oxigênio e ao aumento da afinidade eletrônica do peróxido. Com isso ocorre a transferência de elétron do ativador para o peróxido (k_{TE}), junto com a clivagem da ligação O-O, formando um par de íons radicais, o que representa o passo limitante da velocidade de reação;^{5,6} (iii) clivagem da ligação carbono-carbono (k_{CLIV}) do radical ânion do peróxido gerando um novo ânion radical dentro da cavidade de solvente e um fragmento neutro (CO_2); (iv) retro-transferência de elétron do ânion radical para o cátion radical do ACT (k_{RTE}), liberando energia suficiente para promover o ACT ao seu estado excitado singlete; (v) decaimento do ACT no estado excitado para o fundamental, liberando energia na forma de luz.^{5,6,17,32} Para obter uma

alta eficiência de formação de estados excitados, a clivagem de ligações e transferência de elétron tem que ocorrer dentro da gaiola do solvente. Quando ocorre o escape de uma das espécies reativas desta cavidade (k_{ESC}), esta não irá mais a participar da sequência reacional, reduzindo assim os rendimentos de emissão.

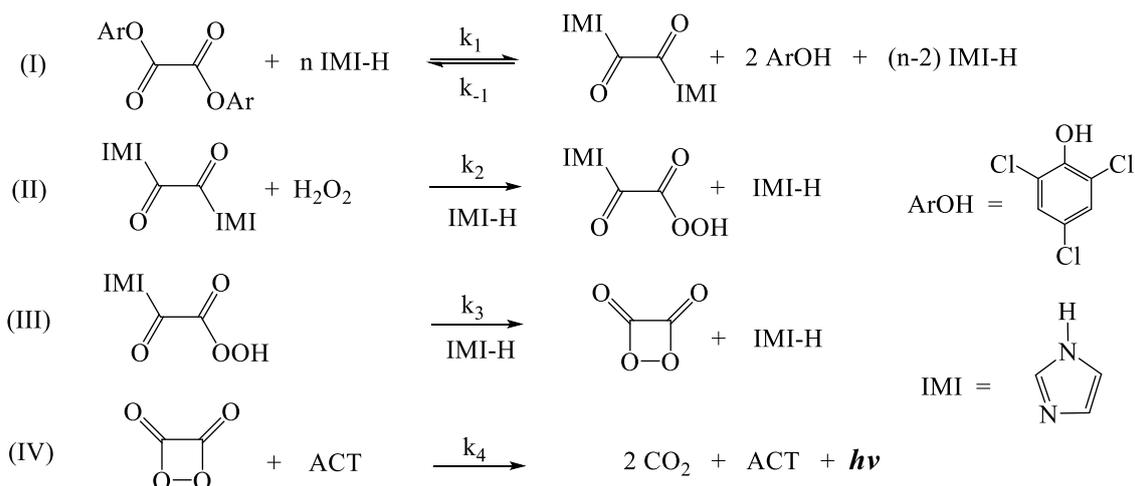


Esquema 7: Mecanismo CIEEL intermolecular para a decomposição catalisada da 1,2-dioxetanodiona.

Estudos do grupo possibilitaram a verificação de um processo de transferência de elétron, relativo ao passo de quimiexcitação, conforme previsto pelo mecanismo CIEEL.^{33,34} De uma forma geral, pôde-se observar que quanto menor o potencial de oxidação do ACT, maior é a eficiência com que o processo de excitação (devido à retrotransferência de elétron) ocorre.

A cinética da reação peroxioxalato pode ser estudada observando-se a intensidade de emissão de quimiluminescência (na presença de um ACT) ou o aumento da absorbância em comprimento de onda adequado (na ausência do ACT) devido à formação de fenol (ArOH). Um mecanismo bem detalhado da reação peroxioxalato de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) com H_2O_2 catalisada por imidazol foi proposto por nosso grupo de

pesquisa^{35,36} (**Esquema 8**). Nesses estudos, foi possível se comprovar o papel de IMI-H como catalisador nucleofílico pela formação do intermediário de reação 1,1'-oxalildiimidazolidico³⁵ além de se averiguar o envolvimento do mecanismo CIEEL na etapa de quimiexcitação do ACT³⁴ na interação do mesmo com o Intermediário de Alta Energia (IAE) do sistema peroxioxalato (1,2-dioxetanodiona).



Esquema 8: Etapas envolvidas no sistema peroxioxalato, para a reação do oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) com H_2O_2 , com catálise nucleofílica e básica por imidazol (IMI-H).

1.3.1 Aplicações do sistema peroxioxalato

A primeira aplicação prática do sistema peroxioxalato (PO-QL) foi a produção de "light stick". Este dispositivo é um bastão formado de um material flexível que contém dentro um segundo bastão facilmente quebrável. Dentro de um dos tubos encontra-se o peróxido de hidrogênio e uma base forte que irá agir como catalisador. No outro tubo, encontra-se o éster oxálico e o ativador. Ao dobrar o bastão, o tubo em seu interior se quebra e as duas soluções se misturam, ocorrendo a reação que leva à emissão de luz.³⁷

A importância da reação peroxioxalato tem sido associada à sua aplicação analítica, que engloba a detecção de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, substâncias que podem funcionar naturalmente como fluoróforos³⁸ ou compostos não fluorescente que pode tornar-se fluorescente, por reação química com cloreto de dansyl (amino ácidos,

esteroides, aminas alifáticos, ácidos carboxílicos, etc.) ou fluorescamina (catecolaminas)³⁹

PO-QL foi empregado para detectar vestígios de compostos à base de metanfetamina em raízes de pêlos de ratos,⁴⁰ halofantrina - um derivado de antraceno-metanol usado no tratamento da malária - no plasma de ratos,⁴⁰ catecolaminas em amostras de cérebro de ratos⁴¹ e plasma humano⁴² entre muitas outras aplicações.

O PO-QL também é comumente aplicado em análises de alimentos, onde polímeros com impressão molecular são usados para reconhecer substâncias nos analitos, que aumentam a emissão de QL. Este método foi desenvolvido pela primeira vez por Li et al. para a determinação de resíduos de etopabato nos músculos da galinha⁴³. Outras aplicações foram encontradas para a detecção de corantes do Sudão em ovos.⁴⁴ Também foi demonstrado que o sistema PO-QL poderia ser usado para determinar a atividade antioxidante de compostos contidos em óleos comestíveis,⁴⁵ bem como pesticidas residuais na água.⁴⁶ A reação foi usada ainda na determinação de N-metilcarbamatos em sucos de frutas,⁴⁷ dado que este pesticida representa um potencial perigo para os consumidores.

Além disso, o sistema peroxioxalato pode ser aplicado em diferentes campos da farmacologia e de diagnóstico. Devido ao fato das células malignas produzirem quantidades acrescidas de peróxido de hidrogênio, formulações baseadas em oxalatos podem ser usadas para a exibição de focos de crescimento de tumores e outros processos inflamatórios. Ainda mais, a aplicação de porfirinas como fluoróforos permite a concepção de um sistema para a destruição seletiva de tumor⁴⁸⁻⁵¹ devido à capacidade de porfirinas, em um estado excitado, transferir energia para moléculas de oxigênio convertendo-os ao estado singlete. Finalmente, a geração de oxigênio singlete em endossomas celulares como um resultado da reação entre um oxalato, uma porfirina e

peróxido de hidrogênio, é de interesse para aumentar a eficiência de transfecção de células, por exemplo, em vacinação de ADN ou luta contra doenças genéticas.

Outros compostos orgânicos também podem ser determinados através do sistema peroxioxalato, entre eles destacam-se colesterol, glucose, lactose, bilirrubina, oxalato, formaldeído, ácido fórmico, L-aminoácido, poliaminas e acetilcolina.⁵²⁻⁵⁵

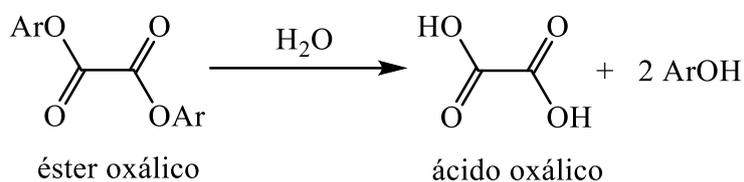
A limitação mais importante desta reação é a sensibilidade à água, álcoois primários e outros solventes nucleofílico, que podem atacar e degradar a molécula de peroxioxalato afetando negativamente a emissão quimiluminescente.

1.3.2 Estudos mecanísticos do sistema peroxioxalato em meios aquosos

Poucos estudos mecanísticos têm sido realizados envolvendo o sistema peroxioxalato em sistemas aquosos, mesmo esse sendo um importante método quimiluminescente analítico. Foi observado que nesses meios de reação os rendimentos quânticos singlete mostraram ser várias ordens de magnitude mais baixos^{56,57} quando comparados com os obtidos em solventes orgânicos anidros.^{27,33,34,58,59}

Sabe-se que em meio aquoso o éster oxálico a ser utilizado sofrerá hidrólise (**Esquema 9**), formando o ácido oxálico correspondente, o qual não pode ciclizar para formar o IAE, tampouco pode interagir com o ACT e levá-lo ao estado excitado, o que diminui o rendimento de quimiluminescência da reação. Além disso, tanto os oxalatos como os fluoróforos são geralmente insolúveis em água, sendo este outro fator que também limita suas aplicações em condições aquosas. Um esforço para melhorar essas deficiências foi feito usando algumas oxamidas solúveis em água⁶⁰, mas elas não foram usadas na prática. Por outra parte, espera-se que a inclusão do éster em micelas ou em outros sistemas organizados incrementa a concentração local do mesmo além de outros componentes do sistema e levem a uma interação favorecida nesses microambientes. Ainda mais, a

utilização destes meios ideais pode favorecer a peridrólise, o ataque do peróxido ao éster oxálico, em relação à hidrólise, o que levaria a uma maior formação do IAE e conseqüentemente uma maior emissão quimiluminescente.



Esquema 9: Hidrólise do éster oxálico, formando o ácido correspondente.

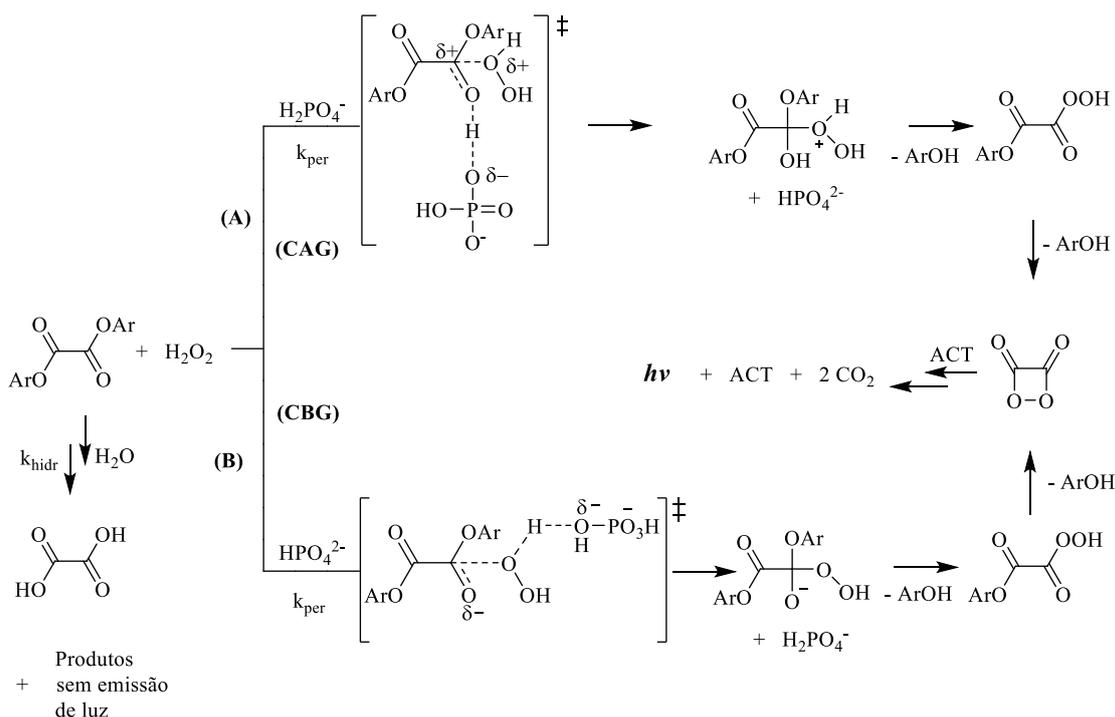
Antes de se partir para uma investigação mais detalhada do sistema peroxioxalato em sistemas organizados, o mesmo deve estar muito bem caracterizado, em termos mecanísticos, tanto em um meio de misturas aquoso : orgânicas quanto em um meio completamente aquoso.

Um estudo recente de nosso grupo estabeleceu condições experimentais em meio aquoso tamponado com fosfato apresentando cinética de reação reproduzível, onde, dependendo do pH do meio, foi possível verificar a catálise ácida e básica geral por íons fosfato.⁵⁷ (**Esquema 10**)

Nesses estudos foi observado que em pH 6 a reação apresentou maiores valores de k_{obs} do que em pH 7 e 8 e a partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar de maneira qualitativa que ocorre uma catálise ácida geral (CAG) nestas condições, na qual a transferência do próton do H_2PO_4^- (espécie mais abundante em pH 6) para o oxigênio carbonílico do éster e o ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio ocorrem de maneira concertada no passo lento desta transformação. A constante de velocidade k_{per} , obtida experimentalmente, pode ser atribuída a este passo que leva à formação do intermediário tetraédrico na forma protonada. Esse intermediário libera uma molécula de fenol substituído, formando o intermediário perácido que, por sua vez, sofre ciclização para a 1,2-dioxetanodiona que interage com o ativador pelo mecanismo CIEEL, levando finalmente à emissão de luz a partir do estado excitado singlete do ACT (**Esquema 10A**).

Por outro lado, em pH 8 a reação foi mais rápida do que em pH 7 o que indica a ocorrência de uma catálise básica geral (CBG), ou seja, a transferência do próton do peróxido de hidrogênio para o HPO_4^{2-} (espécie mais abundante em pH 8) e o ataque nucleofílico do primeiro à carbonila do éster ocorrem de maneira concertada no passo lento desta transformação. Nesse passo ocorre a formação do intermediário tetraédrico, agora na sua forma desprotonada e a reação prossegue de maneira análoga à reação em meio ácido. (**Esquema 10B**).

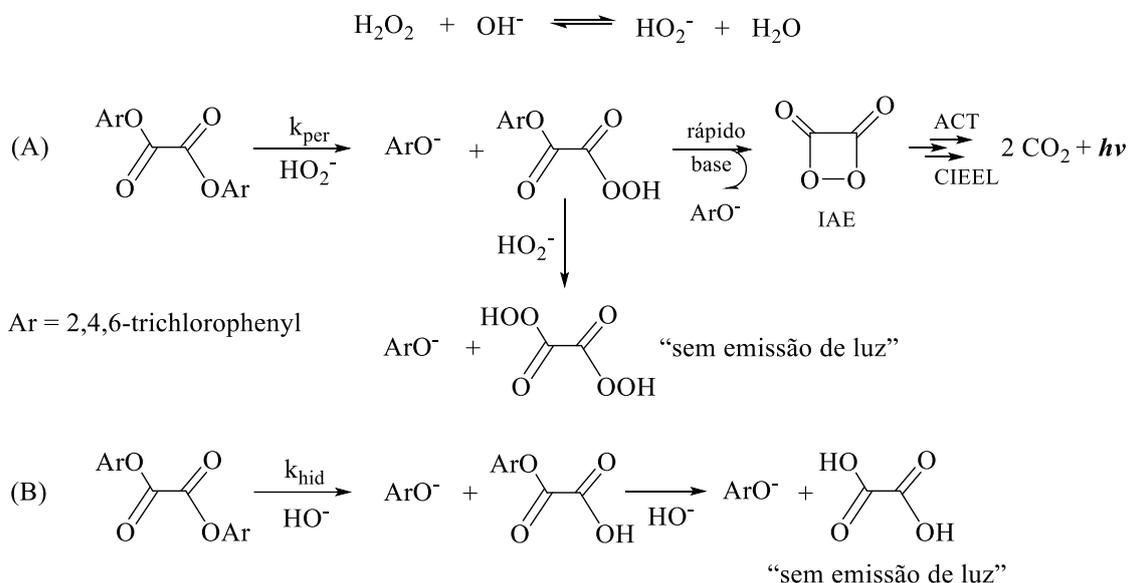
Em ambos os casos também são mostrados os produtos sem emissão de luz provenientes da reação de hidrólise do éster, passo ao qual se atribui a constante de velocidade k_{hid} .



Esquema 10: Reação peroxioxalato com uma possível CAG e CBG mostrando as reações de hidrólise e peridrólise para a reação de um éster oxálico com H_2O_2 , catalisada por fosfato.

Outro estudo mecanístico do sistema peroxioxalato realizado pelo nosso grupo em meio contendo tampão borato demonstrou que a reação ocorre por catálise básica

específica (CBE) pelo fato de que a constante de velocidade não mudou com a concentração de tampão de borato. A partir dos dados cinéticos obtidos pôde-se formular o seguinte mecanismo para a reação de TCPO com H_2O_2 neste meio (**Esquema 11**):

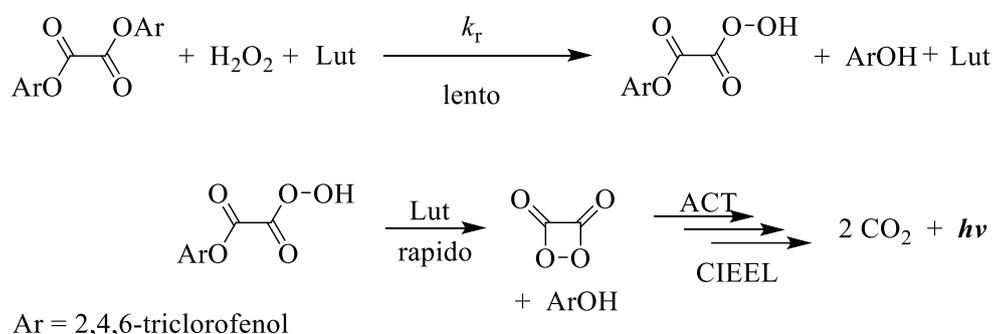


Esquema 11: Mecanismo geral para a reação de TCPO com H_2O_2 em tampão borato. (A) Peridrólise de TCPO com H_2O_2 , levando à emissão de luz; (B) hidrólise do TCPO, sem emissão de luz.

Neste mecanismo o ânion HO_2^- é produzido inicialmente pela desprotonação de H_2O_2 em um passo rápido, seguido pelo ataque do primeiro à carbonila do TCPO na etapa lenta de reação, como evidenciado pela dependência linear das constantes de velocidade com a concentração de peróxido de hidrogênio (consequentemente com a $[\text{HO}_2^-]$) e seu aumento com pH do meio. O derivado do ácido peroxálico formado na primeira etapa está sujeito à ciclização catalisada por base levando à formação do IAE. A interação do IAE com o ACT, ocorrendo pelo mecanismo CIEEL, leva à formação do excitado singlete do ACT e consequente emissão de fluorescência. Conforme indicado no **Esquema 11**, duas reações colaterais levam a uma redução nos rendimentos quânticos de quimiexcitação: a adição de um segundo HO_2^- ao intermediário perácido e a hidrólise de TCPO (**Esquema 11B**). Nesses estudos foi observado também que a adição de líquidos

iônicos ao meio tamponado com borato pode incrementar os rendimentos quânticos singlete do sistema peroxioxalato em comparação aos sais comuns análogos.⁵⁶

Outro estudo cinético do PO-QL foi a reação do TCPO com H₂O₂ usando 2,6-lutidina (2,6-dimetilpiridina) como base em meios orgânicos e aquosos.⁶¹ Experimentos cinéticos projetados para distinguir entre três tipos diferentes de catálise (nucleofílica, base específica e catálise de base geral) indicaram claramente que o papel da 2,6-lutidina nessa reação foi como catalisador básico geral tanto em água quanto em meio orgânico (**Esquema 12**).

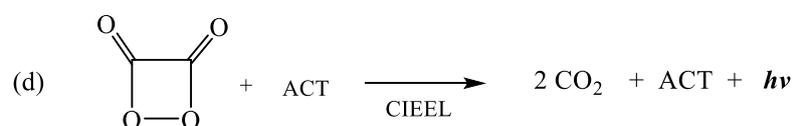
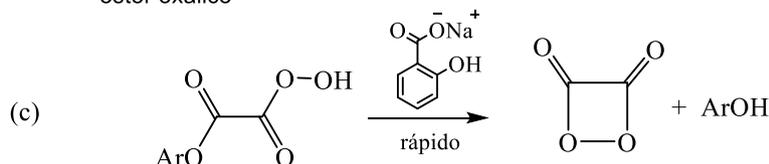
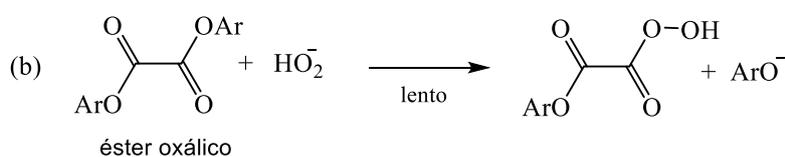
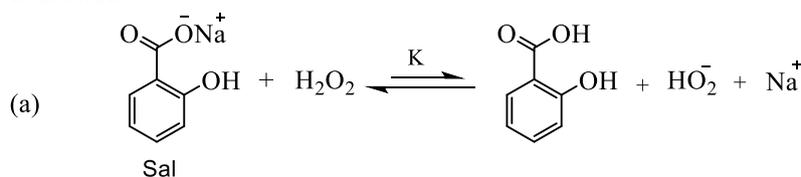


Esquema 12: Mecanismo para a reação peroxioxalato entre TCPO e H₂O₂ em DME com catálise básica geral por Lut.

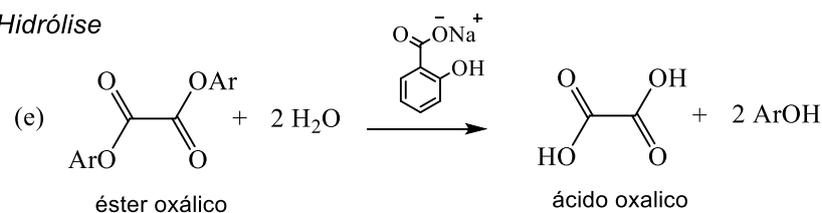
Também foi estudada a reação de três ésteres de reatividade diferentes com H₂O₂ catalisado por salicilato de sódio e em misturas aquosas de 1,2-dimetoxietano.⁶² Em todos os casos, o peróxido de hidrogênio e o salicilato determinam as constantes de velocidade da transformação no meio parcialmente aquoso e o salicilato atua como um catalisador básico específico. O papel do salicilato proposto para esses sistemas é diferente do verificado quando se utiliza o imidazol como catalisador, que atua como catalisador básico e nucleofílico.^{35,36} A reação começa com a formação do ânion HO₂⁻ a partir de um pré-equilíbrio rápido seguido pelo ataque deste à carbonila do éster levando à formação de um derivado de éster monoperoxálico na etapa lenta e limitante de reação (**Esquema 13**). Na sequência, ocorre um ataque intramolecular do perácido à carbonila do éster oxálico, em uma etapa rápida da reação, levando à formação do IAE. Simultaneamente à

reação de peridrólise, que leva à emissão de quimiluminescência, os derivados do éster oxálico também sofrem hidrólise no meio aquoso utilizado, também catalisado por salicilato, o que leva à formação de duas moléculas do correspondente fenol substituído e ácido oxálico, sem emissão de luz.

Peridrólise



Hidrólise



Esquema 13: Mecanismo para a reação peroxioxalato entre um éster oxálico e H₂O₂, ocorrendo com catálise básica específica (CBE) por salicilato, na presença de um ACT, realizado em uma mistura binária de DME : H₂O, bem como hidrólise simultânea do éster.

Além de se estudar bem o mecanismo do sistema peroxioxalato tanto em misturas aquoso : orgânicas quanto em um meio completamente aquoso, em todos os casos foi observado que a eficiência da reação diminui consideravelmente em comparação com um meio orgânico.

1.3.3 Sistema peroxioxalato em meios organizados

Nos últimos anos, houve uma vasta gama de métodos estabelecidos para encapsular os sistemas PO-CL, em que a abordagem mais comum é a inclusão de um corante e o oxalato em surfactante⁶³ ou poli (etileno glicol)-b-poli (ϵ - caprolactona),^{64,65} micelas e lipossomas estabilizados.⁶⁶

As principais características destes sistemas organizados foram aumentar a solubilidade do oxalato, modificar o microambiente e, como resultado, aumentar a intensidade da quimiluminescência e a eficiência quântica em alguns casos. Um exemplo foi o uso de surfactantes aniônicos e não iônicos em meios micelares que incrementou a eficiência da reação de TCPO com H_2O_2 usando oligofenilenevinileno como ativadores.⁶⁷

Anteriormente, Dasari e colaboradores desenvolveram micelas quimiluminescentes compostas de copolímero de poli (etileno glicol)-b-poli (ϵ - caprolactona) (PEG-PCL) e oxalato de difenila, que é mais estável em água que o TCPO. O oxalato de difenila foi encapsulado nos núcleos hidrofóbicos e, portanto, protegido da hidrólise pela água, aumentando sua estabilidade.⁶⁴ Estudos posteriores demonstraram que esses microambientes compostos de oxalato de difenila podem ser utilizados para detectar o peróxido de hidrogênio gerado a partir dos macrófagos ativados pelo lipopolissacarídeo (LPS).⁶⁵ Portanto, em geral, as micelas POCL têm grande potencial em aplicações biológicas devido a sua capacidade de detectar concentrações nanomolar de peróxido de hidrogênio.^{50,64,65,68-70}

Uma das grandes aplicações mais recentes foi a formulação de lipossomas de peroxioxalato compostas com oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) e a curcumina como fluoróforo, capazes de detectar H_2O_2 e que servem como agentes terapêuticos com atividade antioxidante e antiapoptótica potente.⁶⁶

Também foi demonstrado que a incorporação de oxalatos em materiais poliméricos aumenta sua estabilidade para torná-los aplicáveis em meios aquosos.^{68,71,72} Como os polímeros desempenham um papel onipresente na indústria e na vida cotidiana devido às suas propriedades ajustáveis, os materiais quimiluminescente combinados representam um campo promissor. De fato, os materiais poliméricos podem ser feitos sob medida para atender a uma ampla gama de aplicações, ajustando a composição, estrutura, propriedades químicas e físicas inerentes.

Ésteres de celulose são polímeros derivados da celulose com o maior número de aplicações tecnológicas. O interesse em converter celulose surgiu por dois motivos: (i) a celulose decompõe abaixo do seu ponto de fusão, tornando impossível o processamento no estado fundido e (ii) a celulose é insolúvel em água e em muitos outros solventes por causa das intensas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.⁷³ Atualmente, existem vários ésteres de celulose, entretanto, somente o acetato de celulose e os ésteres mistos, propionato acetato de celulose e butirato acetato de celulose, ganharam importância comercial devido às suas propriedades e fácil manuseio (**Figura 1**).⁷⁴ Esses polímeros são aplicados em diversas áreas, como laminados, filmes ópticos, fibras têxteis e revestimentos para produtos farmacêuticos e alimentos.⁷⁵ Em termos de aplicações de membrana e encapsulamento, os derivados de celulose podem fornecer estruturas de rede sofisticadas através da separação de fases induzida por agregação.

O acetato de celulose é o mais estudado e o mais utilizado derivado de éster de celulose. Pode ser obtido através da reação de celulose com anidrido acético, nos quais os grupos hidroxila são substituídos por grupos acetato; as propriedades dos polímeros obtidos dependerão do grau de substituição.⁷⁶ Por mais de 100 anos, o acetato de celulose faz parte dos novos materiais como membranas, pós, fibras, hidrogéis, esferas e microesferas, estas últimas no intervalo de 1 a 1000 nm.

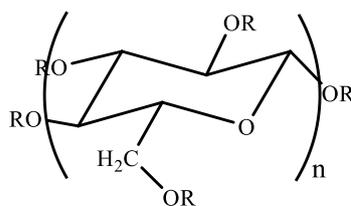


Figura 1: Representação da estrutura do acetato de celulose onde $R=H$, e/ou $COCH_3$ e do acetato butirato de celulose onde $R=H$, $COCH_2CH_2CH_3$ e/ou $COCH_3$

As partículas de celulose também são hidrofóbicas e exibem uma alta superfície específica e boas propriedades de intumescimento. Esferas e cápsulas feitas de celulose têm sido utilizadas para liberação controlada e como material absorvente porque são baratas e inócuas e possuem excelentes propriedades físicas.⁷⁷ A versatilidade do uso de partículas de celulose na absorção de espécies químicas reside no fato de que elas podem ser funcionalizadas para torná-las seletivas e aumentar sua capacidade de extração.⁷⁸

Portanto, outro método simples para aumentar o rendimento quântico da reação peroxioxalato em meio aquoso poderia ser o uso de microesferas de polímeros de celulose que favoravelmente aumentem a concentração local do éster, proporcionando um ambiente hidrofóbico de baixa permeabilidade. Como relatado anteriormente, estes ambientes hidrofóbicos são favoráveis para a etapa de quimiexcitação em que ACT e IAE interagem.

O que se observou em todos os trabalhos envolvendo o sistema peroxioxalato em sistemas organizados foi o pronto aumento de intensidade luminosa da reação, em comparação ao sistema somente em meio aquoso, mas nenhum estudo, em termos mecânicos, foi abordado até o momento.

2. Objetivos

Neste trabalho, primeiramente, propõem-se estudos cinéticos de hidrólise e peridrólise do oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) em diferentes misturas de água e solventes orgânicos. Será verificada a influência dos parâmetros de solventes destes meios sobre a cinética da reação peroxioxalato e sobre os rendimentos quânticos de formação de estados excitados singlete.

Em uma extensão dos estudos sobre a influência do meio reacional, pretende-se estudar o sistema peroxioxalato usando dois ésteres com reatividades diferentes, como o oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) e oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) catalisada por imidazol e em vários meios de reação na presença de pequenas quantidades de água de forma a se contribuir com informações acerca do mecanismo de reação e de elucidar o papel exato da água na diminuição drástica da eficiência de quimiexcitação.

Outro objetivo consiste em estudar o mecanismo de formação de estados excitados da reação peroxioxalato usando cumarinas e a curcumina como ativadores. As cinéticas serão realizadas inicialmente em 1,2-dimetoxietano (DME) anidro e posteriormente em misturas DME:H₂O 1:1 (v/v).

Por último, visa-se adaptar o sistema peroxioxalato ao meio exclusivamente aquoso através de microesferas de celulose para futuras aplicações analíticas e bioanalíticas.

3. Resultados

3.1 Hidrólise de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) em diferentes misturas de solventes moleculares e água.

Inicialmente foi estudada a hidrólise do éster TCPO em diferentes misturas de água e solventes orgânicos (**Tabela 1**) por absorção no UV-Vis a partir da formação de 2,4,6-triclorofenila (TCP) em 296 nm, a fim de se verificar a influência desses sobre a velocidade das transformações e os rendimentos quânticos de quimiexcitação. Os solventes moleculares (SM) utilizados nestes estudos foram: 1,2-dimetoxietano (DME), acetonitrila (ACN), e 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). As curvas cinéticas de aumento de absorbância em função do tempo foram ajustadas por uma equação monoexponencial (**Equação 1**). Para cada curva ajustada foram determinadas as constantes de velocidade observada k_{obs} (**Tabela 2**). Os experimentos cinéticos nestas condições foram iniciados com a adição de TCPO à mistura SM : H₂O contendo uma pequena quantidade de HCl para suprimir qualquer catálise por traços de base sendo a concentração final deste na cubeta de 0,01 M.

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

(Equação 1)

Tabela 1: Misturas de SM e H₂O utilizadas nos estudos de hidrólise do TCPO e as frações molares e concentrações de H₂O dessas.

χ_{H_2O}	DME:H ₂ O (m/m)	[H ₂ O] (mol L ⁻¹)	ACN:H ₂ O (m/m)	[H ₂ O] (mol L ⁻¹)	TFE:H ₂ O (m/m)	[H ₂ O] (mol L ⁻¹)
0,20	9,5/0,5	2,38	9,0/1,0	4,94	9,6/0,4	3,27
0,30	9,2/0,8	3,87	8,4/1,6	7,77	9,3/0,7	5,38
0,40	8,8/1,2	5,77	7,7/2,3	11,11	8,9/1,1	7,94
0,50	8,3/1,7	8,22	6,9/3,0	15,04	8,4/1,5	11,11
0,60	7,7/2,3	11,63	6,0/4,0	20,02	7,8/2,1	15,15
0,70	6,8/3,2	16,80	4,9/5,1	25,27	7,0/3,0	21,04
0,80	5,5/4,4	24,16	3,6/6,4	34,63	5,8/4,2	27,75
0,85	4,7/5,3	29,16	2,9/7,1	39,14	4,9/5,0	32,52
0,90	3,6/6,4	35,99	2,0/8,0	44,67	3,8/6,2	38,39

Foi observado que a constante de velocidade relativa ao aumento de absorvância incrementa com a adição de água nos três sistemas, mostrando um desvio bastante significativo do comportamento ideal, que seria uma correlação linear entre os valores de k_{obs} obtidos e as frações molares das misturas na faixa de 0,2 e 0,85 (**Figura apresentada na Discussão**). Notou-se também que a velocidade de reação se mostrou sempre maior em ACN comparado com os outros solventes (**Tabela 2**).

Tabela 2: Efeito da fração molar de H₂O nas constantes de velocidade de aumento da absorvância.

χ_{H_2O}	DME	ACN	TFE
	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)
0,20	0,0751 ± 0,0004	0,1362 ± 0,0006	0,0286 ± 0,0005
0,30	0,207 ± 0,004	0,4035 ± 0,0007	0,0810 ± 0,0002
0,40	0,352 ± 0,008	0,805 ± 0,009	0,174 ± 0,002
0,50	0,558 ± 0,002	1,33 ± 0,01	0,3395 ± 0,0007
0,60	0,868 ± 0,003	2,26 ± 0,03	0,812 ± 0,004
0,70	1,48 ± 0,02	4,12 ± 0,04	1,48 ± 0,03
0,80	4,00 ± 0,02	14,7 ± 0,2	5,36 ± 0,05
0,85	10,4 ± 0,8	32,0 ± 0,8	10,2 ± 0,4
0,90	-	-	-

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [HCl] = 0,01 mol L⁻¹

Uma vez conhecida a hidrólise do TCPO nesses solventes moleculares a reação foi estudada variando-se a temperatura de 15 até 60 °C numa fração molar da água igual a 0,7 onde foi observado um maior desvio da idealidade em cada mistura (**Tabela 3**). Notou-se que para as três misturas SM : H₂O a constante bimolecular de hidrólise incrementa seis vezes em cada caso com uma variação de quatro vezes na temperatura do sistema.

Tabela 3: Dependência da constante de velocidade de hidrólise observada (k_{obs}) e da constante bimolecular de hidrólise (k_1) com a temperatura na hidrólise do TCPO nas misturas SM : água com $\chi_{H_2O} = 0,7$.

Temperatura °C	DME	ACN	TFE
15	0,8850 ± 0,0006	2,74 ± 0,0006	1,12 ± 0,04
25	1,470 ± 0,005	4,21 ± 0,0007	1,81 ± 0,07
40	2,900 ± 0,005	7,99 ± 0,009	3,180 ± 0,002
60	5,98 ± 0,01	15,6 ± 0,2	6,87 ± 0,05

Temperatura °C	DME	ACN	TFE
15	0,527 ± 0,002	1,084 ± 0,004	0,53 ± 0,03
25	0,875 ± 0,005	1,666 ± 0,007	0,85 ± 0,05
40	1,726 ± 0,005	3,16 ± 0,01	1,510 ± 0,002
60	3,56 ± 0,01	6,2 ± 0,2	3,26 ± 0,05

[H₂O] = 16,8 mol L⁻¹ (DME); [H₂O] = 25,27 mol L⁻¹ (ACN); [H₂O] = 21,04 mol L⁻¹ (TFE); [TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹. Os valores de k_1 foram obtidos a partir dos valores de k_{obs} pela divisão com a [H₂O] nos diferentes meios.

3.2 Reação do oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) com H₂O₂ em SM : H₂O ([H₂O] = 3 mol L⁻¹)

Seguidamente às cinéticas de absorção foram efetuados experimentos cinéticos de emissão da reação de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) e H₂O₂ em misturas SM : H₂O onde a concentração final de água ([H₂O]_f) foi de 3,0 mol L⁻¹. Estudou-se inicialmente o efeito da concentração do H₂O₂ nessa reação. As soluções estoques de H₂O₂ e do ativador (Rod 6G) foram preparadas em tampão borato (50 mmol L⁻¹). Tomou-se o cuidado de manter constante o pH do meio (pH = 7). A partir das curvas cinéticas de emissão obtiveram-se os valores de k_{obs} e dos rendimentos de quimiluminescência (Φ_{CL}) (**Tabelas 4 e 5**).

A constante de velocidade k_{obs} mostrou-se linearmente dependente da concentração de H₂O₂, tanto em misturas de DME : H₂O quanto de ACN : H₂O (**Figuras 2 e 3 esquerda**). Da dependência linear foram obtidas as constantes de hidrólise e peridrólise dessas reações (**Tabela 6**). Os valores de Φ_{CL} não mostraram variação significativa com a [H₂O₂] em misturas aquosas de DME (**Figura 2 direita**). Em misturas ACN : H₂O houve uma leve diminuição dos valores de Φ_{CL} com o aumento da [H₂O₂] (**Figura 3 direita**),

entretanto, os rendimentos de emissão obtidos para a reação peroxioxalato nesta mistura foram maiores do que os observados em DME e TFE, para toda a região de concentração de H₂O₂ estudada (**Tabela 5**).

Tabela 4: Dependência de k_{obs} com a [H₂O₂] na reação com TCPO em misturas SM : H₂O ([H₂O] = 3,0 mol L⁻¹) usando Rod 6G como ativador.

[H ₂ O ₂] (mmol L ⁻¹)	DME	ACN	TFE
	k_{obs} (s ⁻¹)		
10	0,0301 ± 0,0006	0,09 ± 0,02	0,009 ± 0,001
15	-	-	0,020 ± 0,001
20	0,0321 ± 0,0003	0,12 ± 0,01	0,025 ± 0,002
25	-	-	0,030 ± 0,002
30	-	-	0,045 ± 0,005
35	-	-	0,053 ± 0,007
40	-	-	0,057 ± 0,002
50	0,040 ± 0,002	0,163 ± 0,009	0,085 ± 0,008
60	-	-	0,122 ± 0,009
70	-	-	0,18 ± 0,05
100	0,052 ± 0,001	0,201 ± 0,004	0,30 ± 0,02
150	0,064 ± 0,001	0,34 ± 0,02	0,57 ± 0,03

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [Rod] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O]_f = 3,0 mol L⁻¹, pH = 7.

Tabela 5: Variação do rendimento quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}) com a [H₂O₂] na sua reação com TCPO em misturas SM : H₂O ([H₂O] = 3,0 mol L⁻¹) usando Rod como ativador.

[H ₂ O ₂] (mmol L ⁻¹)	DME	ACN	TFE
	Φ_{CL} (E mol ⁻¹)		$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)
10	0,00526 ± 0,0006	0,02909 ± 0,004	3,4 ± 0,8
15	-	-	2,7 ± 0,6
20	0,00397 ± 0,0004	0,03062 ± 0,002	3,5 ± 0,7
25	-	-	2,8 ± 0,6
30	-	-	3,5 ± 0,5
35	-	-	3,2 ± 0,6
40	-	-	2,3 ± 0,5
50	0,00509 ± 0,0006	0,02311 ± 0,003	3,8 ± 0,7
60	-	-	2,7 ± 0,4
70	-	-	3,3 ± 0,8
100	0,00361 ± 0,0003	0,01726 ± 0,0007	3,9 ± 0,7
150	0,00427 ± 0,0006	0,01464 ± 0,002	2,5 ± 0,7

[TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [Rod] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O]_f = 3,0 mol L⁻¹, pH = 7.

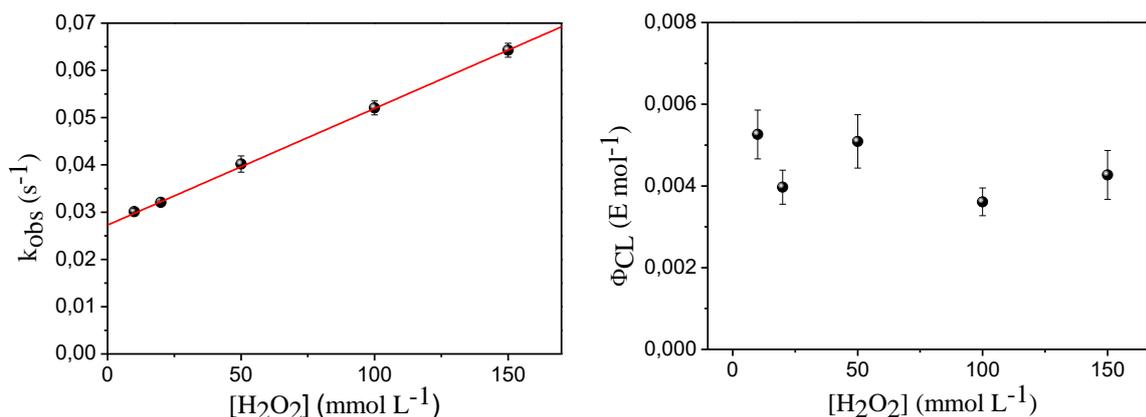


Figura 2: Dependência de k_{obs} e do rendimento quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}) com a $[H_2O_2]$ na reação com TCPO em misturas DME : H_2O ($[H_2O] = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) usando Rod como ativador.

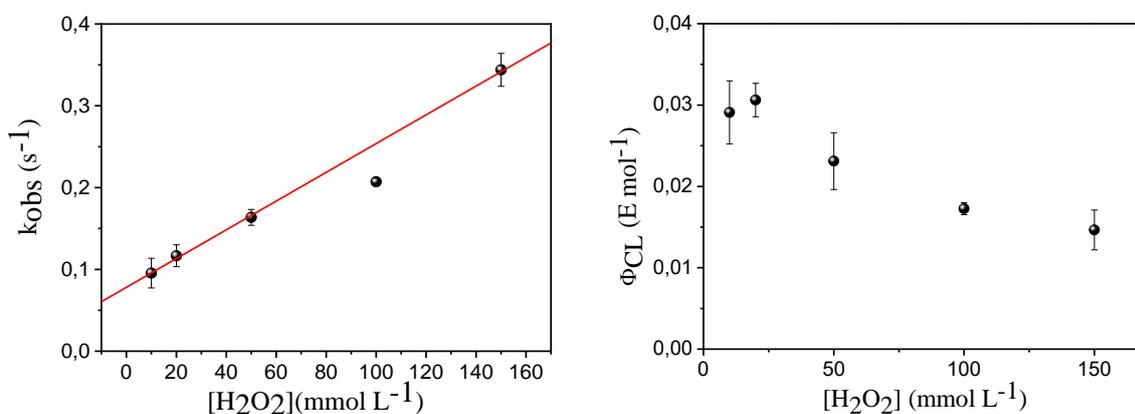


Figura 3: Dependência de k_{obs} e do rendimento quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}) com a $[H_2O_2]$ na reação com TCPO em misturas ACN : H_2O ($[H_2O] = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) usando Rod como ativador.

Tabela 6: Valores das constantes de hidrólise (k_{hid}) e peridrólise (k_{per}), obtidas da dependência de k_{obs} com a $[H_2O_2]$ na sua reação com TCPO em misturas SM : H_2O .

SM : H_2O	k_{hid} (s ⁻¹)	k_{per} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	k_{hid}' (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
DME : H_2O	$0,0273 \pm 0,0004$	$0,25 \pm 0,01$	0,009
ACN : H_2O	$0,08 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,2$	0,027

[TCPO] = $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, [Rod] = $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[H_2O]_f = 3 \text{ mol L}^{-1}$, pH= 7.
 Regressão linear feita com $k_{obs} = k_{hid} + k_{per}[H_2O_2]$. $k_{hid}' = k_{hid}/[H_2O]$

Verificaram-se valores maiores de k_{hid} e k_{per} na mistura aquosa de ACN. Esse resultado confirma que as reações de hidrólise e peridrólise são mais eficientes nesse meio do que em misturas aquosas de DME. Observou-se também que a constante de

velocidade de peridrólise é muito maior que a de hidrólise em ambas as misturas (**Tabela 6**).

