

FORMAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE ESTADOS ELETRÔNICOS EXCITADOS

E. J. H. Bechara e
G. Cilento

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, C.P. 20780, São Paulo, Brasil

Histórico

Seguindo a tradição da época no Departamento de Química da ex-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, após a obtenção do grau de Bacharel (1943) e de Doutor (1946), o Prof. G. Cilento iniciou sua carreira de pesquisador estudando compostos de enxofre. Seu artigo "The Expansion of the Sulfur Outer Shell", publicado no *Chemical Reviews* 60, 147 (1960) despertou considerável interesse. Por este trabalho, foi agraciado pelo Prêmio H. Feigl, em 1962.

Posteriormente, durante vários anos, investigou a formação de complexos biológicos de transferência de carga. Foi o primeiro a demonstrar a ocorrência *natural* de um destes complexos: a banda de absorção em 360 nm ("the Racker band") da enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase era devida a uma transição de transferência de carga de um núcleo indólico da enzima para o anel piridinium da coenzima associada. Hoje em dia, sais de piridinium são amplamente utilizados como sondas para núcleos indólicos de proteínas.

Relacionados à complexação tipo transferência de carga, estudou mecanismos de ativação de oxigênio molecular, especialmente compostos o-difenólicos. Os resultados principais desta linha e suas potencialidades foram publicados em *Records of Chemical Progress* 31, 189 (1970). Nesta época (1969), o co-autor da presente revisão, Dr. Etelvino J.H. Bechara, iniciou sua carreira como doutorando do Prof. Cilento, investigando a oxidação aeróbica de coenzimas piridínicas e seus modelos, catalisada por p-fenilenodiaminas. As coenzimas respiratórias de natureza piridínica haviam sido objeto de interesse do Prof. Cilento desde 1956 quando, como bolsista da Fundação Rockefeller, trabalhou durante um ano com o Prof. F.H. Westheimer na Universidade de Harvard.

Esta nova linha gerou resultados de fundamental importância, entre eles, a proposta de uma reação-modelo para síntese de ATP no sítio I da cadeia respiratória (Tese de Doutorado do Dr. Bechara, Instituto de Química da USP, 1971).

Toda a produção científica do Prof. Cilento sempre manteve um caráter predominantemente físico-químico. Em reconhecimento pelo trabalho realizado, foi conferencista plenário de nove Congressos e Simpósios Internacionais, além de ter ministrado um curso de pós-graduação "Special Topics in Physical Biochemistry" na Universidade de Detroit em 1970, onde foi "Foreign Scientist Visiting"

com o patrocínio da US National Science Foundation.

Historicamente, a linha atual de pesquisa do Professor Cilento sobre a produção bioquímica de estados eletronicamente excitados, com a exclusão da bioluminescência, foi a primeira a despertar seu interesse. Grande parte de suas publicações anteriores estava ligada a este problema como, por exemplo, o trabalho "On the possibility of generation and transfer of electronic energy in biochemical systems" (*Photochem. Photobiol.* 4, 1243 (1965)).

Assim, em 1973 ("Excited Electronic States in Dark Biological Processes", *Quart. Revs. Biophys.* 6, 485) e em 1974 ("Dioxetanes as Intermediates in Biological Processes", *J. Theor. Biology* 55, 471), concomitante mas independentemente do Prof. E. White da Johns Hopkins University ("Chemically Produced Excited States", *Angew. Chem. Int. Ed.* 13, 229 (1974)), lançaram as bases da chamada "Fotobiologia sem luz" ou "Fotobiologia no escuro". Como resultado deste interesse convergente, o Dr. Bechara, na época membro do grupo de pesquisa do Prof. Cilento, associou-se por um ano como pós-doutorando ao grupo do Prof. White, quando investigou na planta *Colchicum autumnale* a conversão "escura" de alcalóides colchicínicos nos respectivos fotoprodutos (lumicolchicinas) (*Photochem. Photobiol.* 36, 245 (1982)). Em seguida, com o objetivo de aprofundar seus conhecimentos e experiências sobre dioxetanos (compostos peroxídicos intermediários de processos quími- e bioluminescentes), o Dr. Bechara trabalhou como "Research Associate" durante um ano e meio com a Profa. T. Wilson, na Universidade de Harvard. Nesta colaboração, resultou o estudo de efeitos estéricos de substituintes na estabilidade térmica de dioxetanos e rendimentos quânticos de produção de estados singlete e triplete na sua termólise (*J. Am. Chem. Soc.* 98, 4648 (1976) e *J. Org. Chem.* 45, 5261 (1980)).

De volta ao Brasil, em fins de 1976, o Dr. Bechara novamente associou-se ao grupo do Prof. Cilento, na pesquisa de sistemas enzimáticos geradores de espécies eletronicamente excitadas e do aproveitamento desta energia de quimiexcitação para realização de trabalho fotoquímico a sistemas acoplados. Esta linha tem grandes potencialidades para a compreensão de processos normais e patológicos das células e tem recebido crescente reconhecimento internacional. Assim, já em 1973, o Prof. Cilento foi Professor Visitante na Universidade de Gunma (Ja-

pão), a convite da Sociedade Japonesa para a Promoção da Ciência e, em 1976, foi conferencista plenário da American Chemical Society. Nos últimos dez anos, foram proferidas várias conferências e seminários internacionais sobre a "fotobioquímica e fotobiologia no escuro". Também é digna de nota, a colaboração com o Prof. W. Adam (University of Puerto Rico e University of Wurzburg) sobre a química e bioquímica de estados eletronicamente excitados, iniciada em meados dos setenta. Dentro desta linha, também foi de fundamental importância a colaboração de doutorandos, pós-doutorandos e outros professores do grupo, tais como o Dr. Nelson Durán (UNICAMP), Dr. Klaus Zinner (IQ-USP), Dra. Adelaide Faljoni-Alário (IQ-USP), Dra. Ohara Augusto (IQ-USP) e Dr. Roberto Casadei de Baptista (IQ-USP).

Mais recentemente, o Dr. Bechara iniciou a investigação da bioluminescência de insetos, ampliando a abrangência da linha de estados excitados em sistemas biológicos, e o estudo da toxicidade de espécies ativadas (radicais) de oxigênio molecular (Clin. Chem. 28, 242 (1982) e Arch. Environm. Health 38, 11 (1983)).

Na presente revisão, são abordadas as bases teóricas da área de "fotobiologia sem luz" e os resultados principais obtidos nos últimos dez anos nos laboratórios do bloco 10 superior (Departamento de Bioquímica do IQ-USP), sob coordenação dos autores desta revisão.

A. Finalidades da fotobiologia

O efeito da luz em promover reações químicas é objeto da fotoquímica; as interrelações entre luz e a matéria vivente constituem as bases da fotobiologia^{1,2,27}. Fotoquímica e fotobiologia constituem amplos e importantes setores da ciência.

