

Giuseppe Cilento

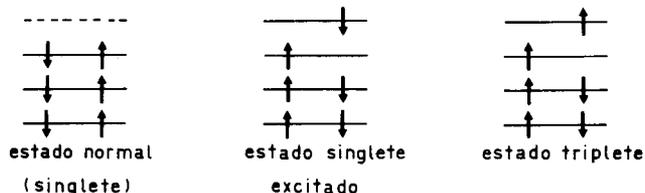
Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade de São Paulo - Cx. P. 20780 - 01498-970 - São Paulo - SP

Recebido em 31/5/93

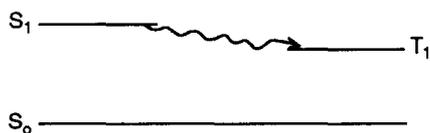
It has been known for a long time that - as attested by light emission - some chemical and enzymatic reactions generate a product in the electronically excited singlet state (chemiluminescence and bioluminescence, respectively). Following the breakthrough (1969) that a product can be formed in the electronically excited triplet state in the thermal cleavage of dioxetanes, this laboratory has been reporting since 1975 the enzymatic formation of triplet species. The main systems are peroxidase catalyzed reactions that consume oxygen. These triplet species can react and transfer energy to appropriate acceptors, thus promoting sensitized emission and sensitized photochemistry.

Keywords: peroxidase; triplet species; chemiluminescence; phosphorescence; transfer of electronic energy.

Nas moléculas em geral, os elétrons ocupam aos pares os níveis (orbitais) de mais baixa energia. Devido ao princípio de Pauli, os elétrons emparelhados têm spins opostos. Sob ação de luz, de energia apropriada, um elétron é promovido a um nível vazio superior. Visto que dois elétrons estão agora desparelhados, eles podem teoricamente ter o mesmo spin ou spins opostos. No primeiro caso, dizemos que a molécula está no estado singlete excitado; no segundo caso, a molécula está no estado tripleto.



Apesar das duas possibilidades, a molécula só é facilmente excitada ao estado singlete; de fato para originar o estado tripleto o elétron tem que mudar de spin, processo este proibido pela lei da conservação do spin. O estado tripleto pode entretanto ser alcançado a partir do estado excitado singlete por um processo chamado cruzamento intersistema, conforme diagrama abaixo; o diagrama também mostra que o nível tripleto tem energia mais baixa do que o singlete excitado.



A pergunta lógica é: o que acontece com a molécula nestes estados excitados, pois o diagrama acima nada informa? A volta de S₁ para S₀ não apresenta problema pois o processo não requer mudança de spin. O processo é pois muito rápido e a desativação pode dar-se com libertação de luz. Esta emis-

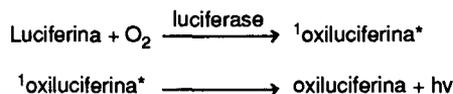
são de luz é chamada fluorescência. Entretanto no caso de T₁ para S₀ o processo requer inversão de spin. Portanto os processos de desativação são lentos. É fácil entender que o estado S₁ tem um tempo de vida intrínscio muito curto (da ordem de milésimo de milionésio de segundo, 10⁻⁹ s) ao passo que a vida intrínscia no estado tripleto é muitas dezenas de vezes mais longa (1 a dez milionésimos de segundo, 10⁻⁶-10⁻⁵s).

Durante esta "longa" vida, vários processos que "acabam" com o tripleto têm oportunidade de ocorrer. Portanto, normalmente a molécula no estado tripleto não tem oportunidade de emitir; em geral, para que haja emissão deve ser retirado o oxigênio dissolvido e o sistema mantido a baixíssima temperatura. A emissão nestes casos é chamada fosforescência; ela ocorre a comprimentos de onda mais longos do que a fluorescência, pois como já vimos o estado T₁ tem menos energia do que o S₁.

São observações já bastante antigas que certas reações químicas produzem luz ("quimioluminescência"); o que acontece é geralmente a formação de um produto no estado excitado S₁ ou seja, fluorescente. Uma das condições necessárias para que isto aconteça (de forma alguma suficiente!) é a reação ser bastante exergônica. Neste caso a entalpia da reação somada à energia de ativação pode ser suficiente para que o produto apareça primeiro no estado S₁.

