

Artigo

“Foto”química Sem Luz?

Baader, W. J.;* Stevani, C. V.; Bechara, E. J. H.

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (1), 74-102. Data de publicação na Web: 12 de dezembro de 2014<http://www.uff.br/rvq>

“Photo”chemistry Without Light?

Abstract: In 1974, independently, Giuseppe Cilento (São Paulo University) and Emil White (Johns Hopkins University) provoked the scientific community with the hypothesis that typically photochemical reactions may take place in dark tissues of animals and plants. They were anchored on the then ongoing photochemistry and chemiluminescence research about enzymatically generated 1,2-dioxetanes and other peroxides that decompose thermally to carbonyl compounds in the triplet state. These species emit ultraweak chemiluminescence, however, being long-lived and reactive, can instead transfer electronic energy to or react like alkoxyl radicals with biological targets (proteins, lipids, DNA), triggering physiological or pathogenic responses. These ideas were pursued by them and various researchers, who ambitiously tried to validate the hypothesis coined as “photochemistry in the dark”, which would broaden the field of photobiology.

Keywords: Peroxides; peroxidases; 1,2-dioxetanes; electronically excited states; triplet state; chemiluminescence; bioluminescence; photochemistry.

Resumo

Em 1974, independentemente, Giuseppe Cilento (Universidade de São Paulo) e Emil White (Johns Hopkins University) provocaram a comunidade científica com a hipótese de que reações tipicamente fotoquímicas podem ocorrer no escuro em tecidos de plantas e animais. Eles se ancoraram nas pesquisas da época sobre fotoquímica e quimiluminescência que desvelavam a produção de compostos carbonílicos no estado triplete por reações químicas e enzimáticas de 1,2-dioxetanos e outros peróxidos. Estas espécies emitem quimiluminescência ultra-fracas, entretanto, tendo vida média relativamente longa e sendo muito reativas, podem competitivamente transferir energia eletrônica ou reagir como radicais alcoxilas com alvos biológicos (proteínas, lipídios, DNA), disparando respostas fisiológicas ou patogênicas. Estas ideias foram ambiciosamente perseguidas por eles e outros pesquisadores na tentativa de validar a hipótese cunhada como “fotoquímica sem luz” que ampliaria o campo da fotobiologia.

Palavras-chave: Peróxidos; peroxidases; 1,2-dioxetanos; estados eletronicamente excitados; estados triplete; quimiluminescência; fotoquímica.

* Universidade de São Paulo, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, CEP 05588-900, São Paulo-SP, Brasil.

✉ wjbaader@iq.usp.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150005](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150005)

“Foto”química Sem Luz?

Wilhelm J. Baader,* Cassius V. Stevani, Etelvino J. H. Bechara

Universidade de São Paulo, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, CEP 05588-900, São Paulo-SP, Brasil.

* wjbaader@iq.usp.br

Recebido em 12 de dezembro de 2014. Aceito para publicação em 12 de dezembro de 2014

- 1. Fotoquímica e fotobiologia**
- 2. Quimiluminescência e bioluminescência**
- 3. Intermediários peroxídicos de reações quimiluminescentes: 1,2-dioxetanos, 1,2-dioxetanonas e 1,2-dioxetanodiona**
- 4. Por que “foto”química sem luz?**
- 5. Fotoquímica sem luz: contribuições de Emil White**
- 6. Fotoquímica sem luz: contribuições de Giuseppe Cilento**
- 7. Outros sistemas biológicos sob a ótica da fotoquímica sem luz**
- 8. Considerações finais e perspectivas**

1. Fotoquímica e fotobiologia

Do mundo antigo, origina-se o termo “fotoquímica” (“foto”, luz, e “química”, com vários significados) para denotar processos de conversão de energia luminosa em energia química, portanto reações químicas em que a transformação da natureza da matéria é iniciada por absorção de fótons de luz. Quando moléculas absorvem energia luminosa adquirem uma estrutura eletrônica diferente e se tornam mais reativas, portanto comportam-se como uma substância com propriedades distintas. São substâncias isômeras. Pré-irradiação, a molécula está no “estado fundamental” e seu estado energizado, metaestável, chamamos de “estado eletronicamente excitado”, ou

simplesmente “estado excitado”. Dois exemplos basilares de fotoquímica no bioma terrestre são a fotossíntese, fonte de oxigênio e alimento, e a visão, meio de comunicação. Na fotossíntese de vegetais e algas verdes, a molécula fotossensível, coletora ou receptora dos fótons, é a clorofila. Uma vez excitada, a clorofila energizada dispara reações de transferência de elétrons (óxido-redução) em cadeia nos cloroplastos da planta, que culminam com a decomposição da água (H_2O) em oxigênio molecular (O_2) e captação dos prótons e elétrons e para produção de adenosina trifosfato (ATP) e síntese de glicose ($C_6H_{12}O_6$), sacarose e amido a partir de gás carbônico (CO_2) (Figura 1). A elucidadação desta etapa pós-irradiação das folhas da planta pela luz solar, conhecida como fase escura da

fotossíntese, produtora de açúcares, bem como óleos combustíveis em euforbiáceas, rendeu a Melvin Calvin, da Universidade da

Califórnia (Berkeley), o Prêmio Nobel de Química em 1961.

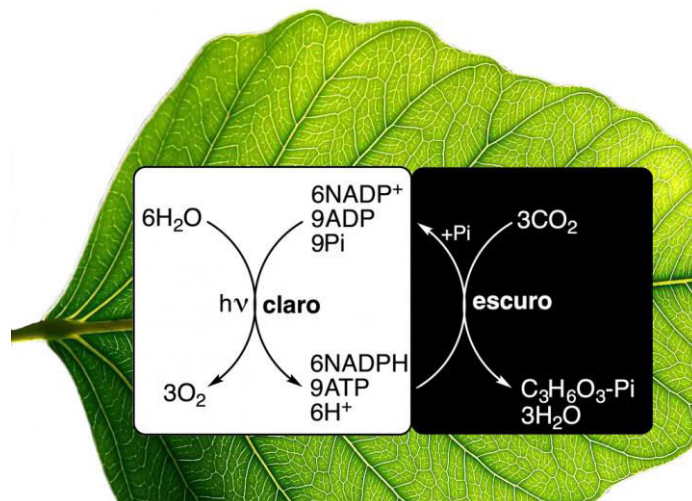


Figura 1. Esquema geral da fotossíntese, iniciada pela clorofila excitada por luz nos cloroplastos das folhas das plantas. Folha reproduzida da Wikipedia[®], Jon Sullivan

Por sua vez, na visão, a absorção de fótons pela proteína rodopsina presente nas células bastonetes (visão de brilho fraco, branco-preto) e por proteínas homólogas, presentes nas células cones (percepção de cores), localizadas na retina dos olhos, dispara uma cadeia cíclica de reações iniciadas pela clivagem da proteína rodopsina em opsina e *cis*-retinal-11, o cromóforo absorvente da luz, que é rapidamente reduzido a retinol, comumente chamado de vitamina A (Figura 2). Retinal e opsina estão interligadas na rodopsina por uma ligação de Schiff (uma imina, $-\text{CH}=\text{NH}-$), um retilideno. O retinal-11 liberado sofre uma série de reações (isomerização *cis-trans*, esterificação, redução) e a rodopsina é convertida em metarrodopsina. Milissegundos após, no escuro há regeneração da rodopsina e alteração de fluxos de cálcio que culminam com a geração de um impulso nervoso e percepção da imagem. Estas reações são conhecidas como “Ciclo Visual de Wald”, em homenagem a George Wald (Biological Laboratories, Universidade de Harvard), laureado com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1967 por esta descoberta.

A fotossíntese e a visão são dois exemplos de fenômenos fotoquímicos emblemáticos da vida no planeta, portanto são “processos fotobiológicos.” A Fotobiologia abriga ainda o estudo de várias outras respostas biológicas à ação da luz, todas elas disparadas pela absorção de fótons por um fotorreceptor específico que se excita tornando-se mais reativo quimicamente. Entre os feitos da irradiação por luz incluem-se: o fototropismo, crescimento de plantas em direção ao sol; o fotoperiodismo, por exemplo, a abertura de flores em certas horas do dia, como a “onze-horas”; a fototaxis, movimento de bactérias em direção à porção iluminada de uma cultura e o movimento do girassol durante o dia; o câncer de pele induzido pela dimerização fotoquímica de pirimidinas do DNA sob ação de luz UV; a terapia fotodinâmica de inflamações bacterianas e dermatoses (micoses, verrugas, câncer) com pigmentos; e os ritmos circadianos, que são variações fisiológicas com duração de cerca de 24 horas durante o ciclo claro-escuro em plantas e animais. Em todos estes exemplos, há uma antena química coletora de fótons – o fotorreceptor.

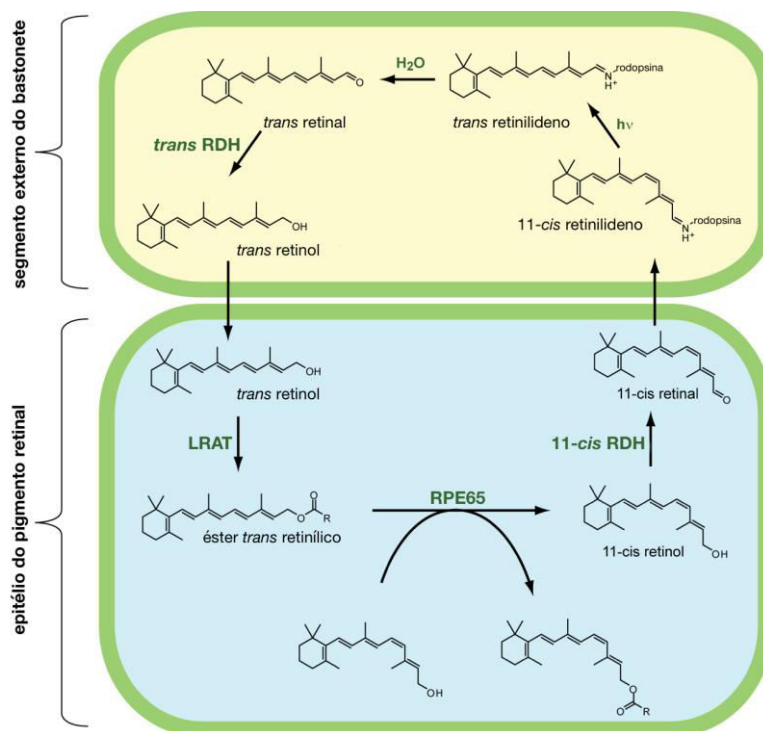


Figura 2. Representação simplificada do Ciclo Visual de Wald, mostrando a cadeia de intermediários disparados pela absorção de fótons pelo 11-*cis*-retinilideno da rodopsina no processo fotoquímico da visão. Esquema adaptado de Wikipedia[®], Roadnottaken

Por outro lado, reações puramente fotoquímicas, sem envolvimento de enzimas e células, incluem uma pletera de processos de importância histórica e tecnológica. Exemplo clássico, hoje quase em extinção, é a fotografia em câmaras analógicas, onde a imagem resulta de reações químicas na película fotossensível do filme ou placa captadora da imagem. Por outro lado, a fotopolimerização é um recurso industrial empregado na produção de plásticos e, na Odontologia, para restauração de dentes através da polimerização da formulação de monômero-peróxido depositada na superfície da cavidade dental quando irradiada com pulsos de luz UV. Pode-se ainda acrescentar o descolorimento de pigmentos por iluminação, que justifica a proibição do uso de flashes para fotografar pinturas nos museus.

