

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Joyce Rodrigues Abrantes

**SISTEMA QUIMILUMINESCENTE PERÓXI-
OXALATO, SUAS POSSIBILIDADES E
CAMINHOS DE PESQUISA A PARTIR DE 2010:
UMA REVISÃO**

Santo André
JULHO – 2021

Joyce Rodrigues Abrantes

SISTEMA QUIMILUMINESCENTE PERÓXI- OXALATO, SUAS POSSIBILIDADES E CAMINHOS DE PESQUISA A PARTIR DE 2010: UMA REVISÃO

Monografia de Trabalho de
Conclusão de Curso, apresentado ao
Bacharelado em Química da UFABC
para obtenção do título de Bacharel
em Química.

Orientador: Prof^a Dr^a Patrícia Dantoni

ASSINATURA
DISCENTE

ASSINATURA
ORIENTADOR

Abrantes, Joyce Rodrigues.

**SISTEMA QUIMILUMINESCENTE PERÓXI-OXALATO, SUAS
POSSIBILIDADES E CAMINHOS DE PESQUISA A PARTIR DE 2010: UMA
REVISÃO**

Joyce Rodrigues Abrantes - Santo André: UFABC, 2021

53 páginas

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meus pais, Gildete e Francisco, meus irmãos, Felipe e Nathalia, meu namorado, Willian por todo o apoio que eles me deram não só durante o período da escrita do TCC, mas de toda a graduação. Foram noites mal dormidas, preocupação, dificuldades e que com o carinho deles eu consegui chegar até aqui.

Aos meus amigos, Mariana, Victor, Mike, Ingrid, Roquette, Cleiton e Noádia por serem as pessoas que passaram pelo mesmo que eu passei e foram o meu suporte dentro da Universidade para que eu tivesse ânimo e coragem quando passava por momentos difíceis, e ao mesmo tempo com quem eu dividia minhas maiores alegrias.

Ao meu companheiro de Licenciatura e de pesquisa, Leonardo, que me ajudou neste trabalho e esteve comigo na jornada de fazer dois cursos específicos dentro da UFABC.

À minha orientadora, Patrícia Dantoni, por ter aceitado me orientar, ter me dado ótimas dicas, conselhos e acima de tudo pela paciência e respeito durante o processo da escrita do TCC. Eu passei por momentos complicados, principalmente por conta desse período de pandemia que estamos vivendo e ela foi extremamente compreensiva e me apoiou sempre. Obrigada.

Aos professores que fizeram parte da banca de avaliação, André Sarto Polo e Fernando Heering Bartoloni.

À Semana da Química, tanto pela experiência de construir esse lindo evento dos cursos de Licenciatura e Bacharelado em Química da UFABC, quanto pelas pessoas incríveis que eu pude conhecer e por quem eu tenho um imenso carinho, Mamud, Cadu, João e Leo.

E por último, à UFABC por ter me dado a possibilidade de crescer como profissional, futura docente e principalmente como pessoa. Tive a oportunidade de entrar em contato com muitos conhecimentos, não só os que envolvem minha

graduação, mas de outros cursos que fizeram toda a diferença na minha vida hoje. E ainda pude alimentar um outro amor meu, o canto, no Coro da UFABC que fez com que esses 6 anos fossem muito melhores.

RESUMO

Este trabalho de conclusão de curso apresenta, por meio de uma Revisão Bibliográfica, os estudos realizados acerca do Sistema Quimiluminescente Peróxi-Oxalato no período de 2010 a 2020. Tendo por objetivo identificar como o sistema é estudado e aplicado, analisou-se o conteúdo de artigos, teses e dissertações. Por meio das informações obtidas, verificou-se que as pesquisas estão mais voltadas para estudos de mecanismo, cinética e aplicações analíticas. De forma geral, os reagentes utilizados são o oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO) como derivado de ácido oxálico, peróxido de hidrogênio e um fluoróforo, o mais usado é o 9,10-difenilantraceno (DPA). As pesquisas que possuem reagentes diferentes são, em sua maioria, trabalhos que buscam estudar novos fluoróforos e/ou derivados do ácido oxálico que podem ter uma futura aplicação específica. Para o estudo dos fluoróforos e mecanismos, informações de rendimento quântico aparecem nas pesquisas. Um dos fluoróforos tem destaque na discussão deste trabalho, qual seja, a Hipericina, que apresenta grande potencial para ser utilizado no sistema. Observou-se, nos últimos anos, um grande aumento do uso de meios aquosos ou parcialmente aquosos nesses estudos, variações de solução-tampão e aplicações em estudos de quantificação de analitos diversos e relacionados a meios biológicos com foco em pesquisas com células tumorais.

Palavras-chave: Quimiluminescência, Sistema Quimiluminescente Peróxi-oxalato, Fluoróforos, Hipericina.