Estas reações constituem a base de um processo biológico muito comum, a bioluminescência; desta, um exemplo muito familiar é a luz do vagalume. Na bioluminescência, a reação é catalisada por um enzima chamado luciferase. O substrato é a luciferina e o que se forma é uma oxiluciferina no estado fluorescente, a qual se desativa com formação de luz.

Existem excelentes revisões sobre bioluminescência.



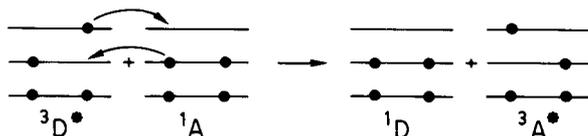
Do que trataremos agora é de um assunto aparentado à bioluminescência.

Se certos sistemas bioquímicos / biológicos são capazes de gerar um produto no estado excitado fluorescente, haveria sistemas capazes de gerar produtos no estado excitado tripleto, ou seja, fosforescente?

* Conferência apresentada na 16ª Reunião Anual da SBQ em Caxambú (Maio 1993).

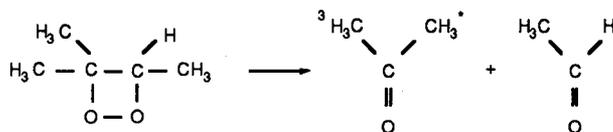
A pergunta é extremamente importante e várias vezes foi levantada na literatura. De fato, moléculas no estado tripleto, por terem uma vida intrínseca muito mais longa do que no estado fluorescente, se formadas seriam muito mais aptas para processos biomoleculares, tal como transferência da sua energia para aceptores apropriados e reações com outras biomoléculas, pois em geral biomoléculas estão presentes *in vivo* em concentrações muito baixas. A pergunta é importante também pelo fato que ocorre na natureza certos processos que são tipicamente fotoquímicos, e que, entretanto, não precisam de luz para ocorrer. A possibilidade de que espécies tripletes pudessem ser formadas por transferência de energia de um produto gerado no estado fluorescente não pode ser excluída, porém, é algo remota pois oceptor deveria estar na vizinhança imediata do doador (o que pode requer alta concentração) ou então estar ligado ao sistema gerador da espécie excitada singlete. Além do mais, é necessário que exista uma certa sobreposição entre a região espectral da fluorescência e a região onde oceptor absorve luz. Diga-se de passagem que esta transferência de energia singlete-singlete é denominada transferência "tipo Forster".

Em suma, é muito mais provável que o processo do tipo fotoquímico seja o resultado de um processo bimolecular em que estados excitados tripletes estejam envolvidos. Desde que a condição energética esteja satisfeita, a transferência de energia tripleto-triplete ocorre por um processo colisional, pois requer interpenetração das nuvens eletrônicas.

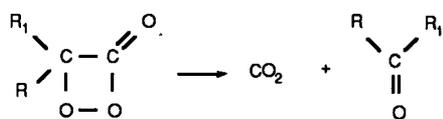


O leitor poderia perguntar: - se estados tripletes fossem gerados em sistemas bioquímicos / biológicos, eles não seriam imediatamente suprimidos pelo oxigênio? Mesmo assim, achamos que valeria a pena procurar uma possível formação de espécies tripletes. De fato, se elas sofressem reações monomoleculares ou bimoleculares, estas reações poderiam competir com a supressão pelo oxigênio, especialmente se as condições fossem favoráveis.

O tema entretanto só pôde ser atacado a partir dos anos 70, em seguida aos trabalhos de Kopecky e Mumford¹. Estes autores sintetizaram peróxidos cíclicos de quatro átomos, os dioxetanos, e verificaram que eles clivam produzindo um dos dois compostos carbonílicos no estado excitado tripleto.



Antes de prosseguirmos, é importante frizar que os intermediários de vários processos bioluminescentes são estritamente aparentados aos dioxetanos. São as alfa-peroxilactonas as quais clivam originando CO₂ e o composto carbonílico no estado fluorescente.

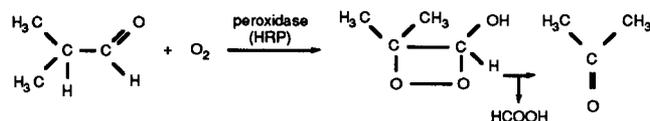


A formação do produto no estado S₁ é devido ao fato que nos processos bioluminescentes o substituinte na alfa-peroxilactona é um excelente doador de elétrons. De fato,

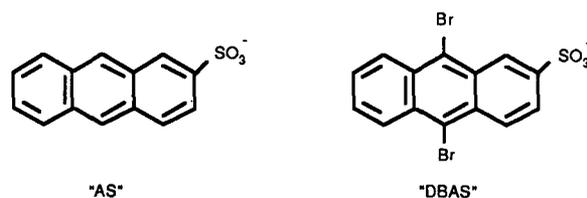
mesmo nos dioxetanos com substituintes doadores de elétrons, a tendência a formar tripletes diminui e aparecem produtos no estado excitado singlete².