Para podermos entender de maneira um pouco mais detalhada os processos biológicos e químicos originados pela irradiação de luz devemos aprender, de

maneira genérica, os processos que moléculas químicas podem sofrer quando são irradiadas por luz e absorvem a energia desta radiação eletromagnética.¹ Estes processos fotoquímicos podem ser esquematizados em um diagrama de energia, chamado de diagrama de Jablonski (Figura 3). A absorção de um fóton por uma molécula a leva ao seu estado eletronicamente excitado singlete, em que os elétrons mantêm-se com spins contrários (anti-paralelos), mas um dos elétrons foi promovido a um estado mais energético (ocupa agora um orbital de energia mais alta). A molécula excitada no estado singlete pode desativar-se por emissão de um fóton de energia mais baixa que aquela de excitação (**fluorescência**). Alternativamente pode converter-se ao seu estado triplete por inversão do spin eletrônico e daí emitir **fosforescência**, processo este denominado **cruzamento inter-sistemas**. A energia de excitação pode ainda ser dissipada na forma de energia vibracional (**conversão interna**) ou através da colisão com moléculas do solvente, perdendo

calor e retornando ao seu estado fundamental original. Finalmente, a molécula excitada pode sofrer reações químicas (**fotoquímica**) ou transferir a energia eletrônica para outras moléculas, levando à formação do estado excitado da molécula receptora de energia. Esta transferência de energia eletrônica pode se dar no contato entre molécula doadora e

aceptora da energia eletrônica, ou por ressonância, a longa distância, até cerca de 100 Å. Se o acceptor excitado se desativa por liberação de calor e, portanto, “apaga” a luminescência, é denominado **supressor** (*quencher*). Alternativamente, se o acceptor de energia fluoresce com maior eficiência que o doador, o acceptor amplifica, intensifica a emissão de luz (*fluorescer* ou *enhancer*).

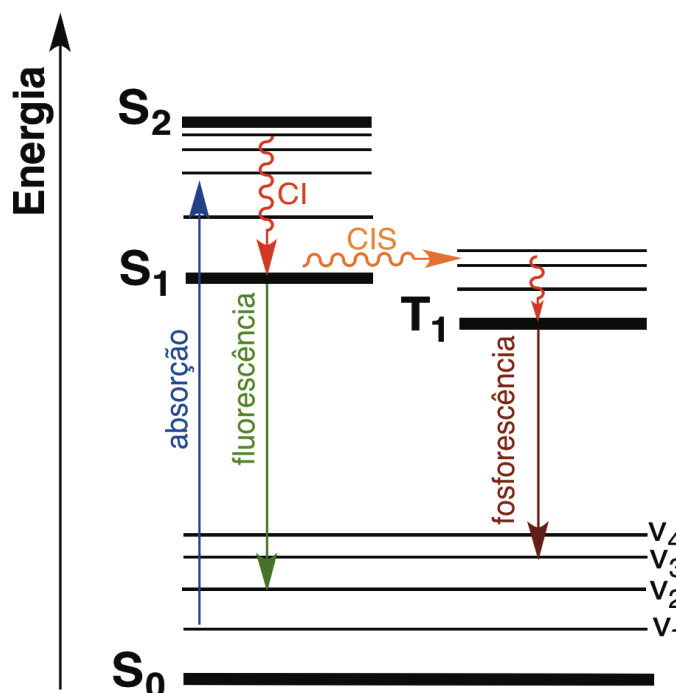
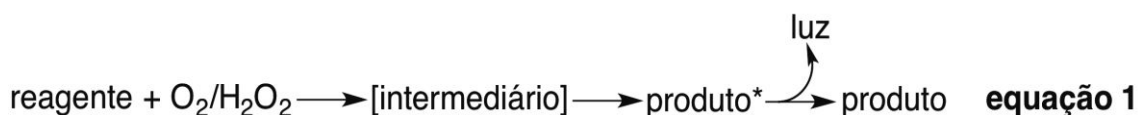


Figura 3. Diagrama de estados e processos de moléculas excitadas por irradiação com luz (Diagrama simplificado de Jablonski). CI: conversão interna; CIS: cruzamento intersistemas; S₀: estado fundamental; S₁: primeiro estado excitado singlete; S₂: segundo estado excitado singlete; T₁: primeiro estado excitado triplete; V_n, níveis vibracionais

2. Quimiluminescência e bioluminescência

A quimiluminescência² e a bioluminescência³ - emissão de luz fria, visível, por reações químicas na ausência e presença de enzimas, respectivamente - são assim fenômenos inversos à fotoquímica. No caso da bioluminescência, o substrato é chamado luciferina e a enzima, luciferase. Estes são fenômenos em que há conversão

da energia das ligações químicas das moléculas reagentes em energia luminosa (equação 1): intensa na bioluminescência de vagalumes (45%) e na quimiluminescência de certos oxalatos tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (até 60%), mais fraca em cogumelos luminosos e na termólise de 1,2-dioxetanos (peróxidos cíclicos de anel tetraômico) e ultra-fracas na peroxidação de lipídios e aldeídos tratados com peroxidases. Nestas transformações, a luz pode ser considerada como um dos produtos da reação.



Nas últimas décadas, muitas substâncias quimiluminescentes foram descobertas e utilizadas no desenvolvimento de métodos analíticos para amostras de diversas naturezas – ambientais, clínicas, biológicas, forenses.⁴ Ressaltamos aqui a oxidação de luminol por peróxido catalisada por muitos metais de transição (Figura 4, equação 2) e amplamente utilizada em ensaios analíticos, desde a detecção de diversos metais de transição ou de peróxido de hidrogênio em vários meios, utilização em imunoenaios e como detector do metabolismo oxidativo de células, aplicação em ensaios de capacidade antirradicalar até o seu uso mais conhecido como método sensível para a detecção de traços de sangue na química forense.⁴ Outras reações quimiluminescente clássicas são a

reação de lucigenina com peróxido de hidrogênio (Figura 4, equação 3), também catalisada por metais de transição e a reação de ésteres oxálicos reativos com peróxido de hidrogênio, catalisada por bases, e necessitando a presença de um composto altamente fluorescente, o chamado ativador (Figura 4, equação 4). Algumas dezenas de luciferinas – os substratos de reações bioluminescentes – também foram isoladas, identificadas e sintetizadas. Emil White destaca-se por ter descrito a síntese e propriedades do luminol e da luciferina de vagalumes, dois dos sistemas luminescentes mais bem estudados e utilizados em kits analíticos para pesquisa fundamental e aplicada.

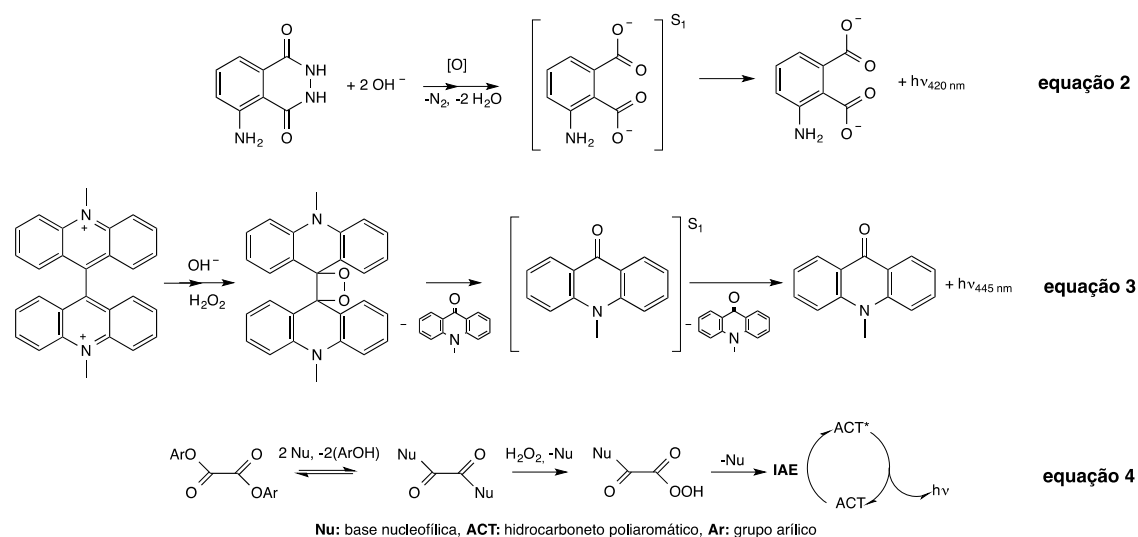


Figura 4. Esquema das reações quimiluminescentes de luminol (eq. 2), lucigenina (eq. 3) e peroxioxalato (eq. 4)⁴

3. Intermediários peroxídicos de reações quimiluminescentes: 1,2-dioxetanos, 1,2-dioxetanonas e 1,2-dioxetanodiona

A elucidação dos mecanismos químicos de emissão de luz por diversos substratos foi alavancada pela síntese de 1,2-dioxetanos e 1,2-dioxetanonas nos anos 1960 e 1970.⁵ Muitas décadas anteriores, eram tidos como intermediários hipotéticos “ricos em energia” da luminescência química e biológica. Apesar de os produtos de sua decomposição serem aqueles esperados da clivagem do intermediário, acreditava-se que sua síntese

era tarefa inglória, pois são peróxidos com anel ciclobutânico, portanto, com ligação O-O relativamente fraca (~ 140 kJ/mol), átomo de carbono sob tensão imposta pelo anel (ângulo de ligação do átomo de carbono inferior a 109°) e forte “pressão termodinâmica” para formação de dois produtos carbonílicos, bastante estáveis (Figura 5). Esperava-se que fossem extremamente termoinstáveis, mas que sua alta energia química excitasse os elétrons dos produtos e fosse finalmente liberada na forma de luz ou utilizada para formação intra- ou intermolecular de fotoprodutos. 1,2-Dioxetanonas seriam ainda mais instáveis devido à presença do grupo carbonila no anel (carbono sp², ângulo 120°).

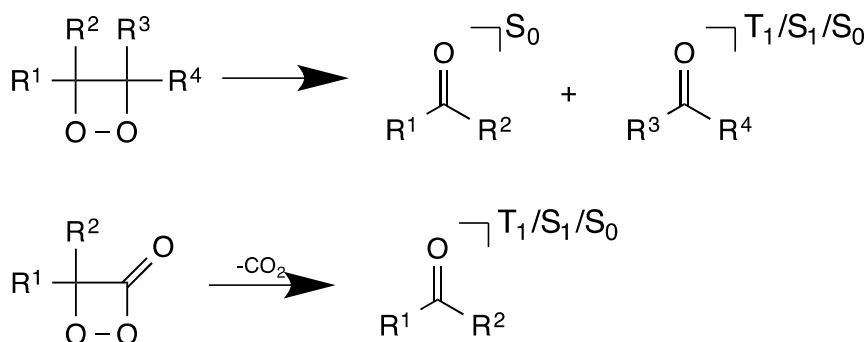


Figura 5. Clivagem térmica de 1,2-dioxetanos e 1,2-dioxetanonas levando a produtos carbonílicos, um deles no estado excitado, com estados excitados triplete predominando sobre estados singlete

Kopecky e Mumford (Universidade de Alberta, Canadá) relataram em 1969 o primeiro 1,2-dioxetano sintetizado a baixa temperatura: o 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano, cujo aquecimento gera acetona e acetaldeído acompanhado da emissão de luz azul. Note-se que a fluorescência e a fosforescência de acetona excitada têm picos espectrais na região do azul: 390 nm e 430 nm, respectivamente.⁶ Já a primeira 1,2-dioxetanona ou α -peroxilactona, a 3-*tert*-butil-1,2-dioxetanona foi sintetizada por Adam e Liu em 1972, na Universidade de Porto Rico, EUA.⁷ Este peróxido cíclico que contém um grupo funcional carbonila ligado ao anel de quatro membros mostrou-se muito mais instável (energia de ativação de

termólise, $E_a \approx 80$ kJ/mol) que o 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano ($E_a \approx 100$ kJ/mol).⁸

A clivagem térmica dos 1,2-dioxetanos (chamada de unimolecular, pois não há participação de outro reagente neste processo) leva, conforme já dito, à formação dos correspondentes compostos carbonílicos (Figura 5), podendo ser um deles em um estado eletronicamente excitado, preferencialmente no estado triplete. A estabilidade dos compostos e os rendimentos quânticos de formação de estados eletronicamente excitados dependem crucialmente do número e da natureza (principalmente do tamanho) dos substituintes no anel peroxídico de quatro átomos, sendo que o 1,2-dioxetano não-

substituído tem estabilidade similar à de 1,2-dioxetanonas.⁹⁻¹² A formação predominante de estados excitados triplete (até 60%) e a quantidade muito baixa de estados excitados singlete formada (menor que 1%) implica em uma eficiência de quimiluminescência muito baixa na decomposição unimolecular destes 1,2-dioxetanos. Sendo assim, esta transformação, contrariamente às expectativas iniciais, não é um bom modelo para processos bioluminescentes, cuja eficiência quântica é muito superior e a luz emitida, plenamente visível.²