Por outro lado, a dependência da k_{obs} com a variação da concentração de H_2O_2 em TFE : H_2O mostrou um comportamento diferente do observado nos outros meios (**Figura 4**). A partir da equação binomial (**Equação 2**), obtiveram-se as constantes de velocidade bimolecular $k_{1(2)} = 0,5 \pm 0,2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e trimoleculares $k_{1(3)} = 22 \pm 3 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

$$k_{obs} = k_{1(2)}[H_2O_2] + k_{1(3)}[H_2O_2]^2$$

(**Equação 2**)

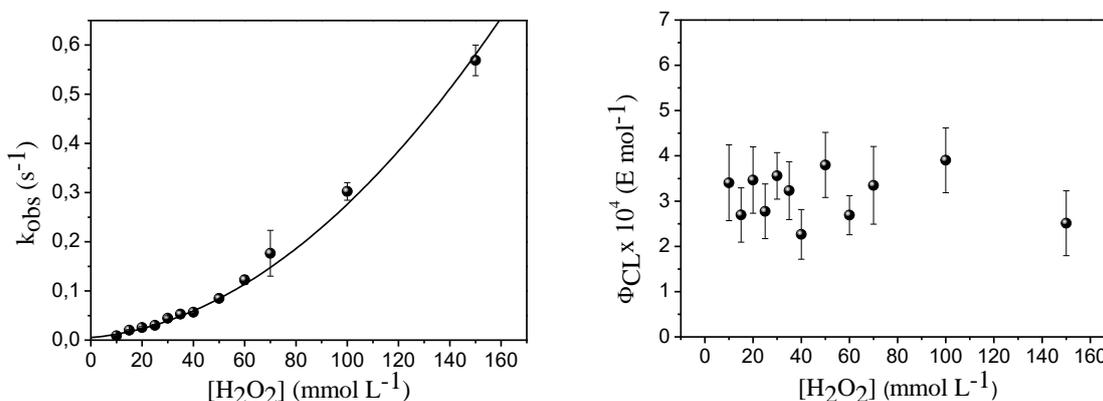


Figura 4: Dependência de k_{obs} e do rendimento quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}) com a $[H_2O_2]$ em sua reação com TCPO em misturas TFE: H_2O ($[H_2O]_f = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) usando Rod como ativador.

Adicionalmente, foram realizados estudos cinéticos por absorção no UV-Vis, acompanhando-se a saída do grupo fenólico da reação de TCPO com H_2O_2 em TFE : H_2O . As curvas cinéticas de aumento de absorbância em função do tempo, registradas em 296 nm, foram ajustadas por funções mono ou bi exponenciais, de acordo com a necessidade para se obter um ajuste adequado ($r^2 > 0,99$). Para cada curva cinética ajustada foram obtidos valores para as constantes de velocidade observada k_{obs} (**Tabela 7**).

Tabela 7: Efeito da $[H_2O_2]$ nas constantes de velocidade de aumento de absorbância (k_{obs}) da sua reação com TCPO em TFE : H_2O . ($[H_2O_2] = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$)

$[H_2O_2]$ mmol L^{-1}	k_{obs} (s^{-1})
10	$0,008 \pm 0,0001$
15	$0,021 \pm 0,001$
20	$0,026 \pm 0,002$
25	$0,031 \pm 0,003$
30	$0,044 \pm 0,002$
35	$0,051 \pm 0,005$
40	$0,0567 \pm 0,0004$
50	$0,10 \pm 0,01$
60	$0,12 \pm 0,02$
70	$0,160 \pm 0,003$
100	$0,29 \pm 0,02$
150	$0,58 \pm 0,03$

A dependência da constante de velocidade de aumento de absorbância (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$ (**Figura 5**) mostrou um comportamento semelhante ao observado anteriormente nos ensaios de emissão. A partir da equação binomial (**Equação 2**), obtiveram-se também as constantes de velocidade bimolecular $k_{1(2)} = 0,44 \pm 0,06 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e trimolecular $k_{1(3)} = 24 \pm 1 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

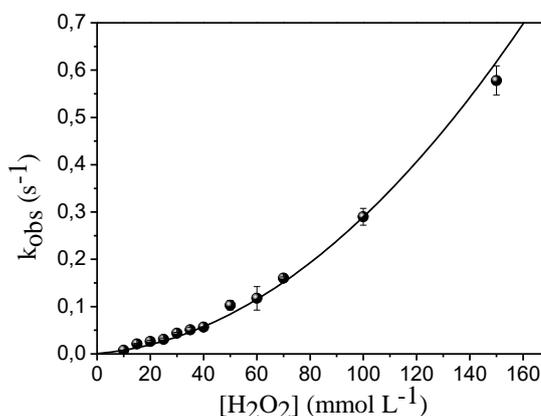


Figura 5: Dependência da constante de velocidade de aumento de absorbância (k_{obs}) com a $[H_2O_2]$.

Observa-se, portanto, que os valores das constantes obtidos nesse caso são semelhantes àqueles obtidos através dos dados medidos pela intensidade de emissão do sistema.

3.3 Estudo cinético do sistema peroxioxalato em misturas 1,2-dimetoxietano: água

De forma a se comparar o mecanismo do sistema peroxioxalato usando dois ésteres com reatividade diferentes, foram efetuados experimentos cinéticos de emissão da reação tanto de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) como de oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) com H_2O_2 catalisada por IMI-H e em misturas aquosas de 1,2-dimetoxietano (DME : H_2O). A contração de volume observada para essas misturas não foi maior que 2%. Essa pequena diminuição não levou a uma variação significativa das concentrações finais dos reagentes. A diferença de reatividade entre o TCPO e DNPO pode ser exemplificado através do perfil temporal de emissão de luz de ambos nas mesmas condições de reação (**Figura 6**). Observa-se que a reação com DNPO termina em 100 segundos, enquanto que esse é o tempo necessário para que a reação com TCPO atinja o máximo da intensidade.

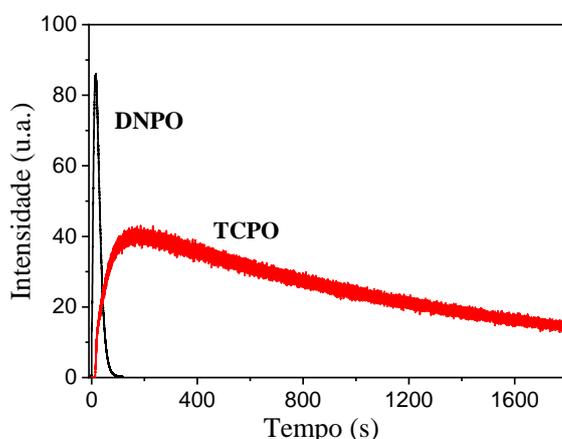


Figura 6: Exemplos de perfis temporais de emissão de luz para a reação de TCPO e DNPO com H_2O_2 . DME, 25 °C, $[\text{TCPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{DNPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ $[\text{IMI-H}] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] (\text{TCPO}) = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] (\text{DNPO}) = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$

Inicialmente, as reações foram estudadas variando a concentração de IMI-H em diferentes misturas aquosas de DME. Os experimentos cinéticos nessas condições foram iniciados com a adição de DNPO ou TCPO à mistura $\text{H}_2\text{O} : \text{DME}$ contendo H_2O_2 , IMI-H e DPA, e foi registrado o perfil temporal de emissão. Foram conduzidos experimentos

em DME puro de forma a se comparar os valores de constantes de velocidade obtidos nas diferentes misturas. As curvas cinéticas de decaimento da intensidade de emissão em função do tempo foram ajustadas por uma equação monoexponencial (**Equação 1**). Para cada curva ajustada foram determinadas as constantes de velocidade observada k_{obs} (**Tabela 8 e 9**) e relacionadas com a [IMI-H] (**Figura 7**). Devido à alta reatividade do DNPO só foi possível estudar a variação do IMI-H em DME puro. A dependência de k_{obs} com a [IMI-H] pôde ser ajustada por uma equação binomial (**Equação 3**) para todas as misturas, obtendo-se constantes de velocidade bimoleculares ($k_{I(2)}$) e trimoleculares ($k_{I(3)}$).

$$k_{obs} = k_{I(2)}[IMI-H] + k_{I(3)}[IMI-H]^2$$

(Equação 3)

Tabela 8: Efeito da concentração de IMI-H na constante de velocidade observada (k_{obs}) na reação entre o TCPO e H₂O₂ em misturas aquosas de DME.

[IMI-H] (mmol L ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^2$ (s ⁻¹)			
	χ_{H_2O}			
	0	0,04	0,1	0,2
0,2	0,070 ± 0,007	0,091 ± 0,007	0,14 ± 0,01	0,2 ± 0,02
0,5	0,19 ± 0,01	0,0224 ± 0,007	0,32 ± 0,02	0,45 ± 0,03
1,0	0,45 ± 0,01	0,497 ± 0,007	0,69 ± 0,02	0,97 ± 0,03
2,0	1,10 ± 0,02	1,110 ± 0,008	1,45 ± 0,05	1,94 ± 0,05
5,0	4,50 ± 0,07	4,210 ± 0,006	4,56 ± 0,05	5,9 ± 0,2
10	11 ± 1	12,2 ± 0,6	12,5 ± 0,2	14,0 ± 0,8
[IMI-H] (mmol L ⁻¹)				
	0,3	0,4	0,5	0,6
0,2	0,28 ± 0,04	0,44 ± 0,04	-	-
0,5	0,61 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,751 ± 0,003	1,06 ± 0,04
1,0	1,26 ± 0,01	1,40 ± 0,04	1,456 ± 0,003	2,01 ± 0,04
2,0	2,5 ± 0,1	2,78 ± 0,07	2,84 ± 0,05	3,8 ± 0,1
5,0	6,9 ± 0,3	7,6 ± 0,2	7,5 ± 0,3	9,9 ± 0,5
10	16,3 ± 0,3	18 ± 1	16 ± 2	19 ± 1

Condições experimentais: [TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,10 mmol L⁻¹.

Tabela 9: Efeito da concentração de IMI-H na constante de velocidade observada (k_{obs}) na reação entre o DNPO e H_2O_2 em DME.

[IMI-H] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)
0,2	0,050 ± 0,003
0,5	0,13 ± 0,03
1,0	0,26 ± 0,01
5,0	1,10 ± 0,08
10	1,78 ± 0,05

Condições experimentais: [DNPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,10 mmol L⁻¹.

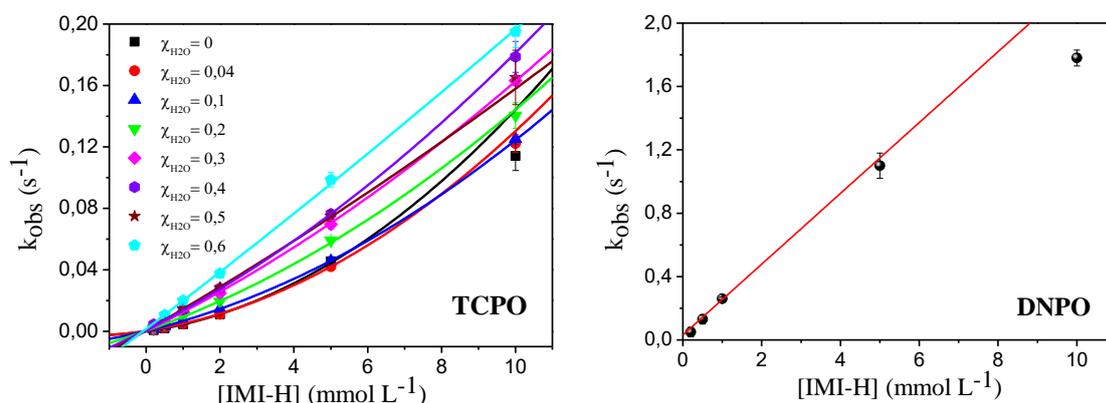


Figura 7: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão com a [IMI-H]. Os valores obtidos de k_{obs} na reação com TCPO foram ajustados pela seguinte equação binomial: $k_{obs} = k_{1(2)}[IMI-H] + k_{1(3)}[IMI-H]^2$

Foi estudada também a variação da concentração de peróxido de hidrogênio em diferentes frações molares para a reação tanto de TCPO quanto de DNPO (**Tabela 10 e 11**). As k_{obs} obtidas a partir dos perfis de emissão, foram correlacionadas com [H₂O₂], conforme mostrado para algumas das frações molares de água (**Figura 8**).

Observou-se uma dependência linear dos valores de k_{obs} com a concentração de H₂O₂ em todas as misturas DME : H₂O tanto para a reação com DNPO quanto para a reação com TCPO (**Figura 8**). A partir do coeficiente linear e angular das correlações, foi possível obter valores para as constantes de hidrólise (k_{hid}) e peridrólise (k_{per}), respectivamente (**Tabela 12**).

Tabela 10: Efeito da $[H_2O_2]$ na constante de velocidade de decaimento de emissão na sua reação com DNPO em diferentes frações molares de água.

$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	χ_{H_2O}				
	0	0,01	0,02	0,04	0,06
	k_{obs} (s ⁻¹)				
1,00	0,0040 ± 0,0001	0,0057 ± 0,0006	0,0070 ± 0,0006	0,0085 ± 0,0002	0,009 ± 0,0005
2,00	0,010 ± 0,002	0,0109 ± 0,0002	0,0121 ± 0,00005	0,0145 ± 0,0003	0,015 ± 0,003
5,00	0,023 ± 0,004	0,032 ± 0,003	0,0331 ± 0,0001	0,034 ± 0,001	0,035 ± 0,0007
10,0	0,040 ± 0,003	0,049 ± 0,005	0,060 ± 0,005	0,062 ± 0,004	0,063 ± 0,004
15,0	0,059 ± 0,003	0,089 ± 0,003	0,092 ± 0,003	0,092 ± 0,01	0,093 ± 0,01
$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	0,08	0,1	0,2	0,3	0,4
1,00	0,010 ± 0,001	0,0106 ± 0,0003	0,0209 ± 0,0002	0,046 ± 0,002	0,102 ± 0,002
2,00	0,018 ± 0,002	0,0200 ± 0,0007	0,0267 ± 0,0008	0,054 ± 0,001	0,111 ± 0,004
5,00	0,038 ± 0,002	0,044 ± 0,002	0,047 ± 0,002	0,077 ± 0,003	0,127 ± 0,004
10,0	0,075 ± 0,003	0,078 ± 0,002	0,087 ± 0,004	0,113 ± 0,009	0,145 ± 0,002
15,0	0,117 ± 0,008	0,119 ± 0,006	0,123 ± 0,005	0,142 ± 0,002	0,17 ± 0,01

Condições experimentais: $[DNPO] = 0,10$ mmol L⁻¹, $[IMI-H] = 0,20$ mmol L⁻¹.

Tabela 11: Efeito da $[H_2O_2]$ na constante de velocidade de decaimento de emissão na sua reação com TCPO em diferentes frações molares de água.

$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	χ_{H_2O}				
	0	0,01	0,03	0,04	0,06
	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)				
10,0	0,240 ± 0,005	0,369 ± 0,003	0,637 ± 0,007	0,72 ± 0,02	0,94 ± 0,03
20,0	0,53 ± 0,04	0,800 ± 0,003	0,98 ± 0,07	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1
50,0	1,4 ± 0,1	1,60 ± 0,02	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1
100	2,67 ± 0,08	2,771 ± 0,005	2,79 ± 0,01	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
150	3,80 ± 0,03	3,600 ± 0,008	3,86 ± 0,03	4,0 ± 0,3	4,2 ± 0,2
$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	0,08	0,1	0,2	0,3	0,4
10,0	1,18 ± 0,03	1,40 ± 0,05	1,98 ± 0,03	3,02 ± 0,01	4,10 ± 0,03
20,0	1,72 ± 0,07	1,50 ± 0,07	2,18 ± 0,05	3,20 ± 0,07	4,200 ± 0,005
50,0	2,4 ± 0,1	2,05 ± 0,06	2,74 ± 0,02	3,53 ± 0,07	4,55 ± 0,01
100	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,4	3,38 ± 0,06	4,32 ± 0,04	5,1 ± 0,2
200	4,3 ± 0,2	4,5 ± 0,3	4,8 ± 0,07	5,4 ± 0,2	6,2 ± 0,2

Condições experimentais: $[TCPO] = 0,10$ mmol L⁻¹, $[IMI-H] = 0,20$ mmol L⁻¹.

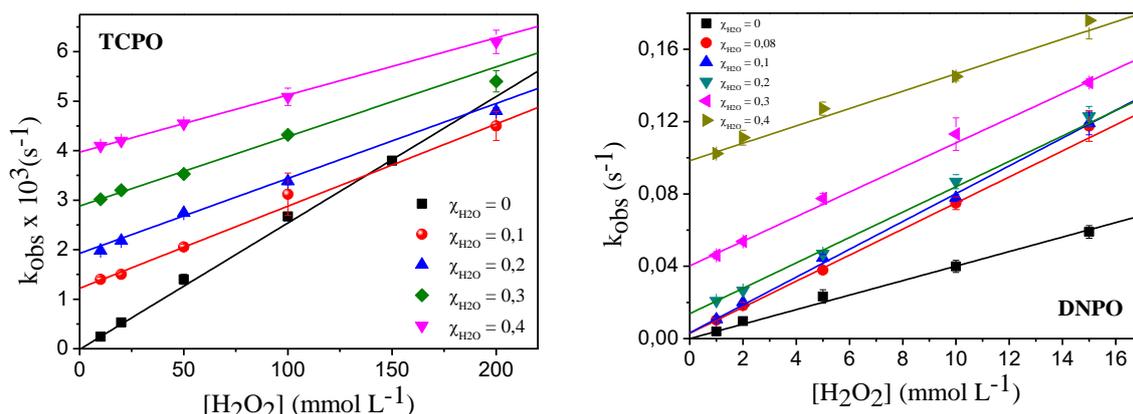


Figura 8: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão com a $[H_2O_2]$ nas diferentes misturas DME : H_2O . $[TCPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[IMI-H] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, $[DPA] = 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ (TCPO), $[DNPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[DPA] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (DNPO). O ajuste foi feito usando regressão linear: $k_{obs} = k_{hid} + k_{per}[H_2O_2]$.

Tabela 12: Valores das constantes de hidrólise e peridrólise nas reações de DNPO e TCPO com H_2O_2 catalisada por IMI-H, obtidas da dependência de k_{obs} com a $[H_2O_2]$.

DNPO			TCPO		
χ_{H_2O}	k_{hid} (s^{-1})	k_{per} ($L \text{ mol}^{-1}s^{-1}$)	χ_{H_2O}	$k_{hid} \times 10^3$ (s^{-1})	$k_{per} \times 10^2$ ($L \text{ mol}^{-1}s^{-1}$)
0,00	$-0,00004 \pm 0,0002$	$4,0 \pm 0,2$	0,00	$-0,00001 \pm 0,000006$	$2,55 \pm 0,02$
0,01	$0,0007 \pm 0,0001$	$5,9 \pm 0,2$	0,01	$0,118 \pm 0,005$	$2,53 \pm 0,04$
0,02	$0,0014 \pm 0,0007$	$6,3 \pm 0,1$	0,03	$0,406 \pm 0,007$	$2,36 \pm 0,01$
0,04	$0,0023 \pm 0,0003$	$6,2 \pm 0,2$	0,04	$0,49 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,1$
0,06	$0,0027 \pm 0,0007$	$6,3 \pm 0,2$	0,06	$0,73 \pm 0,03$	$2,2 \pm 0,1$
0,08	$0,003 \pm 0,001$	$6,5 \pm 0,2$	0,08	$1,02 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,1$
0,10	$0,0032 \pm 0,0004$	$7,7 \pm 0,2$	0,10	$1,22 \pm 0,06$	$1,7 \pm 0,1$
0,20	$0,0138 \pm 0,0004$	$7,0 \pm 0,3$	0,20	$1,92 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,04$
0,30	$0,040 \pm 0,001$	$6,8 \pm 0,2$	0,30	$2,88 \pm 0,02$	$1,41 \pm 0,04$
0,40	$0,098 \pm 0,002$	$4,8 \pm 0,3$	0,40	$3,97 \pm 0,01$	$1,11 \pm 0,04$

$[DNPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ $[DPA] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[IMI-H] = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$
Regressão linear: $k_{obs} = k_{hid} + k_{per}[H_2O_2]$.

A constante de hidrólise, que corresponde à decomposição não quimiluminescente do DNPO e TCPO, aumentou com o incremento da fração molar de água, conforme esperado, devido ao aumento da polaridade do meio e da concentração do nucleófilo água. A constante de peridrólise do DNPO não varia significativamente, enquanto que para o TCPO mostrou uma leve diminuição com o aumento da polaridade do meio (**Tabela 12**).

Foram também realizados estudos cinéticos por absorção no UV-Vis, acompanhando-se a saída do grupo fenólico da reação do TCPO com IMI-H na ausência de H₂O₂ em diferentes frações molares de água, observando-se a hidrólise do éster oxálico e/ou a catálise nucleofílica por imidazol (**Figura 9**).

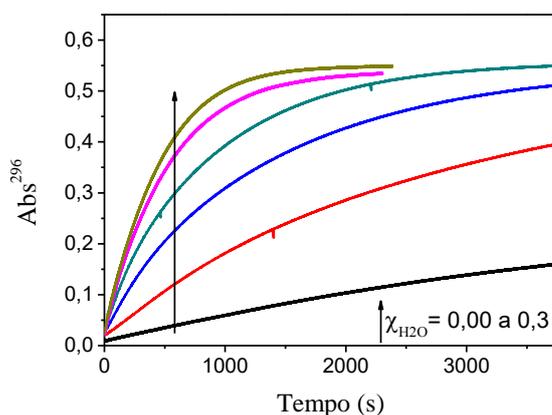


Figura 9: Exemplo de curva cinética de absorção da reação do TCPO com IMI-H na ausência de H₂O₂ em diferentes frações molares de água. 25°C, [TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [IMI-H] = 0,20 mmol L⁻¹

As curvas cinéticas de aumento de absorbância em função do tempo, registradas em 296 nm (**Figura 9**), foram ajustadas por funções mono exponenciais. Para cada curva cinética ajustada foram obtidos os valores das constantes de velocidade observada ($k_{\text{obs}}^{\text{AB}}$) (**Tabela 13**). A constante de velocidade $k_{\text{obs}}^{\text{AB}}$ se mostrou dependente da fração molar da água e coincide com os valores das constantes de hidrólise determinados por emissão para cada meio reacional (**Tabela 12**).

Tabela 13: Efeito da água nas constantes de velocidade de aumento de absorbância ($k_{\text{obs}}^{\text{AB}}$) da reação de TCPO com IMI-H na ausência de H₂O₂.

$\chi_{\text{H}_2\text{O}}$	$k_{\text{obs}}^{\text{AB}} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{hid}} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$
0,03	0,39 ± 0,01	0,406 ± 0,007
0,06	0,76 ± 0,03	0,73 ± 0,03
0,1	1,14 ± 0,08	1,22 ± 0,06
0,2	1,93 ± 0,01	1,92 ± 0,02
0,3	2,2 ± 0,1	2,88 ± 0,02

A 25°C, [TCPO] = 0,1 mmol L⁻¹, [IMI-H] = 0,2 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 0,00 mmol L⁻¹; médias de três réplicas. Valores de k_{hid} obtidos da **Tabela 12** para TCPO.

3.4 Efeito da água sobre o passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato

Experimentos cinéticos de emissão da reação tanto de oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) como de oxalato de bis(2,4,6-triclofenila) (TCPO) com H_2O_2 catalisada por imidazol e em misturas aquosas de 1,2-dimetoxietano (DME : H_2O) foram efetuados, de forma a se verificar a influência da água sobre a velocidade dessa transformação e de elucidar o papel exato da água na diminuição drástica da eficiência de quimiexcitação. Inicialmente a reação com DNPO foi estudada variando a concentração de água de 0 a 7 mol L^{-1} e utilizando 3 concentrações diferentes de ativador (DPA). As curvas cinéticas de decaimento da intensidade de emissão em função do tempo foram ajustadas por uma equação monoexponencial (**Equação 1**). Para cada curva ajustada, foram determinados os parâmetros cinéticos (**Tabela 14**) e relacionadas com a fração molar de H_2O (**Figura 10**). Analogamente aos estudos realizados com DNPO foram obtidas as constantes de velocidade de decaimento (k_{obs}) e os rendimentos quânticos de quimiexcitação (Φ_s) para a reação com TCPO, tanto em misturas aquosas de DME como em acetato de etila (EtOAc) nas mesmas condições experimentais (exceto a concentração do ACT que foi dobrada) (**Tabela 15 e 16**). As constantes de velocidade observadas foram correlacionadas com a $[\text{H}_2\text{O}]$ (**Figura 11**).

Observou-se que a constante de velocidade de decaimento aumenta com a concentração de água no sistema, para ambas as reações. Nota-se dependência linear de k_{obs} com a $[\text{H}_2\text{O}]$ para a reação de TCPO (**Figura 11**) tanto em misturas de DME quanto em acetato de etila, porém, para DNPO observa-se uma correlação complexa entre o k_{obs} e a $[\text{H}_2\text{O}]$ (**Figura 10**).

Tabela 14: Efeito da $[H_2O]$ na constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão (k_{obs}) e no rendimento quântico singlete (Φ_s) da reação de DNPO com H_2O_2 em misturas DME : H_2O usando três concentrações de ACT.

[DPA] mmol L ⁻¹	χ_{H_2O}	$[H_2O]$ mol L ⁻¹	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)
0,05	0,00	0,00	0,045 ± 0,002	1,38 ± 0,05
	0,010	0,11	0,0529 ± 0,0004	1,5 ± 0,1
	0,020	0,22	0,0559 ± 0,0007	1,65 ± 0,04
	0,030	0,34	0,0569 ± 0,0006	1,75 ± 0,03
	0,040	0,46	0,060 ± 0,003	1,78 ± 0,01
	0,060	0,70	0,063 ± 0,004	1,81 ± 0,05
	0,080	0,95	0,063 ± 0,002	1,71 ± 0,06
	0,10	1,2	0,0687 ± 0,0007	1,51 ± 0,06
	0,20	2,6	0,0731 ± 0,0004	0,71 ± 0,03
	0,30	4,4	0,091 ± 0,008	0,211 ± 0,001
	0,40	6,5	0,131 ± 0,003	0,060 ± 0,003
0,1	0,00	0,00	0,050 ± 0,003	1,75 ± 0,01
	0,010	0,11	0,058 ± 0,001	2,03 ± 0,03
	0,020	0,22	0,059 ± 0,002	2,4 ± 0,1
	0,030	0,34	0,063 ± 0,002	2,62 ± 0,03
	0,040	0,46	0,0643 ± 0,0007	2,94 ± 0,06
	0,060	0,70	0,067 ± 0,003	3,0 ± 0,1
	0,080	0,95	0,070 ± 0,006	2,9 ± 0,1
	0,10	1,2	0,074 ± 0,004	2,76 ± 0,07
	0,20	2,6	0,081 ± 0,001	1,21 ± 0,01
	0,30	4,4	0,100 ± 0,002	0,39 ± 0,02
	0,40	6,5	0,136 ± 0,005	0,11 ± 0,01
1	0,00	0,00	0,052 ± 0,001	14,9 ± 0,1
	0,010	0,11	0,0581 ± 0,0005	16,4 ± 0,4
	0,020	0,22	0,059 ± 0,003	16,8 ± 0,6
	0,030	0,34	0,061 ± 0,002	16,9 ± 0,3
	0,040	0,46	0,062 ± 0,001	17,1 ± 0,6
	0,060	0,70	0,066 ± 0,003	17,2 ± 0,7
	0,080	0,95	0,067 ± 0,003	16,93 ± 0,02
	0,10	1,2	0,069 ± 0,005	16,01 ± 0,4
	0,20	2,6	0,087 ± 0,004	9,3 ± 0,1
	0,30	4,4	0,103 ± 0,003	3,9 ± 0,3
	0,40	6,5	0,149 ± 0,007	1,4 ± 0,1

Condições experimentais: $[DNPO] = 0,10$ mmol L⁻¹, $[H_2O_2] = 10$ mmol L⁻¹, $[IMI-H] = 0,20$ mmol L⁻¹.

Tabela 15: Efeito da $[H_2O]$ na constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão (k_{obs}) e no rendimento quântico singlete (Φ_s) da reação de TCPO com H_2O_2 em misturas DME : H_2O .

χ_{H_2O}	$[H_2O]$ (mol L ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)
0,00	0,00	0,70 ± 0,07	2,69 ± 0,06
0,010	0,11	0,79 ± 0,05	2,79 ± 0,04
0,020	0,22	0,8 ± 0,1	3,2 ± 0,2
0,030	0,34	0,85 ± 0,08	3,50 ± 0,3
0,040	0,46	0,91 ± 0,07	3,61 ± 0,05
0,060	0,70	0,9 ± 0,1	4,56 ± 0,06
0,080	0,95	1,25 ± 0,09	4,2 ± 0,1
0,10	1,2	1,4 ± 0,1	3,8 ± 0,4
0,20	2,6	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2
0,30	4,4	2,8 ± 0,4	0,76 ± 0,06
0,40	6,5	4,4 ± 0,4	0,35 ± 0,03

Condições experimentais: [TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹; [IMI-H] = 0,20 mmol L⁻¹ [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ e $[H_2O_2]$ = 10 mmol L⁻¹; solvente: DME.

Tabela 16: Efeito da $[H_2O]$ na constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão (k_{obs}) e no rendimento quântico singlete (Φ_s) da reação de TCPO com H_2O_2 em misturas acetato de etila : H_2O .

χ_{H_2O}	$[H_2O]$ (mol L ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^3$ (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)
0	0,00	0,47 ± 0,03	1,9 ± 0,3
0,01	0,11	0,62 ± 0,03	2,2 ± 0,2
0,02	0,22	0,635 ± 0,001	2,6 ± 0,2
0,03	0,34	0,71 ± 0,04	2,7 ± 0,1
0,04	0,46	0,79 ± 0,01	2,93 ± 0,09
0,06	0,70	0,9 ± 0,1	3,2 ± 0,3
0,08	0,95	1,01 ± 0,09	2,24 ± 0,01
0,1	1,2	1,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2
0,2	2,6	2,0 ± 0,1	1,2 ± 0,3

Condições experimentais: [TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹; [IMI] = 0,20 mmol L⁻¹, [DPA] = 0,20 mmol L⁻¹ e $[H_2O_2]$ = 10 mmol L⁻¹; solvente: acetato de etila.

Como mostra a **Figura 12**, para a reação com DNPO, existe um aumento inicial do rendimento quântico com o incremento da concentração da água seguido por uma diminuição significativa, de mais de uma ordem de grandeza, para maiores concentrações. O comportamento dos rendimentos é similar para diferentes concentrações do ativador DPA. Nota-se que, tanto para a reação com DNPO como com TCPO (**Figura 13**) a diminuição dos rendimentos começa a partir de uma fração molar de 0,06 ($[H_2O] = 0,7 \text{ mol L}^{-1}$).

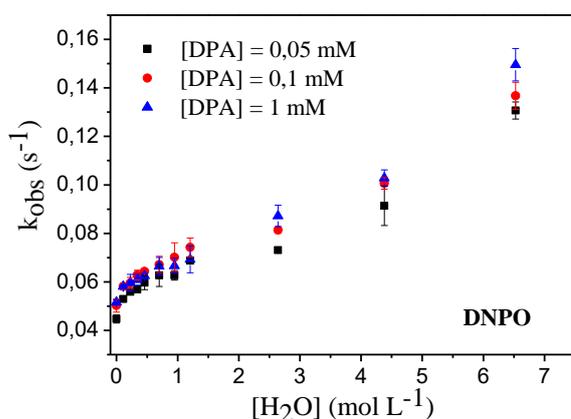


Figura 10: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão com a $[H_2O]$ da reação de DNPO nas três concentrações de DPA em misturas DME : H_2O .

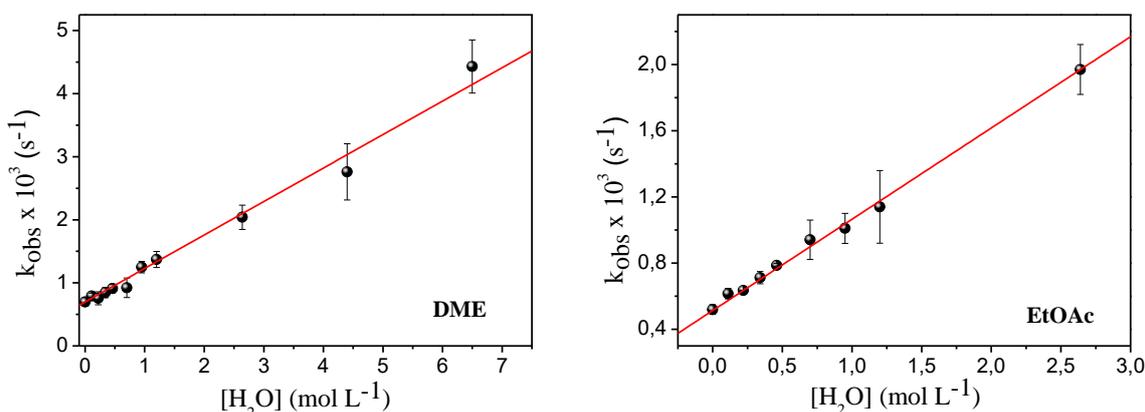


Figura 11: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão com a $[H_2O]$ da reação de TCPO em misturas DME : H_2O e EtOAc : H_2O .

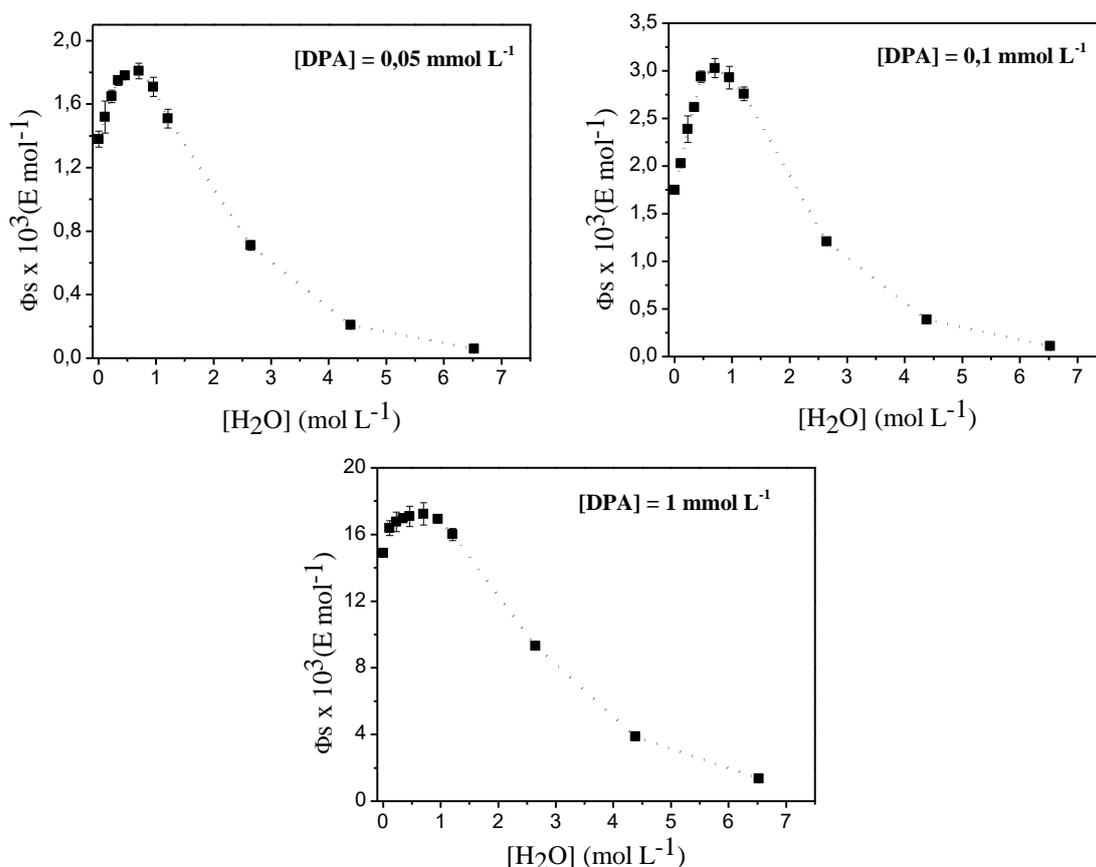


Figura 12: Dependência dos rendimentos quânticos singlete obtidos da reação de DNPO com H_2O_2 com a $[H_2O]$ nas três concentrações de DPA.

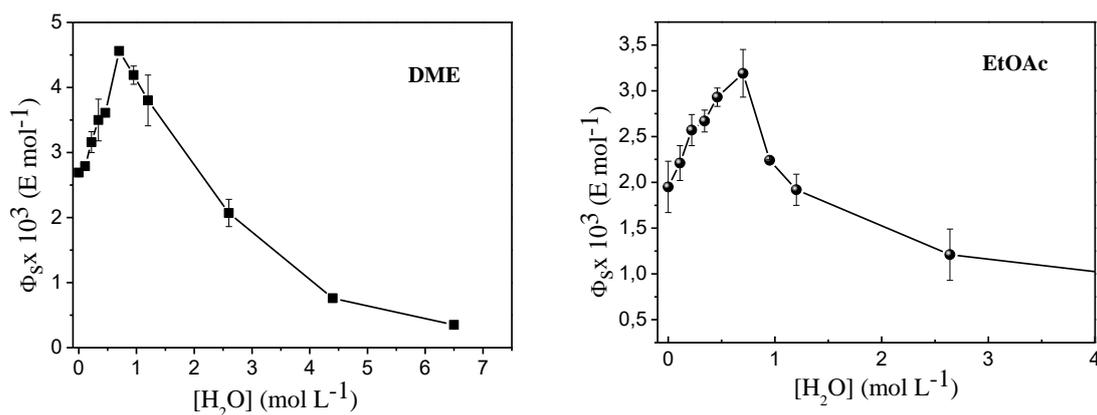


Figura 13: Dependência dos rendimentos quânticos singlete com a $[H_2O]$ obtidos da reação de TCPO com H_2O_2 em misturas DME : H_2O e EtOAc : H_2O .

A polaridade do meio para as várias frações molares de água em DME foi determinada, utilizando-se medidas do parâmetro de polaridade empírico $E_T(33)$. Conforme esperado, com o incremento da concentração da água ocorre um

deslocamento hipsocrômico da banda de transferência de carga da sonda $E_T(33)$, indicando o aumento da polaridade empírica do sistema (**Tabela 17**).

Tabela 17: Valores de $E_T(33)$ nas diferentes misturas DME : H_2O

χ_{H_2O}	$E_T(33)$ (kcal mol ⁻¹)
0,00	45,02
0,010	46,49
0,020	47,81
0,030	48,22
0,040	48,79
0,060	50,16
0,080	50,95
0,10	51,61
0,20	55,30
0,30	57,19
0,40	58,34

3.5 Parâmetros de quimiluminescência da reação peroxioxalato em 1,2-dimetoxietano (DME) e em misturas DME : H_2O

Para entender melhor o passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato, a reação do DNPO com H_2O_2 catalisada por IMI-H, foi estudada em várias frações molares de água usando diferentes ativadores como 9,10-difenilantraceno (DPA), 2,5-difeniloxazol (PPO), perileno (PER), rubreno (RUB), rubreno sulfonado (RUB sulfonado) e a rodamina 6G (ROD). As frações molares de água usadas nestes estudos foram 0,02; 0,06 e 0,1. Para fins de comparação, experimentos controle em DME foram conduzidos inicialmente na maioria dos casos. A partir das curvas cinéticas obtidas foram determinadas as constantes de velocidades e os rendimentos de formação de estados excitados singlete (**Tabela 18, 19 e 20**)

Os valores das constantes de velocidade foram correlacionados com a [ACT] em cada uma das frações molares de água (**Figura 14**). Foi observado que esses valores mostraram ser independentes da concentração de ACT para todo o intervalo de concentrações utilizado e em cada uma das frações molares de água.

Tabela 18: Efeito da [DPA] e [PPO] nas constantes de velocidade de decaimento (k_{obs}) e nos rendimentos de formação de estados excitados singlete (Φ_s), da reação de DNPO com H_2O_2 nas diferentes misturas DME : H_2O .

		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0$		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,02$	
ACT	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)
DPA	0,05	0,056 ± 0,003	0,14 ± 0,04	0,060 ± 0,002	0,189 ± 0,002
	0,1	0,0580 ± 0,0006	0,25 ± 0,06	0,0599 ± 0,0005	0,296 ± 0,004
	0,2	0,057 ± 0,002	0,50 ± 0,07	0,061 ± 0,001	0,525 ± 0,007
	0,5	0,0560 ± 0,0007	1,0 ± 0,1	0,0594 ± 0,0006	1,10 ± 0,03
	1	0,057 ± 0,001	1,6 ± 0,2	0,060 ± 0,001	1,65 ± 0,02
	5	0,057 ± 0,002	-	0,059 ± 0,002	2,82 ± 0,08
		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,06$		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,1$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)
DPA	0,05	0,060 ± 0,002	0,194 ± 0,008	0,0696 ± 0,0008	0,17 ± 0,02
	0,1	0,062 ± 0,004	0,366 ± 0,002	0,068 ± 0,002	0,334 ± 0,002
	0,2	0,063 ± 0,004	0,66 ± 0,02	0,069 ± 0,002	0,64 ± 0,01
	0,5	0,061 ± 0,001	1,33 ± 0,05	0,069 ± 0,002	1,28 ± 0,02
	1	0,063 ± 0,002	2,3 ± 0,1	0,0680 ± 0,0002	2,0 ± 0,1
	5	0,063 ± 0,003	3,75 ± 0,02	0,070 ± 0,001	3,32 ± 0,04
		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0$		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,02$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^4$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^4$ (E mol ⁻¹)
PPO	0,05	0,056 ± 0,002	0,083 ± 0,001	0,060 ± 0,001	0,16 ± 0,02
	0,1	0,056 ± 0,003	0,15 ± 0,03	0,059 ± 0,002	0,29 ± 0,01
	0,2	0,055 ± 0,006	0,23 ± 0,01	0,059 ± 0,002	0,48 ± 0,03
	0,5	0,0556 ± 0,0008	0,53 ± 0,02	0,0594 ± 0,0003	0,99 ± 0,01
	1	0,0561 ± 0,0008	0,95 ± 0,03	0,0587 ± 0,0008	1,6 ± 0,1
	5	0,056 ± 0,002	2,1 ± 0,1	0,058 ± 0,002	3,9 ± 0,2
		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,06$		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,1$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^4$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^4$ (E mol ⁻¹)
PPO	0,05	0,064 ± 0,001	0,33 ± 0,04	0,069 ± 0,002	0,16 ± 0,02
	0,1	0,0630 ± 0,0004	0,53 ± 0,07	0,068 ± 0,001	0,31 ± 0,05
	0,2	0,064 ± 0,001	0,94 ± 0,01	0,069 ± 0,002	0,58 ± 0,04
	0,5	0,0633 ± 0,0001	1,8 ± 0,1	0,069 ± 0,001	1,1 ± 0,2
	1	0,0641 ± 0,0003	4,7 ± 0,2	0,069 ± 0,001	1,7 ± 0,3
	5	0,064 ± 0,001	8,6 ± 0,5	0,069 ± 0,002	4,2 ± 0,1

Condições experimentais: [DNPO] = 0,1 mmol L⁻¹; [IMI-H] = 0,2 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10 mmol L⁻¹

Tabela 19: Efeito da [PER] e [RUB] nas constantes de velocidade de decaimento (k_{obs}) e nos rendimentos de formação de estados excitados singlete (Φ_s), da reação de DNPO com H_2O_2 nas diferentes misturas DME : H_2O .