A luz solar não somente providencia a energia necessária para que exista vida neste planeta mas também torna possível aos animais e às plantas responderem ao ambiente, p. ex., aos ciclos diurnos. Entre os fenômenos que resultam da interação da luz com a matéria vivente destacam-se a fotossíntese, o fototropismo, visão, fotoperiodismo, fototaxis e os ritmos circadianos e sazonais. Entretanto existem também processos fotobiológicos deletérios. Entre estes se situam as "ações fotodinâmicas", resultantes da irradiação na presença de corantes e oxigênio, a fotosensibilidade às drogas, as ulcerações da pele na porfiria eritropoética e a fotocarcinogênese. A fotobiologia quando envolve estudo ao nível subcelular ou molecular pode mais convenientemente ser chamada de fotobioquímica.

A fotoquímica e a fotobiologia abrangem não somente processos nos quais o estado excitado é gerado pela luz, mas também processos que geram luz: a quimioluminescência e a bioluminescência.

B. Fotoexcitação e quimioexcitação

Em geral, nas moléculas, os elétrons ocorrem em pares com spins opostos, ocupando os orbitais de energia mais baixa (Fig. 1A). Pela ação da luz de frequência apropriada em elétron pode ser promovido a um orbital energeticamente superior; caso este seja o orbital mais baixo vazio teremos o primeiro estado excitado singlete (S_1), Fig. 1B; este estado tem uma vida bem curta e tendência a devolver radiação (fluorescência). Existe outro estado de energia mais baixa do que o S_1 , o estado triplete T_1 , no qual os elétrons desemparelhados têm spins paralelos (Fig. 1C).

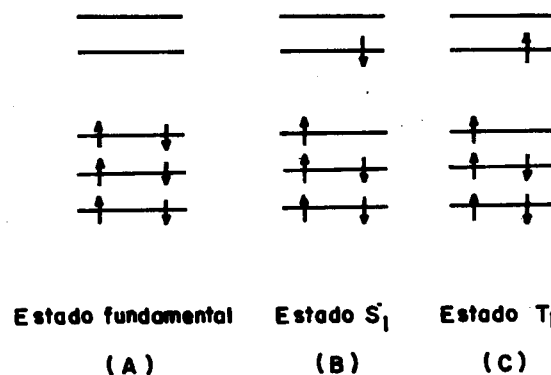


Figura 1

O estado T_1 não pode ser alcançado por irradiação mas sim a partir do estado S_1 por cruzamento intersistema; a eficiência deste, dependendo da molécula, pode variar de praticamente nula à unitária. O estado triplete T_1 tem uma vida intrínseca várias ordens de grandeza maior do que S_1 , pois a volta ao estado fundamental requer uma mudança de spin e este processo é normalmente proibido. A emissão que provém de T_1 é a fosforescência, mas esta não é normalmente observada pois outros processos, entre os quais colisões com oxigênio, suprimem o estado T_1 . As relações entre os estados fundamental, S_1 e T_1 estão esquematizados na Fig. 2.

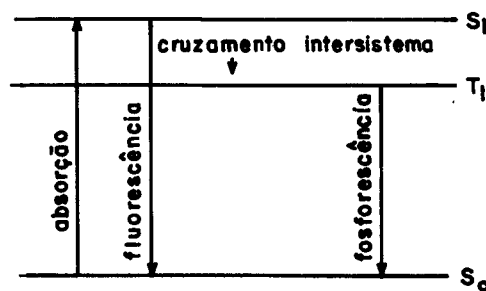
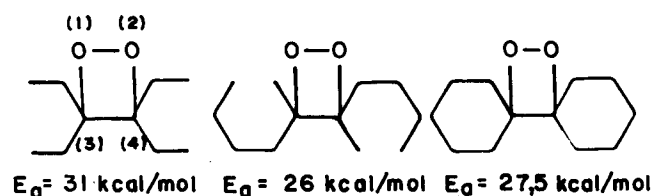


Figura 2

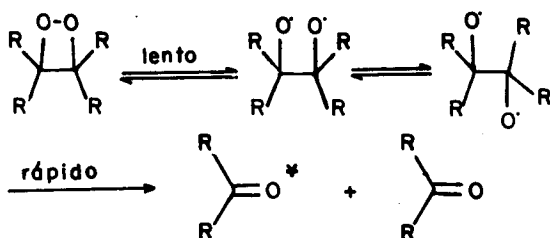
Nas reações quimioluminescentes um produto é formado no estado excitado S_1 e este decai para o estado fundamental S_0 com emissão de luz.

Nos seres vivos é comum o processo da bioluminescência. Em muitos destes processos um substrato (luciferina) é oxidado sob a ação de uma enzima (luciferase) à oxiluciferina no estado excitado emissivo. A bioluminescência é um fenômeno que vem sendo amplamente estudado mas em alguns casos se desconhece sua função. A compreensão dos eventos moleculares que levam à formação do estado excitado recebeu forte impulso com o desenvolvimento da química dos dioxetanos e das dioxetanonas (α -peroxilactonas)^{1,2,30}, cuja clivagem térmica é unimolecular e quimiluminescente, devido à produção de compostos carbonílicos eletronicamente excitados.

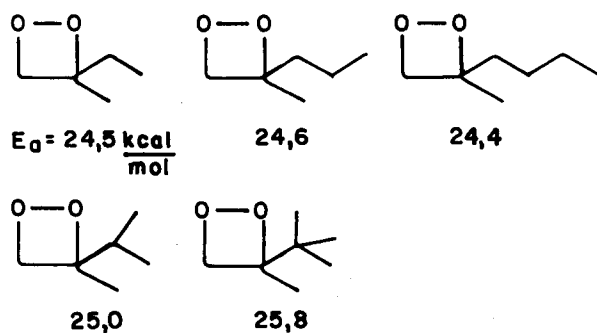
Nos últimos quinze anos foram sintetizados e estudados mais de uma centena destes peróxidos, alifáticos e aromáticos, com o intuito de esclarecer-se como a natureza dos substituintes afeta sua estabilidade térmica e a partição da energia de quimi-excitação disponível neste processo em produtos excitados singletes e tripletes. Assim, em colaboração com a dra. T. Wilson (Harvard University)⁶, estudamos efeitos estéricos envolvendo substituintes em posições 3 e 4 nos seguintes dioxetanos:



Em outro estudo, realizado em colaboração com o Dr. Baumstark (Georgia State University)⁵, observamos que interações estéricas-3,3 também aumentam a estabilidade de dioxetanos. Através do estudo da termólise dos dioxetanos:



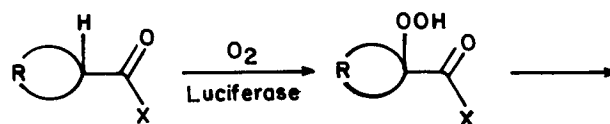
A maior estabilidade do tetraetildioxetano, analogamente ao observado para outros dioxetanos com substituintes volumosos³⁰, foi explicada por interação estérica "gauche" entre os grupos vizinhos de modo a facilitar a recombinção do diradical intermediário, regenerando o dioxetano:



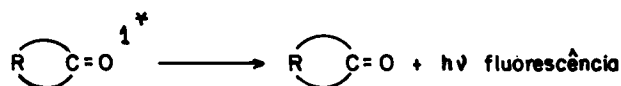
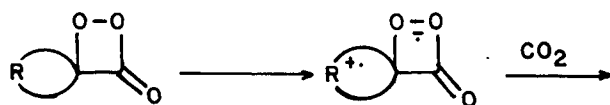
verificamos que, para cada grupo metil adicional no carbono α do substituinte, a estabilidade é aumentada de cerca de 0.7 kcal/mol. Este efeito foi explicado, entre outros argumentos, por interações "gauche" oxi-carbono α no diradical intermediário.