A decomposição unimolecular de 1,2-dioxetanonas mostra características muito similares àsquelas de 1,2-dioxetanos, com formação preferencial de estados excitados triplete em detrimento da geração de estados excitados singlete (Figura 5). É interessante notar que a eficiência do processo de formação de estados excitados por 1,2-dioxetanonas é menor que pelos 1,2-dioxetanos, apesar do maior conteúdo energético dos primeiros.⁵ Entretanto, os trabalhos dos grupos de pesquisa de G. B. Schuster, W. Adam, N. J. Turro e T. Wilson mostraram claramente que estas 1,2-dioxetanonas (especificamente a 3,3-dimetil-1,2-dioxetanona, a única cujas propriedades quimiluminescentes foram detalhadamente estudadas), quando na presença de compostos aromáticos fluorescentes, mostram decomposição catalisada por estes aditivos com a formação consideravelmente maior de estados excitados singlete. Mas neste caso, o composto formado no estado excitado singlete é o hidrocarboneto aromático (não a porção carbonílica do peróxido) e a emissão de sua fluorescência é que responde pela observação da quimiluminescência. Com base nesta observação e dos fatos de que a velocidade de decomposição e a eficiência de formação de estados excitados singlete dependem do potencial de oxidação do hidrocarboneto aromático, chamado de ativador (ACT), levaram os pesquisadores ora citados a postular o mecanismo “Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence (CIEEL)” – ou Luminescência Iniciada Quimicamente

pelo Intercambio de Elétron (LIQIE).¹³⁻¹⁶ Este mecanismo, ao postular uma transferência de elétron do ativador para o peróxido, iniciando assim a clivagem da ligação O-O, foi recebido na época pelos pesquisadores da área com grande entusiasmo e subseqüentemente utilizado para entender a formação de estados excitados em uma grande variedade de transformações quimiluminescentes e bioluminescentes.¹⁷ A retro-transferência de elétron, do radical-anion carbonílico, formado após clivagem da ligação C-C, para o cátion radical do ativador, é responsável pela formação do estado excitado deste último e a conseqüente emissão de fluorescência (Figura 6). Os rendimentos quânticos determinados inicialmente para a decomposição catalisada da 3,3-dimetil-1,2-dioxetanona por vários grupos de pesquisa (de cerca de 10%) indicaram um processo razoavelmente eficiente, de acordo com os altos rendimentos observados em transformações bioluminescentes, justificando o caráter de modelo do mecanismo CIEEL para a bioluminescência de várias espécies. Entretanto, medidas mais recentes dos rendimentos quânticos na decomposição da 3,3-dimetil-1,2-dioxetanona e de dois derivados mais estáveis mostraram que os rendimentos inicialmente obtidos foram superestimados em ao menos duas ordens de grandeza, ou seja, os valores corretos das eficiências das transformações são menores que 0,1%.¹⁸

Estes fatos poderiam levar ao questionamento do uso do mecanismo CIEEL como modelo para a bioluminescência, porém, observou-se que a decomposição de certos 1,2-dioxetanos, contendo em sua molécula grupos doadores de elétron, ocorre com a formação eficiente de estados excitados singlete.¹⁹ A decomposição destes compostos, nos quais a porção doadora de elétron é formada através de uma reação de desproteção, pode ser descrita por um mecanismo análogo ao CIEEL e pode levar à formação de estados excitados por processos de transferência e retro-transferência de elétron intramoleculares (Figura 7).⁸

Foi mostrado por vários grupos de pesquisa que estes derivados 1,2-dioxetanos que possuem alta estabilidade térmica levam à formação eficiente de estados excitados, podendo ter rendimentos quânticos de até 100%^{20,21} Recentemente foi demonstrada a ocorrência de uma transferência de elétron intramolecular como passo lento da reação.²² Além disso, obteve-se evidências de que também a retro-transferência de elétron deve envolver um processo intramolecular.²³ Esta transformação, em que se utilizou um grupo de proteção que pode ser clivado pela ação de uma enzima, após a sua descrição inicial pelo grupo de Paul Schaap,²⁴ tem sido amplamente utilizada como sistema de detecção quimiluminescente em diversos imunoenaios, substituindo os métodos com radioisótopos.²⁵

Os fatos expostos acima indicam a aparente regra geral de que as transformações de peróxidos cíclicos envolvendo transferência intermolecular de elétron ocorrem com baixa eficiência de formação de estados eletronicamente excitados. Entretanto, quando os processos de transferência de elétron são intramoleculares, eles produzem eficientemente estados excitados.²⁶

Mas há um sistema quimiluminescente que deve envolver processos intermoleculares com rendimentos quânticos de estados excitados tão altos que podem ser apreciados visualmente. Trata-se da reação de peroxioxalato envolvida nos bastões luminosos, chamados *light sticks*.²⁷ O sistema peroxioxalato foi descoberto acidentalmente por Chandross ao observar intensa emissão de luz quando efetuou a reação de cloreto de oxalila com peróxido de hidrogênio na presença de um composto fluorescente.²⁸ Posteriormente o sistema foi desenvolvido, detalhadamente estudado e comercializado pelo grupo de pesquisa de Rauhut na empresa American Cyanamid, utilizando diversos derivados oxálicos, principalmente ésteres e algumas amidas reativas.²⁹ A reação de ésteres oxálicos com peróxido de hidrogênio é catalisada por bases e ocorre

em uma série de passos sequenciais e paralelos, levando à formação de um intermediário de alto conteúdo energético, responsável pela formação de estados excitados (Figura 4, equação 4).³⁰ Este intermediário foi formulado como a 1,2-dioxetanodiona (o dímero de CO₂) por Rauhut e colaboradores,²⁹ mas a prova definitiva para sua existência ainda não foi reportada.²⁷ A formação dos estados excitados responsáveis pela emissão de quimiluminescência ocorre com o envolvimento de passos de transferência e retro-transferência de elétron entre o intermediário de alto conteúdo energético e a ativador, conforme comprovado em vários estudos recentes.³¹⁻³³ A eficiência de emissão já foi relatada nos trabalhos iniciais do grupo de Rauhut com até 30%, o que foi comprovado posteriormente, quando se mediu rendimentos quânticos de até 60% em certas condições experimentais.³¹ Em vista disso, podemos afirmar que a reação peroxioxalato é a única transformação quimiluminescente comprovadamente eficiente na formação de estados excitados segundo o mecanismo CIEEL intermolecular, sendo que as razões para esta excepcionalidade não são conhecidas ainda.

O sistema peroxioxalato tem sido assaz utilizado em muitas aplicações analíticas.²⁷ Além disso, pode ser muito útil no ensino de química para efetuar experimentos de demonstração de efeitos de concentração, pH, solvente, temperatura, cinética e catalisador numa reação química. Estas variáveis podem ser facilmente exploradas, pelo menos qualitativamente, através da fotografia da intensidade de emissão de luz no decorrer do tempo.³⁴ Vários oxalatos e ativadores da quimiluminescência que eliciam diferentes cores (ex.: rubreno, laranja; perileno, verde; 9,10-dibromoantraceno, azul; clorofila, vermelho) são hoje comercializados na forma de bastões luminosos (*light sticks*), utilizados como atratores na pesca, kits de emergência e adereços, muito populares em festas de aniversários e baladas. Seus componentes são cito- e genotóxicos, mas são rotulados

como seguros e não há informação sobre seu descarte apropriado.³⁵ Milhares destes bastões utilizados na pesca constituem lixo das praias do nordeste brasileiro e são inadvertidamente utilizados pela população carente como analgésico para dores musculares e nas juntas, bronzamento, massagem, manchas na pele, vitiligo, formicida, entre outros usos.

A decomposição térmica de 1,2-dioxetanos e 1,2-dioxetanonas produz compostos carbonílicos como produtos de clivagem nos seus estados excitados singlete ou triplete. Consequentemente, estes produtos excitados podem sofrer processos fotofísicos e fotoquímicos do mesmo jeito

que ocorre com os estados excitados gerados através da absorção de luz. A investigação da fotoquímica de compostos carbonílicos excitados por vários pesquisadores, entre eles, Ronald Norrish, recipiente do Prêmio Nobel de Química em 1967, resultou na identificação de reações induzidas por luz em aldeídos e cetonas: clivagem homolítica carbono-carbonila, isomerização (*cis-trans*, auto-ciclização), polimerização, cicloadições-1,2 e -1,4, abstração de hidrogênio e substituição aromática, entre outras.¹ A Figura 8 exemplifica o caso da acetona. É extraordinária a pluralidade de reações desencadeadas pela absorção de fótons por uma molécula!

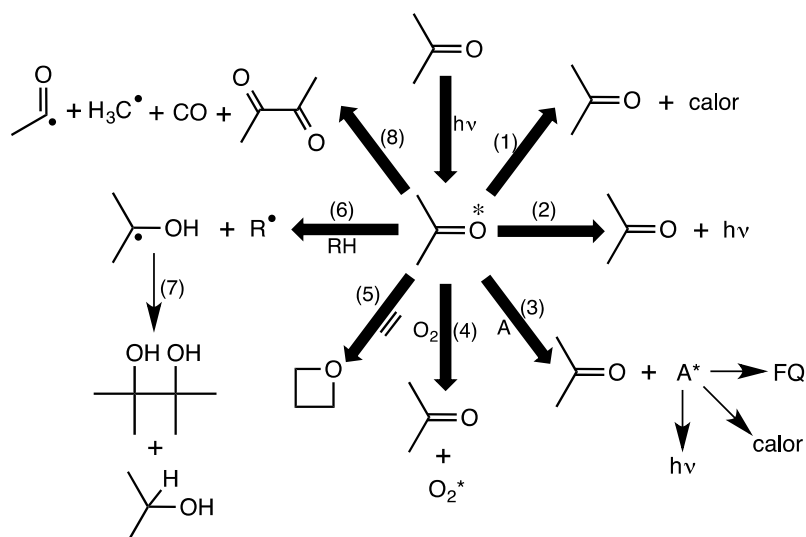


Figura 8. Fotofísica e fotoquímica de acetona: (0) absorção de fótons ($h\nu$) no UV levando-a ao estado excitado (*); (1) desativação térmica espontânea ou por colisão com solvente; (2) emissão de fluorescência e fosforescência; (3) transferência de energia para molécula aceitadora (A), seguida ou não de fotoquímica e dos processos (1) e (2); (4) transferência de energia para oxigênio molecular formando oxigênio excitado, extremamente reativo; (5) cicloadição-1,2 a olefinas (Reação de Paterno-Büchi); (6) abstração de átomos de hidrogênio de doadores como 1,4-dienos e açúcares, (7) reduzindo-se a isopropanol e pinacol; (8) clivagem alfa (homólise) a radical metila e acetila, o qual, por sua vez, pode sofrer, descarboxilação e dimerização a diacetilo

4. Por que “foto”química sem luz?

Com estas premissas, pode-se agora esclarecer com propriedade e precisão a

hipótese da “fotoquímica sem luz” ou “fotoquímica no escuro”, ilógica ou incoerente à primeira vista. Em torno de 1974, independentemente, Emil White (Chemistry Department, Johns Hopkins

University)³⁶ e Giuseppe Cilento (Instituto de Química, Universidade de São Paulo)³⁷ levantaram a hipótese de que reações químicas e enzimáticas geradoras de produtos no estado excitado tinham o potencial de disparar reações tipicamente fotoquímicas, mas no escuro, tal como as reações fotoquímicas clássicas induzidas por irradiação. Nas reações bioluminescentes, o produto excitado (oxiluciferina) tem natureza essencialmente singlete, de vida média da ordem de nanosegundos, portanto, está determinado a desativar-se por emissão de fluorescência. Já no estado triplete, as moléculas têm vida média muito longa, superior a microssegundos, e têm caráter radicalar, portanto são muito reativas.

White e Cilento, ao postularem a hipótese de “fotoquímica na escuro” estavam firmemente ancorados na literatura científica, a qual documenta a ocorrência de “foto”produtos de biomoléculas em tecidos de plantas e animais não expostos diretamente à luz e vários relatos de reações químicas geradoras de “foto”produtos ou emissoras de luz ultra-fracas no escuro. A formação de alguns destes “fotoprodutos” não era consistente com a ocorrência de transformações no estado fundamental segundo as regras de Woodward-Hoffmann, o segundo, recipiente do Prêmio Nobel de Química em 1981. Estas regras estabelecem que certas reações são proibidas ou permitidas de ocorrerem no estado fundamental, com base na simetria de orbitais. Exemplo clássico de reação proibida no estado fundamental é a dimerização de alquenos para o correspondente ciclobutano, denominada reação de cicloadição [2+2]. As regras de Woodward-Hoffmann permitem a compreensão dos mecanismos de reações de cicloadição, eletrocíclicas, sigmatrópicas e de transferência de grupos atômicos.

