

Cassius Vinicius Stevani e Wilhelm Josef Baader

Instituto de Química - Universidade de São Paulo - CP 26077 - 05599-970 - São Paulo - SP

Recebido em 11/8/98; aceito em 1/12/98

THE CHEMILUMINESCENT PEROXYOXALATE SYSTEM. The peroxyoxalate system is still one of the most efficient chemiluminescence reactions and the only one supposed to involve the "Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence - CIEEL" mechanism, with proved high efficiency. Besides the academic interest in the elucidation of the mechanism of this complex reaction, the peroxyoxalate system has found a variety of applications in analytical chemistry. This review contains (i) a short introduction to basic concepts in chemiluminescence, (ii) a critical summary of mechanistic studies on the peroxyoxalate reaction, (iii) and some examples of analytical applications. Although there are some recent reviews on chemiluminescence, no specific critical revision on mechanistic and analytical features of the peroxyoxalate system has been published.

Keywords: chemiluminescence; peroxyoxalate system; CIEEL.

INTRODUÇÃO

Nesta revisão é apresentada uma breve introdução aos conceitos básicos de quimiluminescência orgânica, sendo também mostrados os mecanismos mais importantes de formação de estados eletronicamente excitados, para fornecer ao leitor o conhecimento necessário para o entendimento dos mecanismos envolvidos na quimiluminescência da reação peróxi-oxalato. Na parte principal são relatados e brevemente discutidos os resultados obtidos dos estudos cinéticos mais expressivos sobre esta reação. Para finalizar, foi incluída uma seleção de alguns exemplos recentes de aplicações analíticas do sistema peróxi-oxalato para demonstrar a grande importância e potencialidade desta reação quimiluminescente.

O que é Quimiluminescência?

O termo quimiluminescência foi primeiramente utilizado por Wiedemann, em 1888¹, para descrever reações químicas que emitiam luz: "Das bei chemischen Prozessen auftretende Leuchten würde Chemilumineszenz genannt" ou seja, "Um processo químico que ocorra com luminescência será denominado quimiluminescência"². Wiedemann distinguiu dois tipos diferentes de mecanismos pelos quais sólidos, líquidos ou gases podem produzir luz, um requerendo aumento da temperatura e, o outro, não. O primeiro mecanismo de emissão trata-se de incandescência, que não é um processo químico, mas sim físico, decorrente da emissão de radiação pelo corpo negro. O fenômeno da incandescência, hoje em dia bem estabelecido, foi primeiramente explicado por Planck em 1900 e a equação física que o descrevia foi formulada, de modo mais detalhado, por Einstein em 1904, como resultado dos estudos sobre o efeito fotoelétrico.

Desde os primórdios da civilização humana há várias referências a seres luminosos em diferentes culturas, daí a possível origem da mitologia relacionada a estes fenômenos. Gregos e romanos foram os primeiros a classificar e relatar as características peculiares de seres luminosos como peixes, bactérias e fungos. Apesar de grande quantidade de vívidas descrições bioluminescentes, somente no século XVII iniciaram-se as investigações científicas sobre o fenômeno de "luz fria".

Em 1669 Hennig Brand, médico hamburguês, produziu um composto que emitia luz em contato com o ar, através da fervura de urina humana com salitre, álcool e areia. O composto produzido era fósforo branco³. Na mesma época, foram feitos

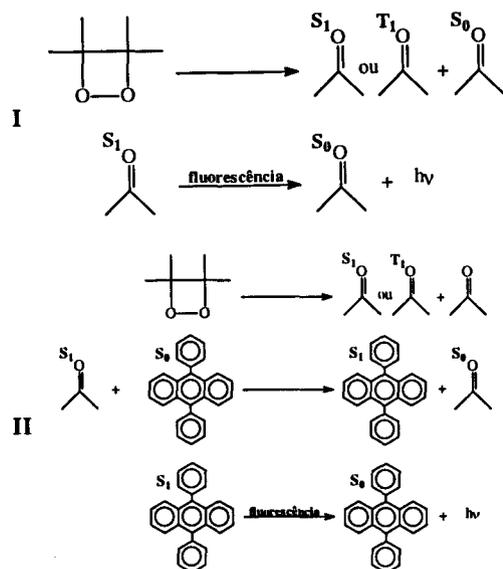
diversos experimentos com fungos e bactérias bioluminescentes, comprovando-se a necessidade de oxigênio nestes processos de emissão de luz.

O primeiro composto orgânico sintético a exibir reação quimiluminescente foi a lofina, preparada em 1887 por Bronislau Radziszewski⁴, que também relatou, logo após seu primeiro artigo, uma grande lista de compostos orgânicos sintéticos quimiluminescentes. Radziszewski afirmou que "a lofina não emite luz quando aquecida", comentário que permitiu a Wiedemann, em 1888, não somente distinguir quimiluminescência de incandescência, mas estabelecer a quimiluminescência como um fenômeno fascinante situado na interface entre a química e a física.

Esquemáticamente, uma reação quimiluminescente pode ser pensada como o inverso de uma reação fotoquímica. Em uma reação fotoquímica, uma determinada substância, ao absorver um fóton, atinge um estado eletrônico excitado e, através de uma reação química, forma-se um produto no estado eletrônico fundamental. Em uma reação quimiluminescente, ocorre uma reação química, que leva à produção de uma substância no estado eletrônico excitado, que, pelo decaimento para o estado eletrônico fundamental, emite luz. Analisando simplificada e, este processo ocorre porque o produto inicial da reação química é produzido, preferencialmente, no estado eletrônico excitado, devido à semelhança energética e geométrica entre os níveis eletrônicos do reagente e do produto excitado. Ou seja, para reações extremamente exotérmicas e nas quais a geometria do estado eletrônico excitado do(s) produto(s) é parecida com a geometria do(s) reagente(s), a energia livre de ativação da reação que conduz ao estado eletronicamente excitado pode ser menor do que aquela que leva ao estado eletrônico fundamental⁵. Em resumo, reações quimiluminescentes geralmente envolvem (i) a geração de um intermediário de alta energia em um ou vários passos, (ii) reação térmica deste intermediário conduzindo a um produto eletronicamente excitado e (iii) liberação da energia de excitação por emissão de luz^{6,7}. A luz emitida pelo decaimento para o estado eletrônico fundamental pode ser proveniente de uma transição entre estados eletrônicos excitados de mesma multiplicidade (*i.e.* singlete/singlete, triplete/triplete), processo chamado de *fluorescência*; quando os estados eletrônicos são de multiplicidades diferentes, tem-se a *fosforescência*. No caso de decaimento por *fluorescência*, o tempo de vida do produto no estado eletrônico excitado esta na faixa de nanossegundos a microssegundos,

enquanto, no caso da fosforescência, que envolve uma transição proibida pela regra de conservação de spin, onde necessariamente ocorre um cruzamento intersistema, este tempo de vida é da ordem de microssegundos a segundos.

Uma molécula excitada pode emitir luz por dois caminhos diferentes: o direto ou o indireto (Esquema 1). Em uma reação quimiluminescente direta, a decomposição da molécula com alto conteúdo energético leva à formação do produto em um estado eletronicamente excitado (S_1 ou T_1), cujo decaimento para o estado eletrônico fundamental é o responsável pela emissão de luz. Já em uma reação quimiluminescente indireta, a espécie química responsável pela emissão não é proveniente da molécula com alto conteúdo energético, mas sim de outra molécula, acceptora da energia de excitação, cujo estado excitado se forma por uma transferência de energia intermolecular, e é o responsável pela quimiluminescência.