Em todos estes casos, é observada a formação preferencial dos produtos no estado triplete (rendimento quântico de T_1/X rendimento quântico de $S_1 = 10^2$ a 10^3); esta tendência é típica de dioxetanos alifáticos³⁰.

Mais recentemente, especialmente a partir de contribuições de Schuster e colaboradores¹⁸, verificou-se que dioxetanos contendo substituintes com conjugação extensiva (portanto, com baixo potencial de oxidação) clivam-se termicamente por um mecanismo diferente, iniciado por transferência de elétron do substituinte para o anel dioxetânico ("chemically initiated electron exchange luminescence", CIEEL), levando à produção preferencial de produto carbonílico no estado S_1 (natureza $\pi\pi^*$). Este é, provavelmente, o mecanismo que opera no caso de muitos processos bioluminescentes, inclusive aquele de vagalumes, crustáceos e celenterados^{1,19}:



LUCIFERINA

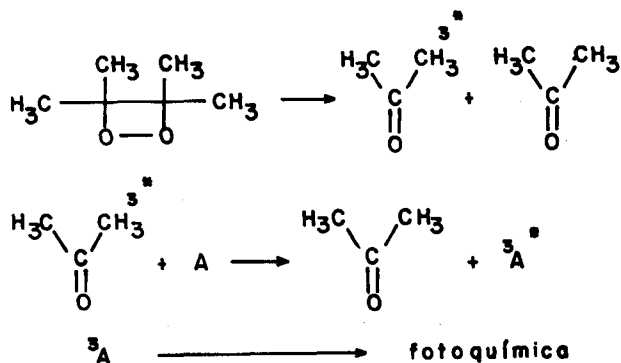


R tem natureza hidroxibenzotiazólica no caso da luciferina de vagalumes e arilpirazínica no caso de crustáceos e celenterados.

Na maioria destes processos bioluminescentes a oxiluciferina, por apresentar extensiva conjugação, aparece no estado emissivo S_1 ; nos casos nos quais se forma uma espécie triplete, via mecanismo "diradical", a energia é transferida para um aceptor fluorescente.

Formação enzimática de espécies excitadas tripletes

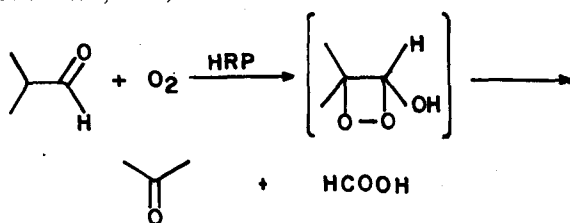
Um dos grandes sucessos da química dos dioxetanos e dioxetanonas é a "fotoquímica sem luz"^{13,14,29}. Usam-se dioxetanos com substituintes simples, cuja clivagem fornecerá portanto um composto carbonílico no estado triplete: este, por transferência de sua energia, poderá induzir um processo fotoquímico num aceptor apropriado.



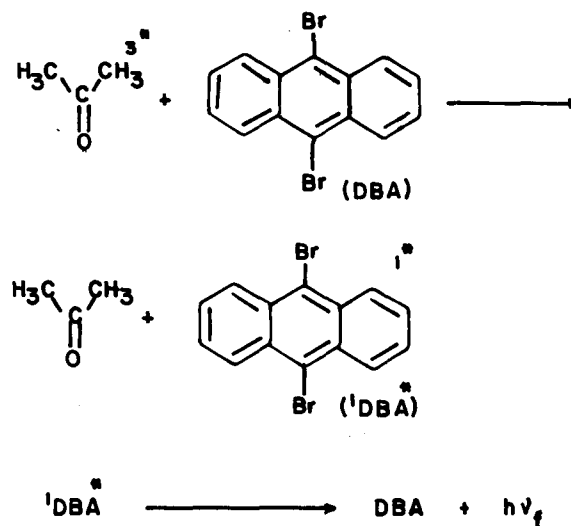
Nosso interesse por mais de duas décadas tem sido a possibilidade de se formarem "in vivo" estados excitados essencialmente não emissivos que pudessem realizar certas funções; também outros autores preocuparam-se com esta possibilidade¹⁴.

Nada se sabe da possibilidade de reações biológicas gerarem um produto no estado S_1 cuja função seria a de sofrer uma reação fotoquímica ou induzi-la em outros sistemas por transferência de energia. Entretanto, visto que a vida do estado S_1 é geralmente bem curta e que os componentes biológicos podem existir em concentrações extremamente baixas, a possibilidade de uma fotoquímica induzida não deve ser muito viável. Ao contrário, estados tripletes, tendo uma vida intrínseca muito mais longa, oferecem uma potencialidade muito maior. Até a década passada nunca tinha sido feito qualquer estudo sistemático na procura de estados tripletes em sistemas bioquímicos, muito menos em sistemas biológicos. Este fato é de certo modo compreensível, pois estados excitados são geralmente detectados através da emissão que originam e nenhuma emissão é de se esperar de estados tripletes mormente na presença de oxigênio. Também não se sabendo quais reações poderiam gerar estados tripletes não se podia lançar mão de métodos indiretos. Uma brecha para a procura de estados tripletes em sistemas bioquímicos e biológicos que nós amplamente exploramos foram os conhecimentos sobre dioxetanos e dioxetanonas acima mencionados.

Para um estudo sistemático, nossa abordagem foi, numa primeira fase, a de selecionar reações bioquímicas que geram produtos esperados de um hipotético intermediário dioxetânico ou dioxetanônico. Logo verificamos que vários sistemas satisfazem este critério. Entre as primeiras reações que selecionamos para estudo — e que depois viria a mostrar-se como uma das mais gratificantes — foi a da oxidação do isobutanal a acetona e ácido fórmico catalisada por peroxidase de rábano ("horseradish peroxidase"; HRP)⁷.