ACT	$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0$			$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,02$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)
PER	0,025	0,055 ± 0,003	--	--	--
	0,05	0,0558 ± 0,0008	1,6 ± 0,2	0,0582 ± 0,0007	1,9 ± 0,1
	0,1	0,056 ± 0,002	2,6 ± 0,1	0,059 ± 0,001	3,0 ± 0,1
	0,2	0,056 ± 0,003	3,4 ± 0,3	0,059 ± 0,001	4,3 ± 0,2
	0,5	0,056 ± 0,004	5,0 ± 0,1	0,059 ± 0,001	5,9 ± 0,2
	0,8	0,055 ± 0,005	--	--	--
	1	0,056 ± 0,003	5,8 ± 0,2	0,059 ± 0,001	6,3 ± 0,3
	5	0,056 ± 0,005	3,8 ± 0,3	0,059 ± 0,001	4,5 ± 0,2
PER	$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,06$			$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,1$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)
	0,025	--	--	0,069 ± 0,001	1,1 ± 0,1
	0,05	0,063 ± 0,002	2,56 ± 0,02	0,0670 ± 0,0002	2,0 ± 0,2
	0,1	0,063 ± 0,002	4,20 ± 0,04	0,069 ± 0,001	3,1 ± 0,1
	0,2	0,063 ± 0,002	6,1 ± 0,2	0,0683 ± 0,0007	4,5 ± 0,3
	0,5	0,063 ± 0,002	8,7 ± 0,4	0,068 ± 0,001	6,2 ± 0,4
	0,8	--	--	0,069 ± 0,002	6,4 ± 0,1
1	0,064 ± 0,002	9,4 ± 0,3	0,069 ± 0,003	6,7 ± 0,2	
5	0,064 ± 0,001	7,3 ± 0,2	0,069 ± 0,001	5,1 ± 0,1	
RUB	$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0$			$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,02$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)
	0,025	0,056 ± 0,002	--	--	--
	0,05	0,055 ± 0,001	9,7 ± 0,6	0,057 ± 0,001	13 ± 1
	0,1	0,055 ± 0,002	14 ± 1	0,058 ± 0,003	18 ± 1
	0,2	0,056 ± 0,002	18 ± 1	0,056 ± 0,002	21 ± 2
	0,5	0,056 ± 0,002	20 ± 2	0,056 ± 0,002	23 ± 1
	0,8	0,055 ± 0,003	--	--	--
1	0,0554 ± 0,0008	21 ± 1	0,0564 ± 0,0004	24 ± 1	
5	0,0552 ± 0,0008	22 ± 2	0,0562 ± 0,0001	23 ± 2	
RUB	$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,06$			$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,1$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^2$ (E mol ⁻¹)
	0,025	0,064 ± 0,001	--	0,069 ± 0,002	10 ± 1
	0,05	0,064 ± 0,001	22 ± 3	0,069 ± 0,002	16 ± 1
	0,1	0,063 ± 0,001	30 ± 2	0,068 ± 0,001	21 ± 2
	0,2	0,064 ± 0,002	37 ± 1	0,0685 ± 0,0007	27 ± 1
	0,5	0,0638 ± 0,0001	43 ± 2	0,0698 ± 0,0006	29 ± 3
	0,8	0,064 ± 0,001	--	0,068 ± 0,001	29 ± 2
1	0,064 ± 0,001	44 ± 3	0,069 ± 0,002	30 ± 1	
5	0,0638 ± 0,0008	39 ± 2	0,068 ± 0,002	30 ± 3	

Condições experimentais: [DNPO] = 0,10 mmol L⁻¹; [IMI-H] = 0,20 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10 mmol L⁻¹

Tabela 20: Efeito da [ROD] e [RUB_{sulf}] nas constantes de velocidade de decaimento (k_{obs}) e nos rendimentos de formação de estados excitados singlete (Φ_s), da reação de DNPO com H₂O₂ nas diferentes misturas DME : H₂O.

		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,02$			$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,06$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)	
ROD	0,0005	0,055 ± 0,001	0,25 ± 0,01	0,061 ± 0,001	0,33 ± 0,01	
	0,001	0,054 ± 0,002	0,50 ± 0,02	0,0610 ± 0,0003	0,60 ± 0,02	
	0,002	0,056 ± 0,003	0,88 ± 0,01	0,060 ± 0,001	1,03 ± 0,03	
	0,005	0,0568 ± 0,0003	2,01 ± 0,02	0,0596 ± 0,0004	2,52 ± 0,01	
	0,01	0,057 ± 0,003	3,12 ± 0,01	0,060 ± 0,001	3,91 ± 0,02	
		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,1$				
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)			
ROD	0,0005	0,068 ± 0,001	0,34 ± 0,01			
	0,001	0,069 ± 0,002	0,59 ± 0,02			
	0,002	0,070 ± 0,002	1,11 ± 0,03			
	0,005	0,0690 ± 0,002	2,49 ± 0,01			
	0,01	0,0696 ± 0,0003	3,84 ± 0,02			
		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,02$			$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,06$	
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)	
RUB Sulf	0,00015	0,059 ± 0,005	0,061 ± 0,001	0,061 ± 0,003	0,095 ± 0,004	
	0,0003	0,060 ± 0,006	0,083 ± 0,002	0,063 ± 0,004	0,14 ± 0,02	
	0,00045	0,058 ± 0,004	0,099 ± 0,001	0,062 ± 0,003	0,17 ± 0,01	
	0,0006	0,059 ± 0,006	0,115 ± 0,002	0,064 ± 0,002	0,20 ± 0,01	
	0,00075	0,060 ± 0,007	0,125 ± 0,003	0,061 ± 0,006	0,22 ± 0,02	
		$\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,1$				
	[ACT] (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	$\Phi_s \times 10^3$ (E mol ⁻¹)			
RUB Sulf	0,00015	0,071 ± 0,004	0,081 ± 0,001			
	0,0003	0,071 ± 0,004	0,124 ± 0,004			
	0,00045	0,070 ± 0,003	0,14 ± 0,07			
	0,0006	0,071 ± 0,002	0,15 ± 0,03			
	0,00075	0,071 ± 0,003	0,17 ± 0,02			

Condições experimentais: [DNPO] = 0,10 mmol L⁻¹; [IMI-H] = 0,20 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10 mmol L⁻¹

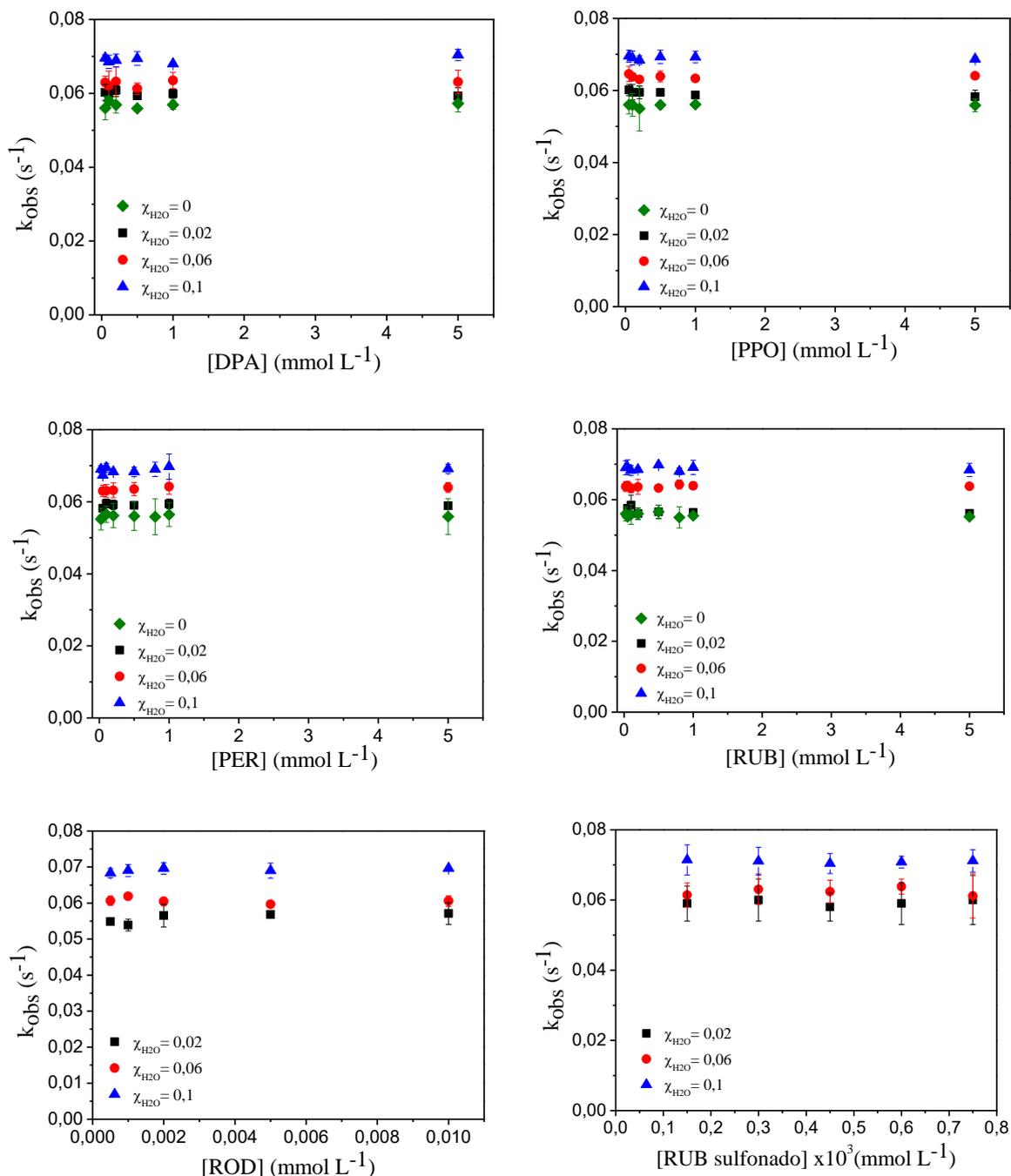


Figura 14: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão com a concentração dos ativadores em várias frações molares de água.

Com base nos dados apresentados, é possível dizer que a constante de velocidade k_{obs} se mostrou independente da natureza e [ACT], porém observou-se que o aumento da fração de água causou um incremento desta (**Figura 14**).

3.6 Estudos cinéticos com TCPO em 1,2-dimetoxietano (DME) anidro e em misturas DME : H₂O 1:1 (v/v) usando cumarinas e a curcumina como ativadores.

Tanto as cumarinas quanto a curcumina são de grande interesse químico devido a suas características fluorescentes, podendo ser aplicadas como sondas.^{79–82} Com o intuito de estudar o sistema peroxioxalato usando esses compostos como ativadores, foram efetuados experimentos cinéticos da reação entre o TCPO e H₂O₂ catalisada por IMI-H. Inicialmente a reação foi realizada em 1,2-dimetoxietano (DME) anidro e posteriormente num sistema binário DME : H₂O na proporção 1:1 (v/v).

Os experimentos cinéticos foram iniciados com a adição de TCPO ao meio cujo solvente utilizado era DME ou mistura DME : H₂O contendo H₂O₂, IMI-H, e ACT, e foi registrado o perfil temporal de emissão. Obtiveram-se curvas de decaimento de primeira ordem para a reação peroxioxalato em diversas concentrações de ACT (**Figura 15**) e a partir do tratamento das curvas com equações exponenciais de primeira ordem determinaram-se as constantes de velocidade observada (k_{obs}), bem como os rendimentos de formação de estados excitados singlete (Φ_s) (**Tabela 21**).

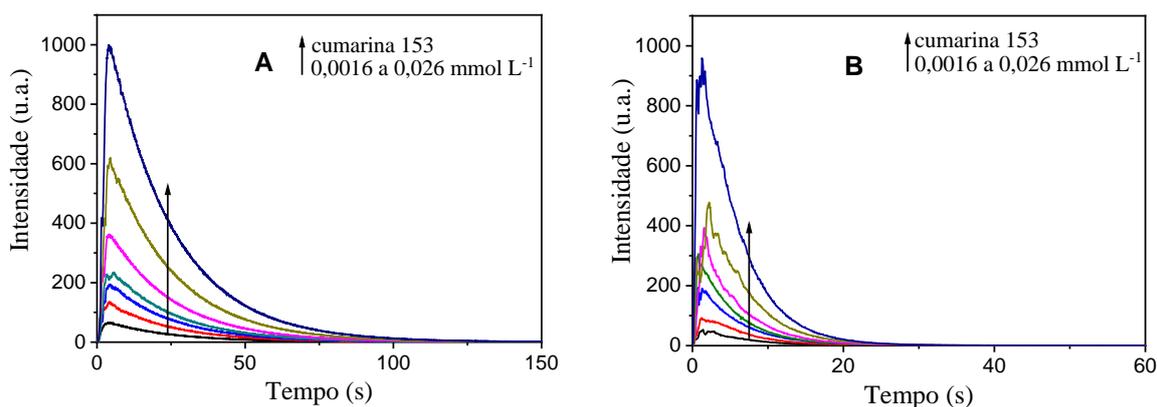


Figura 15: Perfis cinéticos da intensidade de emissão para a variação da [cumarina 153]. [TCPO] = 0,10 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10 mmol L⁻¹, 25°C; (A) em DME, [IMI-H] = 5,0 mmol L⁻¹, usando 600V/10nm de voltagem e fenda da fotomultiplicadora (B) em DME : H₂O 1:1 (v/v), [IMI-H] = 2,0 mmol L⁻¹, usando 400V/10nm de voltagem e fenda da fotomultiplicadora.

Os valores das k_{obs} se mostraram independentes da concentração das cumarinas e da curcumina tanto em DME quanto na mistura binária DME : H₂O 1:1 (v/v), obtendo-se médias de $k_{\text{obs}} = 0,044 \pm 0,001$ e $k_{\text{obs}} = 0,17 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$, respectivamente (**Tabela 21**, **Figura 16**).

Tabela 21: Efeito da [ACT] na constante de decaimento de emissão (k_{obs}) e nos rendimentos de formação de estados excitados singlete (Φ_s), na reação de TCPO com H₂O₂ em DME e DME:H₂O 1:1 (v/v) respectivamente.

ACT	DME ^a			DME:H ₂ O 1:1 (v/v) ^b	
	[cum] x 10 ³ (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	Φ_s x 10 ³ (E mol ⁻¹)	k_{obs} (s ⁻¹)	Φ_s x 10 ⁴ (E mol ⁻¹)
Cum 153	1,65	0,0459 ± 0,0008	0,88 ± 0,01	0,171 ± 0,001	2,0 ± 0,1
	3,30	0,0460 ± 0,0006	1,58 ± 0,03	0,18 ± 0,02	3,1 ± 0,7
	4,95	0,0459 ± 0,0007	2,1 ± 0,4	0,1752 ± 0,0003	4,0 ± 0,2
	6,60	0,0454 ± 0,0004	2,34 ± 0,3	0,18 ± 0,02	4,8 ± 0,1
	9,90	0,046 ± 0,001	3,3 ± 0,9	0,171 ± 0,003	6,5 ± 0,2
	16,5	0,0459 ± 0,0008	4,6 ± 0,6	0,179 ± 0,007	8,2 ± 0,8
	26,4	0,0457 ± 0,0002	6,4 ± 0,4	0,192 ± 0,002	12,0 ± 0,4
Cum 120	5,7	0,043 ± 0,001	0,041 ± 0,003	0,16 ± 0,01	0,241 ± 0,002
	11,4	0,044 ± 0,002	0,080 ± 0,001	0,151 ± 0,006	0,366 ± 0,007
	17,1	0,044 ± 0,003	0,1 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,51 ± 0,06
	22,8	0,043 ± 0,001	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,55 ± 0,03
	34,2	0,041 ± 0,004	0,22 ± 0,04	0,162 ± 0,008	0,74 ± 0,02
	57,0	0,042 ± 0,003	0,30 ± 0,03	0,16 ± 0,01	1,00 ± 0,03
	91,2	0,045 ± 0,001	0,40 ± 0,05	0,155 ± 0,008	1,1 ± 0,3
Cum 151	3,37	0,043 ± 0,002	0,020 ± 0,001	0,158 ± 0,007	0,12 ± 0,01
	6,75	0,0427 ± 0,0006	0,040 ± 0,005	0,163 ± 0,005	0,24 ± 0,04
	10,0	0,0434 ± 0,0003	0,059 ± 0,002	0,153 ± 0,002	0,32 ± 0,02
	13,5	0,0436 ± 0,0002	0,077 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,40 ± 0,03
	20,0	0,0438 ± 0,0003	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,54 ± 0,01
	34	0,0437 ± 0,0008	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,70 ± 0,03
	54	0,044 ± 0,002	0,31 ± 0,03	0,170 ± 0,002	1,37 ± 0,05
Curcumina	5	0,0428 ± 0,001	1,7 ± 0,1	0,18 ± 0,01	7,7 ± 0,6
	10	0,043 ± 0,001	2,6 ± 0,2	0,17 ± 0,003	11,6 ± 0,8
	50	0,0428 ± 0,001	5,2 ± 0,1	0,181 ± 0,02	19,1 ± 2
	100	0,046 ± 0,001	6,2 ± 0,2	0,173 ± 0,003	20 ± 1
	200	0,044 ± 0,003	9,5 ± 0,1	0,187 ± 0,008	22 ± 2

Condições experimentais: [TCPO] = 0,1 mmol L⁻¹, [H₂O₂] = 10 mmol L⁻¹, 25°C; ^a [IMI-H] = 5 mmol L⁻¹, ^b [IMI-H] = 2 mmol L⁻¹.

Os rendimentos quânticos se mostraram dependentes da natureza dos ativadores, além disso eles aumentam com a concentração de cada um deles (**Tabela 21**). As correlações entre os rendimentos quânticos e a concentração e natureza dos ativadores serão efetuados na Discussão.

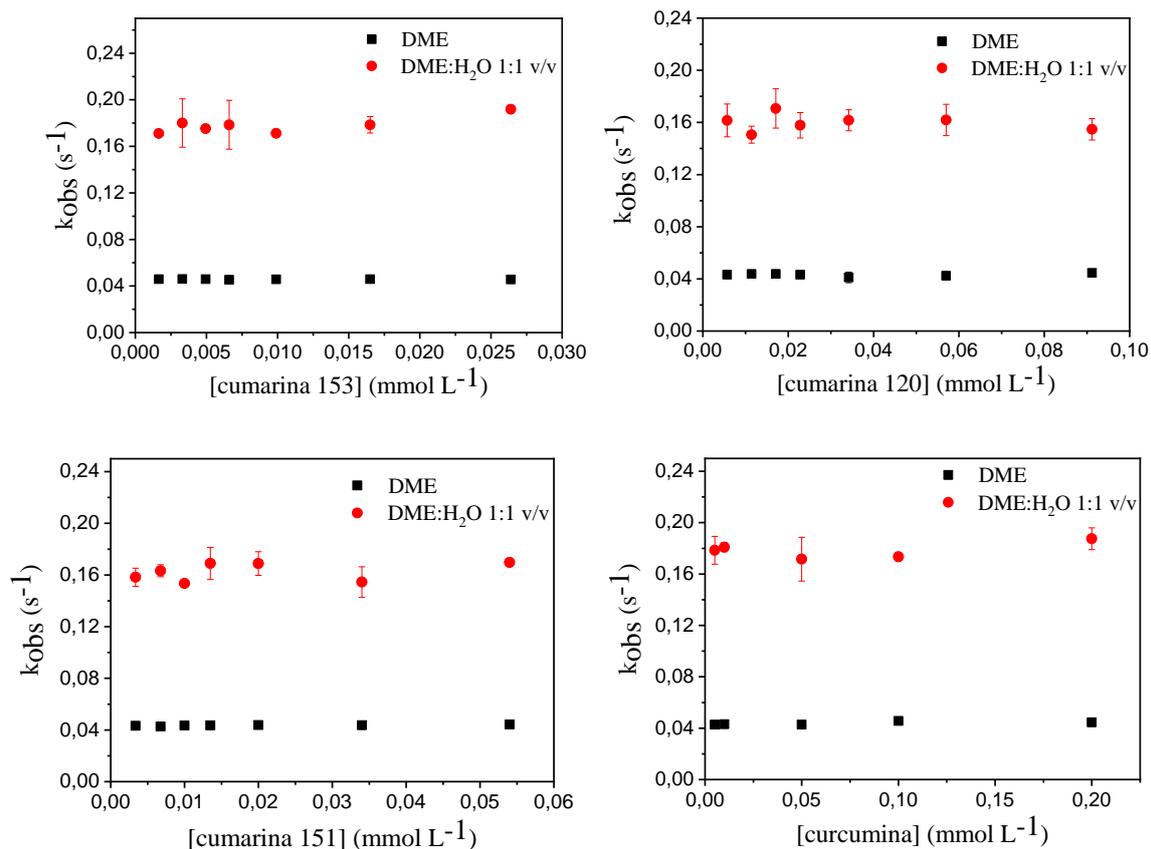
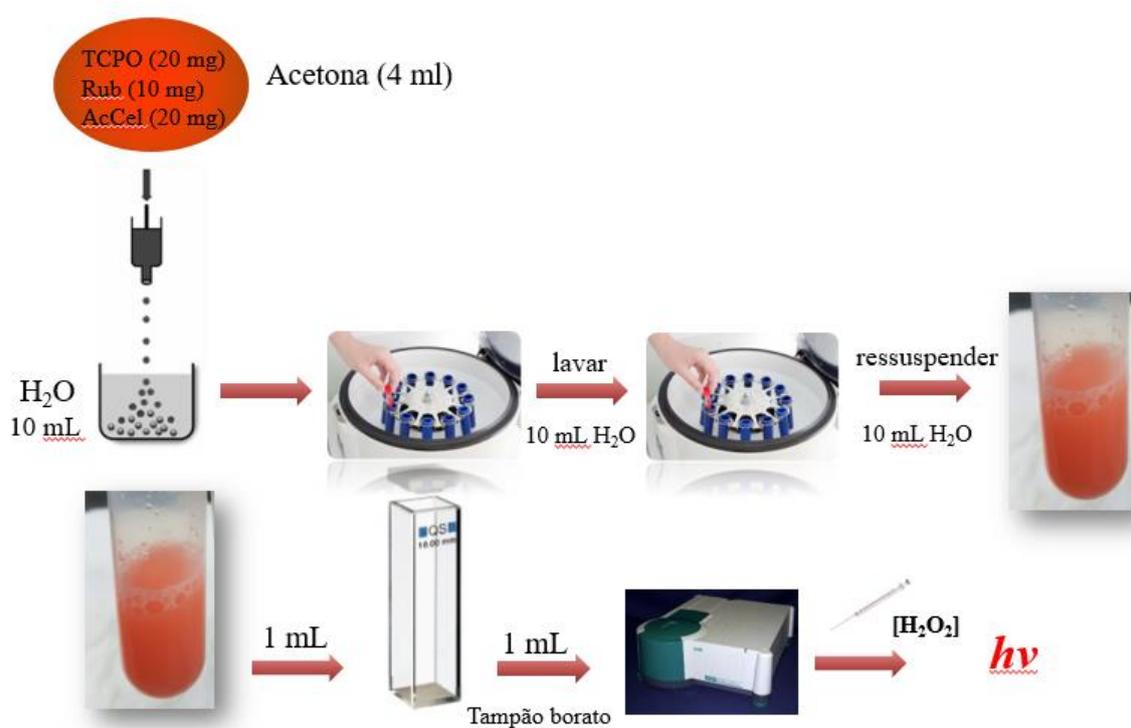


Figura 16: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão (k_{obs}) com a concentração das cumarinas ou da curcumina para a reação de TCPO com $[H_2O_2]$ em DME e DME : H_2O 1:1 (v/v). $[TCPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[H_2O_2] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[IMI-H] = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (DME), $[IMI-H] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (DME : H_2O), 25°C.

3.7 Estudos de microesferas baseadas no sistema peroxioxalato

Com o intuito de incrementar os rendimentos quânticos do sistema peroxioxalato em meio aquoso, estudou-se a reação do TCPO com H_2O_2 em microesferas, usando inicialmente acetato de celulose, para o encapsulamento do éster junto do ACT rubreno. O método padrão para a preparação das microesferas está ilustrado no **Esquema 14**. Inicialmente foram dissolvidos 20 mg de acetato de celulose (AcCel), 20 mg de TCPO e 10 mg de rubreno em 4 mL de acetona. A solução foi gotejada em 10 mL de água MQ sob agitação magnética controlada com rotação de 1500 rpm. A suspensão obtida foi centrifugada e as microesferas lavadas com água, centrifugadas novamente e ressuspendidas em 10 mL de água MQ. Experimentos cinéticos de emissão foram

iniciados com a adição do H_2O_2 à cubeta de fluorescência contendo 1 mL da suspensão das microesferas e 1 mL tampão borato, mantendo sempre a concentração final do último em 100 mmol L^{-1} . A reação foi conduzida neste meio uma vez conhecido bem o comportamento deste sistema em tampão borato.⁵⁶ O perfil cinético da intensidade de emissão mostra um aumento abrupto da intensidade seguido de um decaimento mais lento (**Figura 17**), o qual foi ajustado por uma equação monoexponencial (**Equação 1**) fornecendo os parâmetros cinéticos correspondentes.



Esquema 14: Método padrão utilizado na preparação das microesferas de acetato de celulose contendo TCPO e RUB e sua reação quimiluminescente com peróxido de hidrogênio.

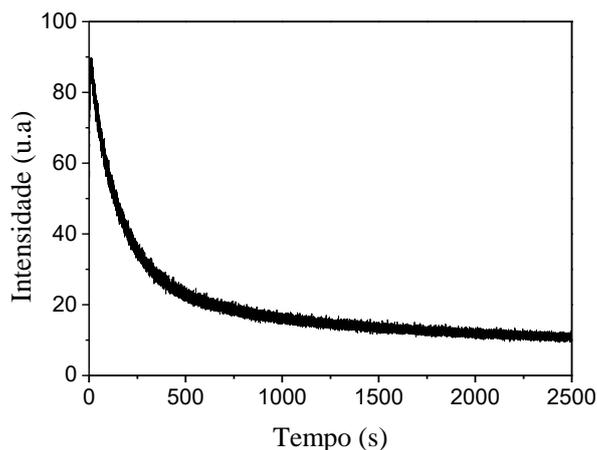


Figura 17: Exemplo do perfil cinético de emissão de luz para a reação peroxioxalato usando microesferas de acetato de celulose preparadas pelo método padrão em tampão borato (100 mmol L^{-1}) e $\text{pH} = 10$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{RUB}]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Uma vez preparadas as microesferas, foi possível obter os espectros de quimiluminescência e fluorescência como mostra a **Figura 18**.

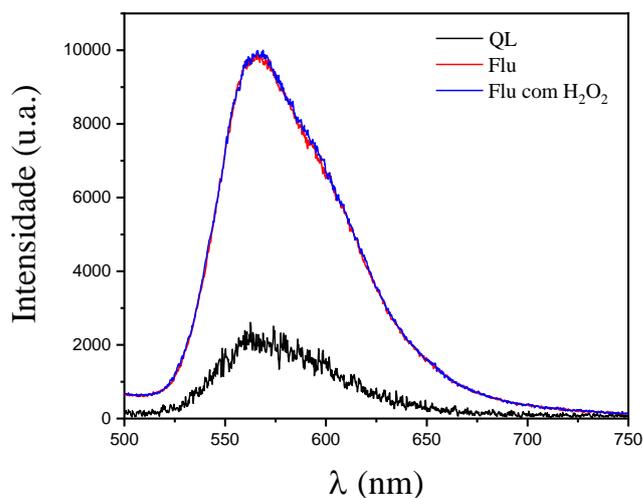


Figura 18: Espectro de emissão de quimiluminescência (QL) e fluorescência (Flu) das microesferas de acetato de celulose preparadas pelo método padrão em tampão borato (100 mmol L^{-1}) e $\text{pH} = 10$. $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{RUB}]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Os espectros de fluorescência foram obtidos na ausência e presença de H_2O_2 , $\lambda_{\text{exc}} = 442 \text{ nm}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$

A fotoexcitação das microesferas em 442 nm gerou emissão de luz em 560 nm , que é um comprimento de onda típico de rubreno. Após a adição de 100 mmol L^{-1} de peróxido de hidrogênio, elas realizaram uma reação de quimiluminescência para emitir luz no

mesmo comprimento de onda. Os resultados demonstram que as microesferas sequestram o TCPO e rubreno em estreita proximidade em seu núcleo hidrofóbico para permitir que realizem a reação de quimiluminescência em resposta ao peróxido de hidrogênio.

Inicialmente, foi estudado o efeito do pH na reação das microesferas em tampão borato 100 mmol L⁻¹. A partir dos perfis cinéticos de emissão (**Figura 19**) obtiveram-se as k_{obs} e os Φ_{CL} (**Tabela 22**). Em pH = 11 foi observado um perfil composto por duas fases, sendo a k_{obs} mostrada na **Tabela 22** obtida a partir do ajuste aplicada à segunda curva (2).

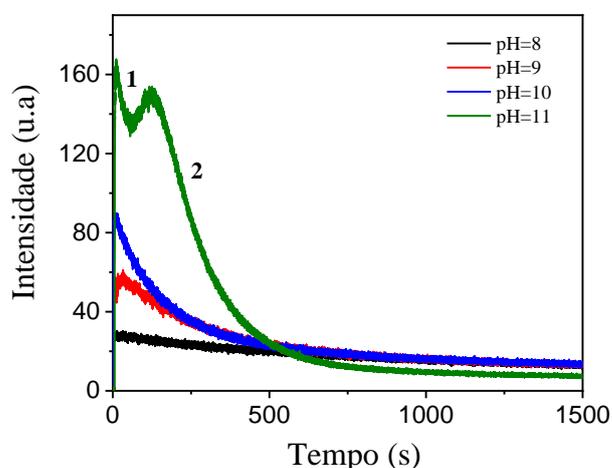


Figura 19: Exemplo dos perfis cinéticos de emissão de luz para a reação peroxioxalato usando microesferas de acetato de celulose preparadas pelo método padrão em tampão borato (100 mmol L⁻¹) variando o pH. 25 °C, [H₂O₂] = 100 mmol L⁻¹, [RUB]_f = 1,0 mmol L⁻¹, [TCPO]_f = 2,2 mmol L⁻¹.

Tabela 22: Efeito do pH na constante de velocidade de decaimento de emissão (k_{obs}) e no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) da reação peroxioxalato usando microesferas de acetato de celulose preparadas pelo método padrão em tampão borato 100 mmol L⁻¹.

pH	$k_{obs} \times 10^2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\Phi_{CL} \times 10^4 \text{ (E mol}^{-1}\text{)}$
8	0,11 ± 0,01	3,35 ± 0,07
9	0,26 ± 0,02	4,20 ± 0,08
10	0,38 ± 0,03	5,2 ± 0,2
11	0,61 ± 0,02	7,3 ± 0,3

A 25 °C, [H₂O₂] = 100 mmol L⁻¹, [RUB]_f = 1,0 mmol L⁻¹, [TCPO]_f = 2,2 mmol L⁻¹.

Observou-se um incremento da k_{obs} com o pH do meio, aumentando seis vezes os valores do menor para o maior pH (**Tabela 22**). Também se notou um leve incremento

do rendimento Φ_{CL} com a crescente alcalinidade do meio, obtendo-se um maior rendimento de emissão do sistema num pH acima do valor de pK_{a1} do tampão borato ($pK_{a1} = 9,24$). Os ensaios de emissão apresentados a seguir foram efetuados em $pH=10$, sempre medindo o pH da solução na cubeta antes e depois da aquisição do perfil temporal de emissão.

Adicionalmente, estudou-se o efeito da variação da proporção das microesferas no meio tamponado em $pH = 10$, registrando-se os perfis cinéticos de emissão (**Figura 20**) dos quais se obtiveram as k_{obs} e os Φ_{CL} (**Tabela 23**). Diferentes quantidades da suspensão das microesferas foram adicionadas à cubeta, completando com tampão borato até um volume de 2 mL. Nestes experimentos, tomou-se o cuidado de manter sempre a concentração final de tampão borato em 100 mmol L^{-1} . Observou-se que a variação na quantidade de microesferas não influenciou na constante de velocidade k_{obs} podendo-se extrair uma média de $k_{obs} = 0,42 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ (**Figura 21, esquerda**). Da mesma forma, o rendimento quântico pareceu não variar com o incremento da quantidade de microesferas fornecendo uma média de $\Phi_{CL} = (5,0 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ (**Figura 21, direita**).

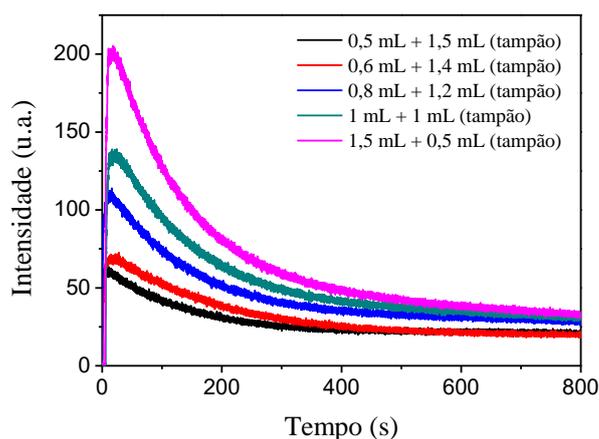


Figura 20: Exemplo dos perfis cinéticos de emissão de luz para a reação peroxioxalato usando microesferas de acetato de celulose em tampão borato (100 mmol L^{-1}) variando a proporção de microesferas. $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $pH = 10$.

Tabela 23: Efeito da proporção das microesferas preparadas pelo método padrão na constante de emissão (k_{obs}) e no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) em tampão borato 100 mmol L⁻¹.

$V_{\text{esferas}} (\%)$	$k_{\text{obs}} \times 10^2 (\text{s}^{-1})$	$\Phi_{\text{CL}} \times 10^4 (\text{E mol}^{-1})$
25	$0,43 \pm 0,01$	$5,0 \pm 0,2$
30	$0,43 \pm 0,01$	$4,81 \pm 0,02$
40	$0,41 \pm 0,01$	$5,2 \pm 0,1$
50	$0,42 \pm 0,02$	$4,8 \pm 0,4$
75	$0,40 \pm 0,01$	$5,0 \pm 0,4$

A 25 °C; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; pH = 10.

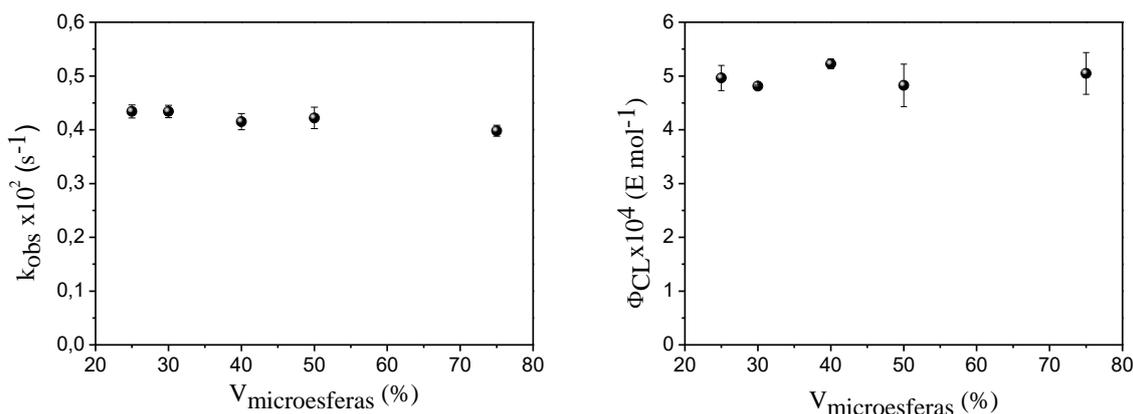


Figura 21: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão (k_{obs}) e do rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) com a variação da proporção das microesferas.

De forma a se determinar o número de mol de TCPO incorporado nas microesferas, utilizado nos cálculos do rendimento quântico em cada proporção das quantidades de microesferas, 20 mg de TCPO e 20 mg de acetato de celulose foram dissolvidos em 4 mL de acetona. A solução foi gotejada em 10 mL de água MQ sob agitação magnética. Posteriormente as microesferas centrifugadas foram dissolvidas em acetato de etila e foi obtido o espectro de absorção com a adição de $[\text{IMI-H}] = 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$. O espectro mostra a intensificação das bandas de absorção em 288 e 296 nm, indicando a formação do fenol correspondente (**Figura 22**). A partir dos valores de absorvidade molar (ϵ) para os máximos de absorção do 2,4,6-triclorofenol (TCP), após reação completa do TCPO com IMI-H foi possível estimar o conteúdo do TCPO nas microesferas analisadas. O resultado obtido foi de 98% em relação à quantidade de TCPO utilizada na preparação das microesferas.

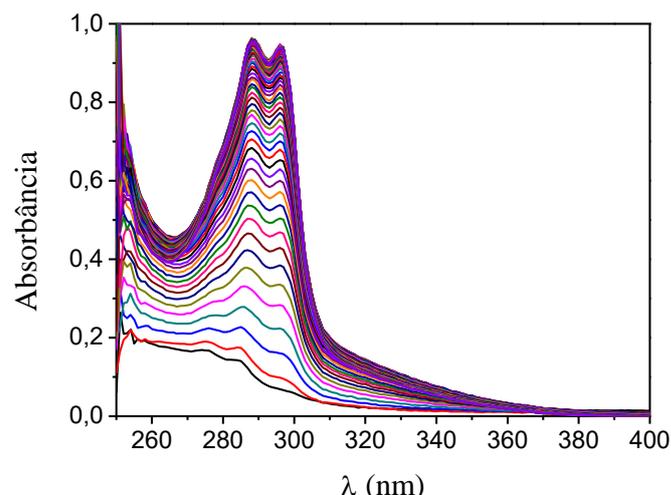


Figura 22: Espectro de absorção das microesferas dissolvidas em acetato de etila com IMI-H ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) com espectros da reação registrados em 100 ciclos de 30 segundos cada e com máximo de absorção em 288 e 296 nm correspondente ao fenol liberado.

Também estudou-se o efeito da concentração de H_2O_2 na sua reação com as microesferas em um meio tamponado ($\text{pH} = 10$). A partir dos perfis cinéticos de emissão obtiveram-se os parâmetros I_0 , k_{obs} e das áreas de emissão total, Φ_{CL} (Tabela 24). Observou-se que tanto os valores da intensidade inicial de emissão (I_0) quanto os rendimentos de quimiluminescência (Φ_{CL}) aumentaram com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$.

Tabela 24: Efeito da $[\text{H}_2\text{O}_2]$ na constante de velocidade de decaimento de emissão (k_{obs}), na intensidade inicial de emissão (I_0) e no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) em $\text{pH}=10$, na reação das microesferas preparadas pelo método padrão.

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mmol L^{-1})	$k_{\text{obs}} \times 10^2$ (s^{-1})	$I_0 \times 10^{13}$ (E s^{-1})	$\Phi_{\text{CL}} \times 10^4$ (E mol^{-1})
0,5	$0,21 \pm 0,01$	$0,74 \pm 0,08$	$0,2 \pm 0,1$
2,0	$0,219 \pm 0,002$	$1,32 \pm 0,06$	$0,87 \pm 0,05$
5,0	$0,221 \pm 0,001$	$1,7 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$
10,0	$0,24 \pm 0,01$	$3,61 \pm 0,04$	$2,4 \pm 0,2$
20,0	$0,25 \pm 0,02$	$5,2 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,5$
50,0	$0,31 \pm 0,01$	$6,3 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,3$
100	$0,41 \pm 0,03$	$8,2 \pm 0,9$	$5,1 \pm 0,5$
200	$0,48 \pm 0,04$	$10,6 \pm 0,8$	$6,0 \pm 0,3$

A $25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 10$, $[\text{RUB}]_{\text{f}} = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_{\text{f}} = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Uma questão fundamental com o uso da reação peroxioxalato em soluções aquosas é a instabilidade dos ésteres à hidrólise da água. No entanto, o encapsulamento do oxalato nas microesferas deve protegê-lo da hidrólise, fornecendo um ambiente hidrofóbico com

baixa permeabilidade à água. Portanto, investigamos a estabilidade das microesferas em meio aquoso, incubando-as em água neutra por vários períodos e medindo o espectro de absorção adicionando imidazol (5 mmol L^{-1}) à solução sobrenadante (**Figura 23**). Não foi observado a liberação do fenol num período de 8 horas sugerindo que as microesferas estabilizam o oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) dentro de seu núcleo hidrofóbico evitando assim a hidrólise.

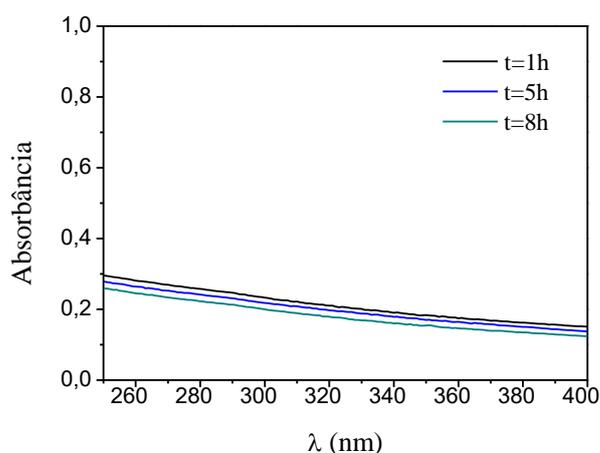


Figura 23: Espectro de absorção das microesferas armazenadas em água com adição de IMI-H (5 mmol L^{-1}).

Também foi estudada a estabilidade das microesferas quando armazenadas em tampão borato $\text{pH} = 10$ por diversos intervalos de tempo. Para isso, as microesferas foram ressuspendidas depois da sua preparação em tampão borato $\text{pH} = 10$ em vez de água, para serem usados nos experimentos cinéticos após diferentes tempos de armazenamento. Observou-se que tanto a k_{obs} quanto a intensidade de emissão diminuem significativamente com o tempo de incubação (**Figura 24**).

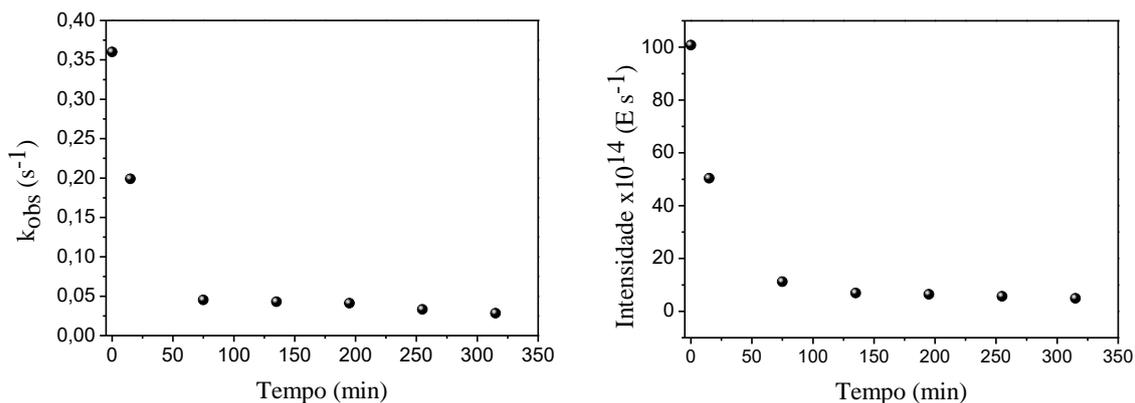


Figura 24: Dependência da k_{obs} e as I_0 na reação de H_2O_2 com as microesferas preparadas pelo método padrão mantidas em $pH = 10$ com o tempo. $[H_2O_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$.

A estabilidade das microesferas em $pH = 10$ também foi estudada por absorção. A **Figura 25** mostra a liberação de fenolato com o tempo de incubação.

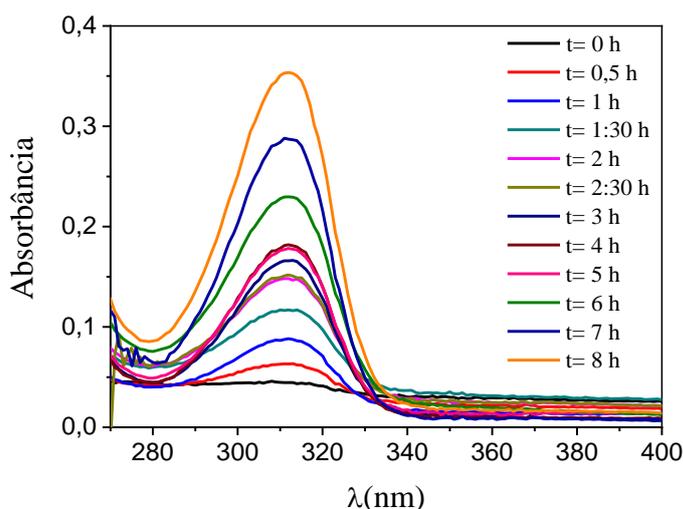


Figura 25: Espectro de absorção das microesferas de acetato de celulose obtidas pelo método padrão e armazenadas em tampão borato ($pH = 10$).