Com base nestes conceitos fotoquímicos, Cilento e White garimparam na literatura química e bioquímica produtos e metabólitos “permitidos” apenas a partir do estado excitado do precursor e os testaram para validar sua hipótese. Que critérios de escolha adotaram? Apoiaram-se (i) nos mecanismos químicos de quimiluminescência e bioluminescência que formam certa fração de produtos no estado excitado; (ii) na similitude estrutural (carbonila com carbono vicinal hidrogenado) e reacional (intermediários de natureza peróxídica) de compostos quimiluminescentes e luciferinas, os substratos da bioluminescência; e (iii) na química de 1,2-dioxetanos e 1,2-dioxetanonas geradores de produtos carbonílicos singlete e, majoritariamente, triplete durante a termólise destes peróxidos cíclicos.

5. Fotoquímica sem luz: contribuições de Emil White

White concentrou-se na síntese e uso de 1,2-dioxetanos como fontes de espécies carbonílicas excitadas e de compostos fotossensíveis clássicos como aceptores da energia eletrônica análogos a produtos naturais de plantas candidatos a fotoprodutos de reações enzimáticas no escuro. Citou como exemplos, em sua revisão para o *Angewandte Chemie* em 1974,³⁶ reações fotoquímicas clássicas, porém induzidas pela termólise de 1,2-dioxetanos no escuro, entre elas:

(i) Isomerização *cis-trans* de estilbeno induzida por 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano, processo hipoteticamente análogo ao que promove isomerização de cinamatos no trevo-branco (*Melilotus alba*) (Figura 9).

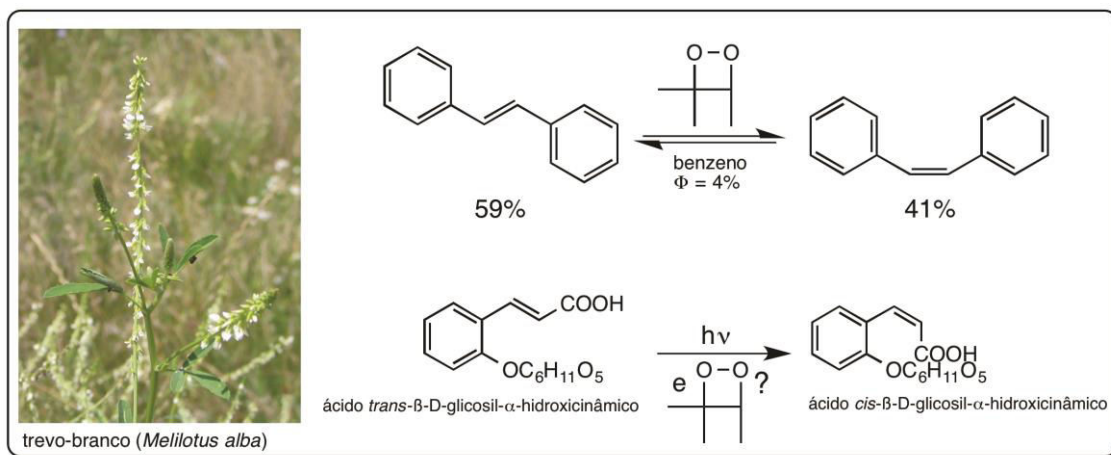


Figura 9. Isomerização *cis-trans* de estilbeno e de um cinamato natural. Foto: Wikipedia[®], Bogdan

(ii) Dimerização ciclobutânica de 1,2-dicianoetileno semelhante àquela que forma truxilatos em uma das espécies de coca e formação de oxetano entre o 1,2-dicianoetileno e acetona excitada (Figura 10).

(iii) Rearranjo de santonina a lumisantonina, presentes na planta *Artemisia maritima*, acoplado à termólise de 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano (Figura 11).

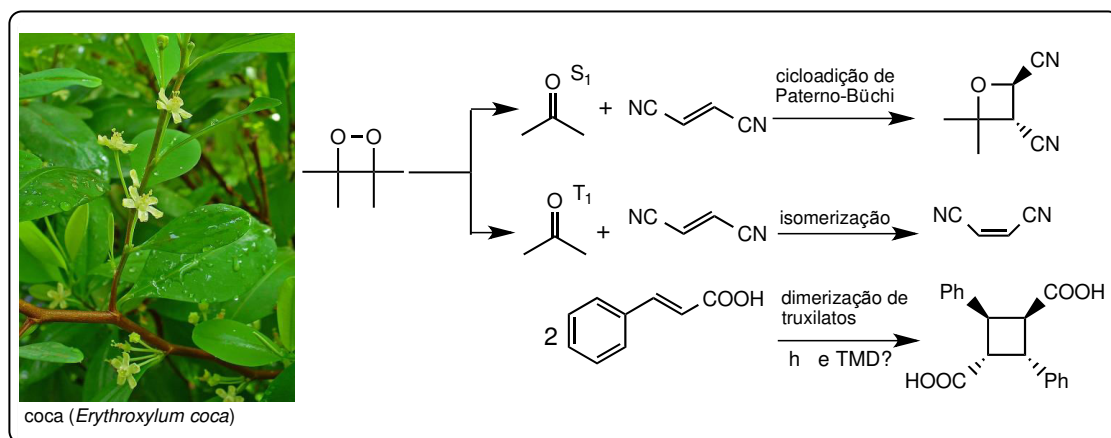


Figura 10. Cicloadição [2+2] de acetona triplete a 1,2-dicianoetileno, acompanhada de sua isomerização *cis-trans*, e dimerização de cinamatos por truxilatos na planta coca (*Erythroxylum coca*). Foto: Wikipedia[®], H. Zell

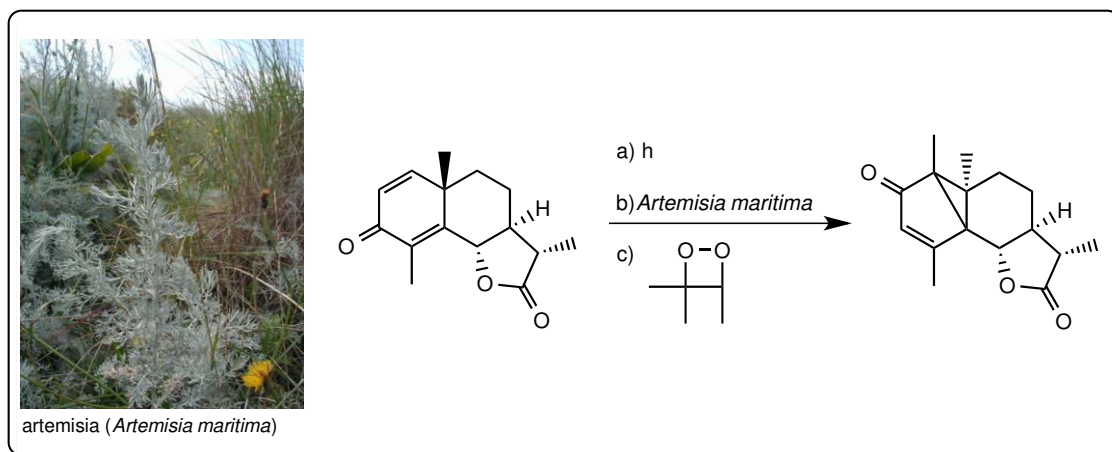


Figura 11. Isomerização de santonina induzida por 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano. Foto: Wikipedia[®], Sten Porse

Outro caso, investigado por um dos autores deste artigo (EJHB) junto com Emil White e Giuseppe Cilento, foi a cicloadição-1,4 (reação Diels-Alder) intramolecular do alcaloide colchicina, uma tropolona abundante nas plantas açafreão-do-prado (*Colchicum autumnale*) e gloriosa (*Gloriosa superba*). Este alcaloide tem propriedades

anti-mitóticas e é usado há milênios no tratamento de gota. Quando irradiado, ele sofre uma ciclização intramolecular-1,4 do anel tropolônico a dois isômeros *cis-trans*: a β -lumicolchicina e a γ -lumicolchicina (Figura 12). Ainda sob irradiação, a primeira dimeriza-se a um derivado ciclobutânico, chamado α -lumicolchicina.

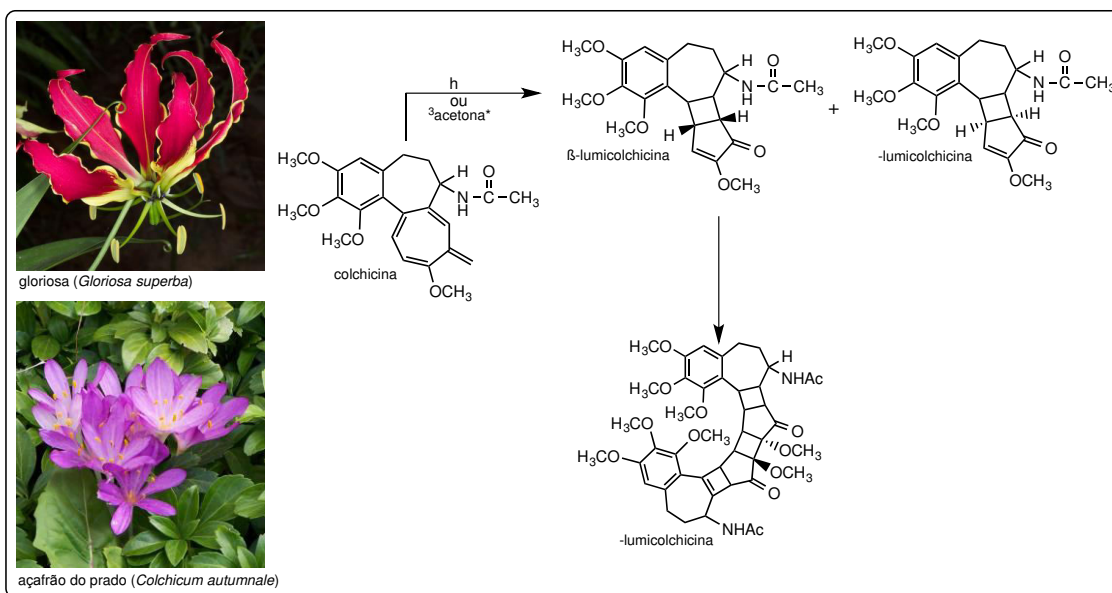


Figura 12. Fotoconversão de colchicina em lumicolchicinas nas plantas gloriosa e açafreão-do-prado. Foto: Wikipedia[®], Brian Gratwicke (*Gloriosa superba*), Jan Mehlich (*Colchicum autumnale*)

Em laboratório, a incorporação de colchicina marcada com C-14 no grupo metoxila do anel tropolônico a colmos de *Colchicum autumnale*, uma planta de dia curto (floresce no outono), através de um barbante que atravessa o colmo e com pontas mergulhadas na solução do substrato, totalmente no escuro, revelou a presença de β - e γ -lumicolchicina marcadas nos extratos da planta.³⁸ Estes resultados foram os primeiros a autenticar a hipótese de fotoquímica sem luz *in vivo*. Entretanto, testes *in vitro* com colchicina exposta a 3,3,4,4-tetrametil-1,2-dioxetano no escuro sob aquecimento durante algumas horas deram resultados contraditórios ao se analisar os fotoprodutos por técnicas cromatográficas, além do fato de experimentos de fotólise com flashes revelarem que os lumiderivados são produzidos pela colchicina excitada ao estado singlete.³⁹ Este sistema merece ser revisitado, entre outras razões, porque a ciclização-1,4 de colchicina também foi alcançada no escuro durante seu tratamento com o complexo $\text{Fe}(\text{CO})_5$, o que levanta a hipótese de que complexos/enzimas de metais de transição possam efetuar a isomerização do alcaloide no estado fundamental (dados não publicados).

Nos anos posteriores, White aprofundou os estudos de 1,2-dioxetanos e do sistema luciferina/luciferase de vagalume, linha principal de seu laboratório, e ampliou a

pesquisa de substituição eletrofílica em aromáticos por carbocátions e alquilação e nitrosação de peptídeos e quimotripsina com nitrosamidas. Não persistiu na busca por evidências *in vitro* e *in vivo* da ocorrência de fotoquímica no escuro, tarefa muito desafiadora na década dos setentas, ainda sem os recursos tecnológicos da modernidade em espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear e imagem com sondas fluorescentes.