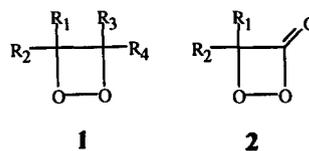


Esquema 1. Esquema simplificado de reação quimiluminescente direta (I) e indireta (II).

Clivagem Unimolecular de 1,2-Dioxetanos

O envolvimento de dioxetanos (1) e α -peróxilactonas (2) como intermediários de alta energia e vida curta, em muitos sistemas quimiluminescentes, foi sugerido primeiramente por McCapra⁸ há trinta anos. Antes disso, Staudinger⁹ havia sugerido a participação de dioxetanos como intermediários em várias reações de oxidação. Tais compostos, ainda não isolados naquela época, pareciam ser os únicos que poderiam desempenhar o papel de intermediário de alta energia, pois, (i) a clivagem térmica, em dois fragmentos carbonílicos, deveria ser altamente exotérmica, considerando a liberação da tensão do anel de quatro membros e a formação de duas ligações carbonílicas fortes, em detrimento de uma ligação fraca O-O e uma ligação C-C; (ii) na estrutura de dioxetanos, o grupo C-O está fora do plano R_1 -C- R_2 (de forma similar a aldeídos e cetonas no estado eletrônico excitado), o que favoreceria, caso fosse possível energeticamente, a formação de carbonilas no estado eletrônico excitado; (iii) em várias reações quimiluminescentes e bioluminescentes foram encontrados, entre os produtos de reação, compostos carbonílicos como, por exemplo, CO_2 , o que sugere a clivagem de um dioxetano.

Kopecky e Mumford¹⁰, no mesmo ano (1968) em que foram postulados os dioxetanos como intermediários em reações quimiluminescentes, sintetizaram o trimetil-1,2-dioxetano, o qual se mostrou relativamente estável, contrariando as previsões de que tais compostos seriam extremamente instáveis para serem



isolados. Submetido ao aquecimento (ca. 50°C), este dioxetano se decompôs lentamente em acetona e acetaldeído, emitindo fraca luz azulada e, em presença de 9,10-difenilantraceno, que age como um acceptor de energia, quimiluminescência intensa.

Dioxetanos, ao contrário da maioria dos sistemas quimiluminescentes, são modelos simples, sendo que a decomposição unimolecular destes compostos relativamente estáveis leva à formação de dois compostos carbonílicos, um deles podendo ser formado em um estado eletronicamente excitado, singlete (S_1) ou tripleto (T_1)¹¹. Entretanto, esta classe de compostos não pode ser usada como um bom modelo para reações bioluminescentes, uma vez que o rendimento quântico de formação de estados T_1 (0,3 E mol⁻¹) é muito maior que o S_1 (10⁻³ E mol⁻¹), o que ocasiona baixos rendimentos quânticos de quimiluminescência. Isto se deve ao fato de estados T_1 serem desativados preferencialmente de forma não-radiativa, enquanto estados S_1 podem desativar-se de forma radiativa. Ou seja, os rendimentos quânticos de fosforescência em solução e na presença de O_2 são extremamente baixos, enquanto os rendimentos quânticos de fluorescência podem até chegar a valores iguais a 1 E mol⁻¹, apesar de não serem também muito altos (~10⁻⁵ E mol⁻¹) para compostos carbonílicos simples.

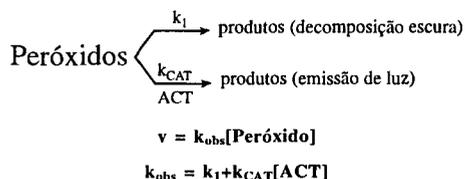
Mecanismo da Luminescência Quimicamente Iniciada por Intercâmbio de Elétron (CIEEL)

Rauhut *et al.*¹² propuseram a existência de um complexo de transferência de carga entre um intermediário de alta energia, formado na reação, e um composto chamado ativador*, para explicar a geração de estados eletrônicos excitados no sistema peróxi-oxalato. Segundo estes autores^{12b,12c}, existe um intermediário de alta energia meta-estável, provavelmente a 1,2-dioxetanodiona, que interage com o ativador através de um complexo de transferência de carga, havendo doação de elétron por parte do ativador. Com base em resultados obtidos em experimentos de determinação do rendimento quântico de quimiluminescência, Rauhut^{12c} propôs que quanto menor o potencial de oxidação do ativador, maior a constante de velocidade de formação de estados eletronicamente excitados e que quanto menor a energia singlete do ativador, maior o rendimento quântico de quimiluminescência.

Posteriormente, Schuster^{13a} constatou, ao estudar uma série de peróxidos cíclicos e lineares isoláveis, que a decomposição destes (k_{obs} , Esquema 2), observada através da emissão de luz, sofria uma aceleração e, além disso, ocorria um aumento significativo da quantidade de luz emitida, quando em presença de ativadores com baixos potenciais de oxidação e altos rendimentos quânticos de fluorescência.

Os principais peróxidos estudados por Schuster foram peróxido de difenoila (3), peróxi-acetato de 1-feniletila (4), 3,3-dimetil-1,2-dioxetanona (5) e peróxido de *o*-xililenila (6). Foi constatado também que os espectros de emissão da reação catalisada pelos ativadores eram idênticos aos espectros de fluorescência dos próprios ativadores utilizados. Através de um

* Notar que existe uma diferença entre acceptor de energia de excitação e ativador. Um acceptor de energia de excitação recebe energia de um outro composto no estado eletrônico excitado não interferindo na velocidade da reação, enquanto um ativador é formado no estado eletrônico excitado através de uma reação química, interferindo na velocidade da reação.



$$k_{\text{CAT}} = A \cdot \exp \left[\frac{\alpha}{RT} \left(E_{\text{ox}} - E_{\text{red}} - \frac{e^2}{\epsilon R_0} \right) \right]$$

A: constante.

R: constante universal dos gases.

T: temperatura em Kelvin.

α : constante de transferência de elétron.

E_{ox} : potencial de oxidação do ACT.

E_{red} : potencial de redução do peróxido.

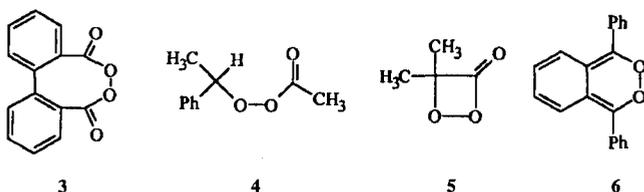
e : carga do elétron.

ϵ : constante dielétrica do solvente.

R_0 : distância entre os íon-radicais.

Esquema 2. Esquema cinético da interação de um peróxido com um ativador, envolvendo uma transferência de elétron².

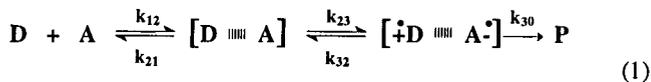
estudo sistemático da variação da constante de velocidade da reação catalisada pelo ativador (k_{CAT}), Schuster observou que k_{CAT} era proporcional ao potencial de oxidação do ativador (E_{ox}), em todos os sistemas estudados, sendo que, a projeção de $\ln k_{\text{CAT}}$ vs. E_{ox} era linear, evidenciando o envolvimento de transferência de um elétron no passo limitante.