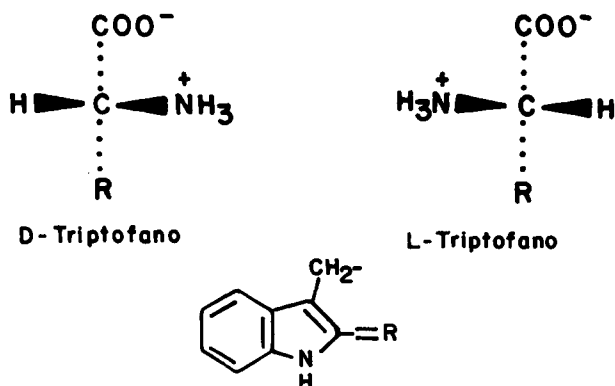
Esta reação tinha sido mencionada, por Kenten¹⁷ o qual a tinha observado mesmo com extratos de plantas. O motivo desta escolha foi o fato de se conhecer bem a fotoquímica da acetona e, portanto, da acetona triplete. Na verdade muitos conhecimentos úteis vinham do próprio estudo da clivagem de dioxetanos, tais como trimetildioxetano e tetrametildioxetano, os quais fornecem acetona triplete com alto rendimento na sua clivagem. Assim, visto que na procura e quantificação desta acetona triplete, usa-se o 9,10-dibromoantraceno (DBA), preparamos o derivado 2-sulfonato de sódio (DBAS), mais aquoso-



lúvel, e o ensaiamos na reação isobutanal/HRP/ O_2 . Pôde-se observar uma emissão bastante forte de fluorescência do DBAS. Tal como a acetona triplete, gerada na clivagem de dioxetano, é incapaz de sensibilizar a emissão do antraceno, também o sistema enzimático se mostrava incapaz de excitar antraceno-2-sulfonato de sódio (AS) ao nível S_1 . Estes resultados indicavam pois que o sistema enzimático gera a acetona no estado triplete. Que, de fato, a espécie excitada doadora gerada enzimaticamente é de longa vida, e portanto presumivelmente um triplete, era indicado pelo próprio fato de a adição de DBAS provocar um aumento da emissão mesmo estando em concentração micromolar. Obviamente, só uma espécie de vida longa tem oportunidade de transferir energia para um aceptor em tão baixa concentração.

Ao se otimizar as condições, e para tanto fez-se também uso de quelantes tais como EDTA e pirofosfato, os quais previnem a clivagem "escura" de dioxetanos catalisada por íons metálicos de transição³⁰, foi observado que a própria reação enzimática, isto é, mesmo sem DBAS, é fortemente emissiva. A relação entre fótons emitidos e moléculas de oxigênio consumido é de cerca 10^{-6} . A observação de fosforescência, se bem que confirmava plenamente a formação de acetona triplete, constituía-se numa surpresa devido ao oxigênio presente. A explicação aventada foi a de que a acetona triplete é gerada num sítio da enzima onde ela está protegida de colisões desa-

tivantes pelo oxigênio. Esta explicação foi posteriormente confirmada pelo fato de a fosforescência ser suprimida com eficiências diferentes por D- e L-triptofano^{2,5}.



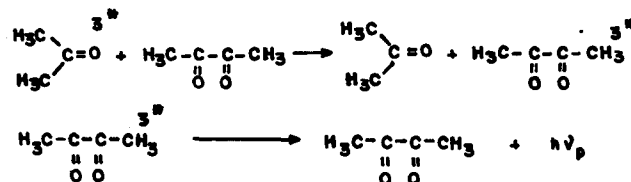
Obviamente esta discriminação quiral não seria de se esperar se a acetona triplete estivesse livre em solução; o resultado também prova que D- e L-triptofano com diferentes eficiências, devem “ver” a acetona triplete dentro do enzima.

Que a acetona triplete está protegida da O₂ é também confirmado pelo fato de a intensidade da quimiluminescência aumentar apenas por um fator de 2-3 enquanto o oxigênio passa da concentração inicial (ca. 2 x 10⁻⁴ M) ao esgotamento⁷. Quando a enzima é substituída por hemina, a oxidação do isobutanal a acetona triplete ainda ocorre, mas não se observa fosforescência, presumivelmente devido ao fato de a acetona triplete estar “desprotegida”³. Além da proteção, outro fator que poderia dificultar a supressão da fosforescência da acetona triplete gerada enzimaticamente seria a de o sítio ser altamente polar, o que certamente não facilitaria a presença do oxigênio.

É surpreendente que acetona triplete fosforesça apesar de estar perto do grupo heme do enzima. O espectro de fosforescência da acetona recobre em grande parte o espectro de absorção do grupo heme (banda Soret) razão pela qual dever-se-ia esperar uma eficiente transferência de energia triplete-singlete do tipo Förster¹⁶, mesmo a longa distância. É possível que a orientação relativa da molécula da acetona triplete e do grupo heme dentro do enzima não favoreça a transferência.

Acetona triplete, apesar de protegida de colisões com oxigênio, é eficientemente suprimida por uma série de agentes. Apenas com alguns destes, ex., flavinas, cuja fluorescência é eficientemente sensibilizada pelo sistema enzimático, é concebível uma transferência a longa distância do tipo Förster. Na maioria dos casos, a supressão (conforme descrito abaixo) requer a participação do estado T₁ ou estados tripletes superiores do aceptor, o que constitui-se numa dificuldade pois a transferência de energia triplete-triplete requer colisões. De alguma forma que ainda resta a esclarecer, apesar da proteção, a potencialidade

toda da acetona triplete continua disponível. Assim, ao adicionar-se biacetilo, observa-se a fosforescência deste, o que cabalmente atesta a transferência de energia triplete-triplete:



Em alguns casos de fluorescência sensibilizada, sabemos que ela é o resultado de transferência de energia para um triplete superior do aceptor seguida de cruzamento inter-sistema para o estado S₁. É o caso do próprio DBAS: tanto ele como o AS suprimem a acetona triplete, mas somente com DBAS se observa a emissão sensibilizada. A explicação mais plausível é de que a acetona triplete transfere energia para o segundo triplete do DBAS e do AS, transferência esta que se dá com a mesma eficiência. No caso do AS passa-se do estado T₂ para o estado T₁, passagem esta altamente favorecida pois não envolve mudança de spin. Entretanto, no caso de DBAS, visto que a regra da conservação do spin deixa de ser válida no caso de átomos pesados, ocorre em parte cruzamento inter-sistema de T₂ para S₁ (favorecida pelos átomos de bromo substituintes) e portanto pode ser observada emissão (Fig. 3).

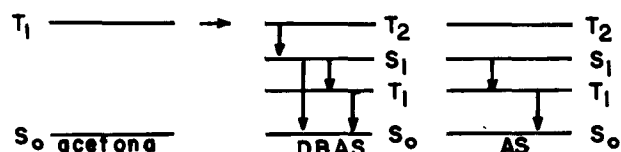


Figura 3

Estes resultados foram recentemente corroborados com o próprio DBA e antraceno solubilizados em micelas⁹ e o mecanismo confirmado usando corantes xantênicos como aceptores¹⁴.

A acetona triplete gerada enzimaticamente também pode transferir energia para a clorofila mas o mecanismo ainda não foi elucidado. Quando a clorofila está dissolvida em micelas a transferência é mais eficiente⁹ e também o rendimento quântico de fluorescência é muito maior. Vários outros sistemas enzimáticos geradores de espécies triplete são capazes de promover fluorescência de clorofila em micela tanto que convertendo-se a situação, tem-se usado clorofila em micelas para detectar espécies tripletes carbonílicas geradas enzimaticamente. A clorofila por simples ligação a estruturas biológicas pode mostrar uma grande eficácia na detecção de estados excitados gerados por estas estruturas, ex. microsomas.