6. Fotoquímica sem luz: contribuições de Gisepe Cilento

Cilento, ao contrário, até seu falecimento em 1992, junto com seus alunos e colaboradores, empenhou-se na busca de substratos de peroxidases produtores de espécies excitadas via intermediários dioxetânicos, particularmente no estado triplete, e de alvos biológicos destas espécies reativas. Apostou no fato de que espécies carbonílicas tripletes são pouco emissivas, têm vida média longa em meio aquoso e hidrofóbico (microsegundos) e variada reatividade, análoga àquela de radicais livres alcoxilas.⁴⁰ A Figura 13 mostra o rico painel de reações típicas de radicais livres similares àquelas realizadas pela acetona fotoexcitada.

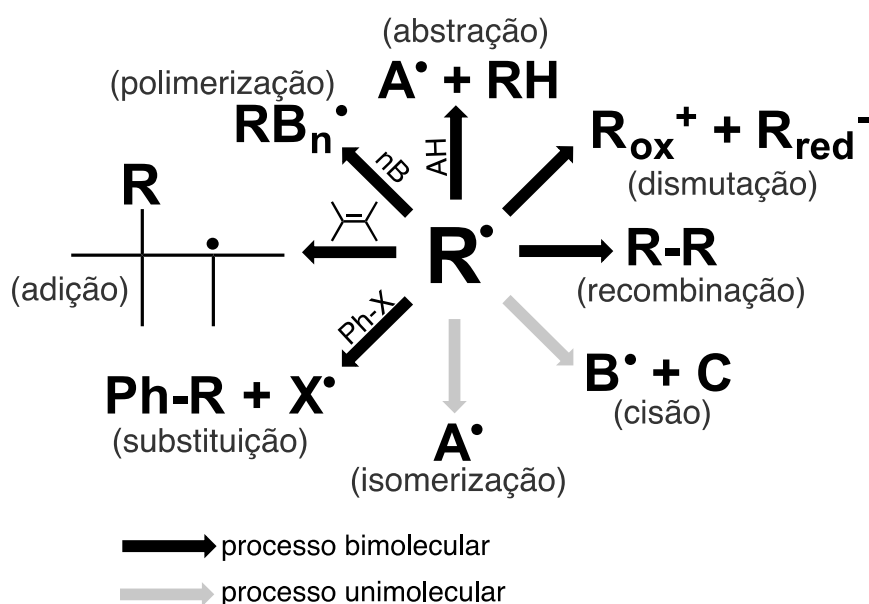


Figura 13. Tipos de reações de radicais livres centrados no carbono, no oxigênio e em outros átomos, em muitos casos similares àquelas de espécies carbonílicas tripletes

Diante da farta bibliografia sobre as propriedades fotofísicas e fotoquímicas de acetona excitada, Cilento considerou a oxidação aeróbica de isobutanal (IBAL) catalisada por peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*, HRP) a formiato e acetona triplete, em tampão fosfato em pH fisiológico (7,4), um modelo ideal para melhor aproximação da realidade biológica.⁴¹

IBAL é estruturalmente análogo ao metabólito metilmalonaldeído, o qual exibe átomo de hidrogênio ativado pela carbonila. A hipótese de trabalho resumida na Figura 14 é auto-explicativa, principalmente se cotejada com outras fontes de cetonas excitadas de ocorrência biológica, por exemplo, como resultado de peroxidação lipídica (Figura 15).^{42,43}

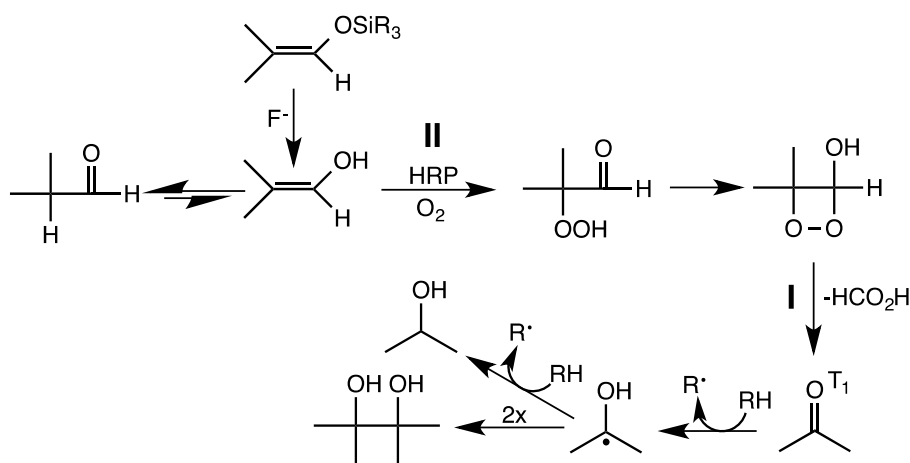


Figura 14. Produção de acetona triplete pela oxidação aeróbica de isobutanal catalisada por peroxidase de raiz forte (HRP, *horseradish peroxidase*). Este substrato reúne características similares as de luciferina (hidrogênio vicinal ativado pela carbonila), possibilidade de inserção radicalar de oxigênio com formação de α -hidroperóxido, produtos esperados da clivagem de um 1,2-dioxetano intermediário e formação de produto no estado excitado⁴²

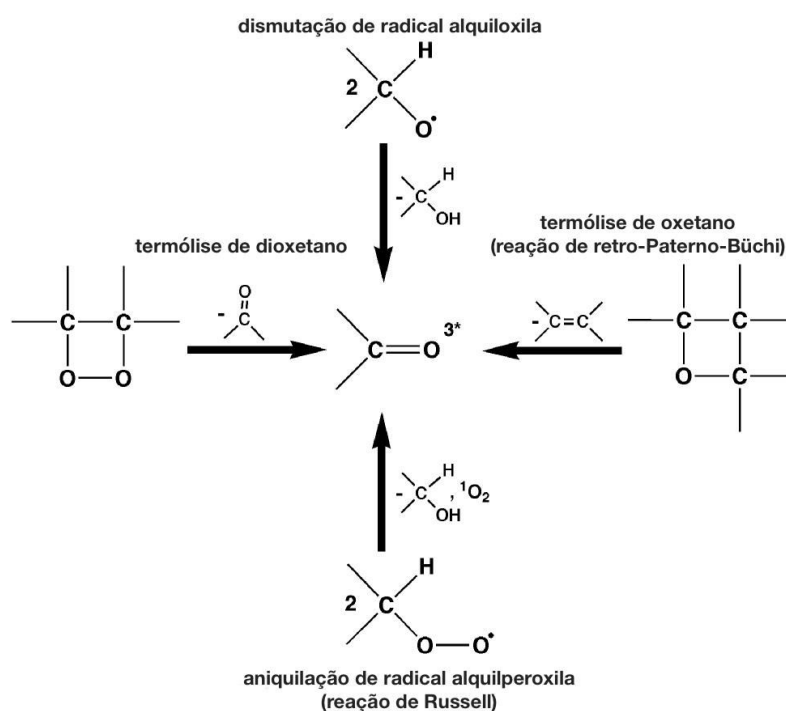


Figura 15. Possíveis fontes biológicas de cetona no estado triplete. Além de 1,2-dioxetanos, há relatos de que radicais alcoxila e alquilperoxila formados na propagação e término de cadeias de peroxidação lipídica geram cetona no estado triplete por dismutação e que a reação de retro-Paterno-Büchi de oxetano derivado de cetona e timina também gera a cetona no estado triplete

Em poucos anos, detalhou-se a cinética e mecanismo desta reação e a formação de acetona no estado triplete (vida média $\tau \sim 1\text{-}2 \mu\text{s}$) atestada pelo espectro de quimiluminescência coincidente com o espectro de fosforescência da acetona ($\lambda_{\text{max}} \sim 430 \text{ nm}$), pela eficiente transferência de energia para 9,10-dibromoantraceno sulfonato (hidrossolúvel), pela supressão por sorbato (2,4-hexadienoato) um dieno conjugado também hidrossolúvel, e pela detecção de fotoprodutos da acetona excitada, isopropanol e pinacol (Figura 14).^{42,44}

Foi mostrado ainda que a reação depende da presença de peróxido como co-substrato para a peroxidase e ocorre com a forma enólica do aldeído, a qual sofre oxidação pela peroxidase agindo como oxidase em um ciclo enzimático típico envolvendo os compostos I e II da enzima.⁴⁵ A forma enólica como o substrato reativo do IBAL foi definitivamente

comprovada pelo uso de silil éter enóis como reagentes na reação, os quais resultam em maiores velocidades de reação, além do aumento da intensidade de emissão e dos rendimentos quânticos de emissão (Figura 14).⁴⁶ A emissão obtida da reação enzimática com estes substratos enólicos é tão intensa que a quimiluminescência pode ser facilmente vista em sala escura, possibilitando fotografá-la na presença de um aceptor de energia triplete, o 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio.^{44,47} Com os substratos enólicos, foi possível mostrar também que a acetona triplete é formada em um ambiente quiral no sítio ativo da enzima devido à supressão diferencial da emissão na presença de *D*- e *L*-triptofano.⁴⁶ Além disso, foi observada reação de oxidação pela HRP de substratos enólicos de ésteres de ácidos carboxílicos. Derivados de ácidos carboxílicos contendo átomo de hidrogênio na posição alfa não sofrem reação de oxidação catalisada pela HRP,

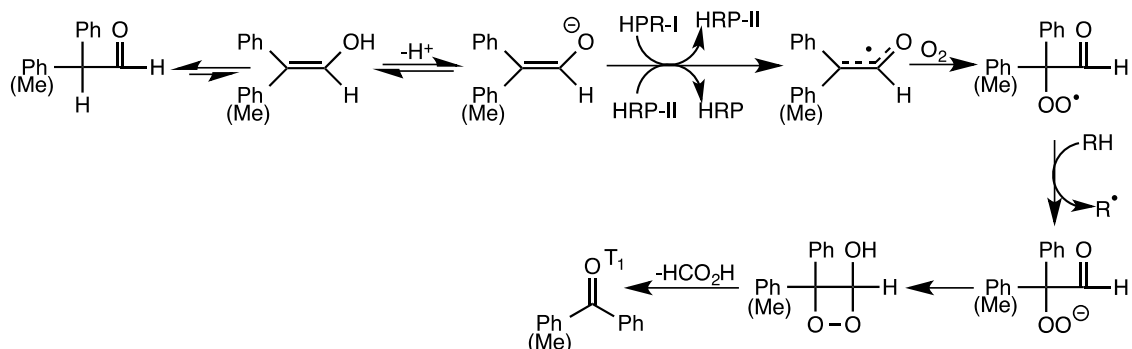


Figura 17. Oxidação de 2-fenilpropanal e difenilacetaldeído catalisada por HRP, com geração de acetona e benzofenona no estado triplete

Outros substratos desafiados com HRP de grande interesse em Biologia, geradores de benzaldeído e indolaldeído no estado triplete, foram respectivamente o fenil- e o indol-acetaldeído, hormônios de crescimento de plantas⁵² e o pentanal, cuja oxidação gera butanal triplete, seguida de clivagem- β e abstração de hidrogênio do carbono- γ (clivagem Norrish tipo II) do butanal produzindo acetaldeído e etileno, outro hormônio de planta.⁵³

Utilizando o sistema IBAL/HRP como fonte de acetona triplete, Cilento e colaboradores lograram excitar e/ou modificar quimicamente vários aceptores de relevância biológica, entre eles, corantes xantênicos (eosina, rosa Bengala) sensibilizadores da formação de oxigênio excitado singlete; fitocromo sensível ao vermelho e fitocromo sensível ao infravermelho, medidores da duração do dia em fototropismo e fotoperiodismo; clorofila, envolvida na

fotossíntese; dietilestilbestrol, um estrogênio com propriedades tumorigênicas; e tetraciclina, antibiótico com atividade bactericida (Figura 18).³⁷ Durante muitos anos, Cilento manteve colaboração estreita com Waldemar Adam na Universidade de Würzburg (Alemanha). Um dos trabalhos de maior destaque deste grupo no que se refere à fotoquímica no escuro foi demonstrar que vários dioxetanos podem induzir modificações químicas, principalmente dimerização [2+2] de pirimidinas e oxidação de guanosina a 8-hidróxi 2'-desoxiguanosina.⁵⁴ Os dímeros ciclobutânicos desta base, gerados por transferência triplete-triplete, foram detectados com uma endonuclease UV específica e a guanina oxidada provavelmente derivou de transferência de elétron de cetona triplete para a base, seguida de reações com o oxigênio molecular dissolvido ou mesmo dioxetano residual.