De forma a se comparar microesferas preparadas de formas diferentes, foram conduzidos experimentos de emissão misturando microesferas separadas de TCPO (20 mg de acetato de celulose e 20 mg de TCPO) e rubreno (20 mg de acetato de celulose e 10 mg de rubreno). Foi observado que a intensidade de emissão é reduzida consideravelmente, sendo 10 vezes menor (**Figura 26**), tanto em $pH = 10$ quanto em $pH = 11$, que a obtida quando prepararam-se microesferas contendo TCPO e rubreno juntos

(Figura 19). Notou-se que em pH = 11, nessas condições de preparação, também se obteve um perfil temporal complexo.

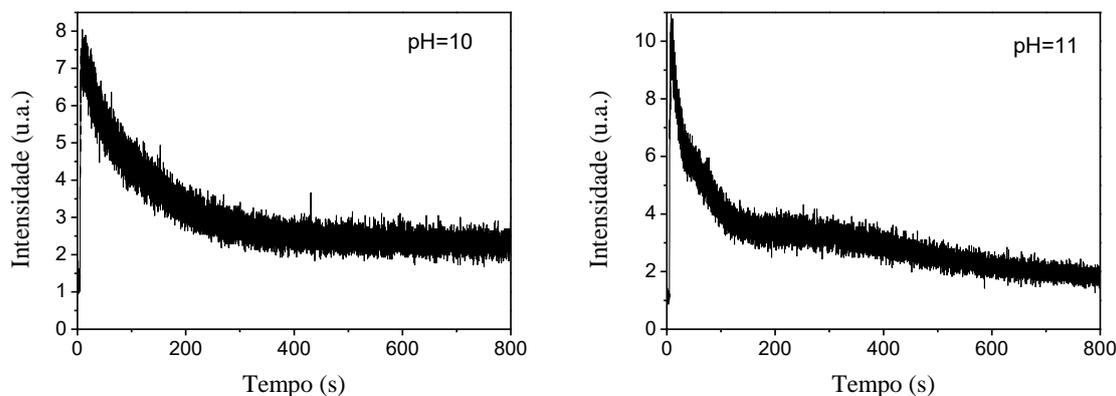


Figura 26: Exemplos de perfis cinéticos de emissão de luz para a reação peroxioxalato usando microesferas separadas de TCPO e rubreno em tampão borato (100 mmol L^{-1}) e pH = 10 e 11. $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{RUB}]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Na sequência foram preparadas microesferas variando-se a proporção entre os reagentes, usando neste caso 20 mg de acetato de celulose, 10 mg de TCPO e 10 mg de rubreno, dissolvidas em 8 mL de acetona e ressuspensas em 20 mL de água MQ. Foi estudado o efeito do pH e os perfis cinéticos de emissão (Figura 27) forneceram valores de k_{obs} e Φ_{CL} (Tabela 25). Observou-se que tanto a k_{obs} quanto os rendimentos quânticos incrementam linearmente com a alcalinidade do meio (Figura 28).

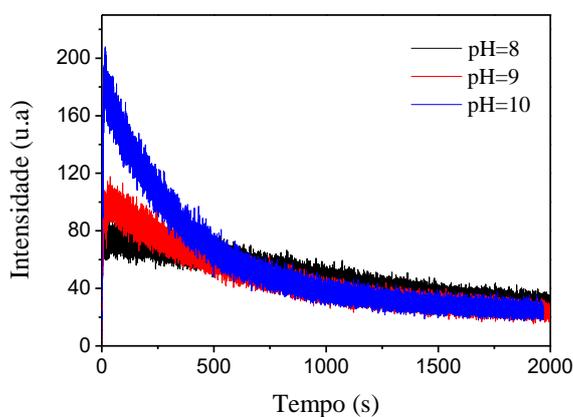


Figura 27: Exemplo dos perfis cinéticos de emissão de luz para a reação peroxioxalato usando microesferas de acetato de celulose em tampão borato (100 mmol L^{-1}) variando o pH. $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{RUB}]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_f = 1,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabela 25: Efeito do pH na constante de velocidade de decaimento de emissão (k_{obs}) e no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) na reação peroxioxalato usando microesferas de acetato de celulose em tampão borato 100 mmol L⁻¹.

pH	$k_{\text{obs}} \times 10^2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\Phi_{\text{CL}} \times 10^4 \text{ (E mol}^{-1}\text{)}$
8	0,06 ± 0,02	1,5 ± 0,1
9	0,16 ± 0,01	2,02 ± 0,07
10	0,266 ± 0,008	2,4 ± 0,1

A 25 °C [H₂O₂] = 100 mmol L⁻¹, 1:1(v/v) microesferas/tampão. 20 mg de acetato de celulose, 10 mg de TCPO e 10 mg de rubreno, dissolvidas em 8 mL de acetona e resuspendidas em 20 mL de água MQ

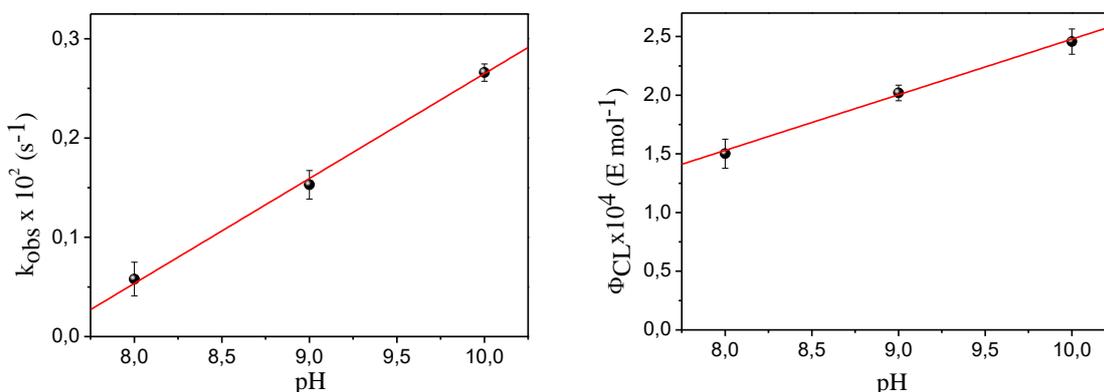


Figura 28: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão (k_{obs}) e do rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) na reação das microesferas de acetato de celulose com a variação do pH, $[\text{RUB}]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_f = 1,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

Com a finalidade de se comparar o comportamento da reação peroxioxalato em microesferas feitas com polímeros de celulose de diferente hidrofobicidade, experimentos cinéticos de emissão foram efetuados em microesferas do éster misto acetato butirato de celulose. O método de preparação foi igual ao descrito anteriormente e utilizaram-se as mesmas proporções dos reagentes nas microesferas.

Inicialmente estudou-se o efeito do pH em tampão borato e foram registrados os perfis cinéticos de emissão (**Figura 29**) dos quais se obtiveram os parâmetros k_{obs} e Φ_{CL} (**Tabela 26**).

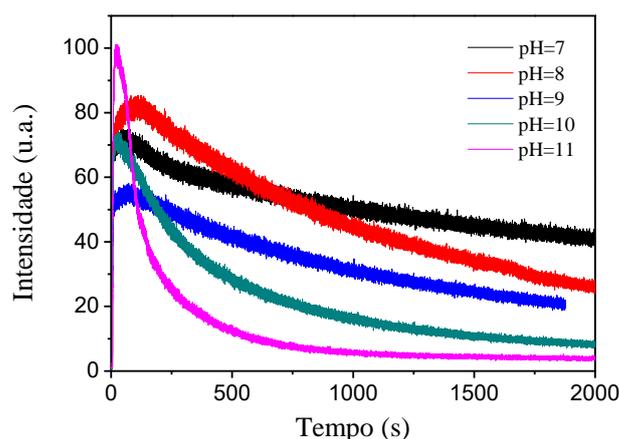


Figura 29: Exemplo dos perfis cinéticos de emissão de luz para a reação peroxioxalato usando microesferas de acetato butirato de celulose preparadas pelo método padrão em tampão borato (100 mmol L^{-1}) variando o pH. $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{RUB}]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabela 26: Efeito do pH na constante de velocidade de decaimento de emissão (k_{obs}) e no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) na reação peroxioxalato usando microesferas de acetato butirato de celulose preparadas pelo método padrão em tampão borato 100 mmol L^{-1} .

pH	$k_{\text{obs}} \times 10^2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\Phi_{\text{CL}} \times 10^4 \text{ (E mol}^{-1}\text{)}$
7	$0,079 \pm 0,007$	$9,3 \pm 0,4$
8	$0,085 \pm 0,001$	$7,9 \pm 0,2$
9	$0,090 \pm 0,007$	$4,3 \pm 0,5$
10	$0,229 \pm 0,007$	$3,52 \pm 0,04$
11	$0,66 \pm 0,02$	$1,89 \pm 0,04$

A $25 \text{ }^\circ\text{C}$ $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{RUB}]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Observou-se um incremento da k_{obs} com o pH do meio sendo que os k_{obs} permanecem constante para valores de pH entre 7 e 9 e aumentam significativamente para os valores de pH 10 e 11. Os valores de k_{obs} aumentaram uma ordem de grandeza do menor valor de pH para o maior (**Tabela 26**). Nesse caso, ao contrário do que foi observado com as microesferas de acetato de celulose, os rendimentos Φ_{CL} diminuíram com a crescente alcalinidade do meio.

Também foi estudado o efeito da concentração de H_2O_2 a qual foi correlacionada com os parâmetros k_{obs} , I_0 e Φ_{CL} obtidos dos perfis cinéticos de emissão (**Tabela 27**). Os estudos foram realizados em $\text{pH} = 10$.

Tabela 27: Efeito da $[H_2O_2]$ na constante de velocidade de decaimento de emissão (k_{obs}), na intensidade máxima de emissão (I_0) e no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) na reação das microesferas de acetato butirato de celulose preparadas pelo método padrão em pH=10.

$[H_2O_2]$ (mmol L ⁻¹)	$k_{obs} \times 10^2$ (s ⁻¹)	$I_0 \times 10^{13}$ (E s ⁻¹)	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)
2,0	0,155 ± 0,007	0,9 ± 0,05	0,87 ± 0,05
5,0	0,157 ± 0,004	1,5 ± 0,1	1,71 ± 0,1
10,0	0,159 ± 0,002	2,3 ± 0,2	2,92 ± 0,2
20,0	0,167 ± 0,01	4,5 ± 0,1	3,5 ± 0,5
50,0	0,181 ± 0,01	6,0 ± 0,3	5,14 ± 0,3
100	0,212 ± 0,01	7,5 ± 0,8	7,92 ± 0,7
200	0,236 ± 0,02	9,1 ± 0,5	8,5 ± 0,7
500	0,282 ± 0,01	9,2 ± 0,4	8,4 ± 0,7
1000	0,34 ± 0,02	9,1 ± 0,7	8,5 ± 0,3

A 25 °C; pH = 10, $[RUB]_f = 1,0$ mmol L⁻¹, $[TCPO]_f = 2,2$ mmol L⁻¹.

O efeito da concentração do H_2O_2 apresentou um comportamento similar ao observado nas microesferas de acetato de celulose tanto na k_{obs} quanto na I_0 e nos Φ_{CL} , sendo que estes parâmetros aumentam com o incremento da concentração de H_2O_2 .

Estudou-se o efeito na proporção das microesferas no meio tamponado em pH = 10, registrando-se os perfis cinéticos de emissão dos quais se obtiveram os parâmetros k_{obs} e Φ_{CL} (**Tabela 28**). Também foi observado que a quantidade de microesferas não influenciou na k_{obs} nem nos Φ_{CL} , podendo-se extrair uma média de $(0,222 \pm 0,005) \times 10^{-2}$ (s⁻¹) e $(3,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ E mol⁻¹ respectivamente (**Figura 30**).

Tabela 28: Efeito da proporção das microesferas na constante de emissão (k_{obs}) e no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) na reação das microesferas de acetato butirato de celulose preparadas pelo método padrão em tampão borato 100 mmol L⁻¹.

Vesferas (%)	$k_{obs} \times 10^2$ (s ⁻¹)	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)
25	0,22 ± 0,001	3,7 ± 0,9
30	0,217 ± 0,004	4,0 ± 0,8
40	0,23 ± 0,01	3,4 ± 1
50	0,225 ± 0,002	3,5 ± 0,7
75	0,219 ± 0,001	3,8 ± 0,6

A 25 °C; $[H_2O_2] = 100$ mmol L⁻¹; pH = 10.

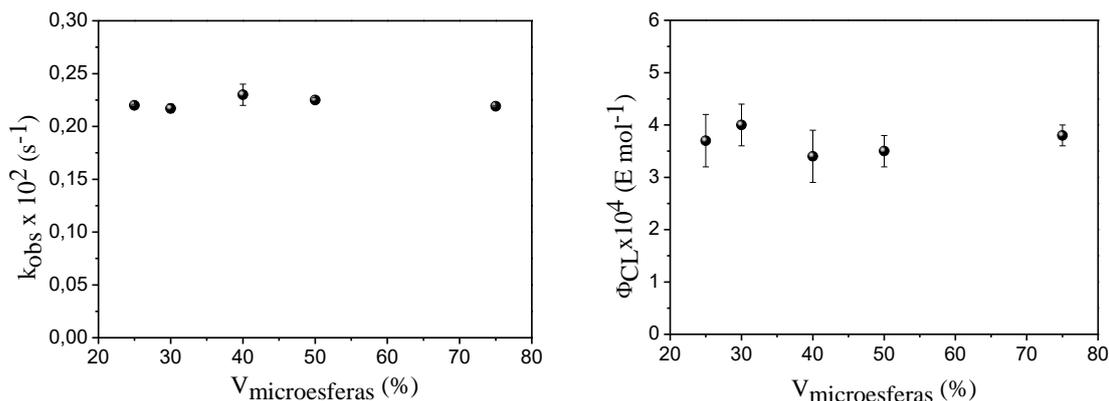


Figura 30: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão (k_{obs}) e do rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) com a variação da proporção das microsferas de acetato butirato de celulose preparadas pelo método padrão.

Foi também estudada a estabilidade das microsferas incubando-as em tampão borato pH=10 por vários períodos de tempo e medindo sua quimiluminescência em resposta ao peróxido de hidrogênio (100 mmol L^{-1}). Não foi observada uma variação significativa nas k_{obs} nem nos Φ_{CL} com o incremento do tempo (**Figura 31**). Estes resultados demonstraram que as microsferas protegem o éster oxálico da hidrólise por um tempo relativamente longo.

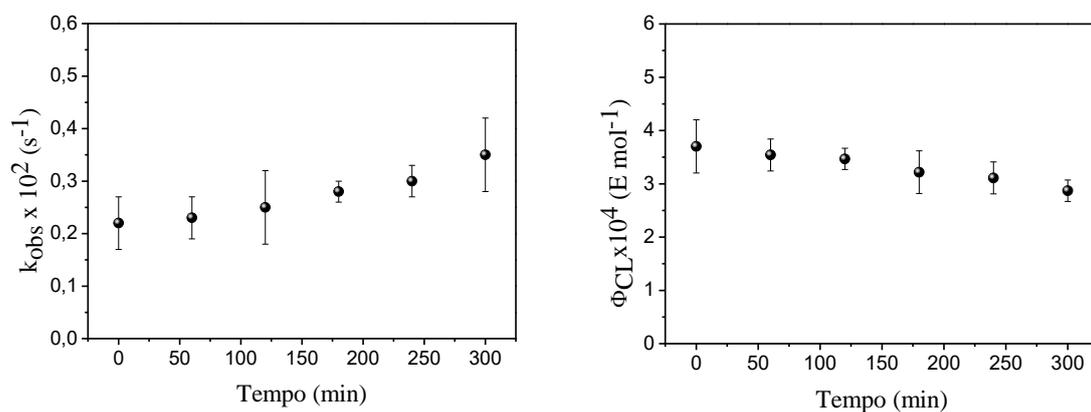


Figura 31: Dependência da k_{obs} e os Φ_{CL} na reação de H_2O_2 (100 mmol L^{-1}) com as microsferas de acetato butirato de celulose preparadas pelo método padrão mantidas em pH = 10 com o tempo de armazenamento.

De forma a se comparar os rendimentos quânticos de quimiluminescência num meio exclusivamente aquoso usando tampão borato e os rendimentos usando microsferas de

acetato butirato de celulose, experimentos cinéticos de emissão foram conduzidos nas mesmas condições experimentais. Foi usado o rubreno sulfonado como ativador nos estudos em meio totalmente aquoso e o rubreno nas microesferas. Os valores dos rendimentos quânticos de quimiluminescência apresentados na **Figura 32** mostraram ser várias ordens de magnitude maiores no caso das microesferas. Isso demonstra que a eficiência da reação peroxioxalato pode ser incrementada encapsulando o éster oxálico e o ativador em microesferas de acetato butirato de celulose.

Determinou-se o diâmetro hidrodinâmico das microesferas por espalhamento dinâmico de luz em água e tampão borato em pH = 10 (**Figura 33 e 34**). Foi verificado que o diâmetro não muda quando as microesferas são suspensas num meio mais alcalino sendo o valor destes 1423 ± 677 nm (água), 1375 ± 543 nm (pH=10) e 1280 ± 856 nm (água), 1337 ± 420 nm (pH = 10) para as microesferas de acetato de celulose e acetato butirato de celulose, respectivamente.

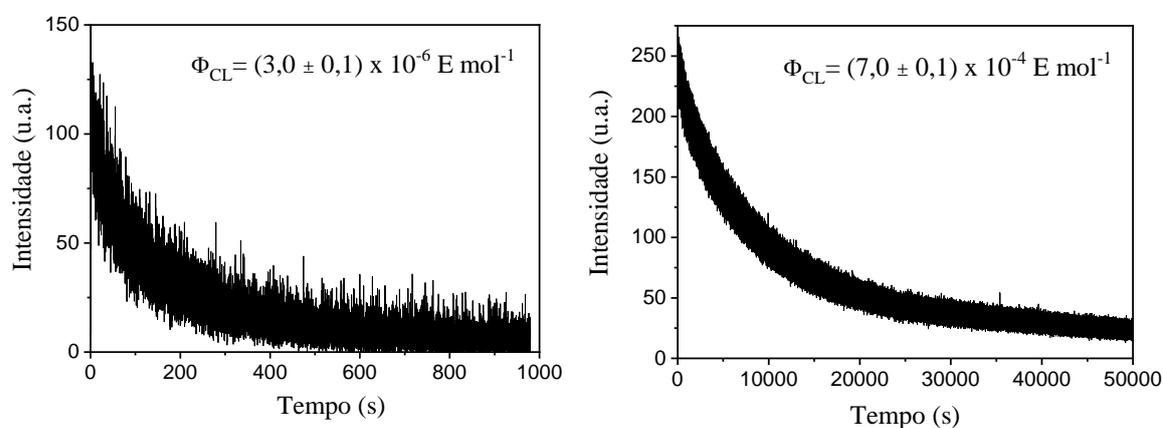


Figura 32: Exemplos dos perfis cinéticos de emissão da reação peroxioxalato em tampão borato (100 mmol L^{-1}) pH = 8,2 usando rubreno sulfonado ($1,14 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$) como ativador (esquerda) num voltagem e fenda da fotomultiplicadora de 1000V/20nm respectivamente e em microesferas de acetato butirato de celulose usando rubreno ($1,14 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$) como ativador (direita), 800V/20nm. $[\text{TCPO}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$

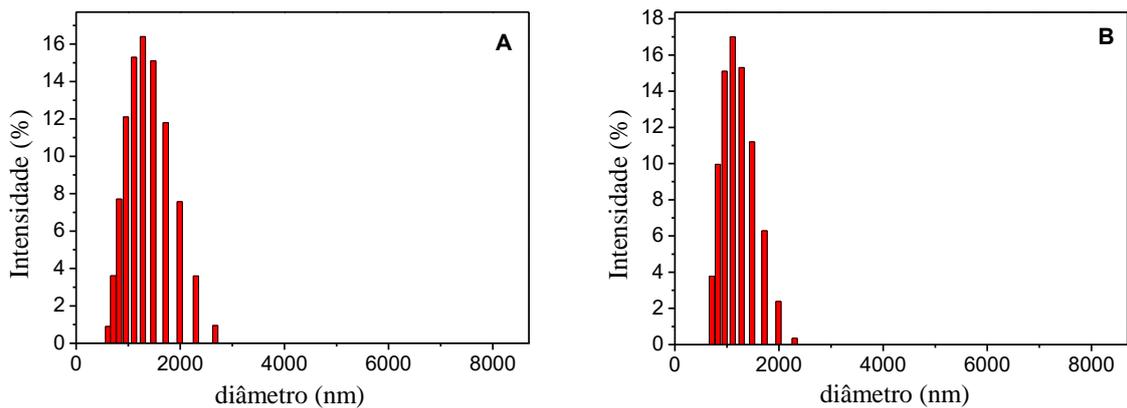


Figura 33: Espalhamento dinâmico de luz das microesferas de acetato de celulose em (A) água (B) tampão borato (100 mmol L^{-1}) pH=10.

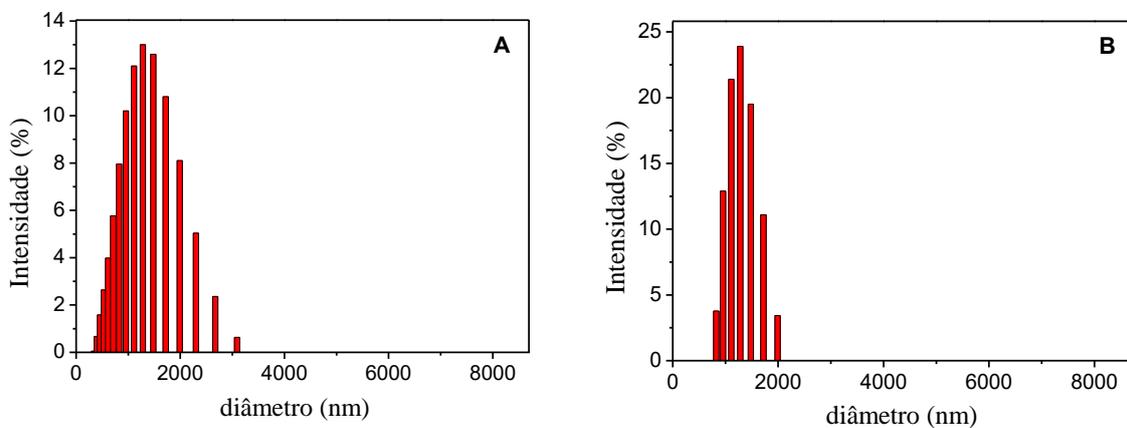


Figura 34: Espalhamento dinâmico de luz das microesferas de acetato butirato de celulose em (A) água (B) tampão borato (100 mmol L^{-1}) pH=10.

A partir dos resultados obtidos com as microesferas baseadas no sistema peroxioxalato, experimentos de estabilidade dessas e dos reagentes encapsulados foram realizados tanto armazenando as amostras liofilizadas quanto as suspensões aquosas das microesferas. Nesses estudos, várias amostras de esferas de acetato de celulose e acetato butirato de celulose com TCPO e rubreno foram preparadas usando o mesmo procedimento anteriormente descrito e estas foram liofilizadas e mantidas secas na geladeira. Após diferentes tempos de armazenamento, as amostras foram ressuspensas em água e sujeitas à reação com peróxido de hidrogênio. Observou-se um aumento significativo da intensidade de emissão da amostra de acetato de celulose liofilizada e diretamente ressuspensa em água, em comparação às amostras não liofilizadas (**Figura**

35A). Na amostra de acetato butirato de celulose, as duas amostras possuem intensidades similares, porém, a liofilizada apresenta decaimento de intensidade mais lenta, levando a um rendimento quântico maior (**Figura 35B**).

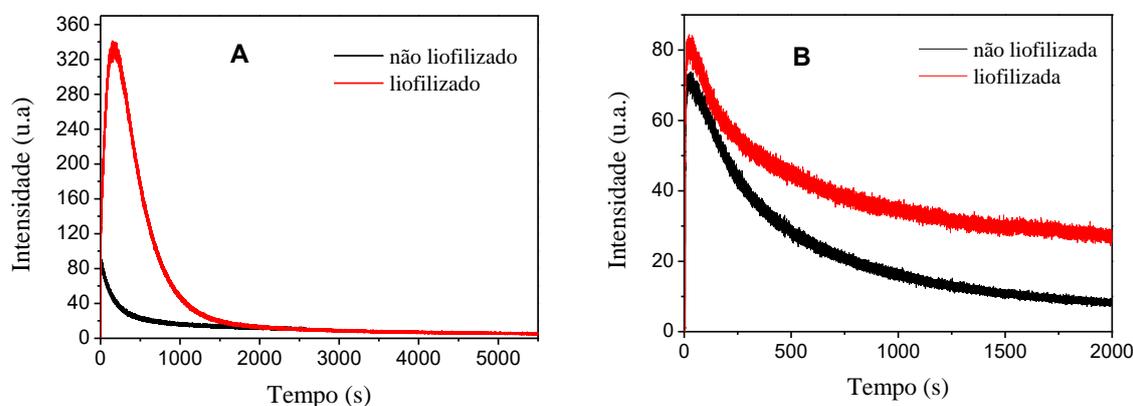


Figura 35: Exemplos de perfis cinéticos de emissão das amostras liofilizadas e não liofilizadas obtidas pelo método padrão de **A)** acetato de celulose, **B)** acetato butirato de celulose em tampão borato (100 mmol L^{-1}), $\text{pH} = 10$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$.

As amostras hidratadas dos dois tipos de microesferas foram mantidas em água por vários dias a temperatura ambiente, estudando-se sua estabilidade através de experimentos de emissão de luz. A partir da integração direta dos perfis cinéticos (**Figura 36**) determinou-se o rendimento quântico em dependência com o tempo de incubação em água (**Tabela 29**).

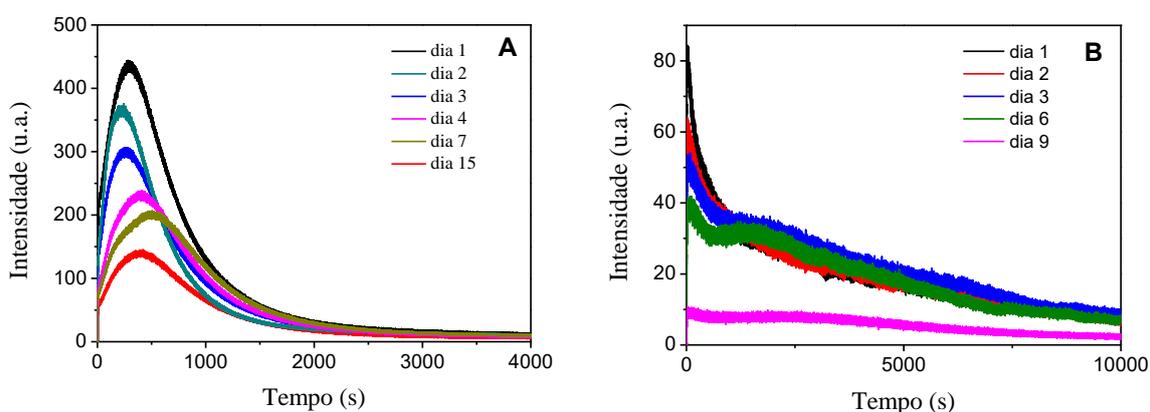


Figura 36: Perfis cinéticos de emissão das amostras liofilizadas mantidas por 1 dia na geladeira, ressuspensas em água e mantidas por tempos diferentes e sujeitos a reação com peróxido de hidrogênio (100 mmol L^{-1}) em tampão borato (100 mmol L^{-1}), $\text{pH} = 10$, **A)** acetato de celulose, **B)** acetato butirato de celulose.

Tabela 29: Efeito do tempo de incubação em água das microesferas obtidas pelo método padrão após 1 dia liofilizadas no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL})

AcCel		AcButCel	
Tempo (dias)	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)	Tempo (dias)	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)
1	29,8 ± 0,4	1	20 ± 2
2	21 ± 1	2	19 ± 2
3	21,0 ± 0,5	3	17 ± 1
4	19,2 ± 0,8	6	16 ± 1
7	19 ± 1	9	5,5 ± 0,4
15	12,0 ± 0,5	-	-

pH = 10, [H₂O₂] = 100 mmol L⁻¹, [RUB]_f = 1,0 mmol L⁻¹, [TCPO]_f = 2,2 mmol L⁻¹.

Após sete (07) dias da preparação das amostras liofilizadas e mantidas secas na geladeira, experimentos de emissão também foram realizados para verificar a estabilidade dessas em água. A partir da integração direta dos perfis cinéticos (**Figura 37**) foram determinados os rendimentos quânticos (**Tabela 30**).

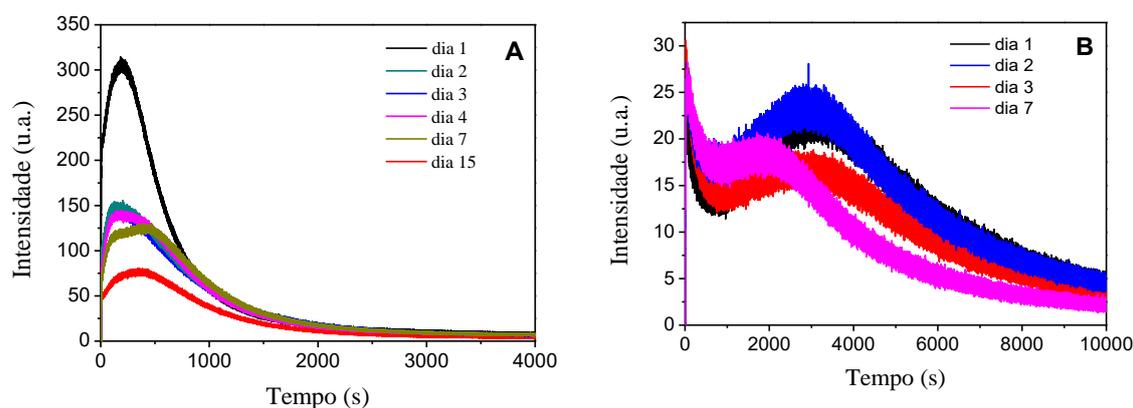


Figura 37: Perfis cinéticos de emissão das amostras liofilizadas mantidas por 7 dias na geladeira, resuspendidas em água por tempos diferentes e sujeitos a reação com peróxido de hidrogênio (100 mmol L⁻¹) em tampão borato (100 mmol L⁻¹), pH = 10, **A**) acetato de celulose, **B**) acetato butirato de celulose.

Tabela 30: Efeito do tempo de incubação em água das microesferas obtidas pelo método padrão após 7 dias liofilizadas no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}).

AcCel		AcButCel	
Tempo (dias)	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)	Tempo (dias)	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)
1	17,6 ± 0,5	1	12,3 ± 0,5
2	12,3 ± 0,2	2	12 ± 1
3	12,0 ± 0,4	3	9,5 ± 0,8
4	12,0 ± 0,5	7	7 ± 1
7	11,9 ± 0,7	-	-
15	7,2 ± 0,9	-	-

pH = 10, [H₂O₂] = 100 mmol L⁻¹, [RUB]_f = 1,0 mmol L⁻¹, [TCPO]_f = 2,2 mmol L⁻¹.

Finalmente, após 21 dias de preparação das amostras, também foi estudada a estabilidade dessas em água. Da integração direta dos perfis cinéticos (**Figura 38**) de emissão foram obtidos os rendimentos quânticos (**Tabela 31**).

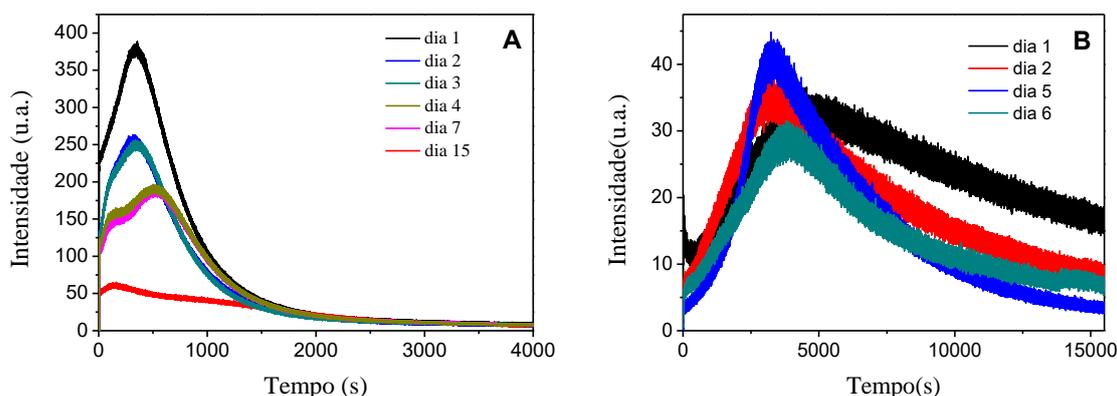


Figura 38: Perfis cinéticos de emissão das amostras liofilizadas mantidas por 21 dias na geladeira, ressuspendidas em água por tempos diferentes e sujeitos a reação com peróxido de hidrogênio (100 mmol L⁻¹) em tampão borato (100 mmol L⁻¹), pH = 10, **A**) acetato de celulose, **B**) acetato butirato de celulose.

Tabela 31: Efeito do tempo de incubação em água das microesferas obtidas pelo método padrão após 21 dias liofilizadas no rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}).

AcCel		AcButCel	
Tempo (dias)	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)	Tempo (dias)	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)
1	25 ± 1	1	38 ± 4
2	18 ± 2	2	25 ± 1
3	18 ± 1	5	19 ± 2
4	16,8 ± 0,8	6	18 ± 3
7	15,8 ± 0,7	-	-
15	8 ± 1	-	-

pH = 10, [H₂O₂] = 100 mmol L⁻¹, [RUB]_f = 1,0 mmol L⁻¹, [TCPO]_f = 2,2 mmol L⁻¹.

Perfis cinéticos de emissão diferentes foram obtidos após 21 dias da preparação e liofilização dessas amostras (**Figura 38**). Em todos os casos foi observado uma diminuição dos rendimentos quânticos com o tempo de incubação em água tanto para as microesferas liofilizadas de acetato de celulose quanto para as de acetato butirato de celulose.

4. Discussão

4.1 Hidrólise de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) em diferentes misturas de solventes moleculares e água.

Misturas binárias de água e solventes orgânicos são extensivamente empregadas em sínteses orgânicas e em estudos de mecanismos de reação.⁸³⁻⁸⁵ O maior interesse em utilizar misturas binárias para estudos mecanísticos é o fato que, nestas misturas, as propriedades do meio podem ser continuamente variadas simplesmente alterando a proporção entre os dois componentes. Além disso, misturas binárias entre solventes apolares e polares permitem efetuar reações contendo tanto reagentes polares quanto apolares.

O conhecimento da cinética de hidrólise de ésteres oxálicos é importante para a utilização da reação peroxioxalato em meio aquoso devido à ocorrência dessa reação, que diminui o rendimento quântico de quimiluminescência. Portanto, para a aplicação analítica dessa reação seria importante estabelecer condições reacionais para executar essa transformação em meios ao menos parcialmente aquosos.

Neste trabalho, foi possível se estudar a hidrólise do oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) em misturas aquosas de três solventes moleculares diferentes: 1,2-dimetoxietano (DME), acetonitrila (ACN), e 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). Os experimentos foram seguidos por absorção no UV-Vis a partir da formação de 2,4,6-triclorofenila (TCP) em 296 nm. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) de formação de TCP pelo hidrólise de TCPO apresentaram desvios bastante significativos do comportamento ideal, correlação linear entre o k_{obs} e a fração molar da água nas três misturas de SM : água (**Figura 39, esquerda**). Em todos os casos, o aumento da velocidade para frações molares baixas de água, se mostrou pequeno, indicando uma clara ocorrência de uma solvatação preferencial do éster oxálico pelo solvente molecular, levando a uma proteção deste da hidrólise.

Com o intuito de se estudar melhor o efeito do meio, os resultados foram comparados com a hidrólise do carbonato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPC) nas mesmas condições experimentais. A **Figura 39** mostra uma diferença muito significativa no comportamento para ambos ésteres. Os dados obtidos nas diferentes misturas binárias SM : H₂O mostraram que a reação do TCPO aparentemente é pouco sensível a efeitos do meio. Notou-se que as k_{obs} são similares nas três misturas binárias. No entanto, para a reação com DNPC, a constante de velocidade mostrou-se dependente tanto da concentração da água quanto da natureza dos solventes moleculares. Além disso, para a reação em DME foi observado um comportamento quase ideal.

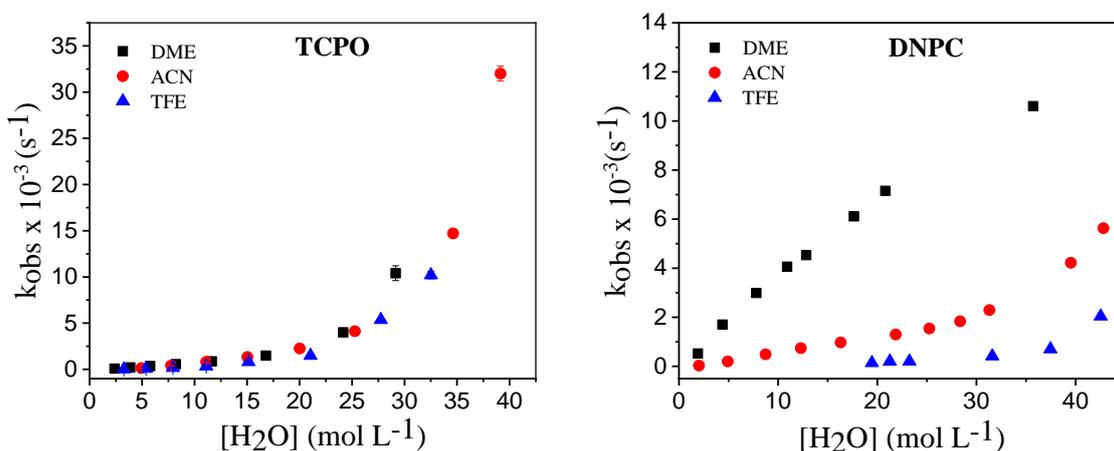


Figura 39: Dependência da constante de velocidade de aumento de absorvância (k_{obs}) com o incremento da fração molar de H₂O na reação de hidrólises do TCPO e DNPC em diferentes meios aquosos.

Para ambas as reações, foi observado que a velocidade é menor nas misturas TFE : H₂O. Estes resultados são esperados devido à acidez do solvente molecular em relação aos outros o que faz que diminua a nucleofilicidade da água. No caso de DNPC a velocidade de reação mostrou-se bem maior em misturas binárias de DME. Esse resultado poderia ser explicado tendo em vista que o DME, ao ser consideravelmente mais básico que a ACN⁸⁶, está agindo como uma base geral para a molécula de água que ataca o éster, como mostrado na **Figura 40**.

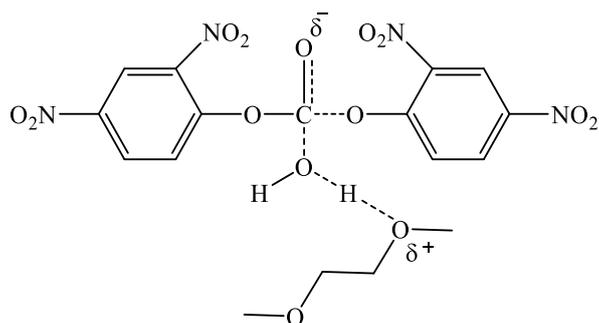


Figura 40: Estrutura de estado de transição sugerida para a reação de hidrólise de DNPC na presença de DME.

No entanto, como foi observado que, aparentemente, o meio reacional não tem muita influência na constante de velocidade de hidrólise do TCPO, poderia se dizer que essa reação, ou seja, o ataque da água ao grupo carbonila do éster, ocorre através de uma catálise intramolecular (**Figura 41**). Como discutido anteriormente, uma possível explicação na diferença do comportamento na hidrólise de carbonatos em relação aos oxalatos nos diferentes meios de reação poderia ser devido ao tipo de catálise promovida. Visto que na reação com TCPO os valores da constante de velocidade não variaram significativamente nas diferentes misturas e dado a diferença de basicidade do DME em comparação à ACN, pode-se supor que a catálise básica geral do solvente na hidrólise dos carbonatos é substituída, nesse caso, por uma catálise intramolecular pela carboxila adjacente do TCPO.

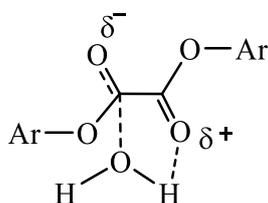


Figura 41: Catálise básica geral intramolecular pelo oxigênio carboxílico do grupo éster adjacente do TCPO.

Efeitos de solventes na velocidade de uma reação podem ser entendidos em termos da teoria do estado de transição. Um aumento da constante de velocidade pode resultar de um decréscimo de entalpia do estado de transição. Portanto, uma vez conhecido o comportamento da reação com o incremento da temperatura do sistema nas três misturas

aquosas, foi determinada a energia de ativação (E_a) correlacionando-se $\ln(k_1)$ com $1/T$ a partir da equação de Arrhenius (**Equação 4**). Também foram determinados os parâmetros de ativação (**Tabela 32**) a partir dos gráficos de Eyring (**Equação 5**) correlacionando-se $\ln(k_1/T)$ com $1/T$ (**Figura 42**).

$$\ln k_1 = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

(Equação 4)

$$\ln \frac{k_1}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}$$

(Equação 5)

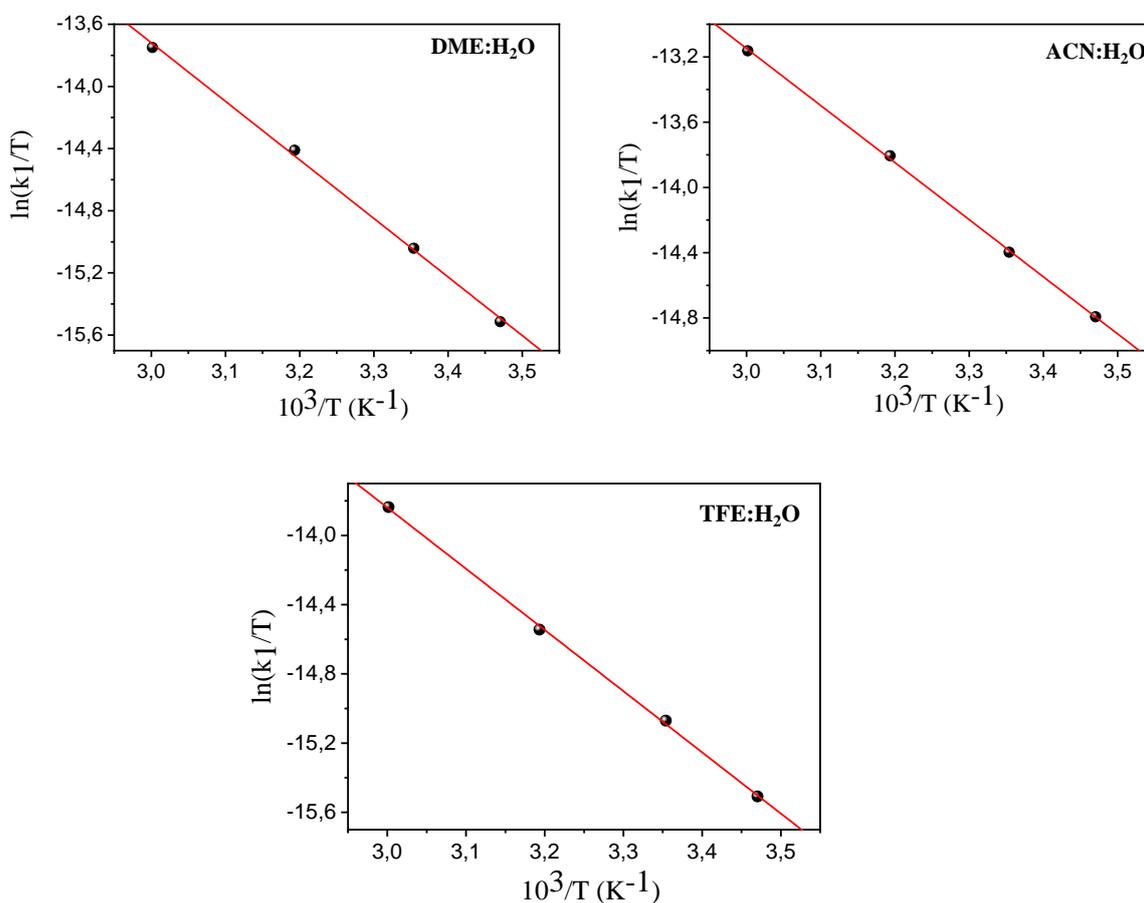


Figura 42: Gráfico de Eyring correspondente à reação de hidrólise do TCPO nas misturas SM : H₂O com $\chi_{H_2O} = 0,7$.