D. Estudos-modelo com tetrametildioxetano em meio aquoso:

O tetrametildioxetano (TMD) tem sido preparado e cristalizado rotineiramente em nossos laboratórios para estudos-modelo em tampões aquosos. A dificuldade da não disponibilidade de $H_2O_2 > 85\%$ no mercado brasileiro para síntese foi contornada pela preparação de soluções anidras de $H_2O_2 - 5 M$ em éter etílico, usando-se técnicas de extração e concentração, a partir de H_2O_2 30%.

Paralelamente ao estudo de processos de "quenching" e transferência de energia da acetona triplete produzida enzimaticamente (isobutanal/ O_2 /HRP), protegida parcialmente pela apoproteína de colisões desativadoras com o oxigênio dissolvido, investigamos estes mesmos processos com a acetona triplete livre gerada em soluções aeradas de TMD sob aquecimento¹¹. Entre os interceptadores estudados, incluem-se o indol e derivados indólicos ($k_q \tau^\circ \sim 2$ a $5 \times 10^3 M^{-1}$), tirosina e derivados 3,5-dihalo genados ($k_q \tau^\circ \sim 2 \times 10^2$ a $7 \times 10^3 M^{-1}$), quinonas ($k_q \tau^\circ \sim 1$ a $4 \times 10^4 M^{-1}$), flavinas ($k_q \tau^\circ \sim 4 \times 10^3 M^{-1}$), ácido sórbico ($k_q \tau^\circ \sim 5 \times 10^3 M^{-1}$) e corantes xantênicos ($k_q \tau^\circ \sim 10^2$ a $10^4 M^{-1}$). É interessante notar que:

(i) o quadro geral comparativo de acetona triplete "livre" (gerada quimicamente) com acetona triplete "protegida" (gerada enzimaticamente), suprimidas por aquelas categorias de compostos, mostra que a vida média da

acetona gerada enzimaticamente é cerca de dez vezes maior que aquela da acetona "livre"; e

(ii) a constante de Stern-Volmer ($k_q \tau^\circ$) é tanto menor quanto mais baixo o potencial de ionização (PI) do supressor, sugerindo mecanismo de supressão controlado por transferência de elétron ou transferência de carga. De fato, as quinonas (PI-11 e V; PI de indóis e fenóis < 9 e V) constituem os supressores mais eficientes de acetona triplete; as constantes de velocidade de supressão estão no limite teórico esperado para processos controlados por difusão.

E. Indução de processos fotoquímicos: fotobioquímica sem luz

É óbvio que acetona triplete gerada enzimaticamente, da mesma forma com elicia emissão sensitizada, deve ser capaz de induzir processos fotoquímicos em aceptores apropriados.

Alguns dos casos investigados – e com sucesso – foram as transformações do fitocromo ($P_r \approx P_{fr}$)⁴, a adição covalente de riboflavina a lisozima¹⁵ e a conversão da colchicina em lumicolchicina⁸. A indução destes processos tipicamente fotoquímicos, produzidos por espécies triplete geradas enzimaticamente, abriu o campo da "fotobioquímica sem luz". Especialmente interessante é a eficiente transformação da colchicina em seus lumide- rivados (α , β e γ):

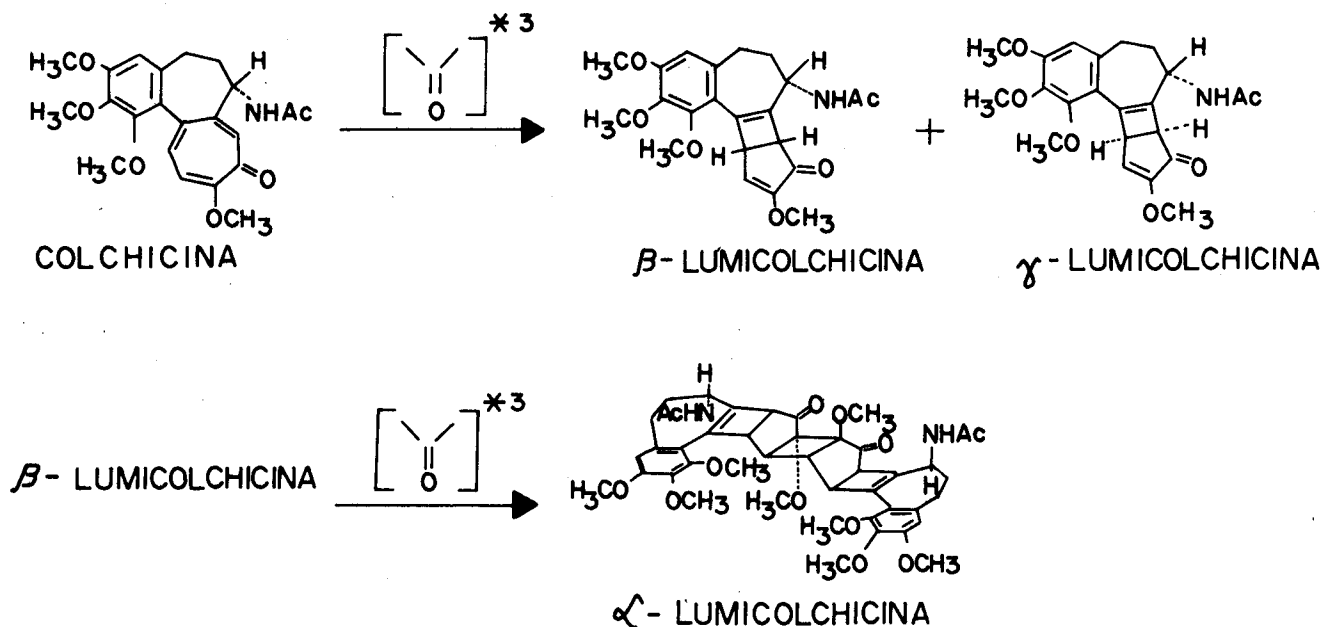


Figura 4

Esta transformação é termicamente proibida e, entretanto, ela ocorre em *Colchicum autumnale L.*, mesmo em partes da planta não expostas à luz. Deve-se pois suspeitar que espécies tripletes endógenas geradas enzimaticamente promovam a conversão.

Naturalmente a própria espécie excitada gerada enzimaticamente pode sofrer alteração do tipo fotoquímico. Assim a formação de acetona é acompanhada da formação de isopropanol (ca. 7%) e todos os controles indicam que o isopropanol provém da redução da acetona triplete.

Obviamente a "fotoquímica no escuro" pode fornecer uma explicação para a ocorrência "in vivo" de certos processos tipicamente fotoquímicos apesar da ausência de luz. Vários destes processos foram salientados por E.H. White e colaboradores²⁹. De especial relevância

é a formação do anel ciclobutânico por dimerização. É interessante pois que o α -lumicolchicina contenha este anel e pode ser formada a partir da β -lumicolchicina pela ação do sistema enzimático de acetona triplete¹⁸.

O fato de a acetona triplete induzir as transformações $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ do fitocromo já indica que ela é capaz de transferir energia para macromoléculas. Já conseguimos também detectar transferência para grupos triptofano de proteínas e para moléculas ligadas a proteínas. Pela ação sobre DNA, observam-se quebras de fitas simples. Surpreendentemente, observa-se transferência mesmo para organelas: adicionando-se cloroplastos, observa-se a emissão da clorofila²⁴.