O coeficiente angular (θ) da relação $\ln k_{\text{CAT}}$ vs. E_{ox} fornece $\theta = -\alpha/RT$, onde α é um parâmetro empírico relacionado com a transferência de elétron ($0 \leq \alpha \leq 1$). O parâmetro α citado é similar ao α utilizado por Brønsted em catálise ácida geral, o qual é uma medida da transferência de próton na etapa limitante da reação, apresentando valores, também, entre 0 e 1. Este parâmetro está relacionado à extensão de transferência de elétron no estado de transição. Porém, como ocorre ruptura de uma ligação química simultaneamente à transferência de elétron, a indica também a extensão desta ruptura. Um valor de $\alpha \approx 1$ significa uma ruptura "quase" completa da ligação no estado de transição, enquanto um valor de $\alpha \approx 0$ significa "pouca" ruptura da ligação no estado de transição. Empiricamente, o valor de α diz respeito à sensibilidade da variável observada (no caso k_{CAT}) a mudanças do potencial de oxidação do ativador. Para o sistema peróxido de difenoila¹⁴, foi comprovado, utilizando-se solventes com constantes dielétricas aproximadamente iguais, que há um incremento nos valores do rendimento quântico de quimiluminescência ao se aumentar a viscosidade, o que demonstra ser este um processo que ocorre dentro da gaiola de solvente.

Em um trabalho teórico, Schuster^{13b} propôs que, (i) no caso de reações irreversíveis de transferência de elétron, com uma constante de velocidade k_{23} (Equação 1), o coeficiente angular da relação $\ln k_{23}$ vs. ΔG_{23} (θ) é nulo para reações com $\Delta G_{23} < 0$, (ii) para reações reversíveis, com $\Delta G_{23} > 0$, o valor do coeficiente angular é $\theta = -1/RT e$, (iii) para reações irreversíveis, com $\Delta G_{23} > 0$, têm-se que $\theta = -\alpha/RT$ e $k_{\text{CAT}} = K_{12}k_{23}$. Todos os sistemas quimiluminescentes estudados por Schuster enquadram-se

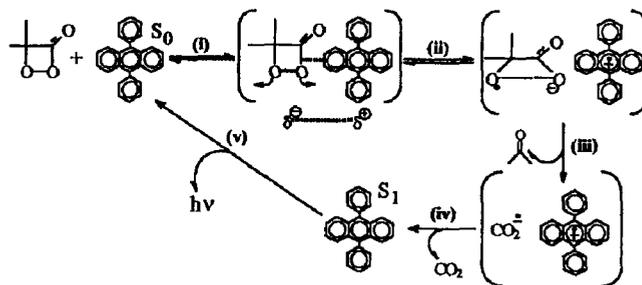
no caso iii, uma vez que ocorre rompimento da ligação peróxídica (O-O) em conjunto com uma transferência de elétron, mais rápida do que a retro-transferência, ou seja, o processo é irreversível. A energia do par de íon-radicais é maior do que a do complexo de transferência de carga, ou seja, esta transferência de elétron é endotérmica. É necessário ainda observar que k_{CAT} é composto de k_{23} e K_{12} , o que faz com que o valor medido de α contenha um componente associado à formação de um complexo de transferência de carga. Schuster obteve um valor de $\alpha \approx 0,3$ para todos os sistemas estudados^{13a}.



D: doador, A: aceptor, P: produtos

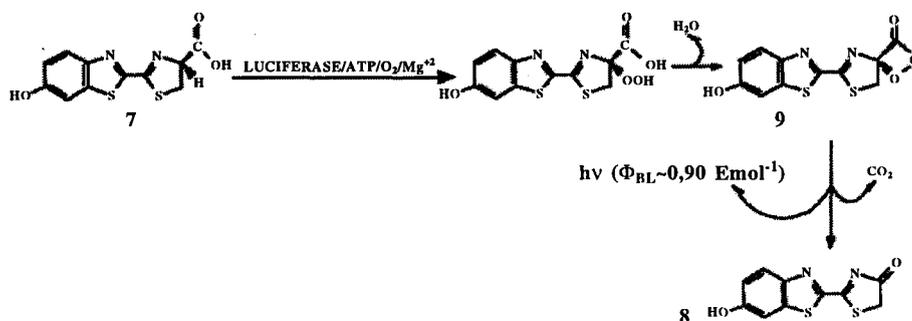
Em uma análise matemática mais detalhada, com respeito às relações de energia livre para reações reversíveis e irreversíveis, Scandola *et al.*¹⁵ verificaram que, para reações com valor pequeno de energia livre de ativação, a relação $\log k_{\text{CAT}}$ vs. E_{ox} é linear. Nestes casos, de reações de transferência de elétron irreversíveis, com E_{ox} conhecido e um único aceptor de elétron (E_{red} único e estabelecido termodinamicamente), α deve possuir valores entre 0,2 e 0,5.

Com base nestas observações, principalmente utilizando o sistema peróxido de difenoila¹⁴, Schuster propôs o mecanismo CIEEL ("Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence"), o qual contém os seguintes passos: (i) primeiramente o ativador entra em contato com o peróxido, formando um complexo de encontro dentro da gaiola de solvente, (ii) a ativação térmica do peróxido, levando ao alongamento da ligação O-O e ao aumento da afinidade eletrônica do peróxido, facilita a transferência de elétron do ativador, que leva à formação de um par de íon-radicais, (iii) então, o radical-ânion do peróxido se cliva, gerando um novo radical-ânion na gaiola de solvente, (iv) ocorre uma reação de aniquilamento do radical-ânion formado com o cátion-radical do ativador, um processo que libera energia suficiente para promover o ativador ao seu estado S_1 , (v) o qual decai para o estado eletrônico fundamental emitindo luz (Esquema 3).

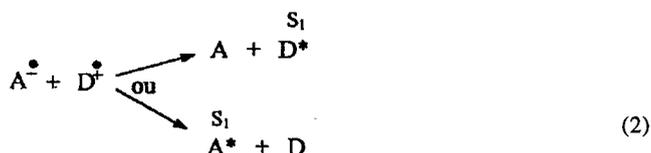


Esquema 3. Mecanismo CIEEL exemplificado com a 3,3-dimetil-1,2-dioxetanona e 9,10-difenilntraceno.

Outro fato que contribui para a proposição do mecanismo CIEEL por Schuster, anterior aos seus experimentos, foi a descoberta da possibilidade de se poder gerar estados eletrônicos excitados por via eletroquímica. Reações que envolvem transferência de elétron, onde um par de íon-radicais (A^\cdot e $D^{+\cdot}$) é gerado eletricamente, foram estudadas por voltametria cíclica. De modo genérico, a luz é emitida por uma espécie química S_1 gerada, por sua vez, através de uma reação de aniquilamento entre o par de íon-radicais, podendo levar tanto o doador (D) quanto o aceptor (A) para o estado excitado (Equação 2). Esta técnica, amplamente utilizada¹⁶, permite o estudo direto de reações que envolvam transferência de elétron, resultando em dados mais confiáveis sobre a etapa de quimi-excitação.

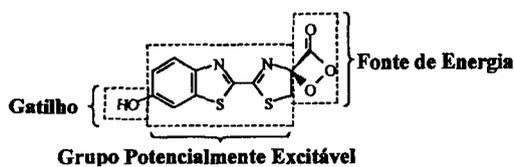


Esquema 4. Mecanismo de bioluminescência do vaga-lume.