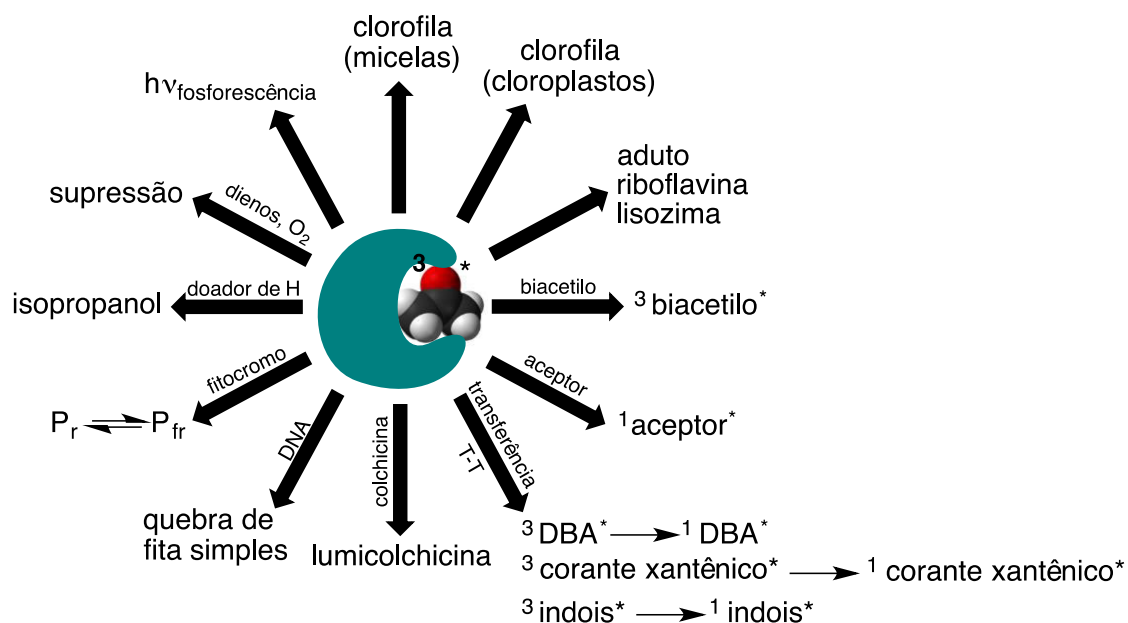


Figura 18. Moléculas-alvo de acetona triplete gerada por isobutanol/HRP. P_r e P_{fr} , fitocromos fotossensíveis ao vermelho e infravermelho, respectivamente. DBA, 9,10-dibromoantraceno. Corantes xantênicos: fluoresceína, eosina e rosa Bengala. Índóis: triptofano e hormônios vegetais

Em 1978, Giuseppe Cilento e Waldemar Adam (Würzburg University, Alemanha) promoveram no Instituto de Química da USP um Workshop Brasil-Estados Unidos sobre quimiluminescência e bioluminescência, financiado pela National Sciences Foundation (NSF, USA). Em seguida, no Guarujá (SP), foi realizada a *International Conference on Chemi- and Bioenergized Processes* com grande sucesso. Esta conferência incluiu os participantes do *workshop* e recebeu ainda a grande maioria dos pesquisadores mais renomados da área de fotoquímica, quimiluminescência e bioluminescência (Figura 19). O Prêmio Nobel de Química (2008), Osamu Shimomura, descobridor da

green fluorescent protein (GFP), cujo gene é quase universalmente utilizado como repórter em muitos métodos analíticos e imageamento de células e tecidos por fluorescência, participou do evento. Infelizmente, apesar de convidados, dois importantes pesquisadores da área de quimiluminescência e fotoquímica, respectivamente, Emil White e Nicholas Turro, não estavam presentes. O leitor deste artigo poderá verificar o comparecimento da plêiade de cientistas famosos na fotografia, ao cotejar os nomes dos autores da bibliografia citada com as fotos dos pesquisadores no grupo retratado.



Figura 19. Participantes da *International Conference on Chemi- and Bioenergized Processes*, realizada em 1978 no Guarujá (SP). Sugere-se a busca destes nomes na lista de referências deste artigo. Sempre da esquerda para a direita: 1ª fila (sentados): Edy Rivas, Carmem Vidigal, Michael Kasha, John Woodland (“Woody”) Hastings, Eduardo Lissi, Etelvino Bechara; 2ª fila: Christopher Foote, Giuseppe Cilento, Waldemar Adam, Frank McCapra, Thérèse Wilson. 3ª fila: William Richardson, Adelaide Faljoni-Alário, Ohara Augusto, Rex Tyrrell, Roberto Casadei de Baptista, Paul Schaap, Nelson Duran, Marcela Haún; 4ª fila: Gary Schuster, Norman Krinsky, Pill-Soon Song, Alfons Baumstark, K. Zaklika, Yoshitaki Shimizu, Rogerio Meneghini; atrás, superior: R. Srinivasan, Karl Kopecky, Klaus Zinner, Frank Quina, Bechara Kachar

7. Outros sistemas biológicos sob a ótica da fotoquímica sem luz

Durante muitas décadas não se entendia porque mitocôndrias não podem ser isoladas em tampão fosfato: as organelas são rapidamente permeabilizadas, há colapso do potencial transmembrana com queda na produção de ATP, perdem seu controle respiratório e acumulam cálcio, levando-as à morte. Considerando-se que o íon dihidrogenofosfato catalisa a conversão de aldeídos à sua forma enólica, o verdadeiro substrato da HRP, imaginou-se que aldeídos

formados naturalmente, mas lentamente, durante a peroxidação dos fosfolípidios da membrana mitocondrial pudessem amplificar, via catálise por fosfato, a cadeia de lipoperoxidação da membrana com consequente inchamento e perda de atividade mitocondrial (Figura 20).⁵⁵ Esta hipótese foi confirmada pelo efeito inibitório do inchamento mitocondrial por 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (hidroxitolueno butilado, BHT) e ciclosporina A, que bloqueiam a peroxidação lipídica, a qual foi fortemente inibida por adição de sorbato, potente supressor de compostos carbonílicos tripletos.

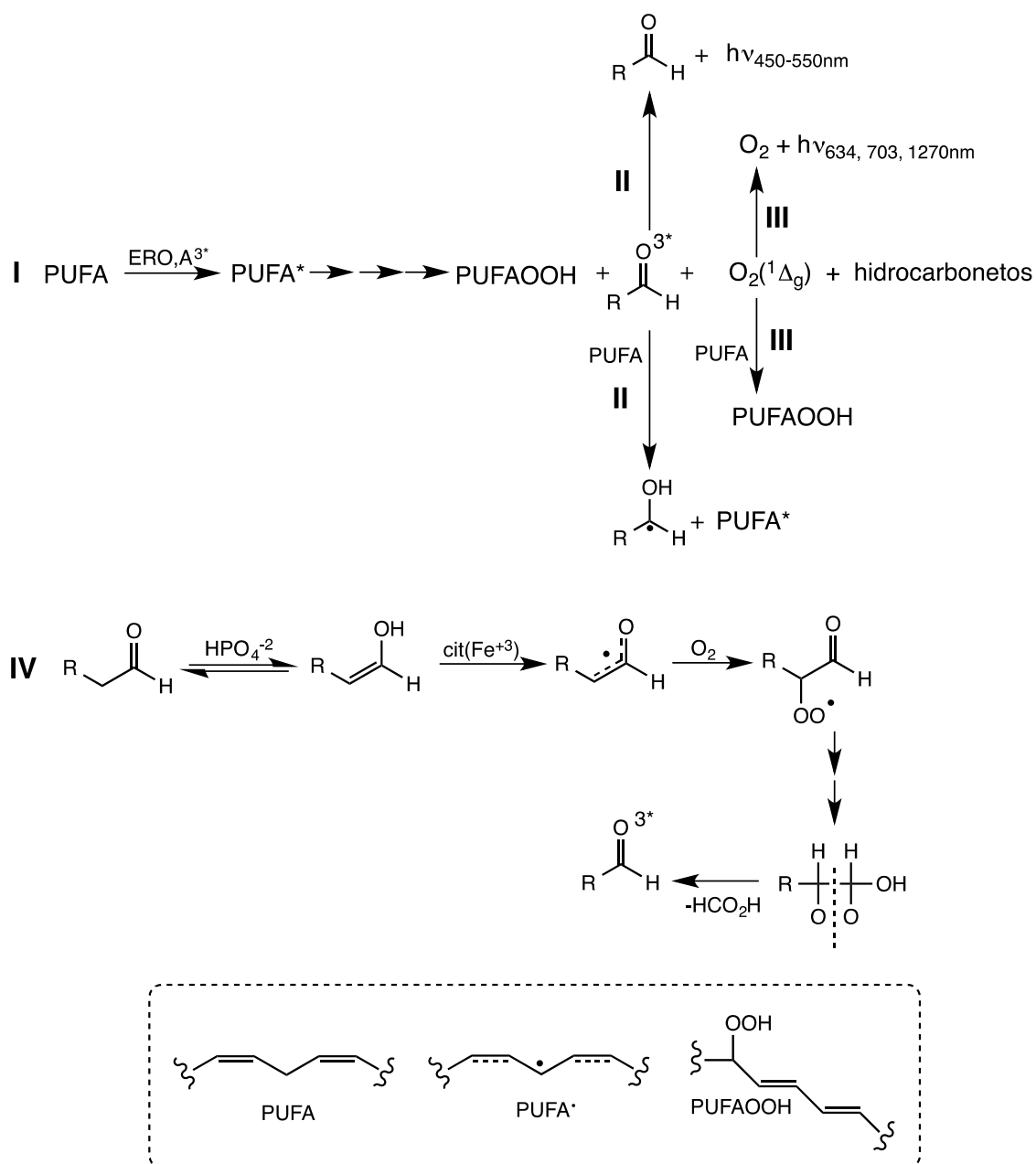


Figura 20. Amplificação da cadeia de lipoperoxidação da membrana mitocondrial por espécies tripletes induzida por fosfato, promotora do envelhecimento das organelas. I, cadeia de peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*), gerando produtos tripletes (ex., n-hexanal), as quais abstraem elétrons dos PUFAs iniciando novas cadeias de peroxidação (propagação), e oxigênio excitado singlete; III, emissão de luz esverdeada pelas espécies tripletes; IV, emissão de luz vermelha pelo oxigênio singlete e sua adição-1,3 a moléculas de PUFA formando hidroperóxidos (PUFAOOH); IV, catálise por fosfato da enolização dos produtos carbonílicos e subsequente oxidação gerando mais espécies tripletes, que amplificarão a cadeia de peroxidação dos PUFAs da membrana mitocondrial

Mais recentemente, espécies tripletes foram implicadas em dois outros eventos, provavelmente adversos às células. Primeiro

citamos a oxidação aeróbica de acetoacetato e 2-metilacetoacetato catalisada por mioglobina a biacetilo triplete.⁵⁶ Estes dois

corpos cetônicos circulam no sangue de diabéticos em concentrações milimolares e podem estar envolvidos nos episódios de rbdomiólise nestes pacientes. Segundo, a demonstração inequívoca de transferência triplete-triplete da energia de acetona excitada, formada por tetrametildioxetano ou isobutanol/HRP, para o oxigênio molecular dissolvido na solução no estado fundamental (triplete) excitando-o ao estado singlete ($^1\Delta_g$).⁵⁷ Emissão de luz no infravermelho em 1270 nm, supressão por histidina e água comum, e adição-1,4 a uma sonda

antracênica são, no conjunto evidências inquestionáveis de sua geração. Oxigênio singlete é extremamente eletrofílico, capaz de oxidar duplas ligações de ácidos graxos poli-insaturados, sulfetos orgânicos como a cisteína e metionina, bases de DNA e RNA. Assim, oxigênio excitado deve ser considerado como agente bioativo, ao lado de aldeídos e cetonas tripletes, quando se discute processos fotoquímicos no escuro. Várias respostas biológicas, algumas delas apontadas na Figura 21, têm sido descritas para o oxigênio singlete.