A Figura 5 esquematiza os processos observados com acetona triplete gerada enzimaticamente.

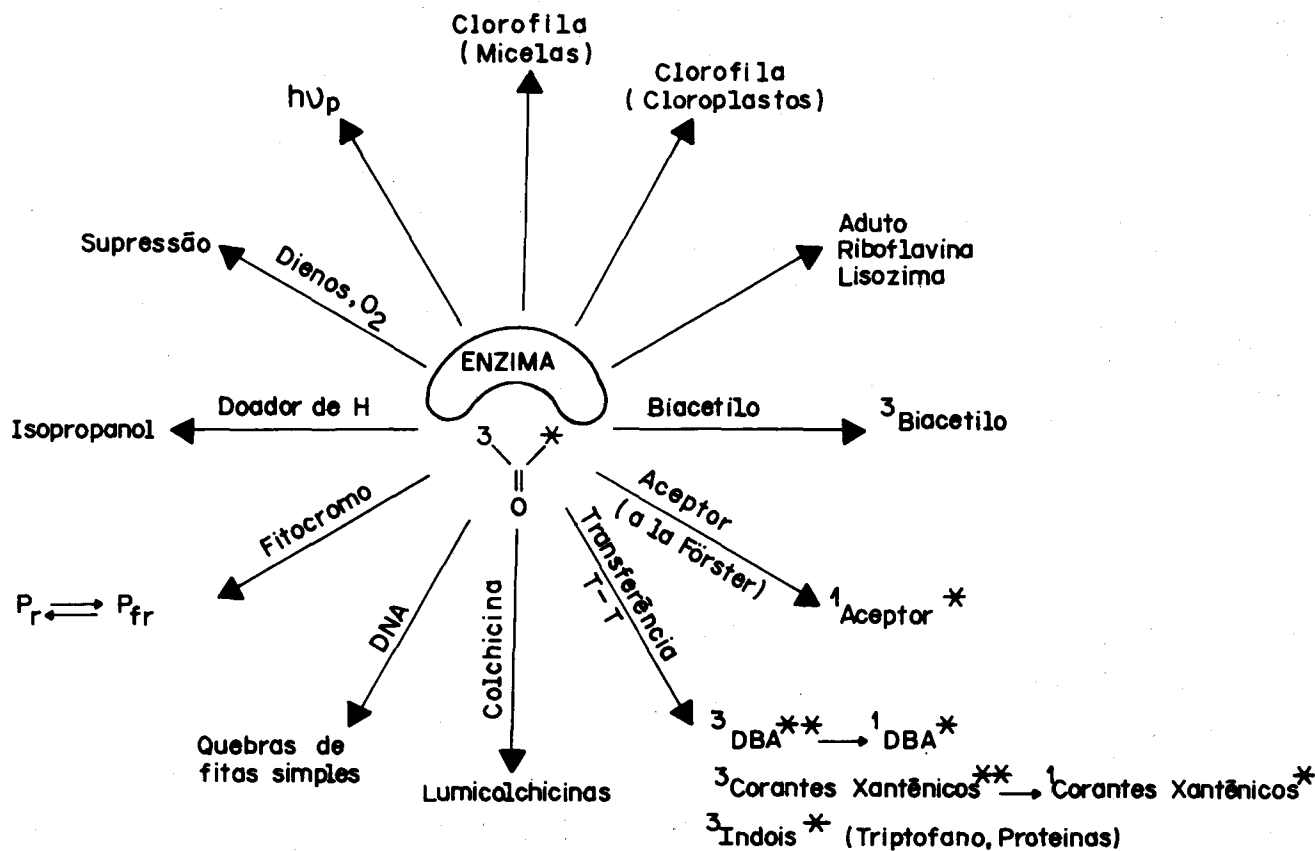
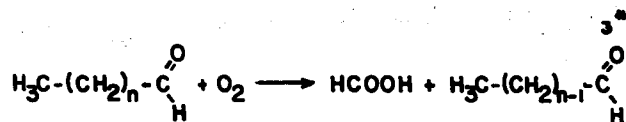


Figura 5

Alguns dos processos observados com acetona triplete gerada enzimaticamente.

F. Outros sistemas enzimáticos geradores de espécies triplete

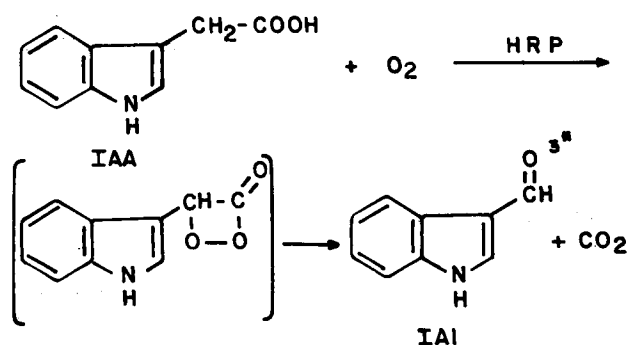
Aldeídos alifáticos são eficientes geradores de espécies mono-carboxílicas excitadas tripletes quando oxidados por peroxidase/oxigênio¹⁰. Por razões de solubilidade os substratos mais usados têm sido o propanal e o butanal. Forma-se o homólogo inferior no estado triplete:



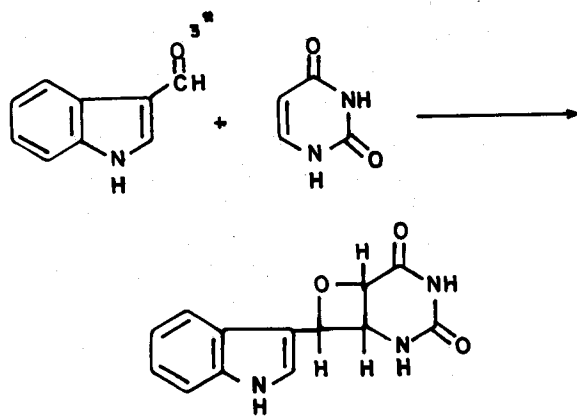
Naturalmente, enquanto isobutanal gera uma acetona triplete, aqui gera-se um aldeído triplete. Existem diferenças e semelhanças notáveis entre os dois sistemas. Uma importante diferença é que estes sistemas não são emissivos. Este fato tem sido vantajosamente explorado na

deteção de emissões induzidas fracas como por exemplo de sondas do DNA, de organelas e frações celulares (mitocôndrias, microsomas). As maiores semelhanças dizem respeito à excitação da clorofila em micelas e em cloroplastos. Cloroplastos excitados por estes sistemas não são capazes de levar a cabo a reação de Hill; isto indica que apenas algumas moléculas de clorofila são excitadas. Abre-se portanto a possibilidade de excitação seletiva por transferência em sistemas complexos.