Tabela 32: Parâmetros de ativação na hidrólise do TCPO numa fração molar da água igual a 0,7 em diferentes solventes moleculares.

Parâmetros de Ativação	DME	ACN	TFE
	kcal/mol		
E_a	$8,1 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,1$
ΔH^\ddagger	$7,5 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,1$
$-T(\Delta S^\ddagger)$	$15,5 \pm 0,3$	$15,6 \pm 0,1$	$15,8 \pm 0,2$
ΔG^\ddagger	$23,0 \pm 0,4$	$22,4 \pm 0,2$	$22,8 \pm 0,3$

T= 298,15 K

É possível observar-se que os parâmetros de ativação são bastantes próximos nos três meios de reação numa fração molar da água igual a 0,7 (**Tabela 32**). Estes resultados confirmam que a reação de hidrólises do TCPO é pouco sensível a efeitos do meio. Devido à alta reatividade do éster, espera-se que esta reação tenha valores de ΔH^\ddagger baixos. Os valores de ΔS^\ddagger altamente negativos sugerem um estado de transição do passo limitante altamente ordenado, indicando um alto grau de solvatação pela água.

Uma vez conhecida a hidrólise do TCPO nas misturas aquosas dos solventes moleculares, foram efetuados experimentos cinéticos de emissão da reação de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) e H_2O_2 em misturas SM : H_2O onde a concentração final de água ($[H_2O]_f$) foi de 3 mmol L^{-1} . Nesses meios de reação a constante de velocidade k_{obs} se mostrou linearmente dependente da concentração de H_2O_2 tanto em misturas de DME : H_2O quanto em ACN : H_2O (**Figuras 2 e 3 esquerda, p 39**). Em meio aquoso é sabido que o TCPO sofrerá hidrólise (**Esquema 15**). Entretanto, espera-se que o fato de que H_2O_2 é mais nucleofílico do que a água, devido ao efeito alfa, aumente o rendimento da via de consumo do éster oxálico por peridrólise, levando à formação de intermediários importantes da reação peroxioxalato (ácido peroxálico).

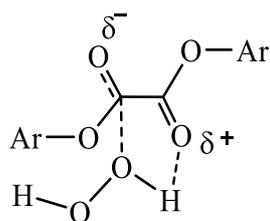


Figura 43: Catálise básica geral intramolecular pelo oxigênio carboxílico do grupo éster adjacente do TCPO.

Além de poder acontecer uma catálise intramolecular, tanto pela água quanto pelo peróxido, um fator importante a considerar é a polaridade do meio que afeta também a constante de velocidade. Portanto, uma possível explicação aos resultados obtidos poderia ser devido à ACN ser um solvente mais polar que o DME ⁸⁶, portanto o meio de reação ajuda a estabilizar mais o estado de transição.

Os resultados obtidos na peridrólise de TCPO em mistura TFE : H₂O, tanto por emissão quanto por absorção, mostram claramente um comportamento cinético muito distinto nesta mistura ao comparar com as misturas com os outros SM. Pela forma do gráfico de k_{obs} versus a [H₂O₂], pode-se entender que na equação cinética deve existir um termo com ordem maior que um para a concentração do peróxido. De fato, foi possível ajustar a correlação com uma função que contém um termo de primeira e um termo de segundo ordem para a [H₂O₂]. Um ajuste deste tipo foi utilizado anteriormente pelo grupo para racionalizar a dependência da constante de velocidade com a concentração de imidazol na reação de TCPO catalisada por esta base nucleofílica em solventes apróticos como acetato de etila³⁵. A observação de um termo de segunda ordem para a [imidazol] na lei de velocidade foi interpretada como uma catálise básica geral pelo imidazol a partir do ataque nucleofílico dele próprio ao éster oxálico, indicando a ocorrência de catálise nucleofílica pelo imidazol nessa transformação. Entretanto, no caso da reação de TCPO com peróxido de hidrogênio em meio aquoso de TFE parece difícil imaginar uma

4.3 Estudo cinético do sistema peroxioxalato em misturas 1,2-dimetoxietano: água

Poucos estudos mecanísticos do sistema peroxioxalato têm sido realizados em meio aquoso, apesar de ser uma importante ferramenta para fins analíticos. Por outro lado, os oxalatos com substituintes que retiram elétrons, como o oxalato de bis (2,4-dinitrofenil) (DNPO) e o oxalato de bis (2,4,6-triclorofenil), são cada vez mais utilizados em sistemas de análise de traços baseados na quimiluminescência deste sistema.⁸⁷ De forma a se comparar o mecanismo da reação peroxioxalato usando estes dois ésteres com reatividade diferentes, foram efetuados experimentos cinéticos de emissão da reação tanto de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) como de oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) em misturas aquosas de 1,2-dimetoxietano (DME:H₂O). Optou-se por utilizar o DME devido a sua miscibilidade em água⁸⁸, além de não reagir com nenhum componente do sistema usado nos ensaios cinéticos. Descartou-se as misturas acetonitrila:água devido às soluções de H₂O₂ preparadas em ACN decomporem-se com o tempo, além do fato de que quando água e acetonitrila são misturados, a água pode formar aglomerados que influenciam no comportamento dos solutos.⁸⁹ Também não foram utilizadas nestes estudos as misturas aquosas de TFE já que foi observado um comportamento bem diferente do sistema nesses meios.

4.3.1 Mecanismo da reação de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) com H₂O₂ catalisada por IMI-H em misturas 1,2-dimetoxietano: água

Primeiramente, foi observado que o incremento da quantidade de água no meio causou um aumento linear da constante de velocidade k_{obs} tanto em misturas DME : H₂O quanto em EtOAc : H₂O. Para ambos meios de reação a concentração dos outros reagentes (TCPO, H₂O₂, IMI-H e DPA) foram mantidas inalteradas (**Figura 11, p 51**). O incremento da k_{obs} com quantidades acrescidas de água pôde ser explicado considerando duas possibilidades: (i) hidrólise do éster oxálico que deveria levar à formação do ácido

oxálico, em uma via responsável pela redução dos rendimentos de emissão do sistema;
(ii) efeito de solvente devido ao aumento da polaridade do meio, levando ao consequente aumento da velocidade tanto da reação de hidrólise quanto da peridrólise.

Os valores dos rendimentos quânticos singlete incrementaram inicialmente com o aumento da concentração da água e seguidamente foi observado uma diminuição significativa, de mais de uma ordem de grandeza para maiores concentrações. Notou-se que tal diminuição começou a partir de uma fração molar de 0,06 ($[H_2O] = 0,7 \text{ mol L}^{-1}$) (**Figura 13, p 52**). A possível explicação para esses resultados será discutida mais adiante.

A constante de velocidade de decaimento k_{obs} mostrou dependência com a $[IMI-H]$ para todas as misturas DME : H_2O estudadas (**Figura 7 esquerda, p 44**) e do ajuste de k_{obs} foram obtidos valores para as constantes de velocidade bi e trimolecular correspondentes (**Tabela 34**).

Tabela 34: Valores das constantes de velocidade bimolecular ($k_{1(2)}$) e trimolecular ($k_{1(3)}$) obtidas da dependência de k_{obs} com $[IMI-H]$ na reação de TCPO com H_2O_2 em diferentes misturas DME : H_2O .

χ_{H_2O}	$k_{1(2)}$ ($L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$k_{1(3)}$ ($L^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	$[H_2O]$ (mol L^{-1})
0,00	$3,4 \pm 0,1$	1100 ± 50	0,00
0,040	$3,71 \pm 0,08$	900 ± 11	0,46
0,10	$5,9 \pm 0,2$	700 ± 30	1,20
0,20	$8,5 \pm 0,4$	600 ± 100	2,60
0,30	$11,8 \pm 0,4$	400 ± 50	4,41
0,40	$12,2 \pm 0,6$	500 ± 100	5,77
0,50	$13,8 \pm 0,2$	200 ± 100	8,21
0,60	$18,3 \pm 0,9$	100 ± 200	11,6

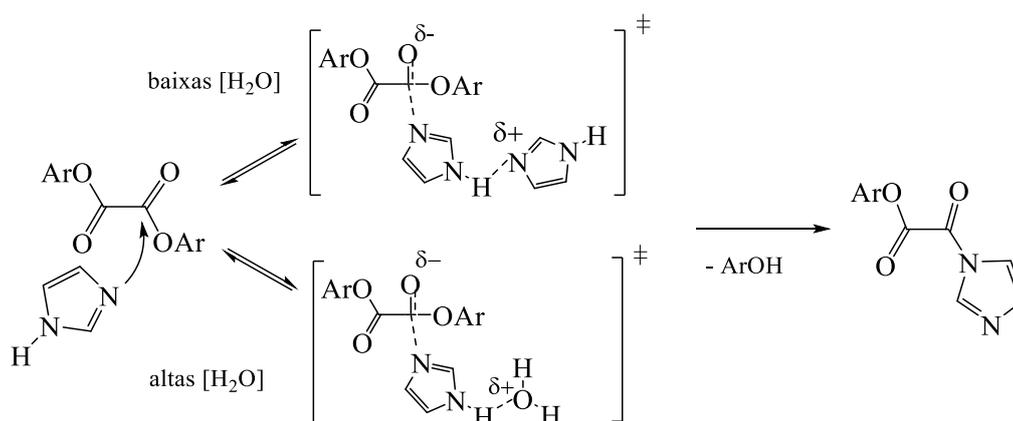
Analisando inicialmente os valores das constantes determinados em DME puro obtidos por emissão pode-se dizer que estão em excelente acordo ao determinado anteriormente por nosso grupo de pesquisa para acetato de etila³³ (**Tabela 35**). Estes resultados sugerem que o mecanismo envolvido na reação peroxioxalato de TCPO e H_2O_2 catalisada por IMI-H em DME é o mesmo para essa transformação em EtOAc.

Tabela 35: Valores das constantes de velocidade bimolecular ($k_{1(2)}$) e trimolecular ($k_{1(3)}$) obtidas da dependência de k_{obs} com $[\text{IMI-H}]$ em DME e EtOAc.

Solvente	$k_{1(2)}$ ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$k_{1(3)}$ ($\text{L}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$)
^a EtOAc	$3,2 \pm 0,6$	900 ± 100
^b DME	$3,4 \pm 0,1$	1100 ± 50

^aValores da ref.³⁶ ^b Nestes estudos.

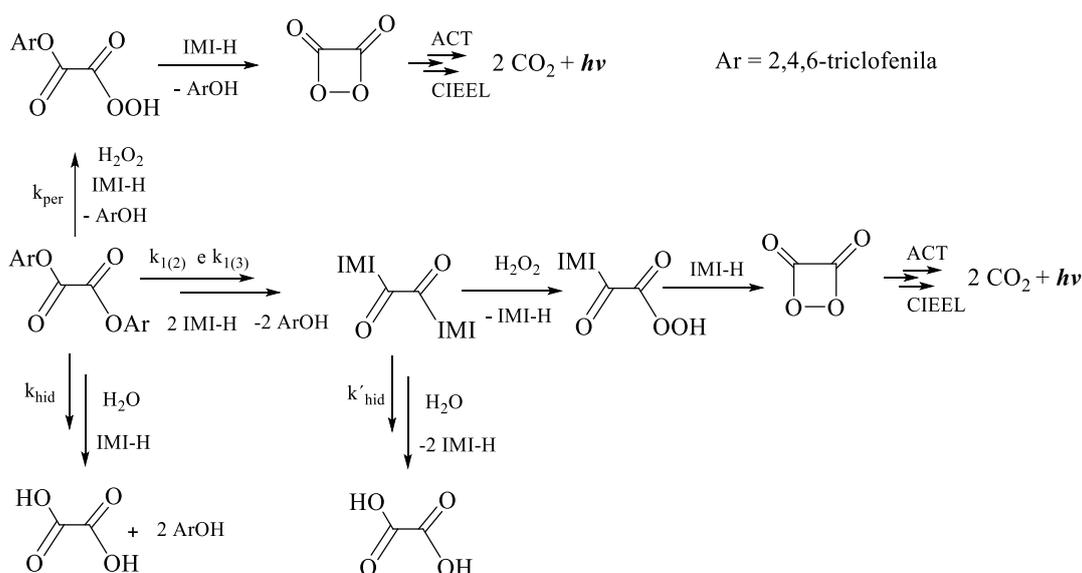
Observa-se que o aumento da quantidade de água no meio de reação aumentou os valores da constante de velocidade bimolecular $k_{1(2)}$ a qual estaria associada à decomposição do TCPO por ataque nucleofílico por imidazol (envolvendo somente uma molécula de IMI-H) (**Tabela 34**). Este comportamento pode ser entendido supondo-se que a água possa agir como catalisador básico geral nessa etapa. O aumento de $k_{1(2)}$ também pode ser entendido simplesmente como um efeito do meio mais polar com o incremento da quantidade de água. Por outro lado, os valores da constante de velocidade trimolecular $k_{1(3)}$ (constante associada ao passo que engloba duas moléculas de IMI-H e uma de TCPO) apresentam uma tendência contrária: ocorre a diminuição de $k_{1(3)}$ com o aumento da $\chi_{\text{H}_2\text{O}}$. Um aumento da quantidade de água no sistema favorece a formação de ligações de hidrogênio entre o imidazol e a água, meio pelo qual a contribuição do termo trimolecular que surge em função do imidazol vai diminuir com o aumento da concentração da água (**Esquema 16**).



Esquema 16: Ataque nucleofílico do imidazol ao TCPO com catálise básica por outra molécula de imidazol em baixas $[\text{H}_2\text{O}]$ e com catálise básica pela água em altas $[\text{H}_2\text{O}]$.

Da variação da $[H_2O_2]$ foi obtida uma dependência linear com os valores da k_{obs} em cada uma das diferentes misturas DME : H_2O (**Figura 8 esquerda, p 46**). Embora tenha sido observada esse comportamento, o incremento da k_{obs} não foi muito significativo tendo em vista que a concentração do H_2O_2 foi aumentada 20 vezes, desde o menor até o maior valor. A partir do ajuste linear foi possível obter constantes de hidrólise (k_{hid}) e peridrólise (k_{per}) (**Tabela 12, p 46**). Um incremento de água causou um aumento da k_{hid} conforme esperado devido à polaridade do meio reacional. Por outro lado, os valores de k_{per} mostraram uma leve diminuição com a crescente fração molar de água. Também foi observado indiretamente nos ensaios de absorção nas diferentes misturas DME : H_2O que a decomposição de TCPO para o fenol correspondente acontece mesmo na ausência de H_2O_2 (**Figura 9, p 47**). As constantes de velocidade obtidas nesses experimentos mostraram-se dependentes da concentração do nucleófilo água, sendo que esses valores correspondem à decomposição não quimiluminescente do TCPO (**Tabela 13, p 47**).

A partir das observações experimentais efetuadas, conclui-se que a reação peroxioxalato de TCPO com H_2O_2 em meios aquosos de DME, catalisada por IMI-H, pode ocorrer a partir do seguinte mecanismo (**Esquema 17**).



Esquema 17: Mecanismo para a reação peroxioxalato de TCPO e H_2O_2 em misturas aquosas de DME, com catálise por IMI-H.

Analisando o mecanismo proposto, em uma primeira etapa, o TCPO é atacado por duas moléculas de IMI-H formando o intermediário 1,1'-oxalildiimidazolídico, sendo que o segundo grupo fenólico é substituído mais rapidamente que o primeiro.³⁵ Esse processo pode ocorrer por catálise geral pelo próprio imidazol ou por água. Em seguida ocorre o ataque do peróxido de hidrogênio ou da água presente no meio a tal intermediário. Ambos os processos devem ter alta eficiência dada a reatividade do 1,1'-oxalildiimidazolídico. A peridrólise leva à formação de um derivado perácido oxálico. A ciclização desse derivado forma o intermediário de alta energia (IAE), supostamente a 1,2-dioxetanodiona (**Esquema 17**).

Em paralelo com o caminho de catálise nucleofílica por imidazol pode ocorrer a reação direta do peróxido de hidrogênio com o TCPO, catalisado por imidazol por CAG (ou eventualmente CAE) que leva à formação do derivado de ácido monoperoxálico, cuja ciclização forma o mesmo IAE, a 1,2-dioxetanodiona (**Esquema 17**, k_{per}). A importância desta reação paralela é evidenciada pela observação de uma dependência linear de k_{obs} com a $[H_2O_2]$, não esperada no caminho da catálise nucleofílica, sendo a constante k_{per} correspondente a esse caminho de reação.

Na última etapa, o IAE interage com o ativador levando-o ao estado eletronicamente excitado e a emissão de fluorescência. Esta etapa deve ocorrer envolvendo transferência de elétron ou de carga, segundo o mecanismo CIEEL (**Esquema 17**).

Dois caminhos reacionais envolvendo hidrólise podem ocorrer e levam à decomposição do TCPO sem a emissão de luz. Tanto o peróxido de hidrogênio como a água, podem reagir diretamente com o TCPO, levando à sua transformação em ácido oxálico, sem emissão de luz. Esse caminho reacional é observado pelo intercepto da dependência de k_{obs} com a concentração do peróxido, da qual se obtém a constante de hidrólise de TCPO (**Esquema 17**, k_{hid}). O segundo caminho de hidrólise ocorre por

substituição nucleofílica pelo imidazol e envolve a reação de água com a diimidazolida, também com formação de ácido oxálico (**Esquema 17**, k'_{hid}). A importância desse caminho reacional não pode ser deduzida dos dados cinéticos obtidos. Essa contribuição para o consumo do TCPO sem quimiexcitação deve ser similar ou maior que o da hidrólise direta em comparação à peridrólise, devido à maior reatividade e menor seletividade da diimidazolida.

Porém, os valores de Φ_s numa fração de água igual a 0,1 ($[H_2O] = 1,2 \text{ mol L}^{-1}$) são próximos aos obtidos em solvente orgânico anidro. Esses resultados demonstram que apesar da alta reatividade do intermediário 1,1'-oxalildiimidazolídico, seu consumo ocorre preferencialmente por uma via de reação com H_2O_2 , mesmo com a água em uma concentração muito superior à do peróxido.

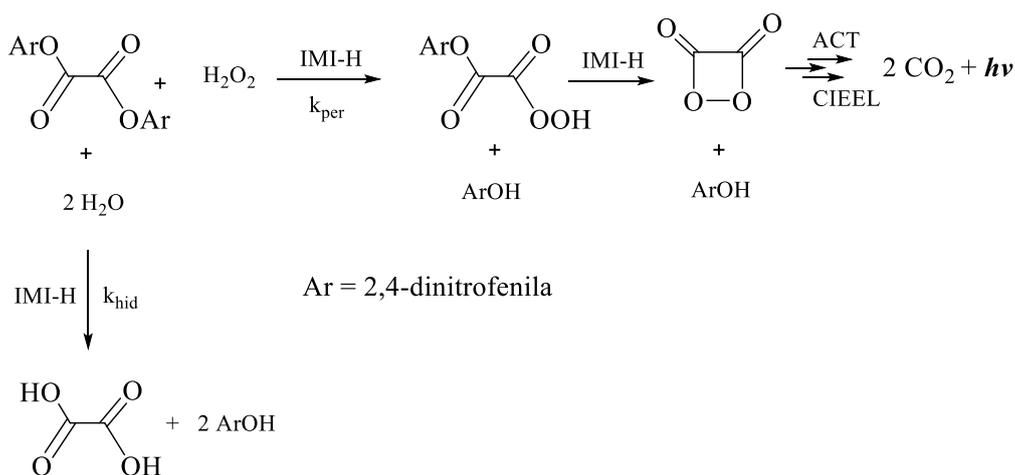
4.3.2 Mecanismo da reação de oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) com H_2O_2 catalisada por IMI-H em misturas 1,2-dimetoxietano: água

Como relatado anteriormente, pelo próprio perfil de emissão em DME nas mesmas condições de reação, nota-se que DNPO é um éster mais reativo do que TCPO (**Figura 6, p 42**), portanto espera-se que o H_2O_2 ataque diretamente o éster oxálico.

Inicialmente, observou-se uma dependência linear dos valores de k_{obs} com a $[IMI-H]$ entre 0,2 e 5,0 mmol L^{-1} , obtendo-se um coeficiente linear e angular de $0,03 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ e $223 \pm 17 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente (**Figura 7 direita, p 44**). Notou-se que só foi possível estudar essa variação de IMI-H em DME puro devido a uma diminuição considerável do tempo de reação nas misturas aquosas, obtendo-se valores de k_{obs} consideravelmente acima de 1 s^{-1} , impossibilitando a obtenção de dados cinéticos exatos. Mesmo em DME puro foi possível obterem-se dados somente em $[IMI-H]$ até 10 mmol L^{-1} (**Figura 7 direita, p 44**).

Também foi observada uma dependência linear da k_{obs} com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ em todas as frações molares de água. A partir do coeficiente linear e angular das correlações foi possível obterem-se valores para as constantes de hidrólise (k_{hid}) e peridrólise (k_{per}) respectivamente (**Figura 8 direita, p 46**). A constante de hidrólise, que corresponde à decomposição do DNPO, aumentou com o incremento da fração molar de água, conforme esperado, devido ao aumento da polaridade do meio e ao aumento da concentração do nucleófilo água. Entretanto, a constante de peridrólise não varia significativamente podendo-se extrair uma média de $6 \pm 1 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (**Tabela 12, p 46**).

Em resumo, a reação de DNPO e H_2O_2 pode ser simplificada a partir do mecanismo representado no **Esquema 18**.



Esquema 18: Mecanismo para a reação peroxioxalato de DNPO e H_2O_2 em misturas aquosas de DME.

A reação do DNPO pode ocorrer por duas maneiras, ambas envolvendo ataques nucleofílicos. A hidrólise (reação com água), leva a produtos que não fazem parte da via quimiluminescente, reduzindo o rendimento de emissão do sistema. A peridrólise (reação com H_2O_2) forma o perácido intermediário que, por uma ciclização, leva à 1,2-dioxetanodiona. Tal etapa de ciclização deve ser mais rápida que as anteriores, visto que esse processo envolve um excelente grupo de partida. O IAE interage com o ativador

levando-o ao estado eletronicamente excitado que, ao voltar para o estado fundamental, emite luz (**Esquema 18**).

Como foi observada uma dependência de primeira ordem de k_{obs} em relação à $[\text{H}_2\text{O}_2]$ e $[\text{IMI-H}]$ em DME puro, pôde-se entender que ambos reagentes estão envolvidos no passo lento da reação. Para esse passo é possível calcular uma constante de velocidade termolecular (k_{ter}) através da razão entre a constante bimolecular obtida da inclinação da reta e a concentração padrão de H_2O_2 e IMI-H (**Tabela 36**).

Tabela 36: Constantes de velocidade termoleculares (k_{ter} e k_{ter}') obtidas a partir das constantes de velocidade bimoleculares da dependência de k_{obs} com as concentrações de imidazol e peróxido, respectivamente, para a reação com DNPO em DME.

Dependência com IMI-H ^a	Dependência com H_2O_2 ^b
$[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$	$[\text{IMI-H}] = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$
$k_{\text{ter}} = (22 \pm 2) \times 10^3$	$k_{\text{ter}}' = (20 \pm 1) \times 10^3$

^a $[\text{DNPO}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{IMI-H}] = 0,2-10 \text{ mmol L}^{-1}$

^b $[\text{DNPO}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{IMI-H}] = 0,2$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1-15 \text{ mmol L}^{-1}$

As duas constantes termoleculares são iguais, portanto, pode se afirmar que na etapa lenta de reação estão envolvidas o DNPO, o peróxido de hidrogênio e o imidazol.

4.4 Efeito da água no passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato

O passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato, no qual ocorre a formação de estados eletronicamente excitados, é explicado através do mecanismo CIEEL. Como relatado anteriormente, os rendimentos de quimiluminescência deste sistema diminuem consideravelmente em meio aquoso. Porém, não existe nenhum estudo sistemático que aborda de maneira detalhada a influência de água sobre a eficiência de quimiexcitação do sistema peroxioxalato, tanto do ponto de vista mecanístico, quanto para a aplicação analítica. De forma a se verificar a influência da água sobre a velocidade dessa transformação e de elucidar o papel exato da água na diminuição drástica da eficiência de quimiexcitação, experimentos cinéticos de emissão da reação foram efetuados. Utilizou-

se tanto de oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO) quanto de oxalato de bis(2,4,6-triclofenila) (TCPO) com H_2O_2 catalisada por imidazol e em misturas aquosas de 1,2-dimetoxietano ($\text{H}_2\text{O}:\text{DME}$) para esse fim. Experimentos com TCPO também foram realizados em acetato de etila:água. A concentração final de imidazol no sistema foi mantida baixa para, desta forma, minimizar a sua influência sobre o passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato.^{90,91}

Foi observado que tanto para a reação com DNPO (nas diferentes concentrações do ativador DPA) como com TCPO (nas duas misturas de SM : H_2O) o comportamento geral dos rendimentos com a concentração da água permanece o mesmo, sendo que existe um aumento inicial do rendimento quântico com o aumento da concentração da água seguido por uma diminuição significativa de mais de uma ordem de grandeza para maiores concentrações. Notou-se que, para ambas as reações, a diminuição dos rendimentos começa a partir de uma fração molar de 0,06 ($[\text{H}_2\text{O}] = 0,7 \text{ mol L}^{-1}$). Experimentos com TCPO também foram realizados de forma qualitativa em misturas aquosas de acetato de etila. Apesar de que só foi possível estudar a reação até uma fração molar de água de 0,2 devido à baixa miscibilidade desse solvente, foi observado que nestes meios reacionais o comportamento dos rendimentos é similar ao observado nas misturas de $\text{DME} : \text{H}_2\text{O}$, obtendo-se um máximo também numa fração molar de 0,06 (**Figura 13, p 52**).

A partir do mecanismo proposto para cada um dos ésteres oxálicos estudados foi observado que, no caso da reação com TCPO, a concorrência entre a hidrólise e peridrólise também pode ocorrer no intermediário da catálise nucleofílica (**Esquema 17**), no entanto, o DNPO é diretamente consumido tanto pela água como pelo H_2O_2 (**Esquema 18**). Para esse último, foi possível calcular a contribuição da hidrólise e peridrólise nos experimentos realizados nas diferentes frações molares de água nos quais utilizou-se uma concentração de H_2O_2 de 10 mmol L^{-1} . Usando essa concentração de peróxido, calculou-

se a porcentagem da contribuição da hidrólise para o consumo do éster oxálico (% hidr.) ocorrendo em cada concentração de água e um fator de correção ($f(\text{corr})$) que foi utilizado para corrigir os valores dos rendimentos quânticos da **Tabela 14, p 49**, descontando-se a decomposição do éster por hidrólise (**Equação 6**) (**Tabela 37**).

$$f(\text{corr}) = \frac{k_{\text{hid}} + k_{\text{per}}[\text{H}_2\text{O}_2]}{k_{\text{per}}[\text{H}_2\text{O}_2]}$$

(Equação 6)

Tabela 37: Valores de % hidr. e $f(\text{corr})$ na reação de DNPO com H_2O_2 catalisada por IMI-H, obtidas da dependência de k_{obs} com a $[\text{H}_2\text{O}_2]$.

DNPO		
$\chi_{\text{H}_2\text{O}}$	% hidr.	$f(\text{corr})$
0	-	1,00
0,01	1,2	1,01
0,02	2,2	1,02
0,04	3,5	1,04
0,06	4,1	1,04
0,08	4,4	1,05
0,10	4,0	1,04
0,20	16	1,20
0,30	37	1,60
0,40	67	3,04

$[\text{DNPO}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{DPA}] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{IMI-H}] = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$

%hidr.: porcentagem da contribuição da hidrólise para a destruição do éster oxálico;

$f(\text{corr})$: fator de correção que deve ser aplicado ao rendimento quântico para compensar a hidrólise do éster oxálico.

Como mostra a **Figura 45**, para a reação com DNPO, a diferença entre os rendimentos quânticos corrigidos e não-corrigidos é significativa somente para maiores valores de fração molar de água. Entretanto, o comportamento geral dos rendimentos com a concentração da água permanece o mesmo e é similar para diferentes concentrações do ativador DPA. A dependência dos rendimentos quânticos corrigidos com a $[\text{H}_2\text{O}]$ mostra que esses parâmetros diminuem mesmo após a correção, descontando a hidrólise do éster oxálico, indicando que a eficiência do passo de quimiexcitação, de início, aumenta

consideravelmente com o aumento da $[H_2O]$, porém diminui a partir de concentrações maiores que $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ (**Figura 45**).

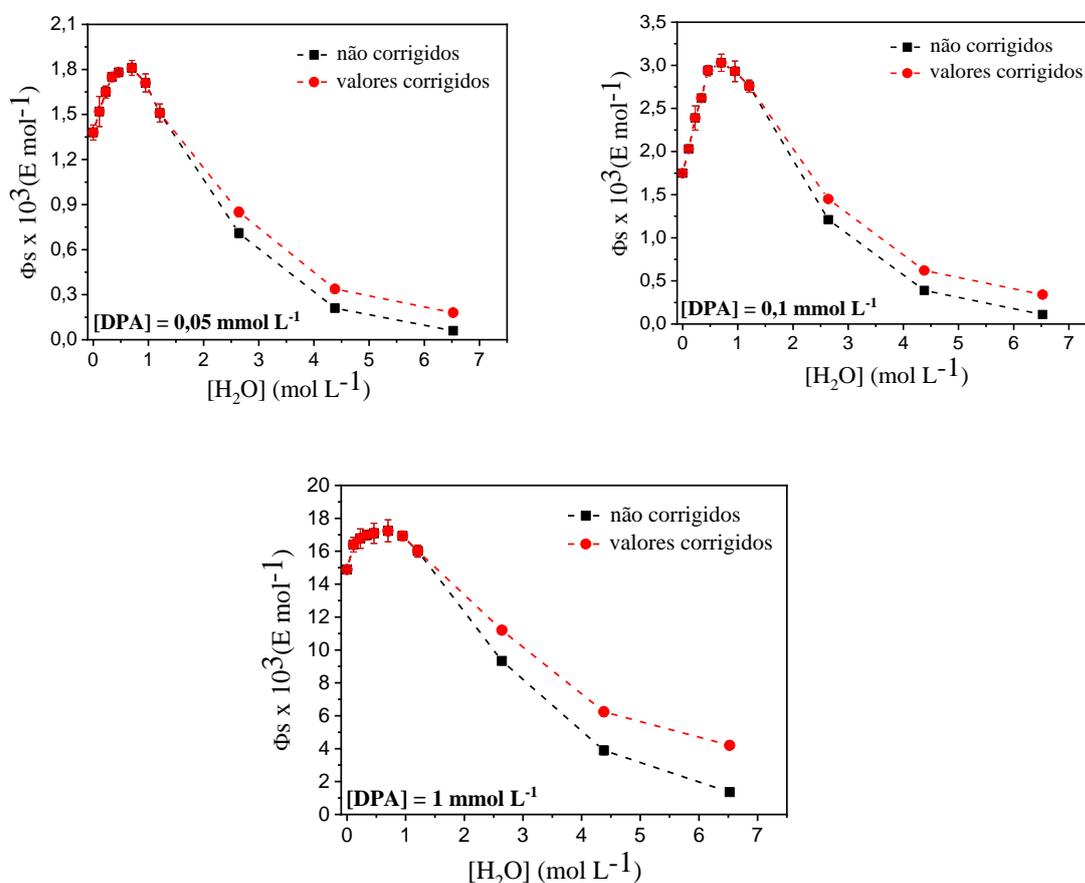


Figura 45: Dependência dos rendimentos quânticos singlete corrigidos e não corrigidos obtidos da reação de DNPO com H_2O_2 com a $[H_2O]$ em três concentrações de DPA.

A polaridade do meio para as várias frações molares de água foi determinada, utilizando-se medidas do parâmetro de polaridade empírico $E_T(33)$. Conforme esperado, com o incremento da concentração da água ocorre um deslocamento hipsocrômico da banda de transferência de carga da sonda $E_T(33)$, indicando o aumento da polaridade empírica do sistema (**Tabela 17, p 53**). Os valores dos rendimentos para a reação com DNPO foram correlacionados com este parâmetro de polaridade, mostrando uma curva de máximo com os maiores valores de rendimentos quânticos para uma faixa de polaridade empírica de $E_T(33) = 49$ a 52 (**Figura 46**). Esses parecem ser os valores

“ideais” de polaridade para a estabilização dos pares iônicos que estão presentes no passo de quimiexcitação.

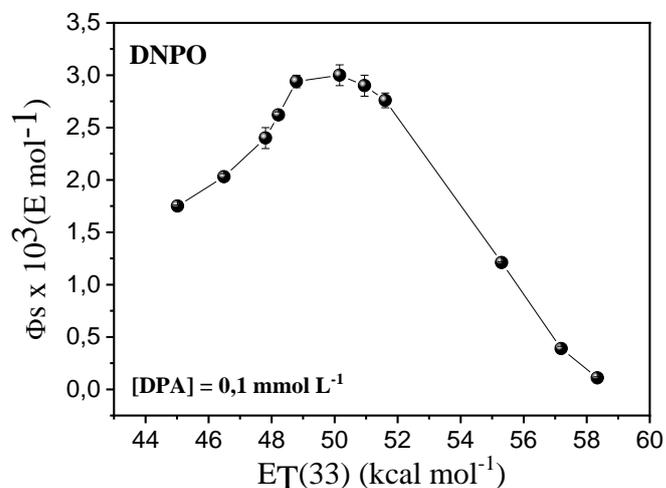
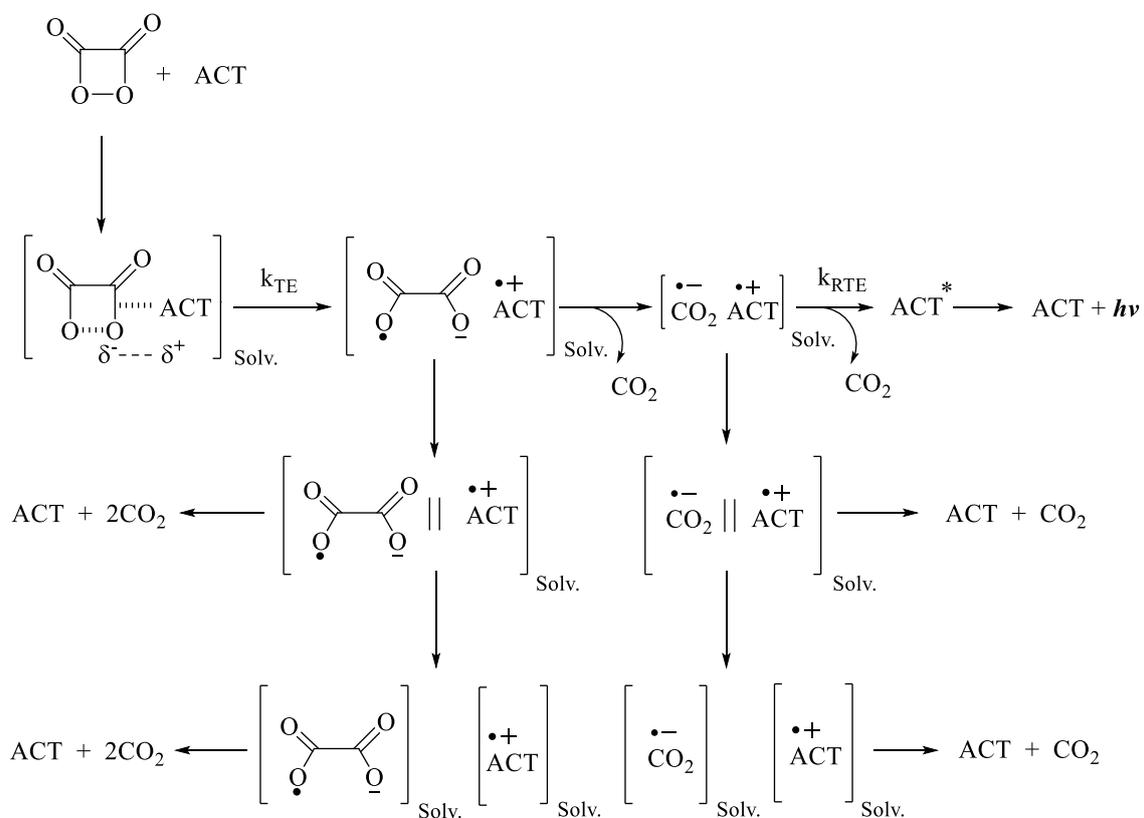


Figura 46: Dependência dos rendimentos quânticos de quimiexcitação com o parâmetro de polaridade empírico $E_T(33)$. $[DNPO] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[IMI] = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, $[DPA] = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$.



Esquema 19: Processo de solvatação na decomposição catalisada do IAE.

Em uma tentativa de explicar os fatos experimentais expostos acima, deve-se considerar o passo de quimiexcitação o qual supostamente ocorre segundo o mecanismo CIEEL. Para se obter a formação eficiente de estados eletronicamente excitados por esse mecanismo, tanto a etapa de transferência quanto de retrotransferência de elétron devem ocorrer dentro da cavidade do solvente (**Esquema 7**). Caso haja o escape das espécies iônicas intermediárias dessa gaiola, o produto é formado no estado fundamental. Portanto, uma possível explicação dos resultados acima pode ser dada supondo que pequenas quantidades de água estabiliza o par de íons radicais formados dentro da cavidade do solvente e a solvatação inicialmente contribui para manter essas espécies juntas até o passo de retrotransferência de elétron (responsável pela formação de estados excitados). A partir de certo valor limite de polaridade os íons radicais podem ser solvatados individualmente pelas moléculas de água evitando a possibilidade dessas espécies se encontrarem novamente. Isso deve levar à diminuição dos rendimentos quânticos de quimiexcitação (**Esquema 19**).

4.5 Parâmetros de quimiluminescência da reação peroxioxalato em várias misturas de DME:H₂O

Na tentativa de se entender melhor o passo de quimiexcitação do sistema peroxioxalato, a reação do DNPO com H₂O₂ catalisada por IMI-H, foi estudada em várias frações molares de água usando diferentes ativadores como 9,10-difenilantraceno (DPA), 2,5-difeniloxazol (PPO), perileno (PER), rubreno (RUB), rubreno sulfonado (RUB_{sulf}) e a rodamina 6G (ROD). Os valores de k_{obs} não apresentam variação com a natureza nem com a concentração do ativador, obtendo-se médias de $k_{obs} = 0,056 \pm 0,001$; $k_{obs} = 0,058 \pm 0,002$; $k_{obs} = 0,062 \pm 0,001$ e $k_{obs} = 0,069 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ nas frações molares de água de 0; 0,02; 0,06 e 0,1 respectivamente (**Tabelas 18, 19 e 20, Figura 14, p 57**). Esse fato

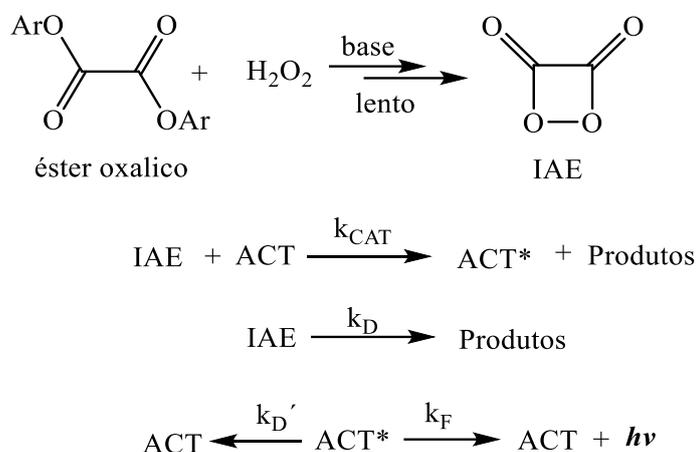
demonstra que também nesses meios de reação a etapa de quimiexcitação é muito mais rápida que as etapas anteriores da reação e que o ACT participa somente dessa etapa.³⁴

Devido a esses fatos, estudos cinéticos convencionais não podem fornecer informação em relação ao passo de quimiexcitação, pois esse passo não é o limitante para a velocidade de reação. Porém, para se obter informação mecanística a respeito da quimiexcitação pode-se aproveitar o fato de que neste passo ocorre a formação de estados eletronicamente excitados, os quais se manifestam em forma de emissão de luz. Sendo assim, a intensidade de emissão do sistema depende da velocidade de formação de estados excitados em relação a outros eventos que decompõem o IAE. Portanto, variando a natureza e a concentração do ACT, espera-se que a velocidade de sua interação com o IAE e, conseqüentemente, a intensidade de emissão se modifiquem. Com isso, o passo de quimiexcitação pode ser estudado a partir de medidas indiretas da velocidade da interação entre o ativador e o IAE.^{34,92}

Neste tipo de estudos, a reação peroxioxalato é efetuada em uma condição de reação que leva a resultados cinéticos reprodutíveis, que são mantidos sob os mesmos parâmetros, variando-se somente a concentração do ativador. Além disso podem ser utilizados ativadores com propriedades – por exemplo redox – diferentes. Nessas condições, a cinética da reação não deve variar, ocorre somente alteração na intensidade de emissão. Para obterem-se dados quantitativos da variação de intensidade de emissão com a concentração do ACT, considera-se o esquema cinético mínimo da transformação incluindo o passo de quimiexcitação (**Esquema 20**).

A reação do éster oxálico com peróxido de hidrogênio, catalisada por imidazol, forma o intermediário de alta energia (IAE) no(s) passo(s) lento(s) da reação, que pode interagir com o ACT levando-o ao seu estado excitado singlete (ACT*), com uma constante bimolecular de catálise (k_{CAT}). Em concorrência com esta reação tal intermediário pode

se decompor unimolecularmente (k_D). O ACT* formado decai para seu estado fundamental emitindo luz (k_F) ou através de um processo não radiativo (k_D') (**Esquema 20**).³⁴



Esquema 20: Esquema cinético mínimo para a reação peroxioxalato, com a formação do IAE nos passos limitantes para a velocidade de reação, seguida pela interação entre o IAE e o ACT, levando ao estado excitado do ACT (ACT*), que pode emitir luz de fluorescência ou sofrer decaimento não radiativo.

Aplicando-se a aproximação do estado estacionário tanto para [IAE] quanto para [ACT*] (espécies com tempo de vida muito curto e cuja concentração não deve variar significativamente após estabelecimento do estado estacionário) se pode obter uma equação que correlaciona o rendimento quântico singlete com a concentração de ACT (**Equação 7**). A referida equação indica que a correlação entre $1/\Phi_S$ e $1/[\text{ACT}]$ deve ser linear e permite, a partir do intercepto, a obtenção do rendimento quântico singlete em concentração infinita do ACT (Φ_S^∞), ou seja, em uma condição hipotética na qual todas as moléculas de IAE formadas interagem com uma molécula de ACT. Além disso, obtêm-se, a partir da inclinação da correlação linear, a relação entre as constantes de velocidade k_{CAT}/k_D .³⁴ (**Esquema 20**)

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

(Equação 7)

Para todos os ativadores usados e em cada fração molar de água estudada, gráficos lineares da relação duplo-recíproco foram obtidos como podemos ver na **Figura 47**. A partir das correlações efetuadas para todos os ACTs foi possível determinar os parâmetros de quimiluminescência do sistema nas diferentes frações molares de água (**Tabela 38**).

