

Giuseppe Cilento

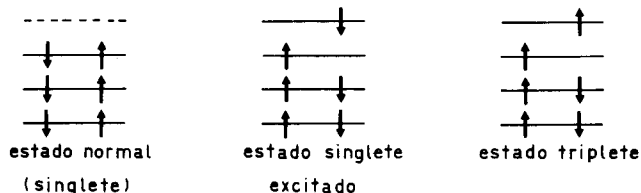
Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade de São Paulo - Cx. P. 20780 - 01498-970 - São Paulo - SP

Recebido em 31/5/93

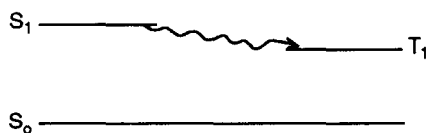
It has been known for a long time that - as attested by light emission - some chemical and enzymatic reactions generate a product in the electronically excited singlet state (chemiluminescence and bioluminescence, respectively). Following the breakthrough (1969) that a product can be formed in the electronically 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 S<sub>1</sub> para S<sub>0</sub> 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-

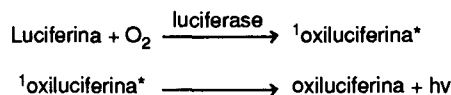
são de luz é chamada fluorescência. Entretanto no caso de T<sub>1</sub> para S<sub>0</sub> o processo requer inversão de spin. Portanto os processos de desativação são lentos. É fácil entender que o estado S<sub>1</sub> tem um tempo de vida intrínscio muito curto (da ordem de milésimo de milionésio de segundo, 10<sup>-9</sup> s) ao passo que a vida intrínscia no estado tripleto é muitas dezenas de vezes mais longa (1 a dez milionésimos de segundo, 10<sup>-6</sup>-10<sup>-5</sup>s).

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 T<sub>1</sub> tem menos energia do que o S<sub>1</sub>.

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 S<sub>1</sub> 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 S<sub>1</sub>.

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.



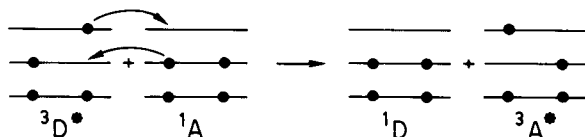
Do que trataremos agora é de um assunto aparentado à bioluminescência.

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).

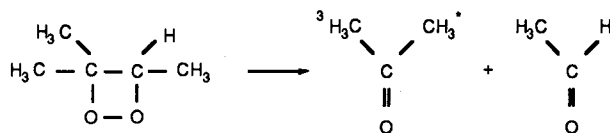
A pergunta é extremamente importante e várias vezes foi levantada na literatura. De fato, moléculas no estado triplete, por terem uma vida intrínseca muito mais longa do que no estado fluorescente, se formadas seriam muito mais aptas para processos biomoleculares, tal como transferência da sua energia 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 ocorrerem 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 o aceptor 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 o aceptor 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 triplete-triplete ocorre por um processo colisional, pois requer interpenetração das nuvens eletrônicas.

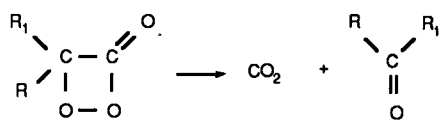


O leitor poderia perguntar: - se estados tripletes fossem gerados em sistemas bioquímicos / biológicos, eles não seriam imediatamente suprimidos pelo oxigênio? Mesmo assim, achamos que valeria a pena procurar uma possível formação de espécies tripletes. De fato, se elas sofressem reações monomoleculares 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 Mumford<sup>1</sup>. Estes autores sintetizaram peróxidos cíclicos de quatro átomos, os dioxetanos, e verificaram que eles clivam produzindo um dos dois compostos carbonílicos no estado excitado triplete.



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 CO<sub>2</sub> e o composto carbonílico no estado fluorescente.