Outro sistema amplamente estudado quanto à formação de produto excitado é o da oxidação aeróbica do ácido indol-3-acético (IAA) catalisada por peroxidase^{2,3}. Os principais produtos são indol-3-aldeído (IAL) e metil-neoxindol, a formação do primeiro sendo favorecida em pH baixos. A formação de IA1 ao lado de CO₂, poderia sugerir um intermediário dioxetânico e, portanto, formação de IA1 no estado excitado:



De fato o IA1 gerado enzimaticamente reage com uridina fornecendo o (s) mesmo(s) produto(s) esperado(s) da reação fotoquímica, ou seja de uma reação Paternó-Büchi:



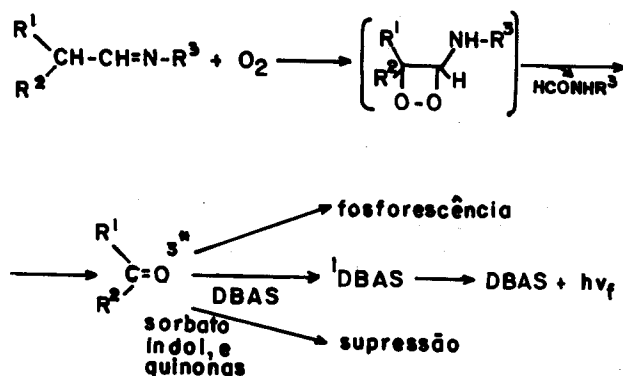
Outras bases não substituem a uridina. Entretanto ³IA1 — seja ótica ou enzimaticamente gerado — pôde ser sequestrado por t-RNA. A adição deve ocorrer num grupo de uridina do t-RNA; de fato após a clivagem do aduto, pôde-se isolar o mesmo produto Paternó-Büchi

acima descrito. Esta reação de ³IA1 com uridina e t-RNA sugere que ³IA1 é formado fora do enzima.

O sistema IAA/HRP/O₂ é também capaz de suscitar emissão de t-RNA^{Phe}. O espectro da emissão sensibilizada indica que o emissor é o grupo tiouridina; de fato, nenhuma emissão é observada com t-RNA de levedura, a qual não possui a base tiouridina. A excitação deve dar-se por transferência de energia do ³IA1 para tiouridina; é mesmo possível detectar — se bem que em pequena extensão — formação de fotoaduto com a citidina na posição 13.

Também os corantes xantênicos e a clorofila (micelas e cloroplastos) são excitados quando adicionados ao sistema IAA/HRP/O₂.

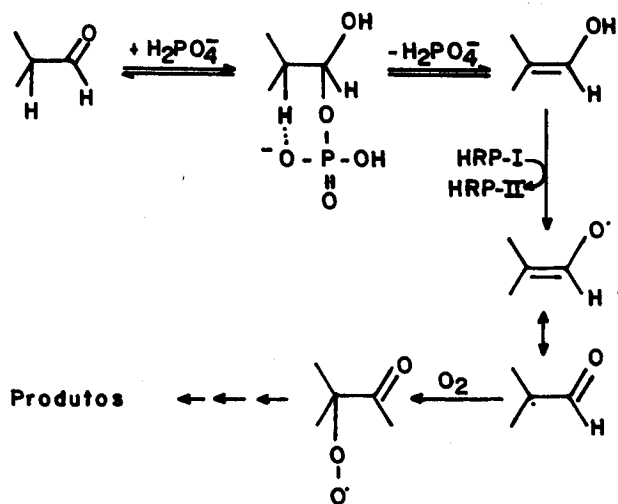
Mais recentemente, verificamos que também bases de Schiff preparadas a partir de isobutanal e butanona com aminas alifáticas (incluindo α-aminoácidos) quimiluminescem em tampões aerados na presença de HRP^{2,2}:



Estes estudos foram ampliados para adutos tipo bases de Schiff entre glicolaldeído e proteínas, tais como soroalbumina, lisozima, ribonuclease e protamina. A formação dos adutos com aminoácidos básicos das proteínas pode ser seguida por espectrofotometria e espectrofluorimetria e a intensidade observada de quimiluminescência depende diretamente da concentração de proteína na mistura de incubação com glicolaldeído. Estes dados constituem a base para o desenvolvimento de método analítico alternativo para dosagem de proteínas.

G. Papel de fosfato nas reações catalisadas por HRP:

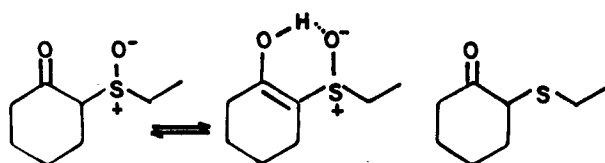
A velocidade de consumo de oxigênio por isobutanal, outros substratos aldeídicos e bases de Schiff, na presença de HRP, mostra uma dependência de primeira ordem na concentração de fosfato¹⁷. Com excessão de arsenato, outros compostos não são efetivos. Os resultados obtidos foram interpretados em termos de uma catálise bifuncional, promovida por fosfato, na interconversão aldeído-enol (ou imina-enamina), em que a forma enólica seria o real substrato da peroxidase.



Outra evidência experimental de que a abstração de elétron do enol (em equilíbrio tautomérico) constitui o passo inicial da reação é o fato de que a oxidação enzimática aeróbica de β -dicetonas não requer a presença de fosfato²⁸. É sabido que β -dicetonas, em meio aquoso, existem predominantemente na forma enólica, estabilizada por ponte de hidrogênio intramolecular:



Situação análoga foi encontrada com β -cetossulfóxidos, como substratos de HRP. Em relação ao sulfeto representado abaixo, o sulfóxido correspondente oxida-se mais rapidamente:



H. Conclusões e comentários

Espécies excitadas tripletes podem ser geradas enzimaticamente em alto rendimento. Eficientemente, transferem sua energia e, assim, além de induzirem emissão sensibilizada, promovem processos fotoquímicos. Com isto abriu-se um novo campo, a "fotobioquímica sem luz". A célula parece ter a sua disposição a potencialidade da fotoquímica, o que por sua vez leva a entender a ocorrência "in vivo" de processos fotoquímicos na ausência de luz. Mesmo moléculas com valor informacional podem ser afetadas. É possível talvez entender as bases de alguns processos deletérios haja visto que espécies excitadas endógenas são responsáveis por certas mutações espontâneas²⁶. Resta acrescentar que o amplo espectro de técnicas

utilizadas neste projeto, equipamentos e conhecimentos básicos sobre o comportamento químico de peróxidos e de oxigênio molecular, capacitaram-nos a incursionar em vários estudos aplicados, por exemplo, na área de "toxicidade de oxigênio"^{20,21} e produção de peróxidos para fins industriais.

Agradecimentos

Este artigo relata em grande parte o trabalho de uma equipe toda. Agradecemos a contribuição fundamental dos nossos colegas. Expressamos também nossa gratidão ao Professor F.H. Quina por ter examinado este capítulo e ter feito excelentes sugestões.

Nossa pesquisa beneficia-se de fundos provenientes da FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos, Rio de Janeiro), CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, OAS (Organization of American States Program) e da Volkswagenwerk Stiftung.