Valores maiores do rendimento quântico singlete na concentração infinita do ativador foram obtidos em uma fração molar de 0,06 para todos os ativadores utilizados (**Tabela 38**). Quanto maior o valor de Φ_s^∞ , maior a probabilidade da formação do ACT* a partir do par de íons-radicais inicial, o seja, Φ_s^∞ é diretamente proporcional ao rendimento de formação de estados excitados na etapa de retrotransferência de elétron.³⁴

A relação entre a constante de velocidade bimolecular do processo de decomposição catalisado (k_{CAT}) e a constante de velocidade unimolecular da decomposição do IAE (k_D), apresenta uma medida relativa da eficiência catalítica de um dado ACT frente à interação com o intermediário, visto que o valor de k_D não varia com a natureza do ACT.^{33,34}

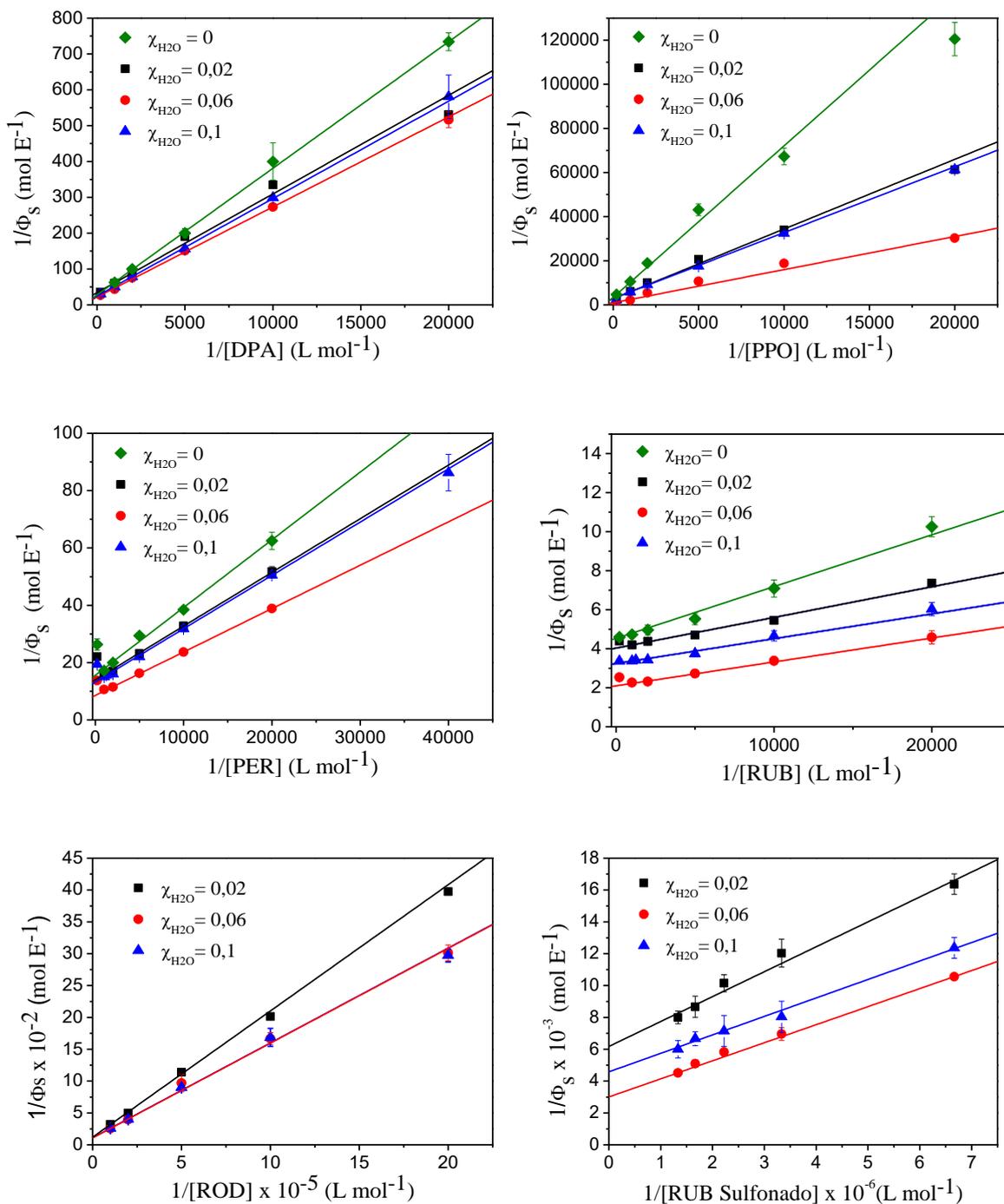


Figura 47: Gráficos duplo-recíprocos $1/\Phi_s$ vs. $1/ACT$ para a reação de DNPO com H_2O_2 catalisado por IMI-H na presença de vários ativadores em diferentes misturas DME : H_2O .

Tabela 38: Parâmetros de quimiluminescência para a reação de DNPO com H₂O₂, catalisado por IMI-H, em diferentes misturas DME : H₂O na presença de vários ativadores e potenciais de oxidação (E_{ox}^{1/2}) e energias singlete (E_s) dos ACTs.

ACT	E _{ox} ^{1/2} (V vs. SCE)	E _s (kJ mol ⁻¹)	χ _{H2O}	Φ _s [∞] x 10 ² (E mol ⁻¹)	k _{CAT} /k _D x 10 ⁻³ (L mol ⁻¹)
RUB	0,61	221	0	22,7 ± 0,6	16 ± 2
			0,02	17,6 ± 0,2	32 ± 1
			0,06	32,8 ± 0,6	21 ± 1
			0,1	25,1 ± 0,7	22 ± 1
RUB _{sulf}	0,61	221	0,02	0,016 ± 0,001	3959 ± 624
			0,06	0,0332 ± 0,0002	2660 ± 50
			0,1	0,022 ± 0,002	3950 ± 890
PER	0,88	273	0	6,4±0,2	6,6±0,6
			0,02	7,09 ± 0,05	7,7 ± 0,5
			0,06	11,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1
			0,1	7,51 ± 0,05	7,1 ± 0,1
DPA	1,06	305	0	3,6 ± 0,6	0,8±0,1
			0,02	2,95 ± 0,06	1,23 ± 0,03
			0,06	4,62 ± 0,02	0,86 ± 0,01
			0,1	4,09 ± 0,06	0,90 ± 0,02
ROD	1,39	219	0,02	0,8 ± 0,1	61 ± 11
			0,06	0,94 ± 0,05	72 ± 6
			0,1	0,9 ± 0,1	78 ± 12
PPO	1,46	356	0	0,030 ± 0,001	0,48 ± 0,03
			0,02	0,039 ± 0,001	0,57 ± 0,03
			0,06	0,27 ± 0,04	0,10 ± 0,02
			0,1	0,10 ± 0,01	0,24 ± 0,03

De acordo com o mecanismo CIEEL, o passo determinante da etapa de quimiexcitação é a transferência eletrônica do ACT para o peróxido, com uma constante de velocidade catalítica (k_{CAT}) (**Esquema 7**). Portanto, uma correlação linear entre o logaritmo natural da relação entre as constantes de velocidade bimolecular catalisada e unimolecular da decomposição do IAE (k_{CAT}/k_D) e o potencial de oxidação do ativador é esperada (**Equação 8**). Esta correlação permite determinar os coeficientes de transferência de elétron.^{93,94}

$$\ln\left(\frac{k_{CAT}}{k_D}\right) = \ln A + \alpha B - \left(\frac{\alpha}{RT}\right)E_{ox} \quad \text{sendo que, } B = \frac{e^2}{R_0\epsilon RT} + \frac{E_{red}}{RT}$$

(Equação 8)

onde A, fator pré-exponencial; α : coeficiente de transferência de elétron; R: constante dos gases ($8,613 \times 10^{-5} \text{ eV K}^{-1}$); T: temperatura (K); E_{ox} : potencial de oxidação do ACT; E_{red} : potencial de redução do IAE; R_0 : distância entre os íon-radicais; ϵ : constante dielétrica do solvente; e: carga do elétron.

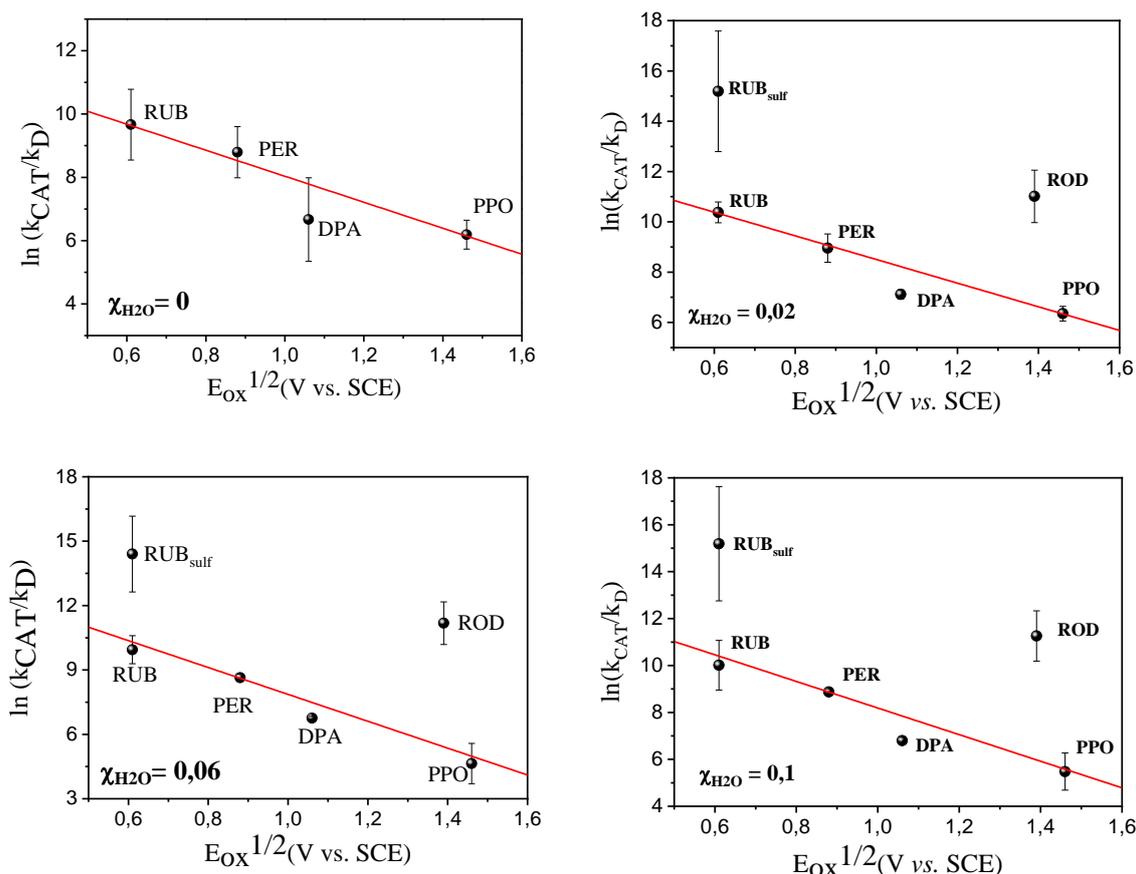


Figura 48: Correlação linear entre $\ln(k_{CAT}/k_D)$ e $E_{ox}^{1/2}$ dos ativadores usados nas diferentes frações molares de água em DME, na reação de DNPO ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com peróxido de hidrogênio (10 mmol L^{-1}) catalisada por imidazol ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$). Os valores associados ao ROD e RUB_{sulf} não foram incluídos no ajuste linear.

Para cada uma das frações molares de água estudadas foi observada uma dependência linear entre $\ln(k_{CAT}/k_D)$ e $E_{ox}^{1/2}$ dos ACTs (**Figura 48**) das quais determinou-se os valores dos coeficientes de transferência de elétrons (**Tabela 39**).

Tabela 39: Coeficientes de transferência de elétron da reação de DNPO (0,1 mmol L⁻¹) com H₂O₂ (10 mmol L⁻¹) catalisado por imidazol (0,2 mmol L⁻¹) nas frações molares de água em DME estudadas.

$\chi_{\text{H}_2\text{O}}$	α
0	0,10 ± 0,01
0,02	0,12 ± 0,01
0,06	0,17 ± 0,01
0,1	0,14 ± 0,01

O coeficiente α está relacionado à extensão da transferência de elétron no estado de transição; um valor de 1,0 indica uma transferência (quase) completa do elétron, enquanto que um valor baixo (perto de zero) mostra pouca ocorrência de transferência de elétron no estado de transição.^{17,18,56,95,96} Embora os valores obtidos aqui sejam consideravelmente baixos (**Tabela 33**), eles indicam a ocorrência de uma transferência de elétrons do ACT para o peróxido conforme previsto pelo mecanismo do CIEEL. Estes coeficientes relatados para vários sistemas CIEEL estão tipicamente dentro da faixa de 0,1-0,3, incluindo para a reação peroxioxalato.^{34,92} Os valores de α obtidos nestes estudos indicam um estado de transição precoce em relação à transferência de elétrons e, presumivelmente, também à clivagem da ligação O-O, já que essas duas etapas devem ser simultâneas.⁹²⁻⁹⁴ Interessantemente, os valores mostram aumento com o fração molar de água até o valor de $\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,6$, a condição na qual são obtidos os maiores rendimentos Φ_s para cada concentração do ACT (**Tabela 18, 19 e 20, p 54-56**) e também os maiores valores para Φ_s^∞ (**Tabelas 38**). Entretanto, os valores de α indicam somente a extensão da transferência de elétron do ACT para o IAE no estado de transição, sendo determinados pela velocidade desta transferência. Esta velocidade, medida experimentalmente pelo parâmetro relativo $k_{\text{CAT}}/k_{\text{D}}$, deve influenciar também nos Φ_s em uma certa concentração do ACT, porém, o rendimento em “concentração infinita do ACT” (Φ_s^∞) não depende mais desta velocidade, exatamente devido à extrapolação do gráfico duplo-recíproco para zero ($1/[\text{ACT}] = 0$).

Mas quais serão então os fatores que devem determinar este rendimento infinito? Com base no mecanismo CIEEL detalhado (**Esquema 18**), podemos entender que este rendimento deve ser determinado pela eficiência de quimiexcitação do passo de retro-transferência de elétron, ou seja da probabilidade de formar nesta etapa o estado eletronicamente excitado (pela transferência de elétron para o orbital LUMO do ACT) ao invés do estado fundamental (pela transferência de elétron para o orbital HOMO do ACT).^{33,34,97,98} Conforme discutido anteriormente,³⁴ essa probabilidade de quimiexcitação e, com isso, o rendimento Φ_s^∞ devem depender, primeiramente, da energia liberada no passo de retro-transferência de elétron; isso sendo válido para a reação do mesmo IAE com ACTs similares estruturalmente.^{21,99}

Seguindo essa argumentação, foram calculados os valores de energia livre liberada na etapa de retro-transferência de elétron com formação de espécies no estado fundamental (ΔG_{RTE}) e excitado (ΔG_{RTE}^*) para os diferentes ativadores (**Tabela 40**).

Tabela 40: Energia do estado singlete (E_s), potencial de oxidação de meio pico ($E_{\text{ox}}^{1/2}$), energia livre de retro-transferência de elétron levando a produtos nos estados fundamental (ΔG_{RTE}) e singlete excitado (ΔG_{RTE}^*) para vários ACT.

ACT	$E_{\text{ox}}^{1/2}$ (V vs. SCE)	ΔG_{RTE} (kJ mol ⁻¹) ^a	E_s (kJ mol ⁻¹) ^b	ΔG_{RTE}^* (kJ mol ⁻¹) ^c
ROD	1,39	-395	219	-176
RUB	0,61	-318	221	-97
RUB _{sulf}	0,61	-318	221	-97
PER	0,88	-344	273	-71
DPA	1,06	-362	305	-57
PPO	1,46	-400	356	-44

^a $\Delta G_{\text{RTE}} = -F[E_{\text{ox}}^{1/2}(\text{ACT}) - E_{\text{red}}^{1/2}(\text{CO}_2)]$; $E_{\text{ox}}^{1/2}(\text{ACT})$ da Tabela 38 e $E_{\text{red}}^{1/2}(\text{CO}_2) = -2,44 \text{ V}^{31}$, ambos vs. SHE. ^bValores da ref.³⁴ e determinados pelos espectros de absorção e fluorescência do ACT. ^c $-\Delta G_{\text{RTE}}^* = \Delta G_{\text{RTE}} + E_s$

Como observado na **Tabela 40**, a variação de energia livre, ΔG_{RTE} , é mais alta (valores mais negativos) para os ativadores com potenciais de oxidação maiores. Por outro lado, o balanço de energia livre para a etapa de retro-transferência de elétron levando ao estado excitado singlete do ativador (ΔG_{RTE}^*), mostra um valor mais alto para

RUB e diminui com o incremento do potencial de oxidação para os outros ativadores. A exceção dessa tendência é a ROD que possui um potencial de oxidação relativamente alto (próximo ao PPO), porém tem energia singlete baixa (menor que o RUB), portanto a energia liberada para quimiexcitação é alta (**Tabela 40**). Correlacionando-se o $\ln(\Phi_s^\infty)$ com ΔG_{RTE}^* em cada uma das frações molares de água, pôde-se notar que há uma tendência de aumento da eficiência de formação de estados excitados à medida que os valores de ΔG_{RTE}^* se tornam mais negativos, exceto para a ROD e o RUB sulf, os ACTs hidrofílicos (**Figura 49**).

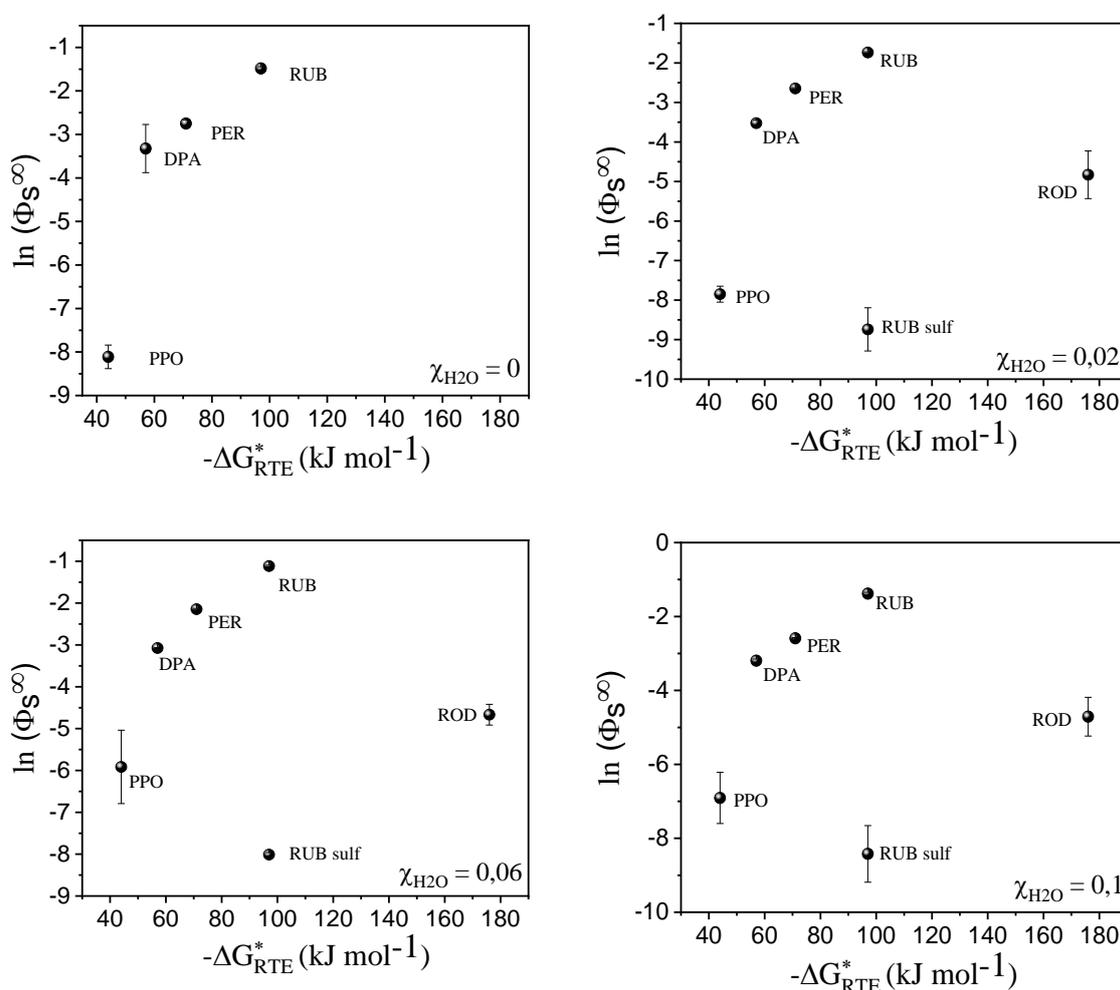


Figura 49: Correlação entre o logaritmo natural de Φ_s^∞ e a energia livre liberada na etapa de retro-transferência de elétron levando a estados excitados (ΔG_{RTE}^*) para a reação de DNPO com H_2O_2 com diversos ACTs em várias frações DME : H_2O .

Como relatado anteriormente, a mudança de energia livre da etapa de retro-transferência de elétron foi calculada com base no esquema CIEEL, portanto esse resultado também contribui para confirmar o mecanismo. No entanto, os dados para dois ativadores geralmente menos usados - ROD e RUB_{sul} - falham na conformidade com a sequência CIEEL, o que implica que os detalhes desse mecanismo ainda precisam ser esclarecidos.

Os ativadores hidrofílicos estudados RUB_{sul} e ROD mostram valores de k_{CAT}/k_D significativamente mais altos que esperados pelos potenciais de oxidação, em comparação com os ativadores hidrofóbicos (**Figura 48**), sendo os valores para RUB_{sul} maiores que para ROD, conforme esperado pelo menor potencial de oxidação do RUB, que foi usado como o potencial do RUB_{sul} (**Tabela 40**). Os maiores valores de k_{CAT}/k_D dos ACTs hidrofílicos em meios aquosos podem ser entendidos por uma solvatação preferencial destes ACTs pela água, aumentando desta maneira a polaridade local do meio de reação, o que pode resultar no incremento da velocidade de transferência de elétron, sendo nesse passo que ocorre a formação de espécies carregadas (**Esquema 17**).

Por outro lado, os rendimentos quânticos de quimiexcitação da ROD e RUB_{sulf} são bem mais baixos que os esperados pela correlação de Φ_s^∞ com a energia ΔG_{RTE}^* (**Figura 49**). Nesse caso, a solvatação preferencial pela água não favorece a formação de estados eletronicamente excitado no passo de retro-transferência de elétron (**Esquema 17**). A maior polaridade do meio causada pela solvatação preferencial destes ACTs hidrofílicos, aparentemente, não é favorável à quimiexcitação. Este fato pode ser causado pela consequente estabilização do par de íon radicais que efetua a retro-transferência, desta maneira sendo menos exergônica (**Esquema 17**).

4.6 Estudos cinéticos com TCPO em 1,2-dimetoxietano (DME) anidro e em misturas DME:H₂O 1:1 (v/v) usando cumarinas e a curcumina como ativadores.

Nos últimos anos, muitos fluoróforos foram introduzidos no sistema PO-CL. Eles emitem luz com diferentes regiões de cores como azul, verde, amarelo, laranja e vermelho¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Embora, mais tentativas de introduzir novos tipos de fluoróforos pareçam atraentes e tentadoras.

Os derivados cumarínicos são amplamente distribuídos no reino vegetal, alguns deles são fisiologicamente ativos e muitos deles são de grande interesse prático.¹⁰⁵⁻¹¹¹ Eles são amplamente utilizados como corantes laser¹¹², branqueadores ópticos¹¹³ e marcadores fluorescentes¹¹³. Por outro lado, alguns dos derivados da cumarina possuem propriedades antimicrobianas e também são empregados no ensaio fluorimétrico de enzimas proteolíticas em fluidos biológicos¹¹⁴, em imunoenaios fluorescentes¹¹⁵, em medições de pH intracelular cerebral¹¹⁶ e como poderoso fármaco em doenças de pele¹¹⁶.

A curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) é um pigmento fenólico natural amarelo extraído do rizoma de *Curcuma longa* Linn¹¹⁷ e na última década tem sido considerada por suas propriedades biológicas e farmacológicas atrativas, como antibacteriana, antioxidante, antiinflamatória e antiproliferativa.^{118,119}

Experimentos cinéticos de emissão da reação de TCPO com H₂O₂ catalisado por IMI-H foram conduzidos usando algumas cumarinas e a curcumina como novos ativadores para essa reação tanto em meio anidro de DME quanto em misturas binárias DME:H₂O (1:1 v/v).

Analisando-se a **Figura 16, p 60** nota-se que os valores de k_{obs} são independentes do tipo e da [ACT] utilizada no experimento. Este fato demonstra que tanto as cumarinas quanto a curcumina também participam somente da etapa de quimiexcitação e não das

anteriores, não consumindo o éster oxálico por alguma possível via paralela à reação peroxioxalato. Esse fato importante mostra também que, os estudos dos derivados cumarínicos possuindo grupos amino, potencialmente básicos e nucleofílicos, não interferem na reação, o que leva à formação de um intermediário de alta energia essencial para a quimiexcitação.

Verificou-se que os rendimentos quânticos singlete para a cumarina 153 e a curcumina são maiores que os das outras cumarinas utilizadas nos estudos para ambos meios de reação (**Tabela 21, p 59**). Os valores de Φ_s foram correlacionados com a concentração do ativador através de uma relação duplo-recíproca $1/\Phi_s$ vs. $1/[ACT]$ (**Equação 7**) (**Figura 50**). A partir dessa correlação, foi possível determinar os parâmetros de quimiluminescência; o rendimento quântico em concentração infinita do ACT, Φ_s^∞ e a constante relativa de interação entre IAE e o ACT, k_{CAT}/k_D (**Tabela 41**). A relação entre essas constantes (k_{CAT}/k_D), podem ser usados como medida (relativa) para k_{CAT} , uma vez que os valores de k_D não mudam no sistema onde apenas o ACT é alterado.³⁴

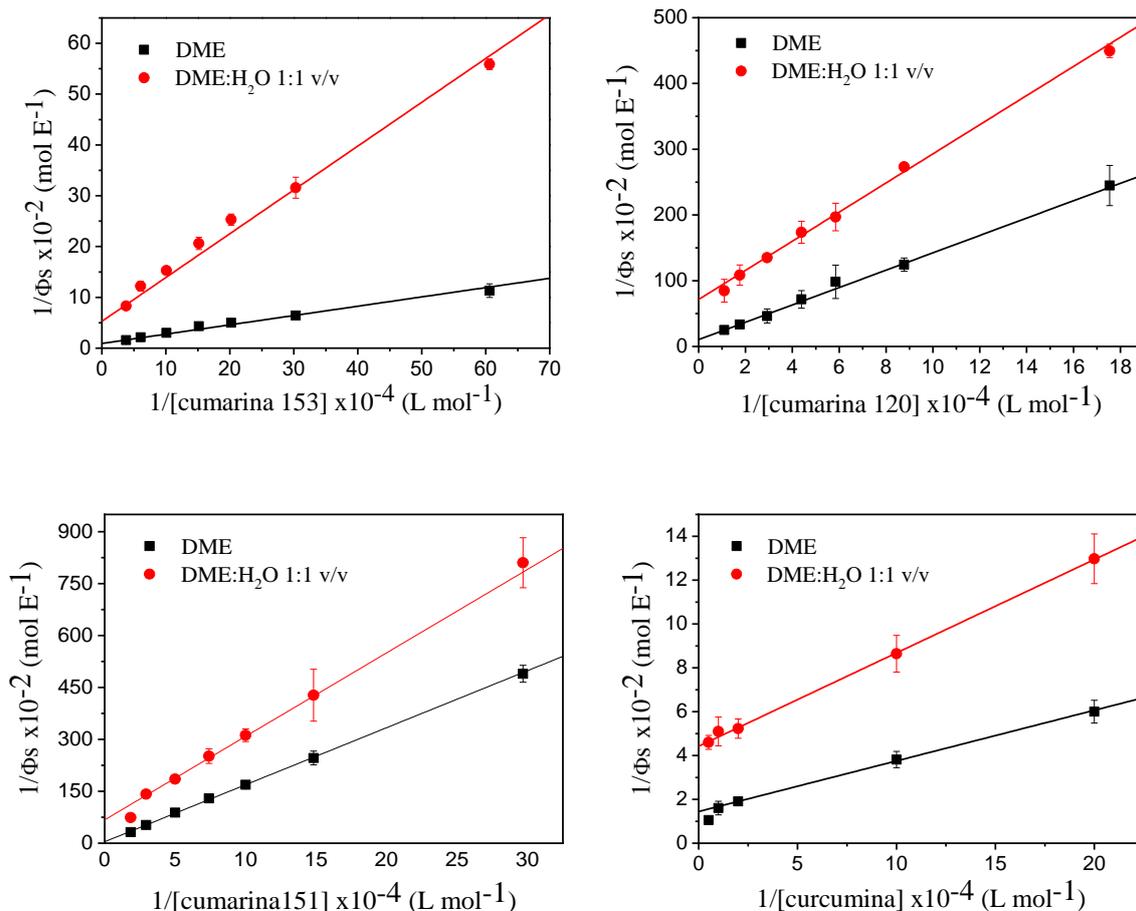


Figura 50: Gráficos duplo-recíprocos $1/\Phi_s$ vs. $1/[\text{cumarina}]$ (ou $[\text{curcumina}]$), para a reação de TCPO com $[\text{H}_2\text{O}_2]$ em DME e DME : H_2O 1:1 (v/v). $[\text{TCPO}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{IMI-H}] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{IMI-H}] = 2 \text{ mmol L}^{-1}$, 25°C .

Tabela 41: Valores de $E_{\text{ox}}^{1/2}$, Φ_s^∞ e da relação $k_{\text{CAT}}/k_{\text{D}}$ para a reação de TCPO com H_2O_2 catalisada por IMI na presença de várias cumarinas e curcumina usadas como ativadores em DME e misturas de DME : H_2O 1:1 (v/v).

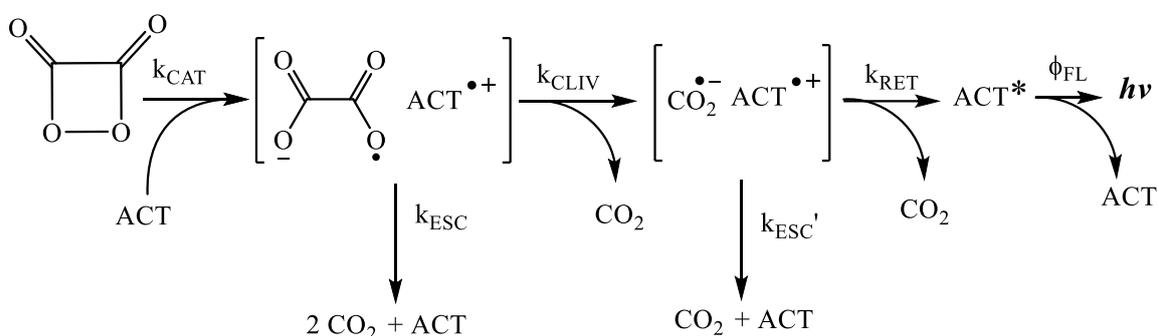
ACT	$E_{\text{ox}}^{1/2}$ (V vs. SCE)	DME		DME : H_2O 1:1 (v/v)	
		$\Phi_s^\infty \times 10^2$ (E mol^{-1})	$k_{\text{CAT}}/k_{\text{D}}$ $\times 10^{-3}$ (L mol^{-1})	$\Phi_s^\infty \times 10^2$ (E mol^{-1})	$k_{\text{CAT}}/k_{\text{D}} \times 10^{-3}$ (L mol^{-1})
Cum 120	1,09	$0,10 \pm 0,03$	8 ± 3	$0,014 \pm 0,001$	32 ± 3
Cum 151	1,20	$0,2 \pm 0,1$	3 ± 1	$0,015 \pm 0,002$	28 ± 6
Cum 153	0,89	$1,08 \pm 0,07$	50 ± 4	$0,189 \pm 0,007$	60 ± 3
Curcumina	0,88	$0,96 \pm 0,03$	62 ± 10	$0,23 \pm 0,01$	100 ± 20

A 25°C .

Em meio anidro, os rendimentos quânticos (Φ_s^∞) são mais altos para a Cum 153 e a curcumina; também os valores de $k_{\text{CAT}}/k_{\text{D}}$ são maiores para esses dois ACTs comparados

com os outros, indicando que o k_{CAT} deve ser maior para Cum 153 e curcumina, já que o k_D deve ser independente da natureza do ACT como mencionado anteriormente (**Tabela 41**).

A eficiência da reação quimiluminescente é menor em misturas binárias de DME:H₂O 1:1 (v/v) em aproximadamente uma ordem de grandeza para Cum 120 e Cum 151, entretanto, para Cum 153 e a curcumina a diferença é de um fator de 4 a 5 (**Tabela 41**). Porém, se deve destacar que esta diferença é relativamente pequena, indicando que estes ativadores podem ser utilizados também em meios aquosos. Na sequência CIEEL, após a clivagem da ligação O–O e geração das espécies radiculares (k_{CAT} , **Esquema 21**), um meio mais polar pode solvatar melhor as espécies carregadas e com isso promover o escape do par de íons-radicaís da cavidade do solvente (k_{ESC} e $k_{ESC'}$, **Esquema 21**), reduzindo a eficiência da reação quimiluminescente.



Esquema 21: Sequência CIEEL simplificada da interação de um ACT com a 1,2-dioxetanodiona. As etapas na horizontal levam à formação de estados excitados do ACT, enquanto as etapas na vertical diminuem o rendimento de quimiluminescência da reação.

Por outro lado, os valores de k_{CAT}/k_D são maiores para o meio aquoso que para DME para todos os ACTs (**Tabela 41**). Este fato pode ser entendido devido à maior polaridade do meio aquoso, facilitando a transferência de elétron entre o ACT e o IAE, na qual ocorre a formação de íon radicais, melhor estabilizados por solventes mais polares. Conseqüentemente a constante de velocidade k_{CAT} deve ser maior neste meio (**Esquema**

21). Se um processo de transferência de elétron (ou pelo menos uma transferência de carga) estiver ocorrendo, pode-se esperar que compostos com potencial de oxidação mais baixo devam ter k_{CAT} mais alto e, portanto, valores mais altos de k_{CAT}/k_D .^{5,33,34,92,120,121} É claramente visto que um aumento no $E_{ox}^{1/2}$ reflete em valores menores de k_{CAT}/k_D na série de ativadores estudados (**Tabela 41**), conforme esperado para o mecanismo CIEEL, no qual há a formação do cátion radical do ativador ($ACT^{•+}$) que vai ser mais estável para ACTs com menor potencial de oxidação (**Esquema 20**).

Uma correlação linear de energia livre entre k_{CAT}/k_D e $E_{ox}^{1/2}$ foi obtida tanto em meio orgânico anidro quanto em misturas aquosas (**Figura 51**). A partir desta dependência o coeficiente de transferência de elétrons (α) pode ser determinado, de acordo com a equação de Marcus aplicada aos processos de transferência de elétron (**Equação 8**).

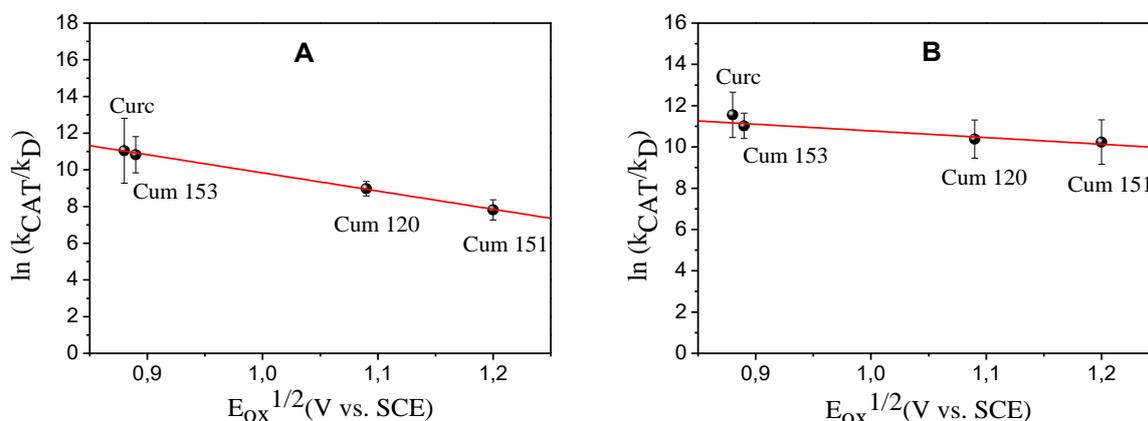


Figura 51: Correlação linear de energia livre entre k_{CAT}/k_D e $E_{ox}^{1/2}$ do ACT para a reação de TCPO com H_2O_2 catalisada pelo IMI-H em **A**) DME anidro e **B**) DME: H_2O 1:1 (v/v)

As correlações lineares forneceram valores para $\alpha = 0,242 \pm 0,001$ e $\alpha = 0,079 \pm 0,001$ em DME e DME : H_2O 1:1(v/v) respectivamente indicando a ocorrência de um processo de transferência de elétron ou de carga, conforme proposto pelo mecanismo CIEEL. Os valores de α encontrado aqui para a reação PO tanto em meio orgânico anidro quanto em misturas DME: H_2O com as cumarinas e a curcumina estão de acordo com o relatado para vários sistemas CIEEL, na faixa de 0,1 a 0,3, que inclui variações do sistema

PO^{33,34,92,121,122} e a decomposição ativada de peróxidos cíclicos isolados de quatro membros, chamados 1,2-dioxetanonas.^{6,17,20} Como mencionado anteriormente o valor de α é um parâmetro empírico relacionado com a extensão da transferência de elétron no estado de transição, indicando também a extensão da ruptura da ligação peroxídica. Um valor de α aproximadamente igual a 1 significa transferência quase que completa de elétron e ruptura praticamente completa da ligação O-O no estado de transição, enquanto um valor de α aproximadamente igual a 0 indica pouca transferência de carga e ligação O-O largamente intacta no estado de transição. Os valores de α de 0,24 e 0,08 observado neste estudo em meio orgânico e aquoso respectivamente indicam um estado de transição precoce com baixa extensão de transferência de elétron e ligação peroxídica do IAE pouco alongada. O fato de que o valor obtido em água ser consideravelmente mais baixo que em meio orgânico anidro pode ser entendido pela melhor estabilização da espécie catiônica por solvatação pela água.

Como mencionado anteriormente, notou-se que os maiores rendimentos quânticos entre as espécies cumarínicas são obtidos com Cum 153 como ACT em ambos meios de reação. Apesar essa espécie também tenha o menor potencial de oxidação, esse fato por si só não explica os maiores rendimentos quânticos (Φ_s^∞), visto que esses rendimentos são determinados em concentrações 'infinitas' de ACT, em condições hipotéticas em que todos os IAE interagem com o ACT. Esta observação pode ser explicada provisoriamente pelo fato de que este composto deve ser mais planar do que os outros derivados, uma vez que o átomo de nitrogênio do grupo amino é incorporado em um sistema de anel bicíclico. Esta natureza planar da Cum153 levará à formação de complexos de transferência de carga / transferência de elétrons mais estáveis com o IAE, e os pares de íons radicais podem permanecer juntos em toda a sequência CIEEL, levando a uma quimiexcitação mais eficiente, em comparação com Cum 120 e Cum 151, onde o nitrogênio amino pode

estar fora do plano dos anéis aromáticos. A maior planaridade da Cum 153 também pode ser a razão pela qual este derivado cumarínico apresente o menor potencial de oxidação dos três derivados estudados.

4.7 Estudos de microesferas baseadas no sistema peroxioxalato

Uma barreira importante ao uso de formulações de peroxioxalato para quimiluminescência em sistemas aquosos tem sido a propensão dos derivados de oxalato à hidrólise. Os derivados mais eficientes, especialmente os ésteres, têm grupos que retiram elétrons fortemente e que favorecem esse processo. A maioria desses derivados é apenas solúvel e eficiente em solventes orgânicos anidros, sendo essa uma limitação para o uso da reação em aplicações analíticas e bioanalíticas. Com o objetivo de permitir a aplicação eficiente do sistema peroxioxalato em meios aquosos foram iniciados estudos com o éster oxálico (TCPO) e o ativador (rubreno) encapsulados em microcápsulas de acetato de celulose e acetato butirato de celulose. Primeiramente, foi realizada a preparação das microcápsulas contendo TCPO e rubreno, encapsulados pela adição de uma solução em acetona dos reagentes (TCPO, RUB, AcCel e/ou AcButCel) à água, sob agitação controlada, seguido de passos de centrifugação e lavagem com água (procedimento padrão). A adição da solução dos reagentes dissolvidos em acetona à água resulta na formação das microesferas de celulose, nos quais permanecem encapsulados os reagentes TCPO e rubreno, devido a sua baixa solubilidade em água. Desta maneira espera-se que o TCPO seja protegido frente à hidrólise dado a hidrofobicidade desse microambiente.

Para efetuar a reação peroxioxalato, a suspensão das microesferas aquosa obtida é adicionada a um meio tamponado adequado e a reação quimiluminescente iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio, obtendo-se um perfil cinético típico de decaimento da intensidade de emissão (**Figura 17, p 62**).

Nos estudos para caracterizar as microesferas obtidas foi observado primeiramente que a incorporação do TCPO à microesfera é praticamente completa, sendo o conteúdo deste de 98% em relação à quantidade utilizada na preparação delas (**Figura 22, p 66**). Através de uma microscopia de fluorescência (**Figura 52**), também se verificou que o rubreno permanece dentro das microesferas não ocorrendo sua transferência para o meio aquoso, devido à sua baixa solubilidade em água.

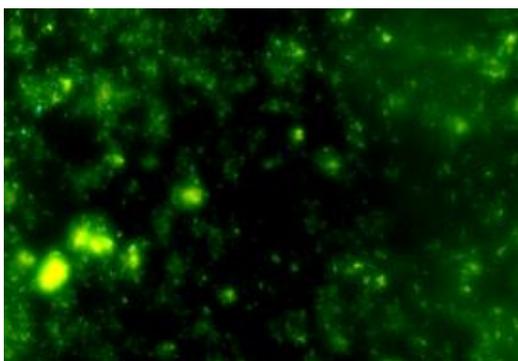


Figura 52: Microscopia de fluorescência para as microesferas de acetato de celulose preparadas pelo método padrão.

Foi investigada também a estabilidade das microesferas de acetato de celulose em meio aquoso incubando-as em água neutra por vários períodos de tempo e medindo o espectro de absorção da fase aquosa após a adição de imidazol (5 mmol L^{-1}) para catalisar a hidrólise do TCPO e observando-se a formação do fenol correspondente (**Figura 23, p 67**). A partir desses experimentos, pôde-se dizer que o acetato de celulose estabiliza o TCPO dentro de seu núcleo hidrofóbico num período de 8 horas de incubação já que não foi observado liberação do fenol.

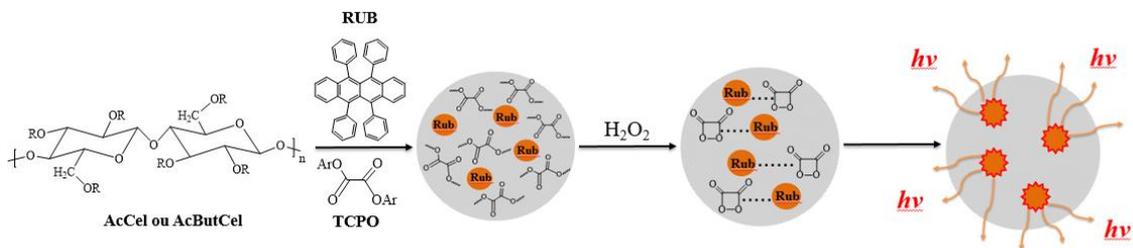
Como a reação das microesferas com H_2O_2 foi estudada num meio tamponado, também foi investigada a estabilidade delas em tampão borato ($\text{pH} = 10$), a partir de experimentos de emissão de luz. No caso das microesferas de acetato de celulose foi observado que tanto a k_{obs} quanto a intensidade de emissão diminuem com o tempo de incubação em $\text{pH} = 10$, indicando a degradação das microcápsulas e/ou a liberação de

TCPO delas para o meio aquoso básico e a consequente hidrólise do éster oxálico (**Figura 24, p 68**). Verifica-se que, após um tempo de armazenamento de 75 min, tanto k_{obs} quanto I_0 diminuem por um fator de 7 a 10, contudo, maiores tempos de armazenamento não levam mais a variações significativas desses parâmetros. Estudos por absorção demonstraram a formação de fenolato quando as microesferas são armazenadas nesse meio alcalino (**Figura 25, p 68**), uma indicação clara de que elas degradam, permitindo a liberação do TCPO para a solução aquosa quando são mantidas nesse pH.

Por outro lado, para as microesferas de acetato butirato de celulose a k_{obs} e os Φ_{CL} não mostram variação significativa com o incremento do tempo de incubação nesse meio tamponado (**Figura 31, p 73**). Estes resultados demonstram que as microesferas de acetato butirato de celulose, diferentemente das microesferas de acetato de celulose, protegem o éster oxálico da hidrólise da água também nestes meios de reação (pH = 10) por um tempo relativamente longo.