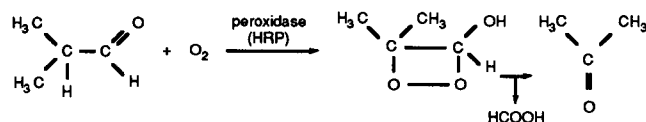


A formação do produto no estado S<sub>1</sub> é devido ao fato que nos processos bioluminescentes o substituinte na alfa-peroxilactona é um excelente doador de elétrons. De fato,

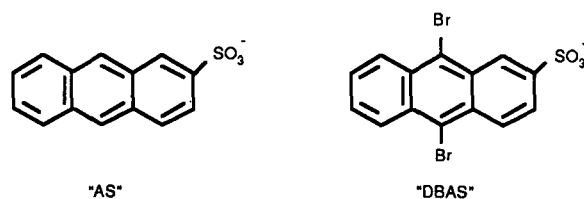
mesmo nos dioxetanos com substituintes doadores de elétrons, a tendência a formar tripletes diminui e aparecem produtos no estado excitado singlete<sup>2</sup>.

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 fórmico<sup>3</sup>, produtos estes que conforme mostrado abaixo correspondem à clivagem de um dioxetano simples:

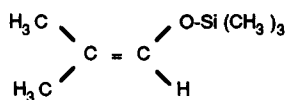


Nesta representação HRP é a peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase"). A reação tinha sido mencionada por Kenten<sup>3</sup> nos seus estudos de oxidação de aldeídos por extratos de plantas. A escolha desta reação deve-se ao fato de que, se acetona viesse mesmo a ser gerada no estado triplete, 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 difusão<sup>4</sup>. Este aumento de emissão com o gradual desaparecimento do oxigênio poderia sugerir que se tratava de um triplete. Entretanto o primeiro fato sólido de que se tratava de um triplete 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 triplete 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 aconteceu<sup>4</sup>. A confirmação que se tratava mesmo de acetona triplete 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 acetona<sup>4</sup>. Também de acordo com a formação de acetona no estado triplete, 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 isobutiraldeído<sup>5</sup>. 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 fotografada<sup>6</sup>.

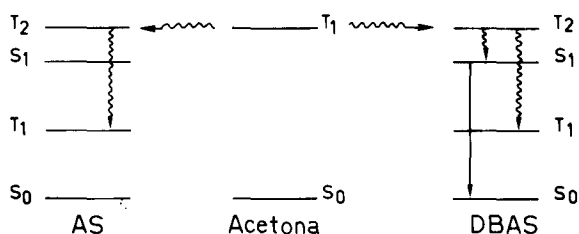


O leitor muito justamente poderá se perguntar como é possível observar tão forte fosforescência se oxigênio está presente. Após quase vinte anos ainda não temos uma resposta totalmente satisfatória. Conhecem-se outros sistemas nos quais uma espécie triplete fosforesce apesar da presença de oxigênio; são casos onde o oxigênio não consegue difundir até a espécie triplete. Nós poderíamos alegar uma situação semelhante, ou seja, o triplete seria gerado na proteína e protegido por ela de colisões desativantes pelo oxigênio.

Existem fatos a favor desta explicação. Assim o L- e o D-triptofano suprimem a fosforescência da acetona com eficiência diferentes o que indica estar a acetona triplete num ambiente assimétrico, ou seja "encaixada" na enzima<sup>7</sup>. Outro fato é que a substituição da peroxidase pela hemina suprime totalmente a emissão direta; evidentemente a parte proteica tem um efeito protetor<sup>8</sup>.

Entretanto outros fatos permanecem inexplicáveis. Isto pôde ser constatado na própria observação de que DBAS, ao contrário do AS, aumenta fortemente a emissão. Este aumento é devido ao fato de que a acetona triplete transfere energia para o segundo triplete do DBAS e do AS; normalmente o acceptor no estado T<sub>2</sub> passa para o estado T<sub>1</sub> e não se vê sua fosforescência. Porém, quando existem átomos de bromo, a regra da conservação do spin não é de toda válida; portanto ocorre também um cruzamento intersistema ao reverso para o estado S<sub>1</sub> e daí a fluorecência do DBAS, responsável pelo grande aumento de emissão.

Esquemáticamente:

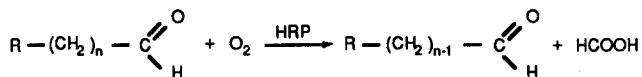


Ora, a transferência de energia T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> tem que ser colisional, ou seja requer contatos. Porque ela acontece se a acetona triplete está protegida?