Voltando ao tema central, nossa abordagem na procura de espécies tripletes em sistemas bioquímicos foi a de selecionar reações enzimáticas cujos produtos são os mesmos esperados de um hipotético intermediário dioxetânico ou dioxetanônico, com substituintes simples, não oxidáveis.

Logo verificamos que existem várias reações enzimáticas que satisfazem este critério. São reações catalisadas por peroxidases nas quais ocorre incorporação de oxigênio à molécula do substrato. Encurtando uma longa estória, selecionamos para estudo detalhado a reação de isobutiraldeído levando a acetona e ácido fórmico³, produtos estes que conforme mostrado abaixo correspondem à clivagem de um dioxetano simples:



Nesta representação HRP é a peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase"). A reação tinha sido mencionada por Kenten³ nos seus estudos de oxidação de aldeídos por extratos de plantas. A escolha desta reação deve-se ao fato de que, se acetona viesse mesmo a ser gerada no estado tripleto, havia disponível na literatura uma excelente "infraestrutura" para identificá-la, informações estas advindas com o estudo químico de dioxetanos e estudos fotofísicos da própria acetona. Já nos primeiros experimentos e, portanto, sem otimização alguma, observamos que a reação emitia fótons sendo que a intensidade da luz aumentava com o consumo de oxigênio, para depois cair dramaticamente quando o oxigênio se esgotava e só estava disponível por difusão⁴. Este aumento de emissão com o gradual desaparecimento do oxigênio poderia sugerir que se tratava de um tripleto. Entretanto o primeiro fato sólido de que se tratava de um tripleto veio com a comparação dos efeitos de dois derivados antracênicos o íon 2-antracenosulfonato ("AS") e o íon 9,10-dibromo-2-antraceno sulfonato ("DBAS")



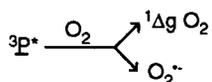
Por razões que serão expostas adiante, caso acetona tripleto tivesse se formado deveria ser observado um grande aumento de emissão juntando-se DBAS ao sistema, ao passo que com o AS nenhum efeito significativo deveria ser esperado. Foi justamente o que aconteceu⁴. A confirmação que se tratava mesmo de acetona tripleto veio com a obtenção do espectro de emissão. De fato, quando as condições foram otimizadas a intensidade da emissão foi suficientemente forte para se obter o espectro em aparelho convencional. O espectro mostrou que se tratava de fosforescência de acetona⁴. Também de acordo com a formação de acetona no estado tripleto, a intensidade da emissão diminuía na presença de supressores de carbonílos saturados tripletes tais como acrilonitrila e sorbato.

Estudos cinéticos mostraram que, tal como prevíamos, o verdadeiro substrato da enzima é a forma enólica do isobutiraldeído⁵. Quando esta foi preparada (bloqueada na forma do derivado trimetilsilil) e usada, a fosforescência da acetona pôde ser observada a olho nú. Quando DBAS foi adicionado, a emissão foi tão forte que pode ser fotografada⁶.

Formação ao nível celular de compostos carbonílicos tripletes

A abordagem foi a de administrar substratos apropriados a células ricas em peroxidases¹⁷. Com esta finalidade a maioria dos estudos foi realizada com neutrófilos, células ricas em mieloperoxidase. A formação de acetona triplete pôde ser constatada quando se usou como substrato o trimetilsilil derivado da forma enólica do isobutiraldeído; este sofre hidrólise gerando a forma enólica do isobutanal que sabemos ser a verdadeira forma reativa. O espectro da emissão mostrou nitidamente o pico de fosforescência da acetona triplete. Além do mais, a adição de DBAS aumentou dramaticamente a emissão, o que não acontece com AS.