A partir dessas observações preliminares, pôde-se propor um esquema simplificado para a reação das microesferas com H_2O_2 . Inicialmente, as microcápsulas são formadas por acetato ou acetato butirato de celulose (AcCel ou AcButCel) na presença de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) e um composto fluorescente como o rubreno (RUB) (**Esquema 22**). As microesferas obtidas possuem um núcleo hidrofóbico que contém o éster oxálico e o ativador muito próximos. O processo quimiluminescente ocorre mediante duas etapas. Primeiramente, o peróxido de hidrogênio difunde-se nas microesferas e reage com as moléculas de ésteres oxálicos encapsuladas, gerando o intermediário de alta energia (IAE), por conjectura a 1,2-dioxetanodiona, supostamente ainda protegida dentro das esferas. A reação entre o TCPO e o peróxido deve acontecer principalmente na interface entre o meio aquoso e a parede da microesfera composta pelo polímero de celulose. No segundo passo da transformação, a 1,2-dioxetanodiona interage

com o ACT encapsulados, através do mecanismo CIEEL, levando à emissão de quimiluminescência a partir do RUB excitado, encapsulado dentro das microesferas (Esquema 22).



Esquema 22: Formação de microesferas de derivados de celulose contendo TCPO e rubreno e reação de quimiluminescência das microesferas funcionalizadas com peróxido de hidrogênio em meio básico aquoso.

Uma vez estudada a estabilidade das microesferas tanto em água neutra como em meio aquoso básico, experimentos de emissão variando o pH do meio foram realizados. No caso das microesferas de acetato de celulose foi observado um perfil de emissão complexo em pH = 11 quando comparados com os outros obtidos a menores pH (**Figura 19, p 63**). Uma possível explicação seria que devido à alta alcalinidade do meio o acetato de celulose degrade e a H₂O reage com o TCPO mais exposto na superfície da microesfera com uma $k_{\text{obs}} = 0,043 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ correspondente à curva **1** na **Figura 19**. Logo o TCPO menos exposto reage com H₂O₂ com uma $k_{\text{obs}} = 0,0061 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ determinada a partir da curva **2** da **Figura 19** a qual é 7 vezes menor.

Nos experimentos com acetato butirato de celulose em diferentes valores de pH, foi usado o tampão fosfato (100 mmol L⁻¹) para o meio em pH = 7, pois o tampão borato não se mostra eficiente nesse pH. Perfis típicos de decaimento da intensidade de emissão foram obtidos para todos os valores de pH, inclusive em pH = 11, contrariamente aos obtidos usando-se microesferas de acetato de celulose. Uma possível explicação seria que o incremento da hidrofobicidade do polímero leva a uma maior proteção do éster dentro

das microesferas e diminui a sua degradação hidrolítica, desta forma, inibindo a saída do TCPO para o meio aquoso.

Como mostra a **Figura 53**, a constante de velocidade de emissão aumenta com o incremento da alcalinidade do meio para ambas as microesferas. Porém, os rendimentos quânticos mostraram comportamento diferentes. Para as microesferas de acetato de celulose foi observado um incremento do rendimento e para as microesferas de acetato butirato de celulose os rendimentos diminuíram com o aumento do pH (**Figura 54**). Notou-se que em pH = 9 e 10 os rendimentos quânticos são similares para ambos microambientes.

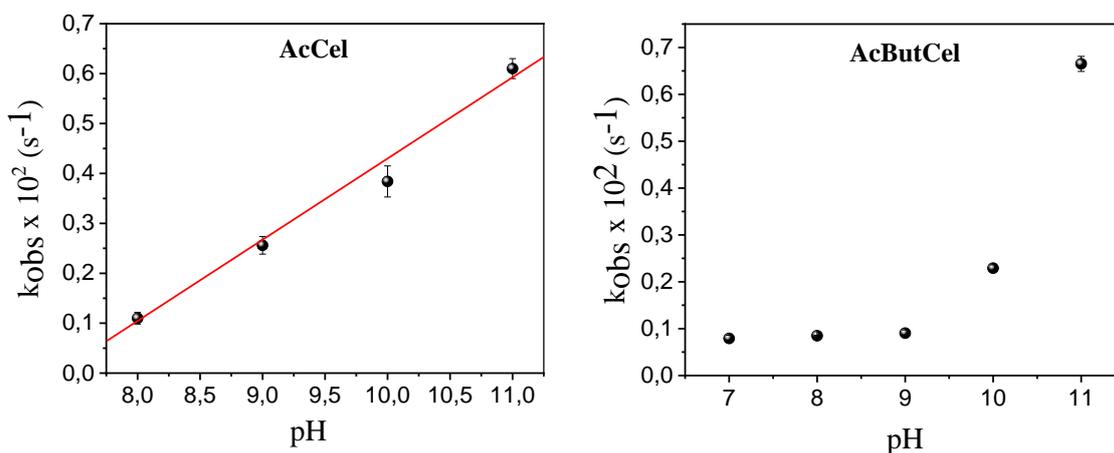


Figura 53: Dependência da constante de velocidade de decaimento da intensidade de emissão (k_{obs}) na reação das microesferas de acetato de celulose (**AcCel**) e acetato butirato de celulose (**AcButCel**) preparadas pelo método padrão com a variação do pH, $[RUB]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

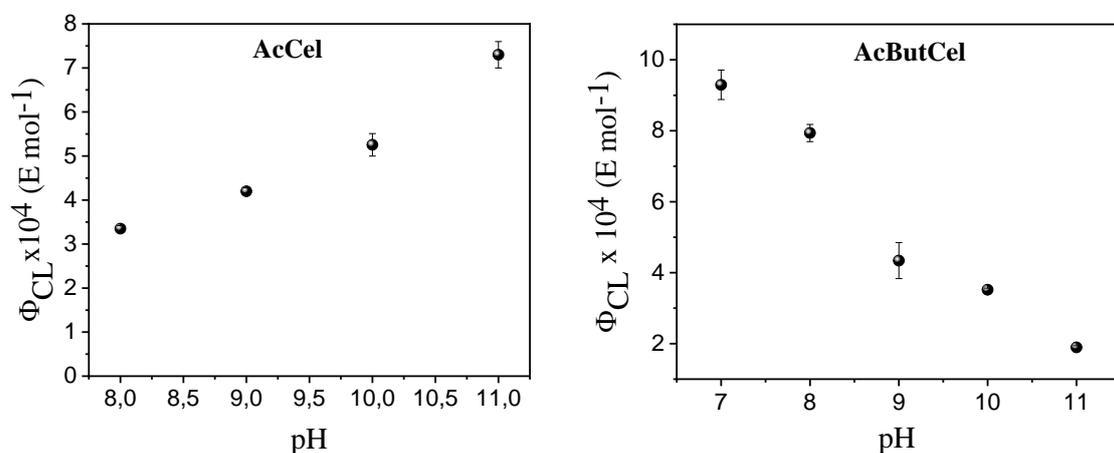


Figura 54: Dependência do rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) na reação das microesferas de acetato de celulose (**AcCel**) e acetato butirato de celulose (**AcButCel**) preparadas pelo método padrão com a variação do pH, $[RUB]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Também foi estudado o efeito da variação da $[H_2O_2]$ em um meio tamponado em $\text{pH} = 10$ sobre a cinética de emissão para ambos sistemas. As constantes de velocidade mostram uma dependência linear com a concentração, até $[H_2O_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ para ambos sistemas (**Figura 55**).

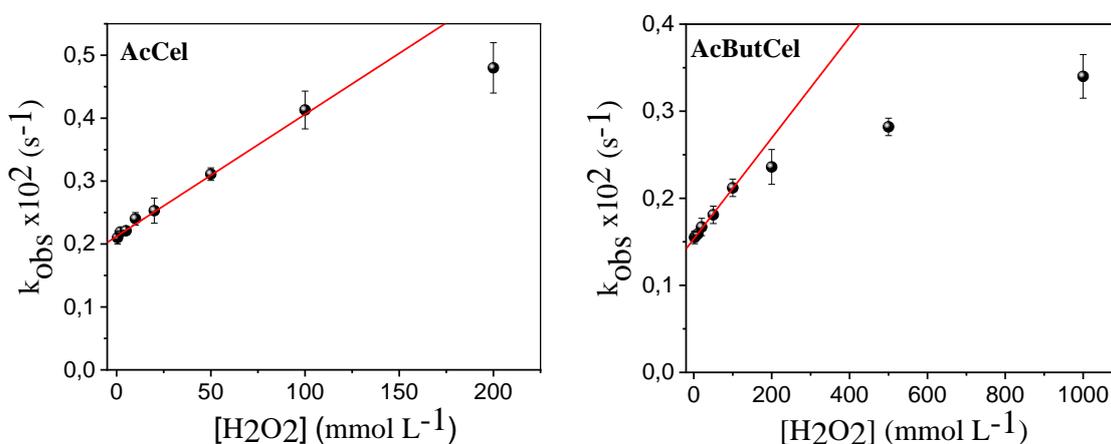


Figura 55: Dependência da constante de velocidade de decaimento de emissão (k_{obs}) na reação das microesferas de acetato de celulose (**AcCel**) e acetato butirato de celulose (**AcButCel**) preparadas pelo método padrão com a $[H_2O_2]$ em $\text{pH} = 10$, $[RUB]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Os valores de k_{obs} até 100 mmol L^{-1} foram ajustados linearmente $k_{obs} = a + b [H_2O_2]$.

Em geral, o comportamento da reação peroxioxalato em ambas as microesferas com a variação de H_2O_2 é similar, podendo-se extrair uma constante de hidrólise e peridrólise a partir da dependência da constante de velocidade com a $[H_2O_2]$ (**Tabela 42**)

Tabela 42: Valores das constantes de hidrólise de pseudo primeira ordem (k_h^1), de peridrólise de segunda ordem (k_p^2) e de hidrólise de segunda ordem (k_h^2) calculadas para a reação peroxioxalato nas diferentes microesferas.

Polímero	$k_h^1 \times 10^2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_p^2 \text{ (L mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$k_h^2 \times 10^5 \text{ (L mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
Acetato de celulose	$0,212 \pm 0,001$	$0,019 \pm 0,001$	3,81
Acetato butirato de celulose	$0,153 \pm 0,002$	$0,006 \pm 0,002$	2,75

Tampão borato (100 mmol L^{-1}), $\text{pH}=10$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$

A constante de hidrólise de pseudo primeira ordem (k_h^1) é ligeiramente maior em AcCel em comparação com AcButCel e a constante de peridrólise de segunda ordem (k_p^2)

é um fator de três maior em AcCel, indicando que AcButCel protege melhor o éster oxálico do ataque nucleofílico de HO^- ou HO_2^- localizado na fase aquosa homogênea. O cálculo da constante de velocidade de hidrólise de segunda ordem (k_h^2) mostra claramente que o TCPO encapsulado na microesfera é altamente seletivo contra o ataque do ânion hidroperoxido em comparação com o íon hidróxido, uma vez que essas constantes de velocidade de hidrólise são pelo menos duas ordens de magnitude mais baixas do que o correspondentes constantes de velocidade de peridrólise para ambas as microesferas (**Tabela 42**). Embora a maior reatividade do peróxido de hidrogênio no meio básico ($\text{pH} = 10$) também possa ser devido ao menor valor de pK_a do peróxido ($\text{pK}_a = 11,6$)¹²³ em comparação com a água, isso não pode explicar a diferença de mais de três ordens de magnitude, indicando que o peróxido de hidrogênio pode ser mais permeável nas microesferas que a água.

Por outro lado, um incremento na $[\text{H}_2\text{O}_2]$ causou um aumento tanto na intensidade de emissão quanto nos rendimentos quânticos até atingir a um valor máximo onde se obteve uma aparente curva de saturação (**Figuras 56 e 57**). Este incremento da eficiência de quimiluminescência pode ser entendido pela concorrência entre água e peróxido de hidrogênio (ou suas bases correspondentes) para o éster oxálico. A reação com o peróxido leva à formação de ácido peroxálico, o qual cicliza para formar o Intermediário de Alta Energia (IAE), a 1,2-dioxetanediona, que é responsável pela emissão de quimiluminescência por interação com o ativador; ao contrário, a reação com a água leva à formação de ácido oxálico, sem envolvimento da emissão de luz (**Esquema 23**). Portanto, em $[\text{H}_2\text{O}_2]$ mais alta, a intensidade da emissão deve ser maior, uma vez que há uma maior concentração de IAE; além disso os rendimentos quânticos devem incrementar, pois a via de peridrólise é favorecida em relação à hidrólise.

As curvas de saturação observada nas intensidades e rendimentos quânticos para altas concentrações de peróxido podem ser entendidas assumindo que nessas condições quase todo o TCPO reage com essa espécie. Por outra parte, com o incremento ainda maior na concentração de peróxido, pode ocorrer a reação do derivado de ácido monoperóxálico com outra molécula de H_2O_2 , levando à formação de ácido diperoxálico que não resulta em emissão de luz, reduzindo, portanto, as intensidades de emissão e os rendimentos quânticos, conforme observado antes em alguns sistemas de perioxalato.^{56,57,124,125}

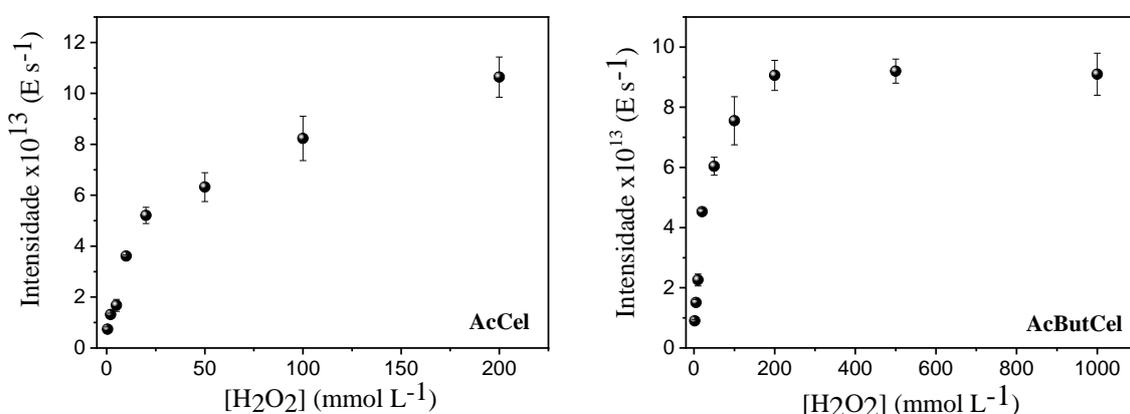


Figura 56: Dependência da intensidade máxima de emissão (I_0) na reação das microesferas de acetato de celulose e acetato butirato de celulose preparadas pelo método padrão com a $[H_2O_2]$ em $pH = 10$, $[RUB]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

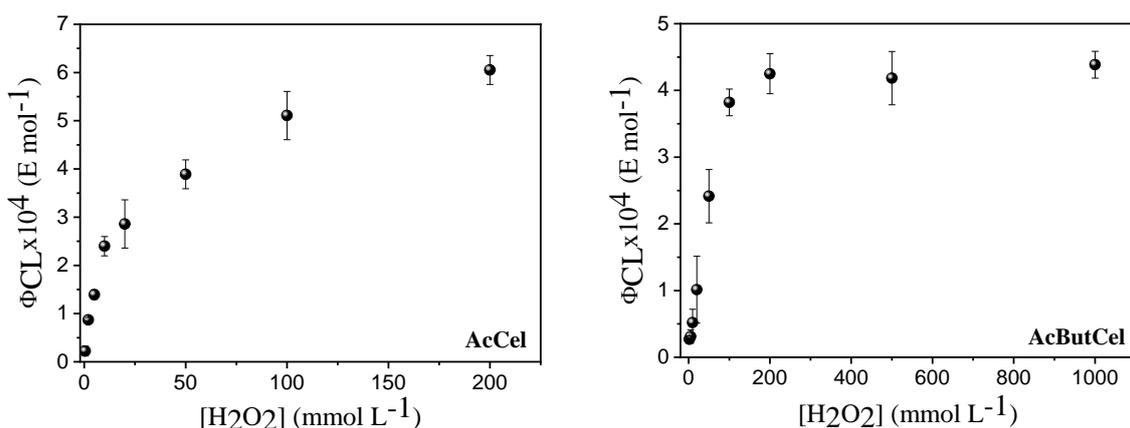
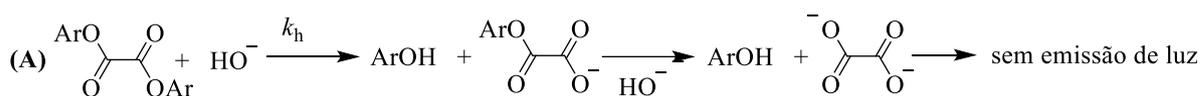
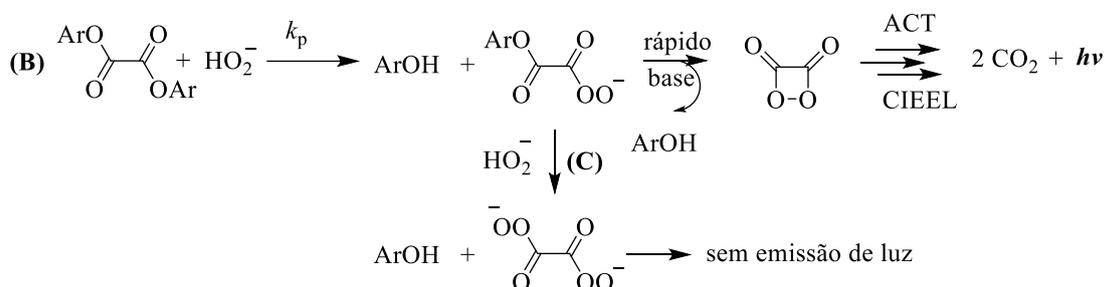


Figura 57: Dependência do rendimento de quimiluminescência (Φ_{CL}) na reação das microesferas de acetato de celulose e acetato butirato de celulose preparadas pelo método padrão com a $[H_2O_2]$ em $pH = 10$, $[RUB]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.



Ar = 2,4,6-triclorofenil



Esquema 23: Mecanismo para a reação de TCPO com H₂O₂ em tampão borato pH = 10 na interface água / microesfera. (A) Hidrólise catalisada por base, (B) reação peroxioxalato de TCPO com HO₂⁻, (C) reação lateral em altas concentrações de peróxido, não levando à formação de IAE.

Vários experimentos de controle foram realizados para entender melhor o sistema peroxioxalato nestes microambientes. Primeiramente foi observado que quando as microesferas são preparadas com 10 mg de TCPO em vez de 20 mg a velocidade da reação diminui, mas o comportamento com a crescente alcalinidade do meio não varia, sendo que tanto a k_{obs} quanto os rendimentos quânticos incrementam linearmente (**Figura 28, p 70**).

Em outro experimento controle, foi variada a quantidade das microesferas, obtidas pelo método padrão, que foi adicionada à cela da reação. Para ambos os sistemas, o aumento na quantidade de microesferas usadas no ensaio cinético resultou em um aumento da intensidade de emissão, mas não influenciou na constante de velocidade nem nos rendimentos quânticos (**Figuras 21, p 65 e 30, p 73**). Também foram preparadas microcápsulas separadas contendo TCPO numa e rubreno em outra. Na reação da mistura de ambas com H₂O₂ foi observado que a intensidade de emissão diminui consideravelmente sendo 10 vezes menor que a obtida nos experimentos onde tanto o éster como o ativador estão dentro da mesma cápsula. Estes resultados indicam que a

reação peroxioxalato nestes ensaios não ocorre pelos reagentes liberados para o meio aquoso, mas, conforme já antecipado, na interface entre o polímero e o meio aquoso, para onde o peróxido de hidrogênio pode difundir-se e na qual devem ser concentrados tanto o TCPO (precursor do IAE) e o RUB (ativador cuja interação com o IAE leva à formação de estados excitados e emissão), desta maneira aumentando a eficiência de quimiexcitação (**Esquema 22**).

Como relatado anteriormente, a reação entre o TCPO com H_2O_2 usando fluoresceína como ativador em tampão borato foi estudada recentemente por nosso grupo de pesquisa.⁵⁶ Nesses estudos, além de obter um mecanismo bem detalhado para a reação num meio completamente aquoso, observou-se que os rendimentos quânticos são muito baixos, sendo na ordem de 10^{-5} E mol⁻¹. De modo a se comparar a eficiência da reação usando microesferas como método de encapsulamento do éster oxálico e em meio totalmente aquoso, experimentos cinéticos foram realizados nas mesmas condições experimentais. Devido à insolubilidade do rubreno em meio aquoso foi usado o rubreno sulfonado como ativador. Pôde-se observar que os rendimentos quânticos aumentaram consideravelmente com o uso de microesferas sendo duas ordens de magnitude maiores ($\Phi_S = 10^{-4}$ E mol⁻¹) em comparação aos obtidos em meio aquoso ($\Phi_S = 10^{-6}$ E mol⁻¹) (**Figura 32, p 74**). Esses resultados demonstram que a eficiência da reação peroxioxalato pode ser incrementada encapsulando-se o éster oxálico e o ativador em microesferas de acetato butirato de celulose.

De forma a se possibilitar o armazenamento das microesferas, as amostras obtidas pelo método padrão foram liofilizadas e sua reação com H_2O_2 foi estudada a partir de experimentos de emissão, após ressuspensão em meio aquoso tamponado. Um resultado surpreendente foi o incremento considerável da intensidade de emissão e dos rendimentos quânticos em relação às amostras não liofilizadas (**Figura 35, p 76**). Uma possível

explicação para a diferença dos rendimentos quânticos poderia ser supondo que uma vez as amostras liofilizadas, o intumescimento delas incrementa a proteção do éster oxálico dentro de seu núcleo hidrofóbico evitando ainda mais a hidrólise do mesmo.

Por outro lado, observou-se que para as microesferas de acetato de celulose (**MAcCel**) a cinética da reação com peróxido mantém-se similar até 21 dias após a liofilização (**Figura 38 A, p 78**). No entanto, para as microesferas de acetato butirato de celulose (**MAcButCel**), a cinética da reação parece sofrer mais modificações, porém isso se aplica mais para a parte rápida da cinética, que parece menos acentuada após maior tempo de armazenamento (**Figura 38 B, p 78**).

Os rendimentos quânticos das amostras liofilizadas após 1, 7 e 21 dias foram correlacionados com o tempo de incubação na água (**Figuras 58, 59 e 60**). Para ambos sistemas o comportamento é semelhante, havendo redução no rendimento quântico com o tempo de exposição.

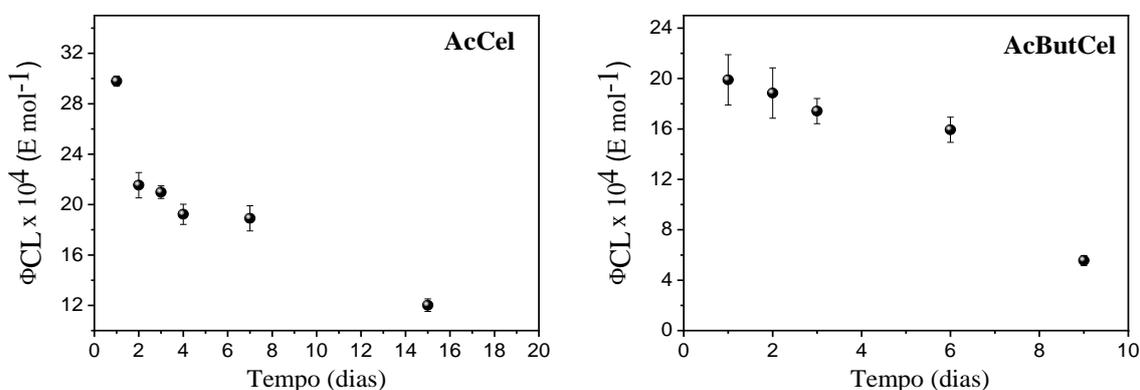


Figura 58: Dependência dos Φ_{CL} na reação de H_2O_2 com as microesferas liofilizadas após 1 dia e mantidas em água com o tempo de armazenamento; reação efetuada em tampão borato (100 mmol L^{-1}), $\text{pH} = 10$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{RUB}]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{TCPO}]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

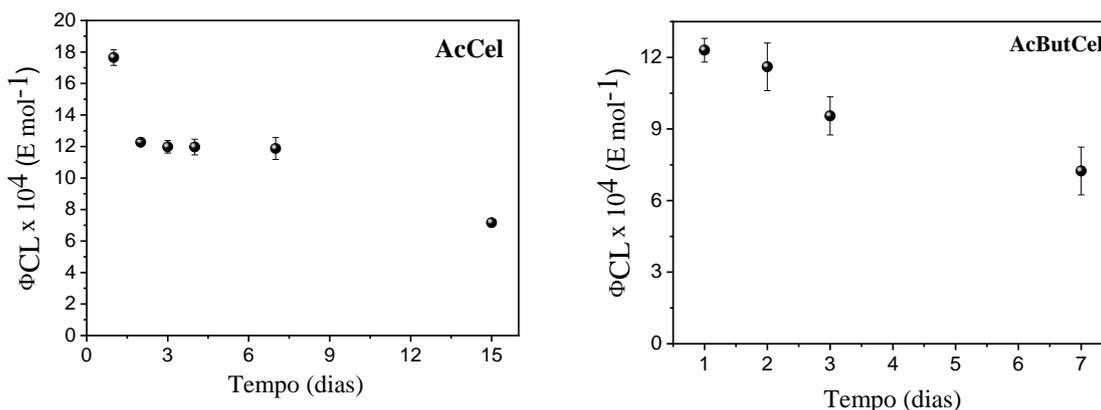


Figura 59: Dependência dos Φ_{CL} na reação de H_2O_2 com as microesferas liofilizadas após 7 dias e mantidas em água com o tempo de armazenamento; reação efetuada em tampão borato (100 mmol L^{-1}), $\text{pH} = 10$, $[H_2O_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[RUB]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

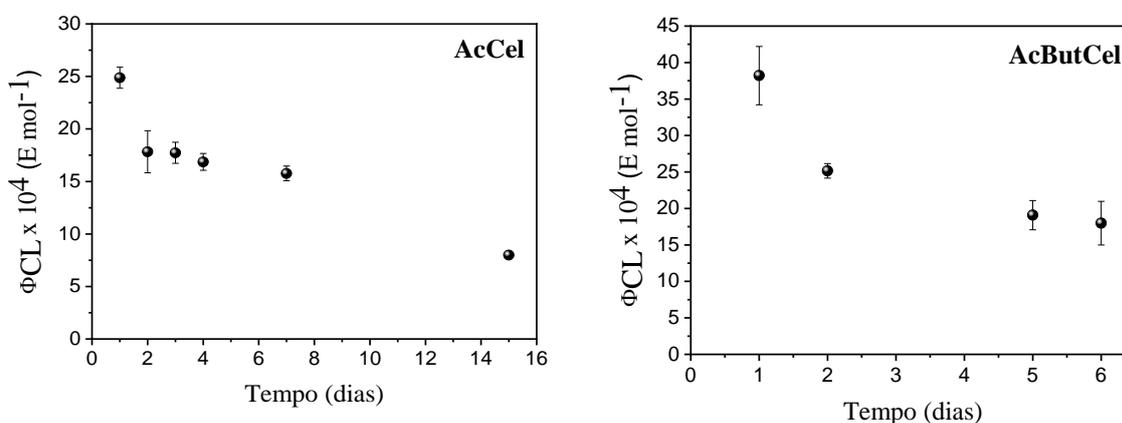


Figura 60: Dependência dos Φ_{CL} na reação de H_2O_2 com as microesferas liofilizadas após 21 dias e mantidas em água com o tempo de armazenamento; reação efetuada em tampão borato (100 mmol L^{-1}), $\text{pH} = 10$, $[H_2O_2] = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $[RUB]_f = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[TCPO]_f = 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Conforme mostrado na **Tabela 43**, os rendimentos quânticos diminuem para pouco mais da metade quando as amostras foram armazenadas secas por 7 dias na geladeira, para ambas as microesferas. Após 21 dias na forma liofilizada, as intensidades de emissão e, conseqüentemente, os rendimentos quânticos são similares a aqueles obtidos com as amostras armazenados por 1 dia, sendo mais altos que os das amostras armazenadas por 7 dias.

Tabela 43: Rendimentos quânticos de quimiluminescência da reação das microesferas liofilizadas com H_2O_2 .

Tempo após a liofilização (d)	MAcCel	MAcButCel
	$\Phi_{CL} \times 10^4$ (E mol ⁻¹)	
1	29,8 ± 0,4	20 ± 2
7	17,6 ± 0,5	12,3 ± 0,5
21	25 ± 1	38 ± 4

pH = 10, [H₂O₂] = 100 mmol L⁻¹, [RUB]_f = 1,0 mmol L⁻¹, [TCPO]_f = 2,2 mmol L⁻¹.

Por outro lado, durante o armazenamento em água das microesferas liofilizadas, há uma diminuição significativa de 30% após mais um dia de incubação, mantendo-se constante até o sétimo dia para **MAcCel** (**Figuras 58, 59 e 60, esquerda**). No caso das **MAcButCel**, a diminuição no rendimento parece constante, sendo que após 7 dias em água o rendimento diminui para a metade (**Figuras 58, 59 e 60, direita**).

Os rendimentos quânticos obtidos da reação dos dois sistemas de microesferas mostram-se similares com rendimentos cerca de 40% maiores para **MAcCel** (exceto na amostra liofilizada e mantida seca por 21 dias). Porém as intensidades para **MAcButCel** são uma ordem de grandeza menores comparado com **MAcCel**. Esses fatos são causados pelas diferenças nas cinéticas para ambos os sistemas, sendo que as reações do sistema **MAcButCel** com peróxido são muito mais lentos que as correspondentes com **MAcCel** (**Figuras 36, 37 e 38, p 76-78**).

O dado mais importante destes resultados é que se pode observar que tanto as cinéticas (**Figuras 36 e 38, p 76 e 78**) quanto a característica de estabilidade das suspensões aquosas de ambos os sistemas para as amostras secas por 21 dias são similares às das amostras armazenadas por 1 dia na geladeira após a liofilização (**Figuras 58 e 60**).

Por último, as microesferas obtidas pelo método padrão também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**Figura 61**). As imagens demonstraram que as partículas possuem uma estrutura esférica. Notou-se que o diâmetro determinado pelo MEV é bem menor que o obtido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) devido

ao fato de que na MEV as imagens foram obtidas com as esferas no estado seco (**Tabela 44**).

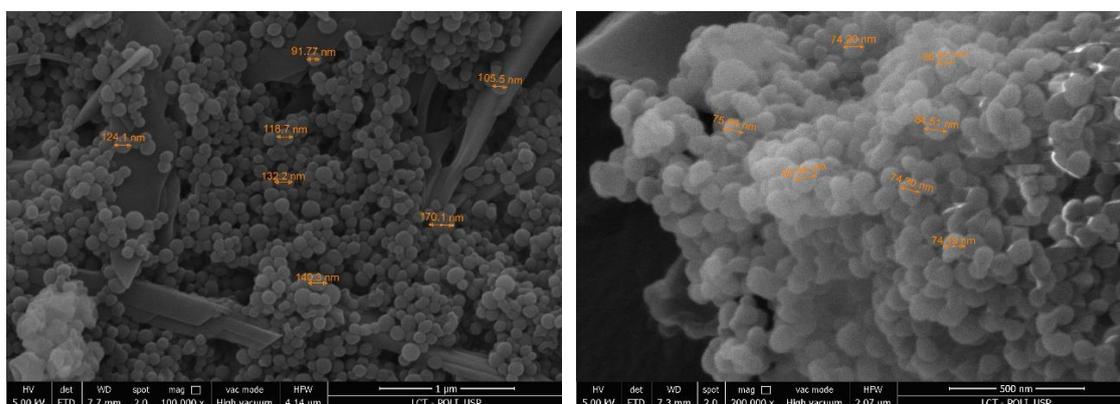


Figura 61: Imagens de MEV (com magnificação de 100 000 x e 200 000) das microesferas de acetato de celulose (esquerda) e acetato butirato de celulose (direita).

Tabela 44: Diâmetro das microesferas de acetato de celulose e acetato butirato de celulose obtido a partir das técnicas de caracterização DLS e MEV.

	AcCel	AcButCel
	d (nm)	
DLS	1400 ± 700 (água)	1300 ± 800 (água)
	1400 ± 500 (pH = 10)	1300 ± 400 (pH = 10)
MEV	120 ± 20	80 ± 10

A caracterização das microesferas tanto por DLS quanto por MEV revelaram que o método empregado para a formulação delas permite obter microesferas de AcCel e AcButCel de tamanho parecido, apesar de possuírem hidrofobicidade diferentes.

5. Conclusões

(i) Verificou-se que a hidrólise do TCPO em diferentes misturas aquosas de solventes orgânicos ocorre através de uma catálise básica intramolecular pela carboxila adjacente do éster. Nesses estudos cinéticos foi observado que, aparentemente, os parâmetros de solventes tal como basicidade não influenciam na constante de velocidade.

(ii) Observou-se que a reação do DNPO, tanto em meio anidro quanto em meio aquoso, ocorre por um ataque nucleofílico direto do H₂O₂ ao éster oxálico, não envolvendo

catálise nucleofílica por IMI-H, contrariamente ao observado na reação de TCPO com H_2O_2 , onde forma-se tal intermediário.

(iii) Para ambos os ésteres, a constante de velocidade de decaimento de emissão aumenta com o incremento da concentração de água ao sistema, indicando a concorrência entre água e peróxido de hidrogênio como reagentes nucleofílicos para os ésteres. As constantes bimoleculares de peridrólise são majoritariamente mais altas que os de hidrólise, confirmando a maior nucleofilicidade do peróxido de hidrogênio devido ao efeito α .

(iv) A eficiência do passo de quimiexcitação da reação peroxioxalato aumenta com a concentração da água até $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ sofrendo diminuição em concentrações mais altas. Sendo assim, a presença de pequenas quantidades de água pode aumentar a sensibilidade da reação peroxioxalato em aplicações analíticas. A diminuição dos rendimentos quânticos em maiores concentrações é devido à influência da água sobre o passo de quimiexcitação, não somente pela maior velocidade de hidrólise de éster oxálico nestas condições.

(v) Derivados de cumarinas e curcumina podem ser utilizados como novos ativadores compatíveis com o meio ambiente no sistema peroxioxalato em 1,2-dimetoxietano (DME) anidro e em misturas DME: H_2O 1:1 (v/v), sendo elas possíveis candidatos para se utilizar em aplicações médicas.

(vi) A reação peroxioxalato pode ser conduzida em meio exclusivamente aquoso através do uso de microesferas de acetato e acetato butirato de celulose, obtendo-se rendimentos quânticos pelo menos uma ordem de magnitude maiores que os obtidos em meio aquoso em condições diretamente comparáveis. Sendo assim o sistema pode ser utilizado em aplicações analíticas e bioanalíticas.

6. Parte Experimental

6.1 Reagentes e solventes

6.1.1 Reagentes

Oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) foi obtido comercialmente (Sigma $\geq 99\%$) e recristalizado em uma mistura 14:5 de clorofórmio: hexano anidros (PF 189 a 191 °C, literatura: 190 °C).¹²⁶ Imidazol (IMI-H, Sigma, 99%), oxalato de bis(2,4-dinitrofenila) (DNPO, Aldrich), hemina bovina (cloreto de ferriprotoporfirina IX, Sigma), luminol (5-amino-2,3-diidro-ftalazina-1,4-diona, Sigma Aldrich), peroxidase de raiz forte HRP-VI (Sigma, hidrogen-peroxidase oxidoreductase, tipo VI-A), ácido bórico (H_3BO_3 , Reagens), tetraborato de sódio decaidratado ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, Merck), acetato de celulose (Eastman), acetato butirato de celulose (Eastman) e os ativadores 9,10-difenilantraceno (DPA), rodamina 6G (Rod), 9,10-difenilantraceno (DPA), 2,5-difeniloxazol (PPO), rubreno (Rub), perileno (Per), cumarina 153, 151, 120 e a curcumina (todos Aldrich) foram obtidos comercialmente e utilizados sem prévia purificação. O rubreno sulfonado foi sintetizado a partir do método usado por Baretz e colaboradores.¹²⁷ 200 mg de rubreno foram dissolvidos numa mistura de 1,2-dicloroetano (12 mL), dioxano (12 mL) e diclorometano (6 mL). Ácido sulfúrico fumegante (18 % SO_3 , 1,0 mL) foi adicionado gota a gota à solução de rubreno a temperatura ambiente. Após adição completa do ácido, a mistura de reação foi agitada por 16 horas. Carbonato de sódio aquoso foi então adicionado lentamente até o pH atingir 7. A fase aquosa foi separada, lavada com diclorometano e concentrada. O produto foi dissolvido em metanol (20 mL) e filtrado. Finalmente a solução concentrada de metanol foi evaporado em rotoevaporador obtendo-se 180 mg de rubreno sulfonado.

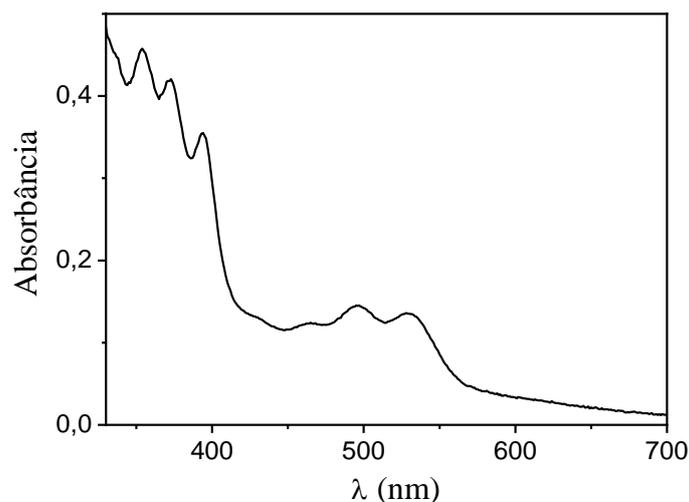


Figura 62: Espectro de absorção do rubreno sulfonado em água.

6.1.2 Solventes

1,2-dimetoxietano (DME) foi submetido á destilação (83-85 °C) e ao destilado adicionaram-se fios de sódio, deixou-se o solvente refluxando e, posteriormente, adicionou-se benzofenona como indicador de grau anidro com o solvente a quente. O solvente foi submetido de novo a refluxo e, quando adquiriu uma coloração azul intensa (meio anidro), destilou-se novamente.

Acetato de etila foi tratado inicialmente com cloreto de cálcio anidro durante a noite e filtrado no dia seguinte. Seguidamente adicionou-se EDTA e colocou-se em agitação durante duas horas e depois filtrou-se. Ao filtrado, adicionou-se hidróxido de potássio sólido e foi mantido sob agitação durante 40 min em banho de gelo. Em seguida, o solvente foi destilado. Finalmente foi colocado num recipiente contendo peneira molecular de 4Å e deixado em repouso a noite toda.

Acetonitrila (ACN) foi refluxado com hidreto de cálcio durante 10 min. Depois foi destilado (82 °C) e mantido sob peneira molecular de 3 Å.

2,2,2-trifluoroetanol (TFE) foi tratado com KCO_3 , mantendo-o sob agitação durante um dia, e destilado posteriormente (76-78 °C). O tratamento destes solventes foi feito de modo a torná-los anidros para evitar a hidrólise indesejada do éster oxálico.

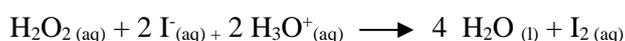
6.2 Procedimentos experimentais

6.2.1 Solução estoque de peróxido de hidrogênio

Para os ensaios cinéticos, prepararam-se soluções estoques de peróxido de hidrogênio no solvente desejado através da diluição de uma solução aquosa de 60% (m/m). Para o preparo de soluções $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, diluiu-se 1 mL de H_2O_2 em 20 mL do solvente. Após a diluição em solventes orgânicos, adicionou-se MgSO_4 à solução e deixou-se em repouso a 4 °C durante 4h. Filtrando-se a solução, obteve-se uma solução anidra de peróxido de hidrogênio.

6.2.2 Determinação da concentração das soluções estoque de peróxido de hidrogênio

Para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio utilizou-se o ensaio iodométrico.¹²⁸ Primeiramente diluiu-se a solução estoque do peróxido de hidrogênio preparado 100 vezes em água. Foram então transferidos para uma cubeta de quartzo de absorção (de volume máximo 3,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm) 3,0 mL de uma solução de KI $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HAc/Ac $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 3,8 e 10 μL de uma solução de peroxidase de raiz forte (HRP-VI, 1 mg mL^{-1}) e então registrada a linha base da mistura. Logo após, adicionaram-se 5 μL da solução diluída de H_2O_2 , agitou-se a mesma e mediu-se a absorbância em 353 nm ($\epsilon_{353\text{nm}} = 25500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As medidas foram realizadas em triplicata e a média das três absorbâncias foi utilizada para a obtenção da $[\text{H}_2\text{O}_2]$ levando-se em conta as diluições realizadas. Neste método, a quantidade de iodeto oxidado é proporcional à concentração de peróxido, cuja concentração se obtém diretamente pela absorbância em 353 nm da espécie I_2 formada (**Equação 9**).



(Equação 9)

6.2.3 Medidas de pH e soluções tampão borato

Medidas de pH de soluções aquosas foram efetuadas em um pHmetro Corning 430 previamente calibrado com soluções padrão pH 4,0; 7,0 e 10,0 com agitação magnética e a 25 °C. Tampão borato foi preparado a partir de uma solução de H₃BO₃ 0,1 mol L⁻¹ e uma solução de Na₂B₄O₇·10H₂O 0,1 mol L⁻¹. As soluções tampão foram preparadas no dia anterior dos experimentos e mantidas sob refrigeração.

6.2.4 Estudo solvatocrômico

Para a realização das medidas de polaridade foi preparada uma solução estoque da sonda 2,6-dicloro-4-(2,4,6-trifenil-N-piridínio) fenolato em acetona (1,3x10⁻³ mol L⁻¹) (**Figura 63**). Posteriormente, foram adicionados 150 µL desta solução em tubos de vidro e a acetona foi evaporada numa estufa a 50 °C sob pressão reduzida. As soluções dos solventes moleculares e das suas misturas com água foram adicionadas aos tubos contendo a sonda sólida e as mesmas foram dissolvidas. A concentração final da sonda nas soluções foi 1.10⁻⁴ mol L⁻¹. Os espectros de UV- VIS foram obtidos por triplicata. Com base nos dados de λ_{máx} (da banda de transferência de carga intramolecular da sonda), calcula-se o valor da polaridade empírica, baseado na escala E_T(33) (**Equação 10**).¹²⁹

$$E_T(33), \text{ kcal/mol} = 28591,5 / \lambda_{\text{máx}} (\text{nm}) \quad (\text{Equação 10})$$

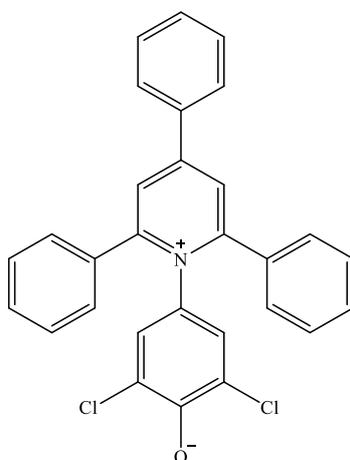


Figura 63: Estrutura de 2,6-dicloro-4-(2,4,6-trifenil-N-piridínio) fenolato

6.2.5 Preparação das frações molares de água nas misturas binárias

As frações molares de água nas diferentes misturas usadas nos ensaios cinéticos de hidrólise do TCPO foram preparadas a partir da relação das massas entre a água e o solvente molecular. Para cada fração foram pesadas as massas correspondentes dos dois solventes e o volume total das misturas foi medido numa bureta fina devido á contração dos volumes que ocorre quando eles são misturados. A concentração da água foi determinada a partir desse volume final.

6.2.6 Preparação das microesferas

Para fabricação das microesferas foi empregada a técnica de gotejamento¹³⁰, 20 mg de oxalato de bis(2,4,6-triclofenila) (TCPO), 20 mg de acetato de celulose ou acetato butirato de celulose e 10 mg de rubreno foram dissolvidos em 4 mL de acetona. A solução foi gotejada em 10 mL de água MQ sob agitação magnética. As microesferas obtidas por centrifugação foram lavadas (retirada do sobrenadante, adição de mais 10 mL de água, centrifugação e retirada do sobrenadante) e resuspensas em água MQ (10 mL). Estas suspensões foram usadas para os ensaios cinéticos após adição aos meios tamponados adequados. O diâmetro hidrodinâmico das microesferas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (Malvern Zetasizer Nano ZS90).