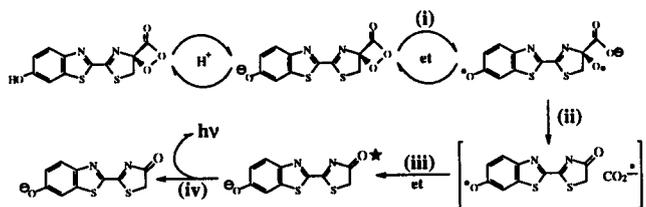


O mecanismo CIEEL foi recebido com entusiasmo pelos pesquisadores da área, ainda mais quando foi utilizado, na mesma época¹⁷, para explicar o passo de quimi-excitação da reação bioluminescente do vaga-lume (*Photinus pyralis*, Coleoptera: Lampyridae). No mecanismo de emissão de luz por este inseto, elucidado nos anos 60¹⁸, ocorre a oxidação da luciferina (7) pelo oxigênio molecular, catalisada pela enzima luciferase, e gerando a oxiluciferina (8; Esquema 4). Neste processo de oxidação foi postulado o envolvimento de uma dioxetanona (9).

O mecanismo de quimi-excitação desta reação, que apresenta um alto rendimento quântico de bioluminescência (em torno de 0,90 E mol⁻¹) pode ser explicado, como já foi dito, com base no mecanismo CIEEL. É interessante notar que a molécula 10 apresenta os três componentes necessários para que ocorra uma reação quimiluminescente, ou seja, uma fonte de energia, a dioxetanona com alto conteúdo energético, um grupo que é capaz de ser formado no estado eletronicamente excitado e um "gatilho", o OH fenólico que, ao ser desprotonado, "dispara" a seqüência de eventos. Dessa forma, o que ocorre é um mecanismo CIEEL intramolecular, onde (i) o íon fenolato livre transfere um elétron para a dioxetanona, ocorrendo a quebra da ligação O-O e (ii) a formação de um par de íons radicais que, (iii) através de uma nova transferência de elétron, leva à formação do ânion de 8 no estado eletrônico excitado o qual, finalmente, (iv) emite luz ao decair para o estado eletrônico fundamental (Esquema 5).



10



Esquema 5. Mecanismo CIEEL intramolecular na bioluminescência do vaga-lume.

Um ponto questionável do mecanismo CIEEL é o que diz respeito aos rendimentos quânticos de quimiluminescência envolvidos no passo bimolecular da reação, pois, os valores calculados para o sistema peróxido de difenoila/perileno foram superestimados em várias ordens de grandeza por Schuster^{13a}, fato que foi revelado em um trabalho posterior de Catalani e Wilson¹⁹. Os autores obtiveram um rendimento quântico de 10⁻⁴ E mol⁻¹, ao invés de 0,1 E mol⁻¹, determinado por Schuster, ou seja, o sistema peróxido de difenoila - o sistema-chave para a formulação do mecanismo CIEEL - é de uma eficiência extremamente baixa.

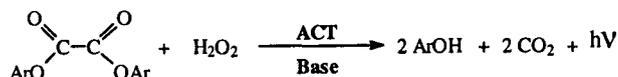
Em uma revisão recente, Wilson²⁰ indaga sobre o motivo pelo qual os sistemas-modelo do mecanismo CIEEL (peróxido de difenoila e peróxido de antraceno) são tão ineficientes. Segundo Wilson, com base no mecanismo CIEEL, dois motivos são prováveis: retro-transferência de elétron muito rápida (Esquema 3) ou difusão para fora da gaiola de solvente, embora nenhum dos dois motivos pareça ser suficiente para explicar rendimentos quânticos tão baixos.

Por outro lado, o sistema peróxi-oxalato mostra rendimento quântico elevado, fato que foi comprovado por uma redeterminação independente utilizando a reação de oxalato de bis(pentaclorofenila) com H₂O₂, catalisada por salicilato de sódio, em presença de 9,10-difenilantraceno^{21a}. Sendo assim, o sistema peróxi-oxalato constitui o único exemplo com alto rendimento quântico que, provavelmente, envolve a seqüência mecanística CIEEL.

O SISTEMA PERÓXI-OXALATO

Estudos Mecanísticos

O sistema peróxi-oxalato despertou o interesse de muitos pesquisadores desde que Chandross²² observou que, na reação de cloreto de oxalila com H₂O₂, em presença de rubreno, ocorria emissão de luz. Posteriormente, o grupo de Rauhut¹² substituiu cloreto de oxalila por ésteres fenólicos do ácido oxálico, contendo substituintes aceptores de elétrons. A reação destes com peróxido de hidrogênio, catalisado por base e em presença de substâncias com baixos potenciais de oxidação e altos rendimentos quânticos de fluorescência (os chamados ativadores), é acompanhada por uma forte emissão de luz, a qual é oriunda da fluorescência do ativador (Esquema 6).



Esquema 6. Reagentes e produtos do sistema peróxi-oxalato.

O principal motivo para que o sistema peróxi-oxalato venha sendo estudado desde a década de 60, é o seu alto rendimento quântico de quimiluminescência e o fato dele poder ser usado em uma grande variedade de aplicações analíticas. Por outro

lado, o mecanismo desta reação complexa não foi ainda muito bem estabelecido, especialmente no que diz respeito ao chamado "passo de excitação", ou seja, o passo elementar da reação no qual a "energia química" é transformada em "energia de excitação eletrônica". No caso do sistema peróxi-oxalato, a seqüência completa de reação deve levar a um ou mais intermediários com alto conteúdo energético - os chamados intermediários de alta energia - e a reação deste(s) intermediário(s), provavelmente com o envolvimento do ativador, libera, em um único passo, energia suficiente para a excitação deste. A estrutura do(s) intermediário(s) de alta energia e o mecanismo de excitação eletrônica ainda não foram esclarecidos como mostra a breve revisão da literatura a seguir.

A cinética da reação pode ser determinada através da observação de emissão de luz ou da absorção, devida ao 2,4,6-triclorofenol liberado (Figura 1). Porém, estudos cinéticos convencionais da etapa de excitação não podem ser feitos, uma vez que as etapas anteriores à produção do intermediário de alta energia, sendo bem mais lentas, são, conseqüentemente, as únicas observadas cineticamente.

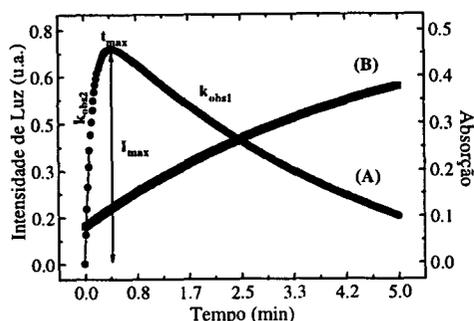
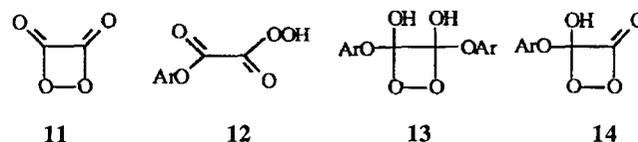


Figura 1. Curvas cinéticas típicas em experimentos de emissão (A) e absorção (B) de luz, utilizando oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila), imidazol e H₂O₂. A - [oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila)] = 0,10 mM, [H₂O₂] = 10 mM, [imidazol] = 1,0 mM, [9,10-difenilantraceno] = 1,0 mM, B - idem, porém sem 9,10-difenilantraceno.