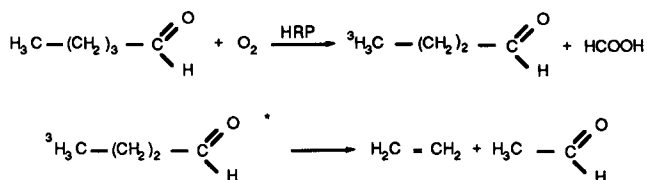
A acetona triplete gerada enzimaticamente é capaz de transferir energia a uma série de aceptores fluorescentes e assim eliciar a fluorecência destes<sup>9</sup>. Podemos mencionar a clorofila, flavinas e corantes xantênicos, como a eosina. Pelo menos no caso da clorofila, sabemos que a energia entra através de um triplete superior<sup>10</sup>.

Da mesma forma que acetona triplete elicia emissão sensibilizada, ela e outros carbonílicos tripletes devem ser capazes de propiciar fotoquímica sensibilizada. Disto nos certificamos amplamente. Apenas alguns exemplos serão relatados. Um caso interessante é o da transformação da colchicina em lumicolchicinas. Esta transformação ocorre na planta *Colchicum autumnale* mesmo em regiões da planta não expostas a luz, como o bulbo e as raízes. Isto constituiu-se -e de certa forma ainda se constitui- num enigma. Levantou-se a possibilidade de que estados excitados endógenos transferiram a energia para a colchicina excitando-a ao estado triplete, estado este envolvido na transformação fotoquímica. O fato de a colchicina transformar-se em lumicolchicinas quando presente no sistema enzimático gerador de acetona triplete constitui-se em excelente modelo para a hipótese da fotoquímica sem luz<sup>11</sup>.

Encontrou-se que a formação enzimática de carbonilos eletronicamente excitados ao estado triplete é bastante geral. Saindo-se de um aldeído linear, chegou-se ao homólogo inferior no estado triplete.



A partir da forma enólica, pôde-se facilmente detectar a fosforescência do homólogo inferior<sup>12</sup>. Aqui também observa-se sensibilização por DBAS, corantes xantênicos e clorofila. A reação acima é de especial interesse pois ela ocorre durante a peroxidação lipídica, o que está de acordo com o fato desta peroxidação produzir eficientemente espécies eletronicamente excitadas<sup>13</sup>. Ulterior interesse vem do fato de que partindo-se de aldeídos suficientemente longos pode-se esperar produtos do tipo Norrish II. Tais fotoprodutos são observados a partir do triplete do butanal; enzimaticamente, visto ser gerado excitado o homólogo inferior, é necessário sair do pentanal. Assim pudemos confirmar a esperada formação de etileno partindo-se do pentanal<sup>14</sup> (mais convenientemente da forma enólica):

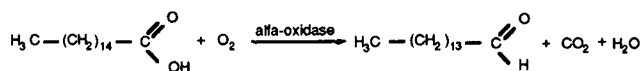


É certamente digno de nota que etileno foi detectado na peroxidação lipídica. Visto que etileno é hormônio de planta, é concebível que as reações acima constituem-se num processo secundário da formação deste hormônio.

### Excitação de cloroplastos

A acetona triplete gerada enzimaticamente é capaz de excitar a clorofila dos cloroplastos conforme se deduz da indução de emissão vermelha. Estes cloroplastos assim excitados são capazes de reduzir certos corantes que funcionam como aceptores artificiais de elétrons<sup>15</sup>. Em outras palavras, a acetona triplete é capaz de induzir a reação de Hill. De forma menos nítida, o fenômeno pôde ser também observado tratando simplesmente os cloroplastos com isobutiraldeído; neste caso a acetona triplete é presumivelmente gerada por peroxidases endógenas. Vários outros compostos carbonílicos no estado triplete gerados enzimaticamente mostraram-se capazes de induzir a reação de Hill.

Já anteriormente havíamos obtido indicações que esta reação de Hill em ausência de luz pode ser promovida sob condições praticamente naturais<sup>16</sup>. Assim existe uma enzima em plantas superiores, chamada alfa-oxidase a qual converte um ácido graxo longo ao aldeído inferior e CO<sub>2</sub>. Saindo-se do ácido palmítico, obtem-se pentadecanal, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O:

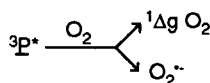


As preparações de alfa-oxidase obtidas a partir de folhas jovens de *Pisum sativum* (ervilha) estão sempre contaminadas com cloroplastos e frações. Quando se adiciona o ácido graxo longo, pode-se observar a emissão vermelha e redução de corantes<sup>16</sup>.

## Formação ao nível celular de compostos carbonílicos tripletes

A abordagem foi a de administrar substratos apropriados a células ricas em peroxidases<sup>17</sup>. 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*<sup>18</sup>. 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