6.3 Equipamentos

Medidas de emissão de luz foram efetuadas em um fluorímetro Varian Eclipse, com *cell holder* com espaço para 4 cubetas e com agitação magnética operando com as celas termoestatizadas a $25,0 \pm 0,5$ °C por banhos Varian Cary. A sensibilidade do fluorímetro foi regulada variando-se os parâmetros de voltagem da fotomultiplicadora e abertura de fenda do equipamento. Medidas de espectrofotometria UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Probe, com *cell holder* com espaço para 18 cubetas, termoestatizado por um banho Varian Cary PCB 150 a $25,0 \pm 0,5$ °C.

6.4 Ensaios Cinéticos

6.4.1 Medidas cinéticas de emissão ou absorção de luz do sistema peroxioxalato

As medidas cinéticas de emissão foram realizadas em cubetas de quartzo e feitas em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. O volume final de cada solução a ser analisada foi de 2,0 mL, enquanto que nas medidas cinéticas de absorção de luz no UV-Visível foram utilizadas cubetas de quartzo para absorção, com 3,0 mL de volume máximo e caminho óptico de 1,0 cm. As soluções de todos os reagentes foram preparadas, na medida do possível, no próprio solvente que estava sendo utilizado ou na mesma mistura de solventes. Para a transferência dos volumes adequados foram utilizadas pipetas de vidro graduadas e microsseringas de injeção. Quando da utilização de ativadores hidrocarbonetos, as cubetas de fluorescência foram lavadas com tolueno (5x), etanol (5x), acetona (2x) e então secas com intenso fluxo de ar. Todas as medidas em certa condição experimental foram realizadas, pelo menos, em três a cinco réplicas.

Um experimento típico foi realizado da seguinte maneira: em uma cubeta de quartzo para fluorescência foram adicionados 1,85 mL de DME, 10 μL da solução estoque de cumarina 153 ($0,66 \text{ mmol L}^{-1}$), 100 μL da solução estoque de IMI (100 mmol L^{-1}) e 14 μL da solução de H_2O_2 ($1,40 \text{ mol L}^{-1}$) de modo que o volume final na cubeta fora em torno de 2 mL. Iniciou-se a aquisição de dados do aparelho e adicionou-se 20 μL da solução estoque de TCPO, para se obter uma $[\text{TCPO}]_f = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$.

As concentrações específicas de cada reagente no momento da medida são apresentadas nas seções referentes a cada estudo. Os resultados obtidos para estes experimentos são um perfil de emissão de luz em função do tempo que de maneira geral da um aumento rápido da intensidade de emissão de luz no início, seguido por uma queda lenta da intensidade, esse último acompanhado por pelo menos três tempos de meia-vida (**Figura 64**). Dependendo das condições experimentais, o aumento da intensidade de

emissão ocorre de forma abrupta impedindo a atribuição do valor da constante de velocidade para esta fase da reação.

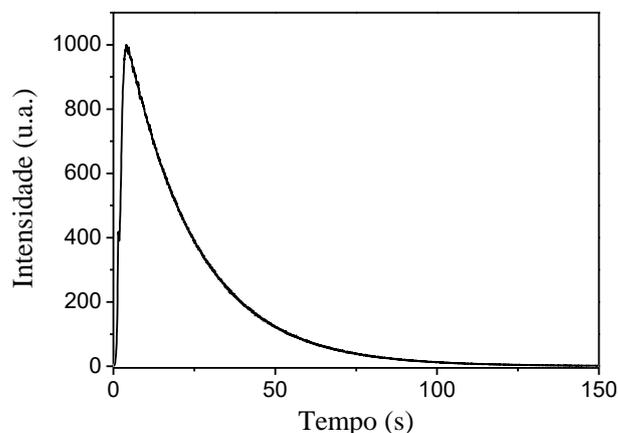


Figura 64: Perfil cinético da intensidade de emissão em função do tempo de reação entre TCPO ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), peróxido de hidrogênio (10 mmol L^{-1}), IMI (5 mmol L^{-1}) e cumarina 153 ($0,026 \text{ mmol L}^{-1}$) em DME.

Enquanto que a cinética de absorção, após o início da aquisição desta, observou-se o aumento de absorbância em função do tempo no comprimento de onda relativo à máxima absorção do grupo fenólico de saída. Registrou-se a absorbância até que a mesma ficasse constante. As medidas de absorção foram sempre efetuadas na ausência do ativador, porque os ativadores utilizados mostram absorbância significativa nos comprimentos de onda onde se observa a formação dos fenóis liberados pelos ésteres oxálicos.

Nos ensaios cinéticos de emissão de luz dos ésteres TCPO e DNPO nas diferentes misturas aquosas de DME e acetato de etila as soluções estoques de imidazol, dos ativadores hidrofóbicos e dos ésteres foram preparadas no solvente orgânico correspondente. Em uma cubeta de quartzo para fluorescência foram adicionados $4 \mu\text{L}$ da solução estoque de IMI-H (100 mmol L^{-1}) sendo sua concentração final de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, $16 \mu\text{L}$ da solução estoque de peróxido ($1,27 \text{ mol L}^{-1}$), com concentração final de 10 mmol L^{-1} , certo volume da solução estoque dos ativadores dependendo da concentração final desejada e pequenas quantidades de água que variaram desde $4 \mu\text{L}$ até $235 \mu\text{L}$

correspondente a cada concentração utilizada. O volume final na cubeta foi completado para 1,98 mL com a adição do volume adequado de DME. A reação foi iniciada com 20 μL da solução estoque do éster, sendo sua concentração final de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Nos estudos com ativadores hidrofílicos, foram preparadas soluções estoques concentradas deles em água de forma tal que sua adição á cubeta também coincidiria com a concentração de água desejada.

6.4.2 Medidas cinéticas de emissão de luz das microesferas baseadas no sistema peroxioxalato

Os ensaios cinéticos com as microesferas foram realizados a partir da adição de peróxido de hidrogênio á cubeta contendo 1 mL da suspensão aquosa das microcápsulas, obtidas como relatado anteriormente, e 1 ml de tampão borato (200 mmol L^{-1}).

6.4.3 Calibração do fluorímetro para cálculos de rendimentos quânticos singletes (Φ_s)

A calibração da fotomultiplicadora do fluorímetro foi realizada utilizando-se solução de luminol como padrão. Inicialmente preparou-se uma solução estoque de luminol $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio ([fosfato] = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH = 11,6. A concentração exata desta solução foi determinada através de espectroscopia UV-Vis verificando-se a absorvância em 347 nm ($\epsilon_{347} = 7600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma solução estoque de H_2O_2 0,30% foi preparada diluindo-se 1,25 mL da solução aquosa de peróxido de hidrogênio 60% em 250 mL de água Milli-Q. Duas soluções de hemina, com absorvâncias em 414 nm próximas a 0,2 (solução diluída) e 0,6 (solução concentrada) foram preparadas a partir de diluições com água de uma solução de 2,5 mg de hemina em 5,0 mL de NaOH 1 mol L^{-1} e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Em uma cubeta de quartzo de fluorescência foram colocados 2,8 mL de solução de luminol e 100 μL de H_2O_2 0,30%; iniciou-se aquisição de dados e adicionaram-se 50 μL da solução diluída de hemina ($A_{414} = 0,2$), resultando em um pico de intensidade de luz

emitida. Após este pico decair até próximo da linha base, adicionaram –se 50 µL de solução de hemina concentrada ($A_{414} = 0,6$), o que pode gerar um pico de pequena intensidade de emissão (**Figura 65**). O procedimento foi repetido até que não se observe mais emissão após a adição de solução de hemina, indicando que todo luminol fosse consumido. Foi feita a calibração da fotomultiplicadora em 600 V e fendas 10 e 20 nm, 800 V e fendas 10 e 20 nm e 1000 V e fendas 10 e 20 nm (**Tabela 45**).

O fator de correção da calibração com luminol (f_{lum}) foi calculado a partir do rendimento quântico quimiluminescente do luminol (Φ_{lum}), igual a $(1,14 \pm 0,06) \times 10^{-2}$ E mol⁻¹, que não depende da concentração inicial de luminol quando esta estiver entre 10^{-9} e $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. (**Equação 11**).^{131,132}

$$f_{lum} = \frac{\Phi_{lum} n_{lum}}{Q_{lum}} \quad (\text{Equação 11})$$

Em que:

f_{lum} : fator de calibração com luminol

Φ_{lum} : rendimento quântico de quimiluminescência do luminol

n_{lum} : número de mols do luminol na cubeta

Q_{lum} : quantidade total de luz emitida pelo luminol (área sob a curva).

Os cálculos dos fatores de calibração da fotomultiplicadora para as diferentes condições de sensibilidade desta foram feitos a partir das áreas sob as curvas de intensidade de emissão (obtidas pela integração numérica de todos os picos registrados) em cada ensaio realizado (**Figura 65, Tabela 45**). Para cada condição de sensibilidade da fotomultiplicadora, foram feitos ao menos três (03) determinações com o ensaio luminol.

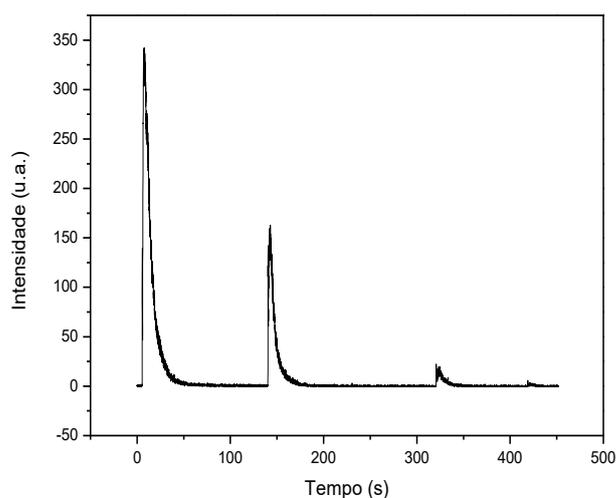


Figura 65: Perfil temporal de uma curva de calibração da fotomultiplicadora típica utilizando-se o padrão luminol.

Tabela 45: Valores dos fatores de calibração (f_{lum}) para diferentes voltagens da fotomultiplicadora e fendas do espectrofluorímetro.

Fenda (nm)	Voltagem (V)	f_{lum} (E u.a. ⁻¹)
10	400	$1,07 \times 10^{-12}$
20	400	$5,22 \times 10^{-13}$
2,5	600	$1,43 \times 10^{-13}$
5	600	$5,13 \times 10^{-14}$
10	600	2×10^{-14}
20	600	$1,12 \times 10^{-14}$
10	800	$1,51 \times 10^{-15}$
20	800	$6,7 \times 10^{-16}$
10	1000	$1,26 \times 10^{-16}$
20	1000	$6,05 \times 10^{-17}$

A determinação dos rendimentos quânticos de quimiluminescência (Φ_{CL}) e de formação de estados excitados singlete (Φ_s) foi feita através do cálculo da área sob a curva e utilizando-se os fatores de calibração calculados anteriormente (**Equação 12 e 13**).

$$\Phi_{CL} = \frac{Q_{em} f_{lum} f_{fot}}{n_{TCPO}} \quad \text{(Equação 12)}$$

$$\Phi_s = \frac{\Phi_{CL}}{\Phi_{FL}} \quad \text{(Equação 13)}$$

Em que:

Q_e : área sob a curva

f_{lum} : fator de correção da calibração com luminol

f_{fot} : fator de sensibilidade da fotomultiplicadora com o comprimento de onda (Tabela 46)

n_{TCPO} : número de mols de TCPO na cubeta

Φ_{FL} : rendimento quântico de fluorescência do ativador (para o DPA= 0,95 em solventes polares)

Os fatores de correção de sensibilidade da fotomultiplicadora com o comprimento de onda de emissão foram calculados a partir dos valores de sensibilidade fornecidos pelo fabricante Hamamutso Photonics K.K e os máximos dos espectros de emissão da cada ACT (**Tabela 46**), relacionados com a sensibilidade da fotomultiplicadora no comprimento de emissão máximo de quimiluminescência do luminol (431 nm).

Tabela 46: Comprimentos de onda máximos de emissão (λ_{max}) e fatores de calibração da sensibilidade da fotomultiplicadora com o comprimento de onda (f_{fot}) para os diferentes ativadores.

ACT	λ_{max}	f_{fot}
DPA	450	1,10
PPO	400	1,13
RUB	560	1,87
PER	480	1,21
ROD 6G	550	1,73
Cum 153	532	1,56
Cum 151	475	1,20
Cum 120	440	1,00
Curcumina	550	1,73

6.4.4 Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{FL})

O rendimento quântico de fluorescência dos ativadores foi determinado pelo método relativo^{133,134}, utilizando-se padrões de fluorescência adequados. Em uma cubeta de quartzo para fluorescência foram adicionados 2 mL do solvente desejado purgado com

nitrogênio. Obteve-se a linha base dos espectros do solvente puro. Em seguida foram registrados os espectros de absorção em um intervalo de comprimentos de onda que englobasse o máximo de absorção de soluções obtidas pela adição de pequenos volumes de soluções 0,1 mmol L⁻¹ dos ativadores até uma absorbância menor que 0,1 fosse obtida no comprimento de onda de máxima absorção. Esta cubeta contendo a mesma solução foi inserida no fluorímetro e se registrou o espectro de emissão de fluorescência corrigido. Calcularam-se as áreas em baixo das curvas de fluorescência obtidas para cada ativador (A_{FL}) e se obteve o valor de Φ_{FL} através da **Equação 14**, sendo que n é o índice de refração do meio para realizar a medida do padrão ou da mostra.

$$\Phi_{FL}^{ACT} = \Phi_{FL}^{padrão} \frac{Abs_0^{padrão}}{Abs_0^{ACT}} \frac{A_{FL}^{ACT}}{A_{FL}^{padrão}} \left(\frac{n^{ACT}}{n^{padrão}} \right)^2$$

(Equação 14)

Referências Bibliográficas

1. Wiedemann, E. Über Fluorescenz und Phosphorescenz. *Ann. Phys.* **270**, 446–463 (1888).
2. Albrecht, H. O. Über die Chemiluminescenz des Aminophthalsäurehydrazids. *Phys. Chem. (Muenchen, Ger.)* **136**, 321–330 (1928).
3. Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M. & Lago, G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. **72**, 896–913 (2007).
4. Quickenden, T. I., Ennis, C. P. & Creamer, J. I. The forensic use of luminol chemiluminescence to detect traces of blood inside motor vehicles. **19**, 271–277 (2004).
5. Baader, W.J., Stevani, C.V., Bastos, E. L. *Chemiluminescence of Organic Peroxides. The Chemistry of Peroxides, Zvi Rappoport (Ed.), Wiley-VCH, Chichester. 1211-1278.* (2006).
6. Schuster, G. B. & Schmidt, S. P. Chemiluminescence of Organic Compounds. *Adv. Phys. Org. Chem.* **18**, 187–238 (1982).
7. Hercules, D. M. Chemiluminescence from Electron-Transfer Reactions DAVID. *Acc. Chem. Res.* **2**, 301–307 (1969).
8. Bixon, M. & Jortner, J. Electron Transfer-from Isolated Molecules to Biomolecules, John Wiley & Sons. Inc. in 106, 35–202 (1999).
9. Marcus, R. A. & Siders, P. Theory of highly exothermic electron transfer reactions. *J. Phys. Chem.* **86**, 622–630 (1982).
10. Marcus, R. A. On the theory of chemiluminescent electron-transfer reactions. *J. Chem. Phys.* **43**, 2654–2657 (1965).
11. McCapra, F. An application of the theory of electrocyclic reactions to bioluminescence. *Chem. Commun.* 155–156 (1968).
12. Wilson, T. Comments on the mechanisms of chemi- and bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* **62**, 601–606 (1995).
13. Adam, W. and Baader, W. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **23**, **166**, (1984).
14. Turro, N. J., Ramamurthy V., S. J. C. *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, University Science Books: Sausalito, CA. (2010).
15. Thérèse Wilson and Arthur M. Halpernlb. A Kinetic Study of Sensitized 9,10-Dibromoanthracene Fluorescence Produced by Energy Transfer from Triplet

- Ketones. 1. Acetophenone as Donor. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7272–7279 (1980).
16. Schmidt, R. & Kelm, H. The energy transfer from triplet state acetone to 9-bromoanthracene and 9,10-dichloroanthracene: an investigation under high pressure. *J. Photochem.* **8**, 217–231 (1978).
 17. Schuster, G. B. Chemiluminescence of Organic Peroxides. Conversion of Ground-State Reactants to Excited-State Products by the Chemically Initiated Electron-Exchange Luminescence Mechanism. *Acc. Chem. Res.* **12**, 366–373 (1979).
 18. Koo, J. young & Schuster, G. B. Chemiluminescence of Diphenoyl Peroxide. Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence. A New General Mechanism for Chemical Production of Electronically Excited States. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 4496–4503 (1978).
 19. Wilson, T. In Singlet Oxygen. *Frimer, A. A., Ed.; CRC Press Inc. Boca Rat.* 37 (1985).
 20. Almeida De Oliveira, M. *et al.* Revision of singlet quantum yields in the catalyzed decomposition of cyclic peroxides. *J. Org. Chem.* **77**, 10537–10544 (2012).
 21. Bartoloni, F. H. *et al.* Chemiluminescence efficiency of catalyzed 1,2-dioxetane decomposition determined by steric effects. *J. Org. Chem.* **80**, 3745–3751 (2015).
 22. Schaap, A. P. & Gagnon, S. D. Chemiluminescence from a Phenoxide-Substituted 1,2-Dioxetane: A Model for Firefly Bioluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 3504–3506 (1982).
 23. Nery, A. L. P., Röpke, S., Catalani, L. H. & Baader, W. J. Fluoride-triggered decomposition of m-sililoxyphenyl-substituted dioxetanes by an intramolecular electron transfer (CIEEL) mechanism. *Tetrahedron Lett.* **40**, 2443–2446 (1999).
 24. Nery, A.L.P., Weiss, D., Catalani, L.H. & Baader, W. . Studies on the Intramolecular Electron Transfer Catalyzed Thermolysis of 1,2-Dioxetanes. *Tetrahedron* **56** (30), 5317–5327 (2000).
 25. Matsumoto, M. Advanced chemistry of dioxetane-based chemiluminescent substrates originating from bioluminescence. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **5**, 27–53 (2004).
 26. Rauhut, M. M. Bollyky, L. J. Roberts, B. G. Loy, M. Whitman, R. H. Iannotta, A. V. Semsel, A. M. Clarke, R. A. Chemiluminescence from Reactions of Electronegatively Substituted Aryl Oxalates with Hydrogen Peroxide and Fluorescent Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 6515–6522 (1967).
 27. Rauhut, M. M. Chemiluminescence from Concerted Peroxide Decomposition

- Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2**, 80–87 (1969).
28. Rauhut, M. M. , Sheehan, D. , Clarke, R. A. , Semsel, A. M. Structural criteria for chemiluminescence in acyl peroxide decomposition reactions. *Photochem. Photobiol.* **4** (6), 1097–1110 (1965).
 29. Cordes HF, Richter HP, H. C. Mass spectrometric evidence for the existence of 1,2-dioxetanedione (carbon dioxide dimer). Chemiluminescent intermediate. *J Am Chem Soc* **91**, 7209–7209 (1969).
 30. DeCorpo, J. J., Baronavski, A., McDowell, M. V. & Saalfeld, F. E. Formation of carbon dioxide dimer in chemiluminescent reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 2879–2880 (1972).
 31. Chang, M. M., Saji, T. & Bard, A. J. Electrogenerated Chemiluminescence. 30. Electrochemical Oxidation of Oxalate Ion in the Presence of Luminescers in Acetonitrile Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5399–5403 (1977).
 32. Bartoloni, F. H. *et al.* Luz: Um raro produto de reação. *Quim. Nova* **34**, 544–554 (2011).
 33. Silva, S. M. *et al.* Studies on the chemiexcitation step in peroxyoxalate chemiluminescence using steroid-substituted activators. *Luminescence* **17**, 362–369 (2002).
 34. Stevani, C. V., Silva, S. M. & Baader, W. J. Studies on the Mechanism of the Excitation Step in Peroxyoxalate Chemiluminescence. *European J. Org. Chem.* 4037–4046 (2000).
 35. Stevani, C. V, Lima, D. F., Toscano, V. G. & Baader, W. J. Kinetic studies on the peroxyoxalate chemiluminescent reaction: Imidazole as a nucleophilic catalyst. *J. Chem. Soc. Trans. 2* 989–995 (1996).
 36. Silva, S. M. *et al.* Kinetic studies on the peroxyoxalate chemiluminescence reaction: Determination of the cyclization rate constant. *Luminescence* **17**, 313–320 (2002).
 37. Pedersen, A. D., Nielsen, V. & Feilberg, A. Survey of chemical substances in consumer products Survey of fluorescent substances in consumer products. 1–43 (2003).
 38. Kazemi, S. Y. & Abedirad, S. M. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Effect of glutathione on peroxyoxalate chemiluminescence of hypericin as the fluorophore. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **118**, 782–786 (2014).

39. Kuroda, N.; Nakashima, K. In *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*; Toyooka, T., Ed., New York: Wiley, Chapter 4. in (1999).
40. Amponsaa-karikari, A., Kishikawa, N., Ohyama, K., Nakashima, K. & Kuroda, N. Determination of halofantrine and its main metabolite desbutylhalofantrine in rat plasma by high-performance liquid chromatography with on-line UV irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *Biomed. Chromatogr.* **23**, 101–106 (2009).
41. Tsunoda, M. & Funatsu, T. Catecholamine analysis with strong cation exchange column liquid chromatography – peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. 1393–1397 (2012).
42. Tsunoda, M., Nagayama, M., Funatsu, T., Hosoda, S. & Imai, K. Catecholamine analysis with microcolumn LC-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. **366**, 168–173 (2006).
43. Li, Z. *et al.* Molecularly imprinted polymer-based chemiluminescence imaging assay for the determination of ethopabate residues in chicken muscle. *Anal. Methods* **00**, 1–9 (2015).
44. He, T. *et al.* Dummy molecularly imprinted polymer based microplate chemiluminescence sensor for one-step detection of Sudan dyes in egg. *FOOD Chem.* **288**, 347–353 (2019).
45. Christodouleas, D. C., Giokas, D. L., Garyfali, V., Papadopoulos, K. & Calokerinos, A. C. An automatic FIA-CL method for the determination of antioxidant activity of edible oils based on peroxyoxalate chemiluminescence. *Microchem. J.* **118**, 73–79 (2015).
46. Wada, M. & Kuroda, N. Chromatographic determination of low-molecular mass unsaturated aliphatic aldehydes with peroxyoxalate chemiluminescence detection after fluorescence labeling with. *J. Chromatogr. B* **953–954**, 147–152 (2014).
47. Liu, M., Lin, Z. & Lin, J. *Analytica Chimica Acta* A review on applications of chemiluminescence detection in food analysis. *Anal. Chim. Acta* **670**, 1–10 (2010).
48. Carpenter, A. S., Fehr, M. J., Kraus, G. A. & Petrich, J. W. Chemiluminescent Activation of the Antiviral Activity of Hypericin : A Molecular Flashlight Source : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , Published by : National Academy of Sciences Stable. **91**, 12273–12277 (1994).
49. Michael J. Phillip, P. P. M. Chemiluminescence and Hematoporphyrin Derivate: a Novel Therapy for Mammary Adenocarcinomas in Mice. *Oncology* **46**, 266–272

- (1989).
50. Chen, R. *et al.* Chemiluminescent Nanomicelles for Imaging Hydrogen Peroxide and Self-Therapy in Photodynamic Therapy. **2011**, 1–9 (2011).
 51. Laptev, R., Nisnevitch, M., Siboni, G., Malik, Z. & Firer, M. A. Intracellular chemiluminescence activates targeted photodynamic destruction of leukaemic cells. 189–196 (2006).
 52. Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M., Huertas-Pérez, J. F. & Lara, F. J. Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis-A review. *Anal. Chim. Acta* **640**, 7–28 (2009).
 53. Tsunoda, M. & Imai, K. Analytical applications of peroxyoxalate chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* **541**, 13–23 (2005).
 54. Emteborg, M., Pontén, E. & Irgum, K. Influence of Imidazole and Bis(trichlorophenyl) Oxalate in the Oxalyldiimidazole Peroxyoxalate Chemiluminescence Reaction. *Anal. Chem.* **69**, 2109–2114 (1997).
 55. Li, H., Deng, S., Yuan, X., Hu, X. & Niu, Y. Pore structure characterization based on joint numerical and experimental study : a case study of Nanpu Sag. *J. Pet. Explor. Prod. Technol.* (2019).
 56. Cabello, M. C., El Seoud, O. A. A. & Baader, W. J. Effect of ionic liquids on the kinetics and quantum efficiency of peroxyoxalate chemiluminescence in aqueous media. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **367**, (2018).
 57. Souza, G. A., Peixoto, M. M. M., Santos, A. P. F. & Baader, W. J. General Acid and Base Catalysis by Phosphate in Peroxyoxalate Chemiluminescence. *ChemistrySelect* **1**, 2307–2315 (2016).
 58. Catherallt, C. L. R. & Palmer, T. F. Determination of Absolute Chemiluminescence Quantum Yields. *J. Biolumin. Chemilumin.* **3**, 147–154 (1989).
 59. Souza, S. P., Khalid, M., Augusto, F. A. & Baader, W. J. Peroxyoxalate chemiluminescence efficiency in polar medium is moderately enhanced by solvent viscosity. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **321**, 143–150 (2016).
 60. Barnett, N. W., Bos, R., Lewis, S. W. & Russell, R. A. Rational design and preliminary analytical evaluation of two novel oxamide reagents for aqueous peroxyoxalate chemiluminescence. *Analyst* **123**, 1239–1245 (1998).
 61. Augusto F. A., Bartoloni F. H., Cabello M. C., Santos A. P. F., B. J. W. Kinetic

- studies on 2,6-lutidine catalyzed peroxyoxalate chemiluminescence in organic and aqueous medium: evidence for general base catalysis. *J. Photochem. Photobiol* **382**, 111967 (2019).
62. Cabello M. C., Souza G. A., Bello L. V., Baader, J. W. Mechanistic Studies on the Salicylate-Catalyzed Peroxyoxalate Chemiluminescence in Aqueous Medium. *Photochem. Photobiol.* **96**, 28–36 (2020).
 63. Zhen, X. *et al.* Intraparticle Energy Level Alignment of. *ACS Nano* **10**, 6400–6409 (2016).
 64. Dasari, M., Lee, D., Erigala, V. R. & Murthy, N. Chemiluminescent PEG-PCL micelles for imaging hydrogen peroxide. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **89**, 561–566 (2009).
 65. Lee, I., Hwang, O., Yoo, D., Khang, G. & Lee, D. Detection of Hydrogen Peroxide in vitro and in vivo Using Peroxalate Chemiluminescent Micelles. *Bull. Korean Chem. Soc.* **32**, 2187–2192 (2011).
 66. Sadeghi Mohammadi, S., Vaezi, Z., Shojaedin-Givi, B. & Naderi-Manesh, H. Chemiluminescent liposomes as a theranostic carrier for detection of tumor cells under oxidative stress. *Anal. Chim. Acta* **1059**, 113–123 (2019).
 67. Motoyoshiya, J. & Takigawa, S. Peroxyoxalate chemiluminescence enhanced by oligophenylenevinylene fluorophores in the presence of various surfactants. *Luminescence* **29**, 772–778 (2014).
 68. Cho, S. *et al.* Chemiluminescent and Antioxidant Micelles as Theranostic Agents for Hydrogen Peroxide Associated-Infl ammatory Diseases. **22**, 4038–4043 (2012).
 69. Guo, H., Aleyasin, H., Dickinson, B. C., Haskew-Layton, R. E. & Ratan, R. R. Recent advances in hydrogen peroxide imaging for biological applications. *Cell Biosci.* **4**, 1–10 (2014).
 70. Lee, D. *et al.* Detection of hydrogen peroxide with chemiluminescent micelles. *Int. J. Nanomedicine* **3**, 471–476 (2008).
 71. Tonkin, S. A. *et al.* Studies on the mechanism of the peroxyoxalate chemiluminescence reaction. Part 2. Further identification of intermediates using 2D EXSY13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **614**, 173–181 (2008).
 72. Romanyuk, A. V, Grozdova, I. D., Ezhov, A. A. & Melik-nubarov, N. S. Peroxyoxalate Chemiluminescent Reaction as a Tool for Elimination of Tumour

- Cells Under Oxidative Stress. *Sci. Reports* **7**, 3410 (2017).
73. Mark, H. F.; Kroschwitz, J. I. Encyclopedia de Polymer Science and Engineering. *New York: Willey, vol.4* (1986).
 74. Heinze, T. & Liebert, T. Chemical characteristics of cellulose acetate. *Macromol. Symp.* **208**, 167–237 (2004).
 75. Edgar, K. J. *et al.* Advances in cellulose ester performance and applicaton. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1605–1688 (2001).
 76. Pandey, J. K., Reddy, K. R., Mohanty, A. K. & Misra, M. Handbook of polymernanocomposites. processing, performance and application volume A: Layered silicates. *Handb. Polym. Process. Perform. Appl. Vol. A Layer. Silic.* 109–124 (2014).
 77. Fischer, S. *et al.* Properties and applications of cellulose acetate. *Macromol. Symp.* **262**, 89–96 (2008).
 78. Schaller, J., Meister, F., Schulze, T. & Krieg, M. Novel Absorbing Fibres Based on Cellulose Acetate. *Lenzinger Berichte* **91**, 77–83 (2013).
 79. Pajk, S., Garvas, M. & Štrancar, J. Fluorescent membrane probes based on a coumarin-thiazole scaffold. *Acta Chim. Slov.* **66**, 668–674 (2019).
 80. Li, G., Zhu, D., Liu, Q., Xue, L. & Jiang, H. A strategy for highly selective detection and imaging of hypochlorite using selenoxide elimination. *Org. Lett.* **15**, 2002–2005 (2013).
 81. Yamakoshi, H. *et al.* Structure-activity relationship of C5-curcuminoids and synthesis of their molecular probes thereof. *Bioorganic Med. Chem.* **18**, 1083–1092 (2010).
 82. Mani, K. S. *et al.* Coumarin based hydrazone as an ICT-based fluorescence chemosensor for the detection of Cu²⁺ ions and the application in HeLa cells. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **214**, 170–176 (2019).
 83. Masuyama, Y., Takahara, J. P. & Kurusu, Y. Palladium-Catalyzed Carbonyl Allylation by Allylic Alcohols with SnCl₂. A solvation-controlled diastereoselection. *Tetrahedron Lett.* **30**, 3437–3440 (1989).
 84. Ansari, I. A., Joyasawal, S., Gupta, M. K., Yadav, J. S. & Gree, R. Wacker oxidation of terminal olefins in a mixture of [bmim][BF₄] and water. **46**, 7507–7510 (2005).
 85. Christian Reichardt and Thomas Welton. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2011).

86. Seoud, O. A. El & Siviero, F. Kinetics of the pH-independent hydrolyses of 4-nitrophenyl chloroformate and 4-nitrophenyl heptafluorobutyrate in water-acetonitrile mixtures: consequences of solvent composition and ester hydrophobicity. *J. Phys. Org. Chem.* **19**, 793–802 (2006).
87. Honda, K., Sekino, J. & Imal, K. Bis (2 , 4-dinitrophenyl) Oxalate as a Chemiluminescence Reagent in Determination of Fluorescent Compounds by Flow Injection Analysis. **940**, 940–943 (1983).
88. William J. Wallace & Matehews, A. L. Densities , Refractive Indices , Molar Refractions , and Viscosities of Ethylene Glycol Dimethyl Ether-Water Solutions at 25 °. *J. Chem. Eng. Data* **8**, 496–498 (1963).
89. Shin, D. N., Wijnen, J. W., Engberts, J. B. F. N. & Wakisaka, A. On the Origin of Microheterogeneity: Mass Spectrometric Studies of Acetonitrile - Water and Dimethyl Sulfoxide - Water Binary Mixtures (Part 2). 6014–6020 (2002).
90. Boaro, A. & Bartoloni, F. H. Peroxyoxalate High-Energy Intermediate is Efficiently Decomposed by the Catalyst Imidazole. *Photochem. Photobiol.* **92**, 546–551 (2016).
91. Stevani, C. V, Campos, I. P. D. A. & Baader, W. J. Synthesis and Characterisation of an Intermediate in the Peroxyoxalate Chemiluminescence: 4-Chlorophenyl O,O-Hydrogen Monoperoxy-oxalate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1645–1648 (1996).
92. Ciscato, L. F. M. L., Bartoloni, F. H., Bastos, E. L. & Baader, W. J. Direct kinetic observation of the chemiexcitation step in peroxyoxalate chemiluminescence. *J. Org. Chem.* **74**, 8974–8979 (2009).
93. Marcus, R. a. Chemical and electrochemical electron-transfer theory. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **15**, 155 (1964).
94. Scandola, F., Balzani, V. & Schuster, G. B. Free-Energy Relationships for Reversible and Irreversible Electron-Transfer Processes. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2519–2523 (1981).
95. Adam, W. & Cueto, O. Fluorescer-Enhanced Chemiluminescence of. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 6511–6515 (1979).
96. Burton, G. *et al.* Investigation of the mechanism of the unimolecular and the electron-donor-catalyzed thermal fragmenta- tion of secondary peroxy esters. Chemiluminescence of 1- phenylethyl peroxyacetate by the chemically initiated electron- exchange luminescence mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 3116–3118

- (1979).
97. Ciscato, L. F. M. . *et al.* The chemiluminescent peroxyoxalate system: State of the art almost 50 years from its discovery. *Arkivoc* **2012**, 391–430 (2012).
 98. Bastos, E. L., Farahani, P., Bechara, E. J. H. & Baader, W. J. Four-membered cyclic peroxides: Carriers of chemical energy. *J. Phys. Org. Chem.* **30**, 1–18 (2017).
 99. Augusto, F. A. *et al.* Mechanism of activated chemiluminescence of cyclic peroxides: 1,2-dioxetanes and 1,2-dioxetanones. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 3955–3962 (2017).
 100. Shamsipur, M., Yeganeh-Faal, A., Chaichi, M. J., Tajbakhsh, M. & Parach, A. A study of chemiluminescence from reaction of bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate, hydrogen peroxide and an optical brightener 5-(3-anilino-5-chloroanilino)-2-[(E)-2-[4-(3-anilino-5-chloroanilino)-2-sulfophenyl]-1-ethenyl]-1-benzenesulfonic acid. *Dye. Pigment.* **72**, 113–118 (2007).
 101. Yari, A. & Saidikhah, M. Chemiluminescence of curcumin and quenching effect of dimethyl sulfoxide on its peroxyoxalate system. *J. Lumin.* **130**, 709–713 (2010).
 102. Yari, A. & Saidikhah, M. Dye Doped Eosin Yellowish Silica Nanoparticles as Novel Fluorophore for a Peroxyoxalate Chemiluminescence System. *J. Fluoresc.* **22**, 993–1002 (2012).
 103. Qiu, Y., Zhao, F., Zhang, F. & Song, X. A further study on the degradation mechanism of rhodamine 6G in the peroxyoxalate chemiluminescent reaction. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **87**, 231–233 (1995).
 104. Kazemi, S. Y., Abedirad, S. M., Vaezi, Z. & Ganjali, M. R. A study of chemiluminescence characteristics of a novel peroxyoxalate system using berberine as the fluorophore. *Dye. Pigment.* **95**, 751–756 (2012).
 105. Sun, X. Y., Liu, T., Sun, J. & Wang, X. J. Synthesis and application of coumarin fluorescence probes. *RSC Adv.* **10**, 10826–10847 (2020).
 106. Náfrádi, M. *et al.* Application of coumarin and coumarin-3-carboxylic acid for the determination of hydroxyl radicals during different advanced oxidation processes. *Radiat. Phys. Chem.* **170**, 108610 (2020).
 107. Odyniec, M. L. *et al.* Peroxynitrite Activated Drug Conjugate Systems Based on a Coumarin Scaffold Toward the Application of Theranostics. *Front. Chem.* **7**, 1–8 (2019).
 108. Jin, L. *et al.* A novel coumarin-based fluorescent probe with fine selectivity and

- sensitivity for hypochlorite and its application in cell imaging. *Talanta* **202**, 190–197 (2019).
109. Gualandi, A. *et al.* Application of coumarin dyes for organic photoredox catalysis. *Chem. Commun.* **54**, 10044–10047 (2018).
 110. Saleh, A. M., Madany, M. M. Y. & González, L. The Effect of Coumarin Application on Early Growth and Some Physiological Parameters in Faba Bean (*Vicia faba* L.). *J. Plant Growth Regul.* **34**, 233–241 (2015).
 111. Cao, D. *et al.* Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors. *Chem. Rev.* **119**, 10403–10519 (2019).
 112. Reynolds, G. A. & Drexhage, K. H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers. *Opt. Commun.* **13**, 222–225 (1975).
 113. Ambrose, R. J. Organic Luminescent Materials. *J. Polym Sci. Part C Polym. Lett.* **27**, 27512 (1989).
 114. Zimmerman, M.; Yurewicz, E.; Patel, G. A New Fluorogenic Substrate for Chymotrypsin. *Anal. Biochem.* **70**, 258–262 (1976).
 115. Thompson, S. G. & Burd, J. F. Substrate-labeled fluorescent immunoassay for amikacin in human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**, 264–268 (1980).
 116. Thoralf M. Sundt, J., Anderson, R. E. & Dyke, R. A. Van. Brain pH measurements using a diffusible, lipid soluble pH sensitive fluorescent indicator. *J. Neurochem.* **31**, 627–635 (1978).
 117. Phytochemicals, F., Prevention, C., Acs, I. I., Series, S. & Society, A. C. Food Phytochemicals for Cancer Prevention II Ho et al .; Food Phytochemicals for Cancer Prevention II. (1994).
 118. Bharat B. Aggarwal, A. K. and A. C. B. & Cytokine. Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. **23**, 363–398 (2003).
 119. Pizzo, P., Scapin, C., Vitadello, M., Florean, C. & Gorza, L. Grp94 acts as a mediator of curcumin-induced antioxidant defence in myogenic cells. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 970–981 (2010).
 120. Augusto, F. A., De Souza, G. A., De Souza, S. P., Khalid, M. & Baader, W. J. Efficiency of electron transfer initiated chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.* **89**, 1299–1317 (2013).
 121. Bartoloni, F. H., Ciscato, L. F. M. L., Augusto, F. A. & Baader, W. J. Transferência de elétron inversa na quimiexcitação o da reação peróxi-oxalato usando ativadores facilmente redutíveis. *Quim. Nova* **33**, 2055–2063 (2010).

122. Catherall, C. L. R., Palmer, D. T. F. & Cundall, R. B. Chemiluminescence from Reactions of Bis(pentachlorophenyl)oxalate, Hydrogen Peroxide and Fluorescent Compounds Kinetics and Mechanism. *J. Chem. SOC. Faraday Trans. 2* **80**, 823–834 (1984).
123. Ulanski, P. & von Sonntag, C. The OH radical-induced chain reactions of methanol with hydrogen peroxide and with peroxydisulfate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2**, 165–168 (1999).
124. Cabello, M. C., Souza, G. A., Bello, L. V. & Baader, W. J. Mechanistic Studies on the Salicylate-Catalyzed Peroxyoxalate Chemiluminescence in Aqueous Medium. *Photochem. Photobiol.* **96**, 28–36 (2020).
125. Augusto, F. A., Bartoloni, F. H., Cabello, M. C., dos Santos, A. P. F. & Baader, W. J. Kinetic studies on 2,6-lutidine catalyzed peroxyoxalate chemiluminescence in organic and aqueous medium: Evidence for general base catalysis. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **382**, (2019).
126. Mohan, A. G. & Turro, N. J. A facile and effective chemiluminescence demonstration experiment. *J. Chem. Educ.* **51**, 528 (1974).
127. Baretz, B. H., Trzaskos, W. J., Elliott, L., Dauplaise, D. L. & Hautala, R. R. An investigation of chemiluminescent reactions. 1–52 (1984).
128. Cotton, M. L. & Dunford, H. B. Studies on Horseradish Peroxidase. XI. On the Nature of Compounds I and II as Determined from the Kinetics of the Oxidation of Ferrocyanide. *Can. J. Chem.* **51**, 582–587 (1973).
129. Reichardt, C. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, Third Edition. *Wiley-VCH, Weinheim, Ger.* 629 (2003).
130. Hornig, S. & Heinze, T. Efficient approach to design stable water-dispersible nanoparticles of hydrophobic cellulose esters. *Biomacromolecules* **9**, 1487–1492 (2008).
131. Lee, J. & Seliger, H. H. Absolute Spectral Sensitivity of Phototubes and the Application To the Measurement of the Absolute Quantum Yields of Chemiluminescence and Bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* **4**, 1015–1048 (1965).
132. Lee, J. & Seliger, H. H. Quantum Yields of the Luminol Chemiluminescence Reaction in Aqueous and Aprotic Solvents. *Photochem. Photobiol.* **15**, 227–237 (1972).
133. Crosby, G. A. & Demas, J. N. Measurement of photoluminescence quantum yields.

- Review. *J. Phys. Chem.* **75**, 991–1024 (1971).
134. Fery-Forgues, S. & Lavabre, D. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. *J. Chem. Educ.* **76**, 1260 (1999).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Maidileyvis Castro Cabello

Filiação: Maidelyn Cabello Pérez e Emilio Castro Herrera

Local e data de nascimento: Artemisa, Cuba, 11 de Fevereiro de 1991.

Nacionalidade: Cubana

EDUCAÇÃO

Colégio, IPVCE Mártires de Humboldt 7, Cuba, 2009.

Ensino médio

Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicada, La Habana, Cuba, 2014.

Bacharela em Radioquímica

Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2016

Mestrado em Química

OCUPAÇÃO

Pós-graduação:

Doutorado – Laboratório de Quimiluminescência Orgânica – Área de atuação: Físico-química Orgânica – Supervisão: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader. Projeto: Estudos sobre o Mecanismo de Geração de Estados Eletronicamente Excitados em Diferentes Meios Aquosos. Vínculo institucional: Bolsista de Doutorado do CNPq, vigência da bolsa: setembro de 2016 – agosto de 2020.

Estágios Didáticos Realizados no Instituto de Química da USP

1. Fev/2015 - Jul/2015: Estágio realizado - Monitora da disciplina QF 1102- Fundamentos de Química Experimental. *Monitora Voluntária*
2. Ago/2015 - Dez/2015: Estágio realizado - Monitora da disciplina QF 2343- Química Orgânica Experimental pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da USP (PAE)

3. Fev/2016 - Jul/2016: Estágio realizado - Monitora da disciplina QFL 2453- Físico Química Experimental. *Monitora Voluntária*

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados

1. **Cabello M.C**, El Seoud O. A. A, Baader J.W; Effect of ionic liquids on the kinetics and quantum efficiency of peroxyoxalate chemiluminescence in aqueous media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 367, 471-478 (2018).
2. Augusto F. A., **Cabello M.C** , dos Santos A. P. F, Baader J.W; Kinetic studies on 2,6-lutidine catalyzed peroxyoxalate chemiluminescence in organic and aqueous medium: Evidence for general base catalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 382, 111967 (2019)
3. **Cabello M.C**, Sousa G. A, Bello L.V, Baader J.W; Mechanistic Studies on the Salicylate - Catalyzed Peroxyoxalate Chemiluminescence in Aqueous Medium. *Photochemistry and Photobiology*, 96, 28-36 (2020)
4. **Cabello M.C**, Bello L.V, Baader J.W; Use of coumarin derivatives as activators in the peroxyoxalate system in organic and aqueous media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 408, 113076 (2021)

Apresentações de Trabalho

1. *Methods and Applications of Fluorescence*
La Jolla, San Diego, CA. USA, 2019.
Poster presentation: Effect of water on the chemiexcitation step in peroxyoxalate chemiluminescence.
2. *20TH International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence*
Nantes, Francia. 2018.
Poster presentation: Kinetic studies of the peroxyoxalate chemiluminescence in aqueous media.
3. *20TH International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence*

Nantes, Francia. 2018.

Oral presentation: Why is the efficiency of the peroxyoxalate reaction so low in the presence of water?

4. ***46th World Chemistry Congress*** (IUPAC)

Sao Paulo, Brazil. 2017.

Poster Presentation: Studies on the efficiency of the peroxyoxalate reaction in aqueous media containing ionic liquids.