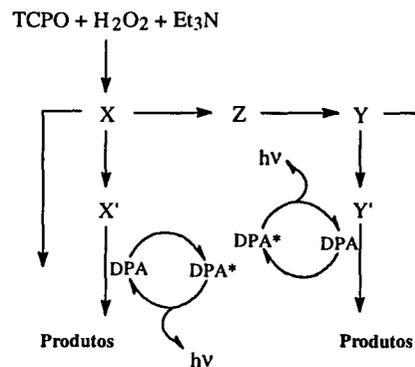
Rauhut^{12c} foi o primeiro autor a verificar a dependência das constantes de formação (k_{obs2}) e de decaimento (k_{obs1}), com a [H₂O₂] e [base]. Também, foi o primeiro a sugerir a ocorrência de um intermediário meta-estável como intermediário de alta energia, a 1,2-dioxetanodiona (11), formulando um mecanismo que envolvia a formação de um complexo de transferência de carga entre o intermediário de alta energia e o ativador, baseando-se na observação de que, quanto menor o E_{ox} ou, quanto menor a energia singlete do ativador, maior o rendimento quântico de quimiluminescência.

Catherall *et al.*^{21b}, estudando a reação de oxalato de bis(pentaclorofenila) com H₂O₂, catalisada por salicilato, em presença de 9,10-difenilantraceno, (i) verificaram que a adição retardada do ativador à reação não modificava a cinética normal, onde o ativador era adicionado previamente, (ii) não propuseram 11 como intermediário de alta energia, mas sim, intermediários do tipo 14, pois não verificaram a ocorrência de um intermediário de alta energia meta-estável, (iii) não observaram quimiluminescência, utilizando anisol como ativador (energia singlete de 426 kJ mol⁻¹, rendimento quântico de fluorescência de 0,29 E mol⁻¹), o que concorda razoavelmente bem com um trabalho anterior de Lechtken e Turro²³, onde foi verificado que o sistema peróxi-oxalato pode gerar estados eletronicamente excitados cuja energia singlete do ativador seja de até 439 kJ mol⁻¹, (iv) determinaram um valor relativo para a constante de transferência de elétron, utilizando 9,10-difenilantraceno, (v) não verificaram correlação entre o rendimento quântico de quimiluminescência e a energia singlete do ativador, (vi) observaram correlação linear entre o rendimento

quântico de quimiluminescência e a $E_{1/2}^{ox}$ (energia potencial de oxidação de meia-onda) dos ativadores 2,5-difeniloxazol, 9,10-dibromoantraceno, 1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)benzeno, antraceno e 9,10-difenilantraceno.



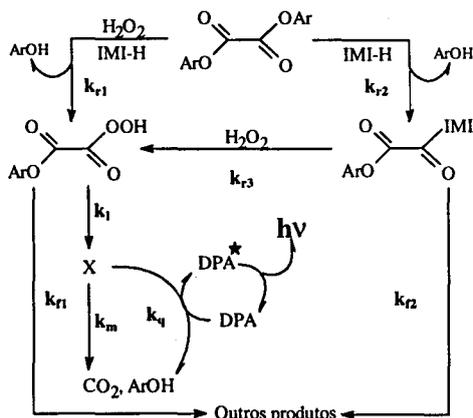
Alvarez *et al.*²⁴, estudando a reação de oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) com H₂O₂, catalisada por trietilamina, em presença de 9,10-difenilantraceno, observaram um comportamento aparentemente oscilatório da emissão de luz. Os mesmos formularam um mecanismo consistente com os resultados, no qual dois intermediários de alta energia, gerados em série, produzem luz (Esquema 7). As curvas cinéticas experimentais foram analisadas numericamente usando-se um modelo cinético, onde há o envolvimento de, no mínimo, dois intermediário de alta energia (X e Y) interligados com um outro intermediário não-quimiluminescente (Z). Os autores propuseram que X seria um intermediário do tipo 12 ou ArOC(OH)(OOH)C(O)OAr, Y seria 11 ou um intermediário do tipo 14 e que Z seria um intermediário do tipo 13. Entretanto, este comportamento oscilatório poderia também ser explicado por uma competição complexa entre as etapas que antecedem a formação do intermediário de alta energia, observada com uma concentração não excessiva de trietilamina, não sendo necessário postular o envolvimento de vários intermediários de alta energia^{25,26}.



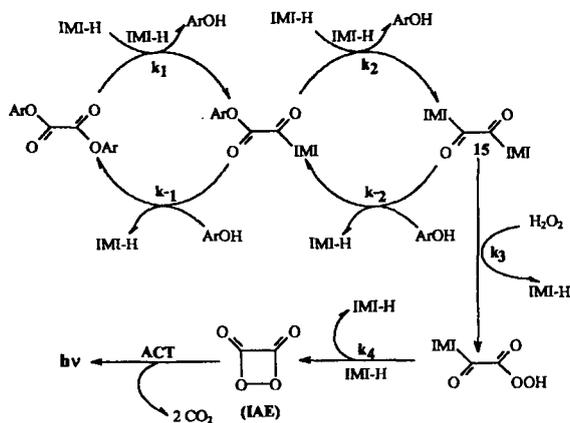
Esquema 7. Esquema mecanístico proposto por Alvarez *et al.*²⁴ para a quimiluminescência do sistema peróxi-oxalato.

Já Orlovic *et al.*²⁷ afirmaram que somente era possível obter uma cinética simplificada para o sistema quando se utilizava quantidade substancial de água (acetonitrila 75%, água 25%), propondo estruturas do tipo 14 como intermediários de alta energia. Os autores erraram ao atribuir a constante de velocidade de formação (k_f) à soma de dois processos k_{f1} e k_{f2} (caso os valores das constantes k_{f3} e k_{f2} sejam bem maiores), que são relacionadas com o ataque de H₂O₂ e imidazol ao oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila), respectivamente. Além disso, os autores erraram na atribuição da constante de decaimento (k_f), pois, segundo os mesmos, esta dever-se-ia à somatória dos processos k_{f1} e k_1 , à decomposição não-quimiluminescente e à transformação do perácido no intermediário de alta energia (Esquema 8). Como mostra um trabalho posterior de Stevani *et al.*²⁵, a constante de formação é relacionada com o ataque nucleofílico do H₂O₂ à carbonila do 1,1'-oxalil-di-imidazol 15 formado pelo ataque do imidazol ao oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila), processo este que, por sua vez, é correlacionado

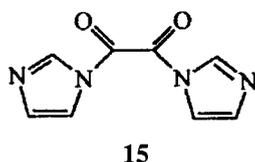
com a constante de decaimento (k_3 , Esquema 9). Ainda mais, no mesmo trabalho, é também mostrado que para $[H_2O_2] < 20$ mM o ataque direto do peróxido de hidrogênio à carbonila do oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (k_{r1} , Esquema 8) é desprezível.



Esquema 8. Esquema mecânico proposto por Orlovic et al.²⁷ para a quimiluminescência do sistema peróxi-oxalato.



Esquema 9. Esquema mecânico proposto por Stevani et al.²⁵ para a quimiluminescência do sistema peróxi-oxalato.

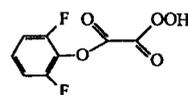


15

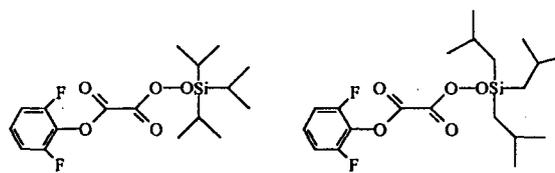
O trabalho de Chokshi et al.²⁸ é uma exceção dentre os trabalhos cinéticos, pois é o primeiro em que se obtêm evidências mais diretas sobre a estrutura do intermediário de alta energia envolvido. Utilizando a reação de oxalato de bis(2,6-difluorofenila) com H_2O_2 , em acetonitrila:água (3:1), monitorada por RMN ^{19}F , os autores encontraram um sinal diferente do próprio oxalato de bis(2,6-difluorofenila), ou do fenol advindo da reação, que diminuía de intensidade em presença de dansilfenilalanina, utilizado como ativador. Tal sinal foi atribuído como sendo devido ao derivado perácido (16), o qual reage diretamente com o ativador, levando à formação de estados excitados deste último. Sendo assim, estes autores consideraram derivados perácidos do tipo 12 como intermediários de alta energia na reação peróxi-oxalato.