I. Referências Bibliográficas

- Adam, W. e G. Cilento, eds., "Chemical and Biological Generation of Excited States", Academic Press, New York, 1982.
- Adam, W. e G. Cilento, "Four-membered Ring Peroxides as Excited State Equivalents: a New Dimension in Bioorganic Chemistry", *Ang. Chem. Int. Ed. (Engl.)* 22: 529-542 (1983).
- Augusto, O. e E.J.H. Bechara, "Hemín-Catalyzed Generation of Triplet Acetone", *Biochim. Biophys. Acta* 631, 203-209 (1980).
- Augusto, O., G. Cilento, J. Jung e P.S.-Song, Photo-transformation of Phytochrome in the Dark, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 963-969 (1978).
- Baumstark, A.L., T. Dunams, L.H. Catalani e E.J.H. Bechara, "Thermolysis of 3-Methyl-3-alkyl-1,2-dioxetanes: Steric Effects of the Activation Parameters", *J. Org. Chem.* 48, 3713-3716 (1983).
- Bechara, E.J.H. e T. Wilson, "Alkyl Substituent Effects on Dioxetane Properties. Tetraethyl-, Dicyclohexylidene- and 3,4-Dimethyl-3, 4-di-n-butylidioxetanes. A Discussion of Decomposition Mechanisms", *J. Org. Chem.* 45, 5261-5268 (1980).
- Bechara, E.J.H., O.M.M.F. Oliveira, N. Durán, R.C. Baptista e G. Cilento, "Peroxidase Catalyzed Generation of Triplet Acetone", *Photochem. Photobiol.* 30, 101-110 (1979).
- Brunetti, I.L., E.J.H. Bechara, G. Cilento e E.H. White, Possible "in vivo" Formation of Lumicolchicine from Colchicine by Endogenously Generation Triplet

- Species", *Photochem. Photobiol.* **36**, 245-249 (1982).
- 9 Brunetti, I.L., G. Cilento e L. Nassi, "Energy Transfer from Enzymically Generated Triplet Species to Acceptors in Micelles", *Photochem. Photobiol.*, **38**, 511-520 (1983).
 - 10 Campa, A., L. Nassi e G. Cilento, "Triplet Energy Transfer to Chloroplasts from Peroxidase-generated Excited Aliphatic Aldehydes", *Photochem. Photobiol.*, no prelo.
 - 11 Catalani, L.H. e E.J.H. Bechara, "Quenching of Chemiexcited Triplet Acetone by Biologically Important Compounds in Aqueous Medium", *Photochem. Photobiol.*, no prelo.
 - 12 Clayton, R.K., "Light and Living Matter: a Guide to the Study of Photobiology", volumes 1 e 2, McGraw-Hill, New York, 1970-1971.
 - 13 Cilento, G., "Generation and Transfer of Triplet Energy in Enzymatic Systems", *Acc. Chem. Res.* **13**, 225-230 (1980).
 - 14 Cilento, G., "Electronic Excitation in Dark Biological Processes", Capítulo 9 na referência (1), 1982.
 - 15 Durán, N., M. Haun, S.M. Toledo, G. Cilento e E. Silva, "Binding of Riboflavin to Lysozyme Promoted by Peroxidase-generated Triplet Acetone", *Photochem. Photobiol.* **37**, 247-250 (1983).
 - 16 Förster, T.H., "Mechanism of Energy Transfer". Em: "Comprehensive Biochemistry (M. Florkin and E.H. Stotz, eds.) **22**, 61-81, Elsevier, Amsterdam, 1967.
 - 17 Kenten, R.H., "The Oxidation of Phenylacetaldehyde by Plant Saps", *Biochem. J.* **55**, 350-360 (1953).
 - 18 Koo, J.-Y., S.P. Schmidt e G.B. Schuster, "Bioluminescence of the Firefly: Key Steps in the Formation of the Electronically Excited State for Model Systems", *Prof. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 30-33 (1978).
 - 19 McCapra, F., "Chemical Mechanisms in Bioluminescence", *Acc. Chem. Res.* **9**, 202-208 (1976).
 - 20 Medeiros, M.H.G., P.E. Marchiori e E.J.H. Bechara, "Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Catalase Activities in the Erythrocytes of Patients with Intermittent Acute Porphyria", *Clin. Chem.* **28**, 242 (1982).
 - 21 Medeiros, M.H.G., E.J.H. Bechara, P.C. Naoum e C.A. Mourão, "Oxygen Toxicity and Hemoglobinemia in Subjects from a Highly Polluted Town", *Arch. Environm. Health* **38**, 11-16 (1983).
 - 22 Medeiros, M.H.G. e E.J.H. Bechara, "Chemiluminescence of Schiff Bases Catalyzed by Horseradish Peroxidase". Em "Oxygen Radicals in Chemistry and Biology", (W. Bors, M. Saran e D. Tait, eds.), Walter de Gruyter & Co., Berlin, pp. 539-542 (1984).
 - 23 Mello, M.P., S.M. Toledo, M. Haun, G. Cilento e N. Durán, "Excited Indole-3-aldehyde from the Peroxidase Catalyzed Oxidation of Indole-3-acetic Acid Reaction with and Energy Transfer to t-RNA", *Biochemistry* **19**, 5270-5275 (1980).
 - 24 Nassi, L. e G. Cilento, "Red Emission from Chloroplasts Elicited by Enzyme Generated Triplet Acetone and Triplet Indole-3-aldehyde", *Photochem. Photobiol.* **37**, 233-237.
 - 25 Rivas-Suárez, E. e G. Cilento, "Quenching of Enzyme-Generated Acetone Phosphorescence by Indole Compounds: Stereo-specific Effects of D- and L-Tryptophan. Photochemical Like Effects", *Biochemistry* **20**, 7329-7333 (1981).
 - 26 Sargentini, N.J. and K.C. Smith, Much of the Spontaneous Mutagenesis in *Escherichia coli* is due to error-prone DNA repair: Implications for Spontaneous Mutagenesis, *Carcinogenesis* **2**, 863-872 (1981).
 - 27 Smith, K.C., ed. "The Science of Photobiology", Plenum Press, New York, 1977.
 - 28 Soares, C.H.L. e E.J.H. Bechara, "Enzymatic Generation of Triplet Biacetyl", *Photochem. Photobiol.* **36**, 117-119.
 - 29 White, E.H., J.D. Miano, C.J. Watkins and E.J. Breaux, "Chemically Produced Excited States", *Ang. Chem. Int. Ed. (Engl.)* **13**, 229-243 (1974).
 - 30 Wilson, T., "Chemiluminescence in the Liquid Phase: Thermal Cleavage of Dioxetanes". Em "Chemical Kinetics", Série 2 (D.R. Hersbach, ed.), MTP Int. Rev. Sci., London, pp. 265-322, 1976.

MECANISMO DA LACTONIZAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS γ, δ -INSATURADOS E DERIVADOS FUNCIONAIS PELA REAÇÃO COM REAGENTES ELETROFÍLICOS

Luciano do Amaral*
Antonia Tavares do Amaral

Instituto de Química
Universidade de São Paulo
Caixa Postal 20780, São Paulo, SP

1. Histórico

A pesquisa em Química Orgânica iniciou-se no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo

desde a sua fundação, sob orientação dos eminentes mestres Profs. Heinrich Rheinboldt e Heinrich Hauptman.