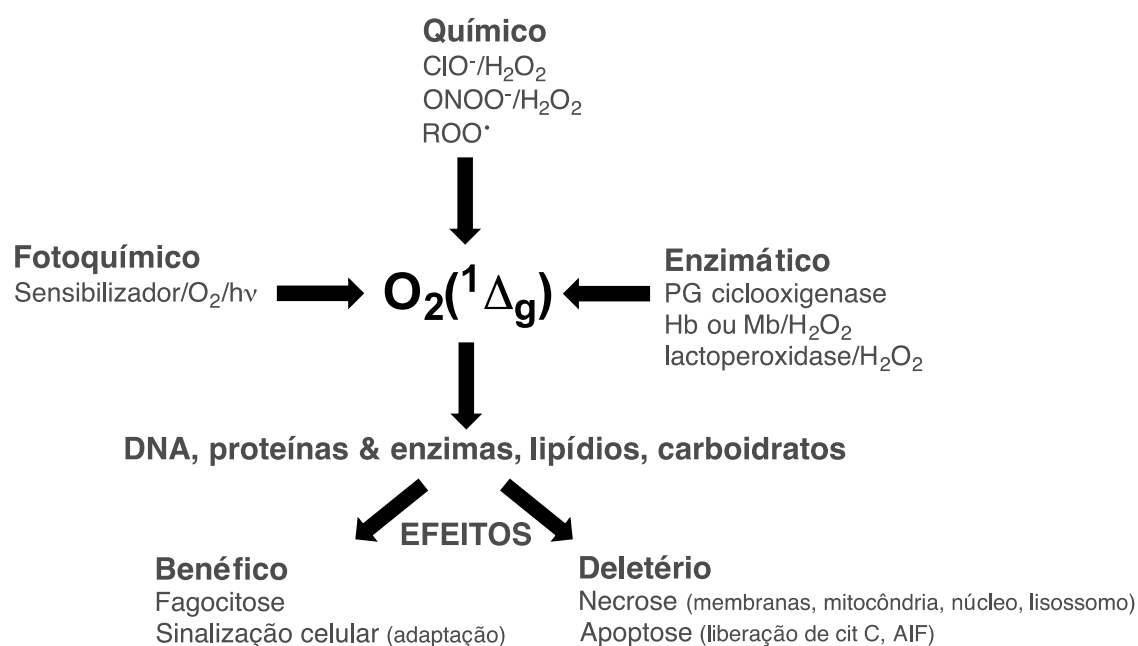


Figura 21. Fontes, alvos e respostas biológicas de oxigênio singlete

Finalmente, apresentamos um resumo dos principais estudos realizados sobre o papel potencial de espécies tripletes em

sistemas biológicos, ainda em passo de espera para sua comprovação in vivo (Figura 22).

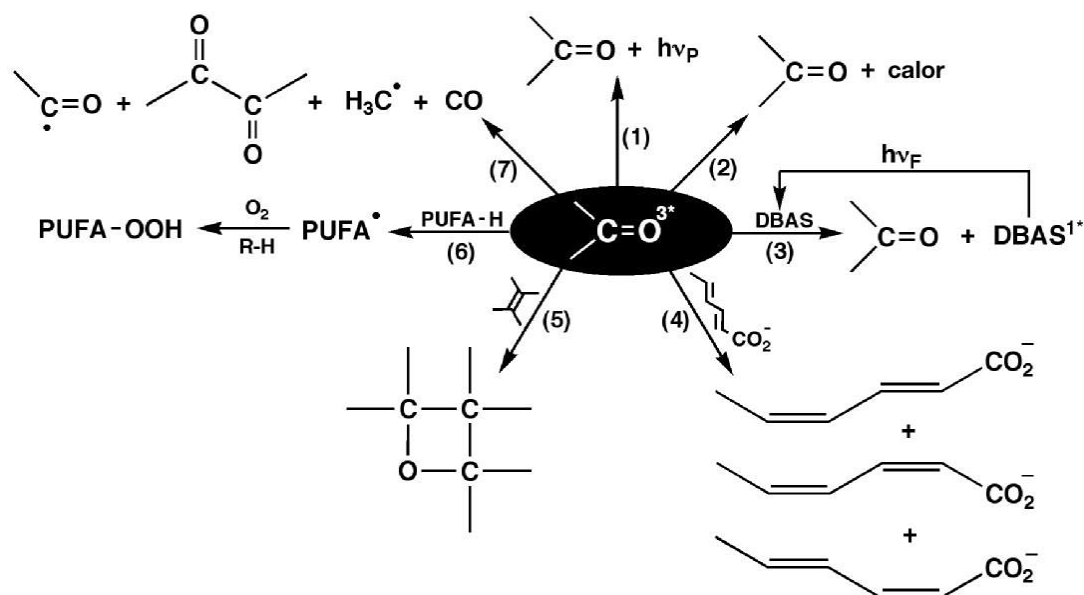


Figura 22. Efeitos fotofísicos (1-3) e fotoquímicos (4-7) de acetona triplete produzida pelo sistema isobutanal/HRP sobre sistemas de interesse químico ou biológico. Sistemas *in vitro* já relatados: 4, supressão e isomerização *cis,trans* promovidas por sorbato;⁴² 5, cicloadição-1,2 a compostos insaturados com formação de oxetanos;⁵⁸ 6, iniciação da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (linolênico e araquidônico) por abstração de átomo de hidrogênio duplamente alélico;⁵⁹ 7, fotoquímica clássica de acetona triplete¹

8. Considerações finais e perspectivas

Este artigo pretende-se constituir um meio de divulgação científica da hipótese de “foto(bio)química no escuro postulada por Cilento e White nos anos 1970. Ressaltamos alguns estudos destes pesquisadores e seus alunos, colaboradores e seguidores em suporte à noção de que não apenas moléculas fotoexcitadas desempenham papéis biológicos cruciais – a clorofila, na fotossíntese, os fitocromos no fotoperiodismo, a rodopsina na visão, por exemplo –, também biomoléculas produzidas por reações químicas e enzimáticas no estado eletronicamente excitado, em particular tripletes, em tecidos não expostos à luz (raízes e fígado, por exemplo), podem realizar reações tipicamente fotoquímicas com funções biológicas ainda a serem esclarecidas. Ressaltamos aqui “foto”isomerizações e “foto”cicloadições de produtos naturais de plantas, a

permeabilização e inativação de mitocôndrias por fosfato, a produção de hormônios de plantas (etileno e fenilacetaldeído), mutagênese e câncer associados à dimerização de pirimidinas, a metabolização de fármacos e a geração de oxigênio singlete, potente agente oxidante.

Os substratos estudados com maior potencial de “fotoquímica no escuro” são análogos àqueles de reações bio- e quimiluminescentes, a saber, compostos com hidrogênio vicinal a grupos carbonila ou carboxila, os produtos excitados têm natureza majoritariamente triplete e reagem similarmente a radicais alcóxilas. Os alvos biológicos potenciais são os mesmos atores da bioquímica do estado fundamental – membranas, peptídeos, proteínas, enzimas, açúcares, ácidos nucleicos, hormônios, etc. Ressaltamos aqui alvos biológicos de natureza tiólica e outros alvos participantes de processos envolvidos no balanço redox celular, portanto uma das mensagens da “fotoquímica no escuro” é que espécies tripletes têm sido negligenciadas dentro da

família das denominadas “espécies reativas de oxigênio” citadas na literatura sobre estresse oxidativo ou balanço redox, as quais incluem radicais livres, peróxidos, oxigênio singlete e hipoclorito.

Cabe também pontuar que a detecção de espécies excitadas *in vivo* e seu papel no ciclo celular e ação tóxica são tão desafiadores como tem sido a pesquisa de radicais e outras espécies reativas em biomedicina. São muitas vezes frustrantes as tentativas de quantificação e fluxos de espécies reativas em culturas de células ou tecidos; de síntese e teste de sondas específicas para estabelecimento de mecanismos inequívocos do papel normal ou tóxico de transientes reativos; e identificação de biomarcadores específicos de desordens inatas ou adquiridas, bem como desenvolvimento de métodos específicos e sensíveis para sua detecção. Cilento e White não avançaram na comprovação da hipótese de “fotoquímica no escuro”, entre outros motivos, pela indisponibilidade das ferramentas de separação e de análise de que dispomos hoje, entre elas, a cromatografia líquida de alta eficiência, a eletroforese capilar e a espectroscopia de massa e de ressonância nuclear e eletrônica.

O legado de possibilidades aventadas por Cilento e White são um prato atraente, inspirador e promissor para os jovens pesquisadores. São inúmeras as reações químicas e enzimáticas geradoras de espécies tripletas; as moléculas-alvo e os produtos esperados de interesse bioquímico ou sintético são diversos; etapas ainda obscuras de vias biossintéticas ou catabólicas em plantas e animais seriam esclarecidas; novos métodos analíticos poderão ser desenvolvidos; e as bases moleculares de diversas doenças inatas e adquiridas poderiam ser desveladas.

Dedicatória

Este artigo é dedicado *in memoriam* ao Prof. Giuseppe Cilento (1923, Sorrento, Itália

– 1994, São Paulo) pela sua excepcional criatividade, produção científica e capacidade de formação de pesquisadores, muitos deles renomados docentes de universidades brasileiras e do exterior. G. Cilento tinha infinita paciência, dedicação e efetividade na orientação dos alunos. Recusava-se a desistir dos alunos com formação precária, generosidade rara na academia. Destacam-se na sua trajetória científica, os estudos de efeitos isotópicos na cinética de reações na Harvard University (Cambridge, USA), como estagiário pós-doutoramento; propriedades espectroscópicas e químicas de piridino-nucleotídeos (coenzimas), com destaque para a proposta de um modelo químico de síntese de ATP no sítio I da cadeia respiratória; mecanismos de ativação do oxigênio molecular; e, no fim de sua vida, a “fotoquímica no escuro”.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fernanda F. Ventura pela ajuda com as referências e ao apoio financeiro das agências Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos 2006/03420-7 a WJB, Processos 2006/56530-4 e 2008/57721-3 a EJHB, e Processo 2013/16885-1 a CVS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ, Processo 302326/2011-1 a EJHB). EJHB também agradece à John Simon Guggenheim Foundation (Fellowship 1996).

Referências Bibliográficas

¹ Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiano, J. C.; *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, University Science Books: Sausalito, 2010. [CrossRef]

² Campbell, A. K.; *Chemiluminescence – Principles and Applications in Biology and Medicine*, Ellis Horwood: Cambridge, 1988.