Em um trabalho recente, Hohman et al.²⁹ obtiveram derivados do intermediário 12 protegidos por grupos silila, O,O-tri-

isopropilsilil monoperóxalato de 2,6-difluorofenila (17) e O,O-tri-isobutilsilil monoperóxalato de 2,6-difluorofenila (18). Tentativas de purificação dos compostos 17 e 18 não obtiveram êxito, devido à labilidade dos mesmos. Apesar disso, foram feitos alguns experimentos cinéticos, utilizando fluoreto de tetrabutylamônio como agente desprotetor e em presença de 9,10-difenilantraceno, que demonstraram haver emissão de luz após a desproteção, apesar da má reprodutibilidade das curvas de decaimento. Hohman et al.²⁹ concluíram que, após a liberação do percarboxilato de 17 ou 18, ocorre rápida interação destes com o ativador, ou seja, o percarboxilato de 17 ou 18 é o intermediário de alta energia. Porém, o artigo publicado não mostra nenhum experimento mais minucioso como, por exemplo, um estudo da influência da concentração do ativador sobre a cinética de decaimento. Por outro lado, em um trabalho recente do nosso grupo foi claramente demonstrado que intermediários do tipo 12 não são intermediários de alta energia neste sistema[†].



16



17

18

Uma das bases mais utilizadas nos estudos cinéticos sobre o sistema peróxi-oxalato é o imidazol (IMI-H). Dentre os motivos pelos quais ele é tão utilizado destacam-se sua solubilidade (imidazol é solúvel tanto em água, quanto em diversos solventes orgânicos), o fato de poder agir como base e como catalisador nucleofílico e, principalmente, a reprodutibilidade dos experimentos cinéticos.[‡]

Dos estudos cinéticos com IMI-H publicados até o presente, apesar de conterem alguns resultados contraditórios e interpretações mecânicas diferentes, é possível extrair os pontos de convergência e formular um mecanismo geral para o sistema peróxi-oxalato (Esquema 9). A seguir serão resumidas as interpretações mecânicas mais importantes, sobre as quais há um consenso na literatura.

- Através da relação k_{obs1} vs. $[IMI-H]$, foi estabelecida uma dependência de segunda ordem com a concentração de imidazol, do tipo $k_{obs1} = k [IMI-H]^2$ ^{25,30,31}. Tal comportamento deve-se à ocorrência de uma catálise básica geral do imidazol sobre o ataque nucleofílico do imidazol à carbonila do éster oxálico, o chamado "ataque nucleofílico de imidazol catalisado pelo próprio imidazol"³². Utilizando imidazol como catalisador ocorre a substituição dos dois grupos fenólicos do éster, levando à formação de 15 (Esquema 9) seguida da reação deste com H_2O_2 ^{25,30,31}.
- Com a variação da $[H_2O_2]$, mantendo-se a concentração dos demais reagentes constante, foi observado que k_{obs1} (Figura 1)

[†] Deve-se deixar claro aqui, o que chamamos de intermediário de alta energia. É um dos intermediários, dentre os muitos participantes no sistema peróxi-oxalato, que interage com o ativador, provavelmente pela seqüência mecânica CIEEL, gerando o estado S_1 deste.

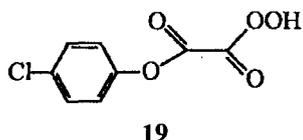
[‡] É interessante notar que o sítio ativo de diversas enzimas hidrolíticas e da luciferase possuem imidazol na forma de histidina, embora isso não esteja relacionado com a utilização de imidazol no sistema peróxi-oxalato.

não dependia da $[H_2O_2]$, pelo menos até uma certa concentração, e que a relação k_{obs2} vs. $[H_2O_2]$ era linear. Tais resultados mostram que a constante de velocidade de formação (k_{obs2}) é relacionada com o ataque de H_2O_2 a **15** (Esquema 9)²⁵.

- Trabalhos bem recentes, como os de Hadd *et al.*³³ e de Neuvonen²⁶, indicam o envolvimento de **15** no processo de formação do intermediário de alta energia. A reação de **15** com H_2O_2 leva rapidamente à produção do intermediário de alta energia, provavelmente **11**, passando, logicamente, por um perácido do tipo IMI-C(O)C(O)OOH. Dessa forma, este perácido e **15** constituem os intermediários-chave na produção do intermediário de alta energia.
- Em todos os trabalhos cinéticos acerca do sistema peróxi-oxalato não se verificou variação das constantes de velocidade observadas com a variação da concentração do ativador, pois as etapas anteriores, como já foi dito, são lentas, quando comparadas com a etapa onde ocorre a interação do ativador com o intermediário de alta energia.

Como já foi dito, nos trabalhos iniciais de investigação do sistema, **11** foi postulado como intermediário meta-estável, o qual excita o ativador com o envolvimento de um complexo de transferência de carga^{12c}. Entretanto, outros autores falharam em detectar a ocorrência de um intermediário meta-estável nesta reação^{25,34}. Tais resultados confirmam a extrema sensibilidade do intermediário de alta energia, eventualmente **11**, a traços de impurezas presentes no sistema.

Em trabalhos recentes realizados no nosso grupo, foi sintetizado e caracterizado um composto análogo ao intermediário tipo **12**, o O,O-hidrogênio monoperóxalato de 4-clorofenila (**19**)³⁵. Pôde-se comprovar que **19**, em presença de um ativador (*i.e.* rubreno, 9,10-difenilantraceno, perileno), não emite luz, o que exclui, definitivamente, intermediários do tipo **12** como intermediários de alta energia³⁵. **19** somente exhibe quimiluminescência em presença de um ativador e de bases com pK_a adequado ($pK_a > 6$). Tal fato sugere que deve ocorrer uma reação química anterior à emissão, provavelmente uma ciclização, que dá origem ao intermediário de alta energia. Dos estudos cinéticos da reação de **19** com diversas bases [*i.e.* imidazol, *p*-clorofenolato e *t*-butóxido de potássio e 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno], observando-se a emissão de luz em presença de 9,10-difenilantraceno ou a absorção, a 292 nm, do *p*-clorofenol formado, puderam ser formulados esquemas mecanísticos dos processos que antecedem a etapa de quimi-excitação, obtendo-se evidências indiretas para a ocorrência de **11** como intermediário de alta energia³⁶.