Vários outros substratos de peroxidase mostraram ser capazes de gerar um produto triplete ao nível celular. Estes resultados abrem um importante campo de estudo ou seja a investigação dos efeitos intracelulares induzidos por espécies tripletes geradas *in situ*¹⁸. Enquadram-se aqui estudos com xenobióticos, pois é sabido que vários deles exercem seus efeitos como resultado da metabolização peroxidativa. De fato pudemos constatar que vários xenobióticos produzem espécies eletronicamente excitadas quando metabolizados peroxidativamente. Portanto quando se procuram verificar as bases moleculares dos efeitos de xenobióticos além de (i) produtos reativos no estado normal (ii) radicais intermediários (iii) espécies ativas de oxigênio, deve ser levada em conta também a formação de espécies eletronicamente excitadas. É de se notar que esta última possibilidade não é totalmente independente da (iii) pois certas espécies tripletes podem gerar oxigênio singlete e também íon superóxido:



COMENTÁRIOS

Vimos que espécies tripletes podem ser formadas em sistemas bioquímicos, podem reagir e induzir processos fotoquímicos na ausência de luz. Estudos em andamento sugerem que também radicais cátions excitados -espécies estas altamente reativas- podem ser gerados enzimaticamente. Outras enzimas além da peroxidase, por exemplo lipoxigenases estão também envolvidas na geração de espécies eletronicamente excitadas. Existem pois condições para a fotobioquímica escura *in vivo*. Entretanto a demonstração de uma possível funcionalidade apresenta-se ainda difícil. Até que esta demonstração aconteça de forma plena e convincente, apenas valor acadêmico pode ser atribuído à fotobioquímica sem luz. A história da ciência nos ensina a esperar.

AGRADECIMENTOS

Este artigo apresenta um panorama de duas décadas de trabalhos nos quais participaram dezenas de contribuidores, de estudantes a professores visitantes. É impossível agradecer a todos de forma individual. Entretanto um agradecimento mais especial é dirigido ao Professor Etelvino J. H. Bechara por ter examinado o presente artigo e levantado sugestões valiosas.

REFERÊNCIAS

1. Kopecky, K.R. and Mumford, C.; *Can. J. Chem.*, (1969), **47**, 709.
2. Adam, W.; "Determination of chemiexcitation yields in the thermal generation of electronic excitation from 1,2-dioxetanes" in W.Adam and G.Cilento (Eds) *Chemical and Biological Generation of Excited States*, Academic Press, New York, p. 115-152.
3. Kenten, R.H.; *Biochem. J.*, (1953), **55**, 350.
4. Faria Oliveira, O.M.M.; Haun, M.; Durán, N.; O'Brien, P.J.; O'Brien, C.R.; Bechara, E.J.H. and Cilento, G., *J.Biol.Chem.*, (1978), **253**, 4707.
5. Baader, W.J.; Bohne, C.; Cilento, G. and Dunford, H.B.; *J.Biol.Chem.*, (1985), **260**, 10217.
6. Baader, W.J.; Bohne, C.; Cilento, G. and Nassi, L. *Biochem. Ed.*, (1986), **14**, 190.
7. Rivas-Suarez, E. and Cilento, G., *Biochemistry*, (1981), **20**, 7329.
8. Augusto, O. and Bechara, E.J.H. *Biochim.Biophys.Acta*, (1980), **631**, 203.
9. Cilento, G., *Pure Appl. Chem.*, (1984), **56**, 1179.
10. Bohne, C. and Scaiano, J.C.; *J.Am.Chem.Soc.*, (1989), **III**, 2409.
11. Brunetti, I.L.; Bechara, E.J.H.; Cilento, G. and White, E.H.; *Photochem.Photobiol.*, (1982), **36**, 245.
12. Adam, W.; Baader, W.J. and Cilento, G.; *Biochim. Biophys. Acta*, (1986), **881**, 330.
13. Cadenas, E.; Sies, H.; Campa, A. and Cilento, G. *Photochem. Photobiol.*, (1984), **40**, 661.
14. Da Silva Knudsen, F.; Campa, A.; Stefani, H.A. and Cilento, G. submetido para publicação.
15. Silva, E.; Rodrigues, G.; Faljoni, A. and Cilento, G., *Photochem. Photobiol.*, (1991), **53**, 271.
16. Salim-Hanna, M.; Campa, A. and Cilento, G., *Photochem. Photobiol.*, (1987), **45**, 849.
17. Escobar, J.A.; Cilento, G. and Nascimento, A.L.T.O. *Photochem. Photobiol.*, (1990), **51**, 713.
18. Cilento, G. and Nascimento, A.L.T.O., *Toxicol. Lett.*, (1993), **67**, 17.

Publicação financiada pela FAPESP