- ³ Wilson, T.; Hastings, J. W.; *Bioluminescence – Living Lights, Lights for Living*, Harvard University Press: Cambridge (U. S. A.), 2013. [Link]
- ⁴ Bartoloni, F. H.; Ciscato, L. F. M. L.; Peixoto, M. M. M.; Santos, A. P. F.; Santos, C. S.; Oliveira, S.; Augusto, F. A.; Pagano A. P. E.; Baader, W. J. Luz: Um Raro Produto de Reação. *Química Nova* **2011**, *34*, 544. [CrossRef]
- ⁵ Adam, W.; Cilento, G. Four-Membered-Ring Peroxides as Excited States Equivalents: a New Dimension in Bioorganic Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **1983**, *22*, 529. [CrossRef]
- ⁶ Kopecky, K. R.; Mumford, C. Luminescence in thermal decomposition of 3,3,4-trimethyl-1,2-dioxetane. *Canadian Journal of Chemistry* **1969**, *47*, 709. [CrossRef]
- ⁷ Adam, W.; Liu, J. C. Alpha-peroxy lactones synthesis and chemiluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94*, 2894. [CrossRef]
- ⁸ Nery, A. L. P.; Baader, W. J. Quimiluminescência de Peróxidos Orgânicos: Geração de Estados Eletronicamente Excitados na Decomposição de 1,2-Dioxetanos. *Química Nova* **2001**, *24*, 626. [CrossRef]
- ⁹ Adam, W.; Baader, W. J. 1,2-Dioxetane: Synthesis, Characterization, Stability and Chemiluminescence. *Angewandte Chemie International Edition* **1984**, *23*, 166. [CrossRef]
- ¹⁰ Adam, W.; Baader, W. J. Effects of Methylation on the Thermal Stability and Chemiluminescence Properties of 1,2-Dioxetanes. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 410. [CrossRef]
- ¹¹ Bechara, E. J. H.; Wilson, T. Alkyl substituent effects on dioxetane properties – Tetraethyl-, dicyclohexylidene-, and 3,4-dimethyl-3,4-di-n-butyl-dioxetanes – a discussion of decomposition mechanisms. *Journal of Organic Chemistry* **1980**, *45*, 5261. [CrossRef]
- ¹² Bastos, E. L.; Baader, W. J. Theoretical Studies on Thermal Stability of Alkyl-Substituted 1,2-Dioxetanes. *ARKIVOC* **2007**, 257. [CrossRef]
- ¹³ Schuster, G. B. Chemiluminescence of Organic Peroxides. Conversion of Ground-State Reactants to Excited State Products by the Chemically Initiated Electron-Exchange Luminescence Mechanism. *Accounts of Chemical Research* **1979**, *12*, 366. [CrossRef]
- ¹⁴ Turro, N. J.; Chow, M.-F. Chemiluminescent Thermolysis of α -Peroxylactones. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 5058. [CrossRef]
- ¹⁵ Adam, W.; Cueto, O. Fluorescer-Enhanced Chemiluminescence of α -Peroxylactones via Electron Exchange. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101*, 6511. [CrossRef]
- ¹⁶ Wilson, T. Comments on the Mechanisms of Chemi- and Bioluminescence. *Photochemistry and Photobiology* **1995**, *62*, 601. [CrossRef]
- ¹⁷ Koo, J.-Y.; Schmidt, S. P.; Schuster, G. B. Bioluminescence of the Firefly: Key Steps in the Formation of the Electronically Excited State for Model Systems. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **1978**, *75*, 30. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Oliveira M. A.; Bartoloni, F. H.; Augusto, F. A.; Ciscato, L. F. M. L.; Bastos, E. L.; Baader, W. J. Revision of Singlet Quantum Yields in the Catalyzed Decomposition of Cyclic Peroxides. *Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 10537. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Schaap, A. P.; Gagnon, S. D. Chemiluminescence from a Phenoxide-Substituted 1,2-Dioxetane: a Model for Firefly Bioluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104*, 3504. [CrossRef]
- ²⁰ Schaap, A. P.; Chen, T.-S.; Handley, R. S.; De Silva, R.; Giri, B. P. Chemical and Enzymatic Triggering of 1,2-Dioxetanes. 2: Fluoride-Induced Chemiluminescence from *tert*-Butyldimethylsilyloxy-Substituted Dioxetanes. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 1155. [CrossRef]

- ²¹ Nery, A. L. P.; Weiss, D.; Catalani, L. H.; Baader, W. J. Studies on the Intramolecular Electron Transfer Catalyzed Thermolysis of 1,2-Dioxetanes. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5317. [[CrossRef](#)]
- ²² Ciscato, L. F. M. L.; Weiss, D.; Beckert, R.; Bastos, E. L.; Bartoloni, F. H.; Baader, W. J. Chemiluminescence-Based Uphill Energy Conversion. *New Journal of Chemistry* **2011**, *35*, 773. [[CrossRef](#)]
- ²³ Bastos, E. L.; da Silva, S. M.; Baader, W. J. Solvent Cage Effects: Basis of a General Mechanism for Efficient Chemiluminescence. *Journal of Organic Chemistry* **2013**, *78*, 4432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Schaap, A. P.; Sandison, M. D.; Handley, R. S. Chemical and Enzymatic Triggering of 1,2-Dioxetanes. 3: Alkaline Phosphatase-Catalyzed Chemiluminescence from an Aryl Phosphate-Substituted Dioxetane. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 1159. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Beck, S.; Köster, H. Applications of Dioxetane Chemiluminescent Probes to Molecular Biology. *Analytical Chemistry* **1990**, *62*, 2258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Augusto, F. A.; Souza, G. A.; Souza Jr., S. P. Khalid, M.; Baader, W. J. Efficiency of Electron Transfer Initiated Chemiluminescence. *Photochemistry and Photobiology*, **2013**, *89*, 1299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Para revisão veja: Ciscato, L. F. M. L.; Augusto, F. A.; Weiss, D.; Bartoloni, F. H.; Albrecht, S.; Brandl, H.; Zimmermann T.; Baader, W. J. The Chemiluminescent Peroxyoxalate System: State of the Art Almost 50 Years from its Discovery. *ARKIVOC* **2012**, 391. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Chandross, E. A. A New Chemiluminescent System. *Tetrahedron Letters* 1963, *4*, 761. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Rauhut, M. M. Chemiluminescence from Concerted Peroxide Decomposition Reactions. *Accounts of Chemical Research* **1969**, *2*, 80. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Silva, S. M.; Casallanovo Jr., F.; Oyamaguchi, K. H.; Ciscato, L. F. M. L.; Stevani, C. V.; Baader, W. J. Kinetic Studies on the Peroxyoxalate Chemiluminescence Reaction: Determination of the Cyclization Rate Constant. *Luminescence* **2002**, *17*, 313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Stevani, C. V.; Silva, S. M.; Baader, W. J. Studies on the Mechanism of the Excitation Step in Peroxyoxalate System. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 4037. [[CrossRef](#)]
- ³² Ciscato, L. F. M. L.; Bartoloni, F. H.; Bastos, E. L.; Baader, W. J. Direct Kinetic Observation of the Chemiexcitation Step in Peroxyoxalate Chemiluminescence. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 8974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Bartoloni, F. H.; Ciscato, L. F. M. L.; Augusto, F. A.; Baader, W. J. Transferência de Elétron Inversa na Quimiexcitação da Reação Peróxi-Oxalato Usando Ativadores Facilmente Redutíveis. *Química Nova* **2010**, *33*, 2055. [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Albertin, R.; Arribas, M. A. G.; Bastos, E. L.; Röpke, S.; Sakai, P. N.; Sanches, A. M. M.; Stevani, C. V.; Umez, J. I.; Yu, S.; Baader, W. J. Quimiluminescência Orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. *Química Nova* **1998**, *21*, 772. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Oliveira, T. F.; Silva, A. L. M.; Moura, R. A.; Bagattini, R.; Oliveira, A. A. F.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Campos, I. P. A.; Barreto, F. P.; Bechara, E. J. H.; Loureiro, A. P. M. Luminescent threat: toxicity of light stick attractors used in pelagic fishery. *Scientific Reports* **2014**, *4*, 5359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ White, E. H.; Miano, J. D.; Watkins, C. J.; Breaux, E. J. Chemically produced excited states. *Angewandte Chemie International Edition* **1974**, *13*, 229. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Cilento, G. Dioxetanes as Intermediates in Biological Processes. *Journal of Theoretical Biology* **1975**, *55*, 471; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
Cilento, G. Generation and transfer of triplet energy in enzymatic systems. *Accounts in Chemical Research* **1980**, *13*, 225; [[CrossRef](#)]

- Cilento, G.; Zinner, K.; Bechara, E. J. H.; Durán, N.; Baptista, R. C.; Shimizu, Y.; Augusto, O.; Faljoni-Alário, A.; Vidigal, C. C. C.; Oliveira, O. M. F.; Haun, M. Estados excitados em sistemas biológicos. *Ciência e Cultura* **1979**, *31*, 290.
- ³⁸ Brunetti, I. L.; Bechara, E. J. H.; Cilento, G.; White, E. H. Possible in vivo formation of lumicolchicines from lumincolchicine by endogeneously generated triplet species. *Photochemistry and Photobiology* **1982**, *36*, 245. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Nery, A. L. P.; Quina, F. H.; Moreira, P. F.; Medeiros, C. E. R.; Baader, W. J.; Shimizu, K.; Catalani, L. H.; Bechara, E. J. H. Does the photochemical conversion of cochicine into lumicolchicines involve triplet transientes? A solvent dependence study. *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *73*, 213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Cilento, G.; Adam, W. From free radicals to electronically excited species. *Free Radical Biology & Medicine* **1995**, *19*, 103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Bechara, E. J. H.; Oliveira, O. M. M. F.; Duran, N.; Baptista, R. C.; Cilento, G. Peroxidase catalyzed generation of triplet acetone. *Photochemistry and Photobiology* **1979**, *30*, 101. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Velosa A. C.; Baader, W. J.; Stevani, C. V.; Mano, C. M.: Bechara, E. J. H. 1,3-Diene probes for detection of triplet carbonyls in biological systems. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, *20*, 1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Di Mascio, P.; Catalani, L. H.; Bechara, E. J. H. Are dioxetanes chemiluminescent intermediates in lipid peroxidation? *Free Radical Biology & Medicine* **1992**, *12*, 471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Catalani, L. H.; Wilson, T.; Bechara, E. J. H. Two water soluble chemiluminescence probes for chemiexcitation studies: sodium 9,10-dibromo- and 9,10-diphenylanthracene-2-sulfonate. Synthesis, properties and application to triplet acetone and tetramethyldioxetane. *Photochemistry and Photobiology* **1987**, *45*, 273. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁵ Baader, W. J.; Bohne, C.; Cilento, G.; Dunford, H. B. Peroxidase-Catalyzed Formation of Triplet Acetone and Chemiluminescence from Isobutyraldehyde and Molecular Oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 10217. [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Adam, W.; Baader, W. J.; Cilento, G. Enols of Aldehydes in the Peroxidase/Oxidase – Promoted Generation of Excited Triplet Species. *Biochimica Biophysica Acta* **1986**, *881*, 330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Baader, W. J.; Bohne, C.; Cilento, G.; Nassi, L. Enzymatic Generation of Triplet Acetone: A Window to Photochemistry without Light. *Biochemical Education* **1986**, *14*, 190. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ Baader, W. J. Formação Enzimática de Compostos Carbonílicos no Estado Triplete a Partir de Substratos Enólicos: Uma Abordagem Cinética. *Química Nova* **1989**, *12*, 325. [[Link](#)]
- ⁴⁹ Soares, C. H. L.; Bechara, E. J. H. Enzymatic generation of triplet biacetyl. *Photochemistry and Photobiology* **1982**, *36*, 117. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁰ Nantes, I. L.; Bechara, E. J. H. Horseradish peroxidase-catalyzed generation of acetophenone and benzophenone in the triplet state. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *63*, 702. [[CrossRef](#)]
- ⁵¹ Almeida, A. M.; Bechara, E. J. H.; Vercesi, A. E.; Nantes, I. L. Diphenylacetaldehyde-generated excited states promote damage to isolated rat liver mitochondrial DNA, phospholipids, and proteins. *Free Radical Biology & Medicine* **1999**, *27*, 744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Escobar, J. A.; Vazquez-Vivar, J.; Cilento, G. Free radicals and excited states in the metabolism of índole-3-acetic acid and its ethyl ester by horseradish peroxidase and by neutrophils. *Photochemistry and Photobiology* **1992**, *55*, 895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ⁵³ Knudsen, F. D.; Campa, A.; Stefani, H. A.; Cilento, G. Plant hormone ethylene is a Norrish type II product from enzymically generated triplet butanal. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **1994**, *91*, 410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Müller, E. B.; Adam, W.; Saha-Moller, C. R. Photochemical DNA modifications induced by 1,2-dioxetanes. *Chemical and Biological Interactions* **1992**, *85*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Kowaltowski, A. J.; Castilho, R. F.; Grijalba, M. T.; Bechara, E. J. H.; Vercesi, A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. *Journal of Biological Sciences* **1996**, *271*, 2929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Ganini, D.; Christoff, M.; Ehrenshaft, M.; Kakiiska, M. B.; Mason, R. P.; Bechara, E. J. H. Myoglobin-H₂O₂ catalyzes the oxidation of β -ketoacids to α -dicarbonyls: mechanism and implications in ketosis. *Free Radical Biology & Medicine* **2011**, *51*, 733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Mano, C. M.; Prado, F. M.; Massari, J.; Ronsein, G. E.; Martinez, G. R.; Miyamoto, S.; Cadet, J.; Sies, H.; Medeiros, M. H.; Bechara, E. J. H.; Di Mascio, P. Excited singlet molecular O₂ (¹ Δ_g) is generated enzymatically from excited carbonyls in the dark. *Scientific Reports* **2014**, *4*, 5938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Farreth, W. E.; Jonhson, D. G. Chemiluminescence in the infra-red photochemistry of oxetanes: The formal reverse of ketone photocycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 1875. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁹ Indig, G.; Campa, A.; Bechara, E. J. H.; Cilento, G. Conjugate diene formation promoted by triplet acetone acting upon arachidonic acid. *Photochemistry and Photobiology* **1988**, *48*, 719. [[CrossRef](#)]