Em um estudo adicional foram determinados os rendimentos quânticos de quimiluminescência da reação de **19** com imidazol, em presença de sete ativadores com diferentes potenciais de oxidação: rubreno, perileno, 9,10-dimetoxiantraceno, 9,10-difenilantraceno, 9,10-dicianoantraceno, antraceno e 2,5-difeniloxazol, com o objetivo de obter informações sobre a etapa de quimi-excitação, a etapa onde ocorre a interação entre o intermediário de alta energia e o ativador, com a formação de estados excitados. O rendimento quântico de quimiluminescência em concentrações infinitas de ativador e a constante de velocidade de transferência de elétron correlacionam-se linearmente com o potencial de oxidação dos ativadores comumente utilizados^{37,38}. Estes resultados evidenciam uma transferência de elétron entre o intermediário de alta energia, formado pela reação de **19** com imidazol, e os ativadores utilizados, o que

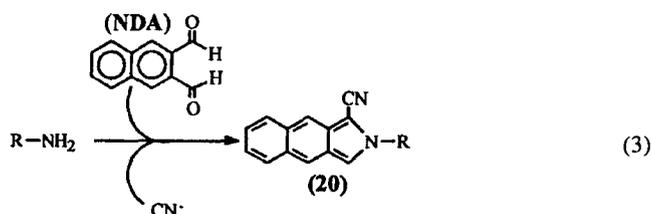
está de acordo com o mecanismo CIEEL. Porém, quando em presença do ativador 9,10-dimetóxi-antraceno e, especialmente, em presença de 9,10-dicianoantraceno, os quais não são ativadores comumente utilizados em estudos sobre o mecanismo CIEEL, foram observados desvios significativos do comportamento previsto por este mecanismo^{37,38}. Portanto, estes dados mostram a necessidade de evidências experimentais adicionais, utilizando um sistema eficiente como o peróxi-oxalato, para poder acumular mais resultados a favor, ou contra, a validade do atraente e controverso mecanismo CIEEL.

Aplicações do Sistema Peróxi-Oxalato

A primeira aplicação prática do sistema peróxi-oxalato foi na produção de "light sticks", que são bastões de plástico contendo os reagentes necessários para a reação quimiluminescente, otimizados quanto aos reagentes, quantidade e solvente. Ao quebrar-se um tubo no interior do bastão, provavelmente contendo H_2O_2 e uma base, a reação inicia-se, podendo emitir luz por até 48h. Com certeza, esta foi a primeira aplicação, pois o sistema foi descoberto por Michael M. Rauhut, funcionário da American Cyanamid Co., empresa que produz até hoje os "light sticks". Rauhut também produziu "cápsulas de aviso contra a infiltração de tropas" para a marinha americana⁶. Tais cápsulas foram desenvolvidas contendo um éster oxálico, um ativador e uma fonte de peróxido de hidrogênio, no caso um derivado da antra-hidroquinona, que, em contato com o ar, produz H_2O_2 .

De maneira geral, o sistema peróxi-oxalato é útil na análise quantitativa de: H_2O_2 , ou reações que o produzam; compostos aromáticos fluorescentes com baixos potenciais de oxidação; e compostos que possam suprimir a emissão de luz. Uma vez que o sistema peróxi-oxalato emite luz, em presença de concentrações muito baixas de H_2O_2 (limite de detecção de 70 nM), pode-se, por exemplo, medir a concentração de glicose pela reação com glicose oxidase, que produz H_2O_2 ,² ou determinar H_2O_2 em águas de chuva³⁹. Mais recentemente, foram feitas tentativas de se utilizar o sistema peróxi-oxalato para a análise de vários íons metálicos⁴⁰, entretanto, as metodologias não parecem ainda muito bem estabelecidas⁴¹.

Uma outra aplicação analítica é a detecção de compostos aromáticos fluorescentes com baixos potenciais de oxidação, realizada em HPLC, através da técnica denominada "post-column derivatization", que possibilita detecção de até 1 fmol de certos compostos. Através desta técnica, é possível quantificar diversos compostos aromáticos fluorescentes diretamente ou, outras substâncias, após uma reação de derivatização. Um sistema derivatizante bem interessante é o naftaleno-2,3-dialdeído/cianeto (NDA/CN)⁴², utilizado na quantificação de aminoácidos e peptídeos. Através da derivatização, o composto **20** passa a atuar como o ativador, que, em presença dos demais reagentes necessários emite luz (Equação 3).



Atualmente, é grande a utilização do sistema peróxi-oxalato como ferramenta analítica na detecção e quantificação de compostos orgânicos, presentes nos mais variados meios. A Tabela I mostra alguns exemplos ilustrativos de aplicação do sistema peróxi-oxalato, recentemente publicados, relacionados com a quantificação de diversos analitos. Artigos recentes de revisão ressaltam a importância da quimiluminescência acoplada com

HPLC na determinação de uma infinidade de substâncias, como é o caso dos artigos de Bowie *et al.*⁴³ e Orosz *et al.*⁴⁴, dos quais constam diversos métodos de determinação utilizando o sistema peróxi-oxalato.

Tabela 1. Aplicações analíticas do sistema peróxi-oxalato na determinação de diversos analitos.

Determinação	Método	Utilização	Ref.
derivados psicotrópicos de indol (p.ex. psilocina)	HPLC, após derivatização cloreto de dansila	determinação de psilocina em cogumelo	45
colesterol	HPLC	determinação em soro humano	46
bilirubina	HPLC	determinação em soro humano	47
oxalato	HPLC	determinação em soro humano	48
catecolaminas	HPLC	p.ex. determinação de adrenalina em soro humano	49
urobilina	HPLC	determinação em soro humano	50

CONCLUSÃO

Dos estudos sobre o sistema peróxi-oxalato, conclui-se que o mecanismo das transformações que ocorrem no estado fundamental pode ser considerado bem estudado e, relativamente bem conhecido. Já o mecanismo do "passo de excitação", no qual ocorre a formação de estados eletronicamente excitados, e a natureza do intermediário de alta energia, o qual é responsável pela excitação do ativador, ainda são sujeitos a controvérsias. Dos estudos cinéticos com imidazol como base pode-se propor um esquema mecanístico simplificado, o qual está de acordo com todos os resultados cinéticos obtidos (Esquema 9). Este esquema foi primeiramente proposto por nosso grupo²⁵ e parece ter sido aceito de maneira geral pelos pesquisadores da área conforme mostram alguns trabalhos recentes^{26,33}. Um ponto ainda polêmico é a estrutura do intermediário de alta energia. Na maioria dos trabalhos cinéticos até 1996 foram favorecidas estruturas como **12** e **14** como intermediário de alta energia, considerando-se também várias estruturas interconversíveis, seguindo a sugestão de Alvarez *et al.*²⁴. Entretanto, os perfis cinéticos obtidos por estes autores podem ser explicados também por uma competição complexa entre os vários passos cinéticos lentos, que ocorrem antes do passo de excitação. Em um trabalho cinético sobre o sistema peróxi-oxalato propusemos que o intermediário de alta energia fosse a 1,2-dioxetanodiona (**11**), seguindo-se a sugestão inicial de Rauhut *et al.*¹². Apesar de não termos obtido evidências diretas para a ocorrência de **11** como intermediário de alta energia, foram apresentadas evidências indiretas e argumentos baseados nas propriedades conhecidas de peróxidos cíclicos a favor da estrutura **11** como intermediário de alta energia. Esta argumentação foi reforçada pelas evidências obtidas em um estudo cinético do derivado perácido **19**^{35,36}. Além disso, nestes estudos foi claramente comprovado que perácidos do tipo **12** não podem ser o intermediário de alta energia na quimiluminescência da reação peróxi-oxalato. Também neste caso, a argumentação usada nos trabalhos recentes^{26,33} mostra a boa aceitação de nossa proposta pelos pesquisadores da área. Entretanto,

deve-se mencionar que alguns autores^{28,29} ainda favorecem as estruturas de perácidos do tipo **12** como sendo as do intermediário de alta energia.

O mecanismo do passo de quimi-excitação no sistema peróxi-oxalato, entretanto, ainda não foi bem esclarecido. Existem evidências de que este passo envolva o mecanismo CIEEL, pois ocorre uma transferência de elétron entre o intermediário de alta energia e o ativador. Porém, existem poucos trabalhos que tentam elucidar o mecanismo do passo de excitação. Em um estudo de nosso grupo foram obtidas evidências da ocorrência de tal transferência de elétron, ao se utilizarem os ativadores mais comuns em estudos sobre o mecanismo CIEEL³⁷. Entretanto, utilizando-se ativadores incomuns, foi observado um comportamento diferente daquele previsto pelo mecanismo CIEEL, fato que reforça a necessidade de informações adicionais para comprovar ou excluir a ocorrência do mecanismo CIEEL na quimiluminescência da reação peróxi-oxalato.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dr. Daisy de Brito Rezende pelas valiosas sugestões químicas e gramaticais. Ao CNPq, FINEP-PADCT e a FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA

1. Wiedemann, E.; *Ann. Phys. Chem.* **1888**, *34*, 446.
2. Campbell, A. K.; *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*; Weinheim; Deerfield Beach, FL: VCH; Chichester: Horwood, 1988.
3. Gmelin; *Handbook of Inorganic Chemistry* **1966**, *16 P*, 24.
4. Radziszewski, Br.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *10*, 70.
5. Hercules, D. M.; *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 301.
6. Gundermann, K. D.; *Chemiluminescence in Organic Chemistry*; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1987.
7. Adam, W.; Cilento, G.; *Chemical and Biological Generation of Excited States*, Academic Press, New York, 1982; Adam, W.; Cilento, G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 529.
8. McCapra, F.; *Chem. Commun.* **1968**, 155.
9. Staudinger, H.; *Chem. Ber.* **1925**, *58*, 1075; Staudinger, H.; Dyckerhoff, K.; Klever, H. W.; Ruzicka, L.; *Chem. Ber.* **1925**, *58*, 1079.
10. Kopecky, K. R.; Mumford, C.; Abstracts, 51st Annual Conference of the Chemical Institute of Canada, Vancouver - B.C., 1968, p. 41.
11. Kopecky, K. R.; Van de Sande, J. H.; Mumford C.; *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 709.
12. a) Rauhut, M. M.; Sheehan, D.; Clarke, R. A.; Semsel, A. M.; *Photochem. Photobiol.* **1965**, *4*, 1097; b) Rauhut, M. M.; Bollyky, L. J.; Roberts, B. G.; Loy, M.; Whitman, R. H.; Iannotta, A. V.; Semsel, A. M.; Clarke, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 6515; c) Rauhut, M. M.; *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 80.
13. a) Schuster, G. B.; *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 366; b) Schuster, G. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5851; c) Schuster, G. B.; Schmidt, S. P.; *Adv. Phys. Org. Chem.* **1982**, *18*, 187.
14. Koo, J-Y; Schuster, G. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4496.
15. Scandola, F.; Balzani, V.; Schuster, G. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2519.
16. Faulkner, L. R.; Glass, R. S.; Em *Chemical & Biological Generation of Excited States*; Adam, W.; Cilento, G. eds.; Academic Press, New York, 1982, p. 197.
17. Koo, J-y; Schmidt, S. P.; Schuster, G. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 30.
18. McElroy, W. D.; Seliger, H. H.; White, E. H.; *Photochem. Photobiol.* **1969**, *10*, 153.

19. Catalani, L. H.; Wilson, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2633.
20. Wilson, T.; *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 601.
21. a) Catherall, C. L. R.; Palmer, T. F.; Cundall, R. B.; *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, *3*, 147; b) Catherall, C. L. R.; Palmer, T. F.; Cundall, R. B.; *J. Chem. Soc. Faraday II* **1984**, *80*, 823, 836.
22. Chandross, E. A.; *Tetrahedron Lett.* **1963**, 761.
23. Lechtken, P.; Turro, N. J.; *Mol. Photochem.* **1974**, *6*, 95.
24. Alvarez, F. J.; Parekh, N. J.; Matuszewski, B.; Givens, R. S.; Higuchi, T.; Schowen, R. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6435.
25. Stevani, C. V.; Lima, D. F.; Toscano, V. G.; Baader, W. J.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 989.
26. Neuvonen, H.; *J. Biolumin. Chemilumin.* **1997**, *12*, 241.
27. Orlovic, M.; Schowen, R. L.; Givens, R. S.; Alvarez, F.; Matuszewski, B.; Nikhil, P.; *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3606.
28. Chokshi, H. P.; Barbush, M.; Carlson, R. G.; Givens R. S.; Kuwana, T.; Showen, R. L.; *Biomed. Chromatog.* **1990**, *4*, 96.
29. Hohman, J. R.; Givens, R. S.; Carlson, R. G.; Orosz, G.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8273.
30. Neuvonen, H.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1987**, 159. Neuvonen, H.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 945, 951.
31. Hadd, A. G.; Birks, J. W.; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2657.
32. Kirsch, J. F.; Jencks, W. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 833, 837.
33. Hadd, A. G.; Robinson, A. L.; Rowlen, K. L.; Birks, J. W.; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3023.
34. White, E. H.; Wildes, P. D.; Wiecka, J.; Doshan, H.; Wei, C. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7050.
35. Stevani, C. V.; Campos, I. P de A.; Baader, W. J.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 1645.
36. Stevani, C. V.; Baader, W. J.; *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 593.
37. Baader, W. J.; Lima, D. F.; Stevani, C. V.; *em Chemiluminescence and Bioluminescence*; eds. Hastings, J.W.; Kricka, L.J.; Stanley, P.E.; John Wiley & Sons, 1996, p. 16.
38. Stevani, C. V.; *Tese de Doutorado*, Instituto de Química - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1997.
39. a) Quab, U.; Klockow, D.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1995**, *60*, 361; b) Zoonen, P. B.; Kamminga, D. A.; Gooijer, C.; Velthorst, N. H.; Frei, R. W.; Gübtiz, G.; *Anal. Chim. Acta* **1985**, *174*, 151.
40. a) Steijger, O. M.; Rodenburg, P. H. M.; Lingeman, H.; Brinkman, U. A. Th.; Holthuis, J. J. M.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 233; b) Steijger, O. M.; Nieuwenboer, H. C. M. den; Lingeman, H.; Brinkman, U. A. Th.; Smilde, A. K.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *320*, 99; c) Sato, K.; Tanaka, S.; *Microchem. J.* **1996**, *53*, 93.
41. Nakamura, M. M.; *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1998.
42. Givens, R. S.; Jencen, D. A.; Riley, C. M.; Stobaugh, J. F.; Chokshi, H.; Hanaoka, N.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1990**, *8*, 477.
43. Bowie, A. R.; Sanders, M. G.; Worsfold, P. J.; *J. Biolumin. Chemilumin.* **1996**, *11*, 61.
44. Orosz, G.; Givens, R. S.; Schowen, R. L.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1996**, *26*, 1.
45. Cepas, J., Silva, M.; Perez-Bendito, D.; *Analyst* **1996**, *121*, 49.
46. Mike, J. H.; Cleland, T. J.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *259*, 73.
47. Wu, N.; Horvath, W. J.; Huie, C. W.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *269*, 99.
48. Albrecht, S.; Hornak, H.; Freidt, T.; Boehm, W. D.; Weis, K.; Reinschke, A.; *J. Biolumin. Chemilumin.* **1993**, *8*, 21.
49. Prados, D.; Santa, T.; Homma, H.; Imai, Z.; *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 575.
50. Yokoyama, S.; Yokoyama, K.; Takeuchi, T.; Tamiya, E.; Karube, I.; *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **1994**, *15A*, 433.