ABSTRACT

This course conclusion work presents, through a Bibliographic Review, the studies carried out on the Peroxy-Oxalate Chemiluminescent System in the period from 2010 to 2020. Aiming to identify how the system is studied and applied, the content of articles, theses and dissertations were analyzed. Through information obtained, it was found that research is more focused on studies of mechanism, kinetics and analytical applications. In general, the reagents used are bis(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate (TCPO) as a derivative of oxalic acid, peroxide and a fluorophore, the most used is 9,10-diphenylanthracene (DPA). Researches that have different reagents are mostly works that seek to study new fluorophores and/or oxalic acid derivatives that may have a specific future application. For the study of fluorophores and mechanisms, quantum yield information appears in research. One of the fluorophores is highlighted in the discussion of this work, namely, Hypericin, which has great potential to be used in the system. In recent years, there has been a great increase in the use of aqueous or partially aqueous media for studies, variations of buffer solution and applications in studies of quantification of various analytes and related to biological media with a focus on research with tumor cells.

Keywords: Chemiluminescence, Chemiluminescent peroxioxalate system, Fluorophores, Hypericin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis caminhos para a oxidação do luminol	13
Figura 2 - Estrutura do fluoróforo DPA	14
Figura 3 - Estrutura da 1,2-dioxetanodiona (IAE do sistema QL-PO)	16
Figura 4 - Estrutura TCPO	16
Figura 5 - Estrutura Imidazol	16
Figura 6 - Formação da 1,2-dioxetanodiona	17
Figura 7 - Mecanismo CIEEL do sistema QL-PO	18
Figura 8 - Estrutura rubreno	29
Figura 9 - Estrutura fluoresceína	29
Figura 10 - Estrutura 2,5-difeniloxazol	29
Figura 11 - Estrutura perileno	29
Figura 12 - Estrutura antraceno	29
Figura 13 - Estrutura 9,10-dibromoantraceno	29
Figura 14 - Estrutura 9,10-bis(feniletinil)antraceno	29
Figura 15 - Estrutura 9-cloroantraceno	29
Figura 16 - Estrutura 9,10-dicianoantraceno	29
Figura 17 - Estrutura rodamina B	29
Figura 18 - Estrutura rodamina 6G	29
Figura 19 - Estrutura da hipericina	31
Figura 20 - Diagrama de Jablonski	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fluoróforos mais usados no sistema QL-PO entre 2010 e 2020	30
Tabela 2 - Rendimentos Quânticos	38
Tabela 3 - Trabalhos que utilizam intensidade de fluorescência e quimiluminescência	41

LISTA DE SIGLAS

ANT: Antraceno

BPEA: 9,10-bis(feniletinil)antraceno

CD: Ciclodextrina

CIEEL: Chemically Initiated Electron Exchange Luminescente

CLA: 9-cloroantraceno

CPPO: Oxalato de bis(2-carbopentiloxi-3,5,6-triclorofenil)

DBA: 9,10-dibromoantraceno

DCNA: 9,10-dicianoantraceno

DME: Dimetil éter

DPA: 9,10-difenilantraceno

EC: Eletroforese Capilar

FIA: Análise por injeção de fluxo

FLU: Fluoresceína

HP: *Hypericum perforatum* L.

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HYP: Hipericina

IAE: Intermediário de Alta Energia

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

Nm: Nanômetro

PBS: Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

PER: Perileno

PPO: 2,5-difeniloxazol

QL-PO: Sistema Quimiluminescente Peróxi-oxalato

RUB: Rubreno

TCPO: Oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila)

THF: Tetraidrofurano

UFABC: Universidade Federal do ABC

USP: Universidade de São Paulo

UV-Vis: Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Quimiluminescência.....	12
1.1.1. Sistema quimiluminescente peróxi-oxalato.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Geral.....	18
2.2. Específicos.....	18
3. METODOLOGIA.....	19
4. ABORDAGENS PARA USO DO SISTEMA QUIMILUMINESCENTE PERÓXI- OXALATO.....	20
4.1. Sistemas Mais Empregados.....	24
4.2. Metodologias Mais Empregadas.....	25
4.3. Sistemas Emergentes.....	26
5. FLUORÓFOROS.....	27
5.1. Fluoróforos Empregados no Sistema QL-PO e suas Características.....	28
5.2. Hipericina.....	32
6. PRINCIPAIS INSTRUMENTOS.....	33
6.1. Luminômetro.....	34
7. RENDIMENTO QUÂNTICO E INTENSIDADE DE SINAIS.....	35
7.1. Rendimento Quântico de Fluorescência e Rendimento Quântico e Quimiluminescência.....	35
7.2. Intensidade de Fluorescência e Intensidade de Quimiluminescência.....	39
8. APLICAÇÕES DO SISTEMA QL-PO ATUALMENTE.....	42
9. CONCLUSÃO.....	44
10. REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A introdução deste trabalho de conclusão de curso apresentará o histórico da quimiluminescência e depois o funcionamento do sistema quimiluminescente peróxido-oxalato (QL-PO).

1.1. Quimiluminescência

Não é de hoje que fenômenos luminescentes são descritos, isso ocorre desde a Antiguidade, porém eles eram atribuídos a personagens mitológicas, fantasmas, figuras etéreas. Um marco dentro das reações que emitem luz foi a produção de fósforo partindo da destilação exaustiva da ureia. O produto da destilação oxida em contato com o gás oxigênio presente no ar e emite luz. Essa reação quimiluminescente foi descrita pelo médico Henning Brandt no ano de 1669 [1, 2, 3].

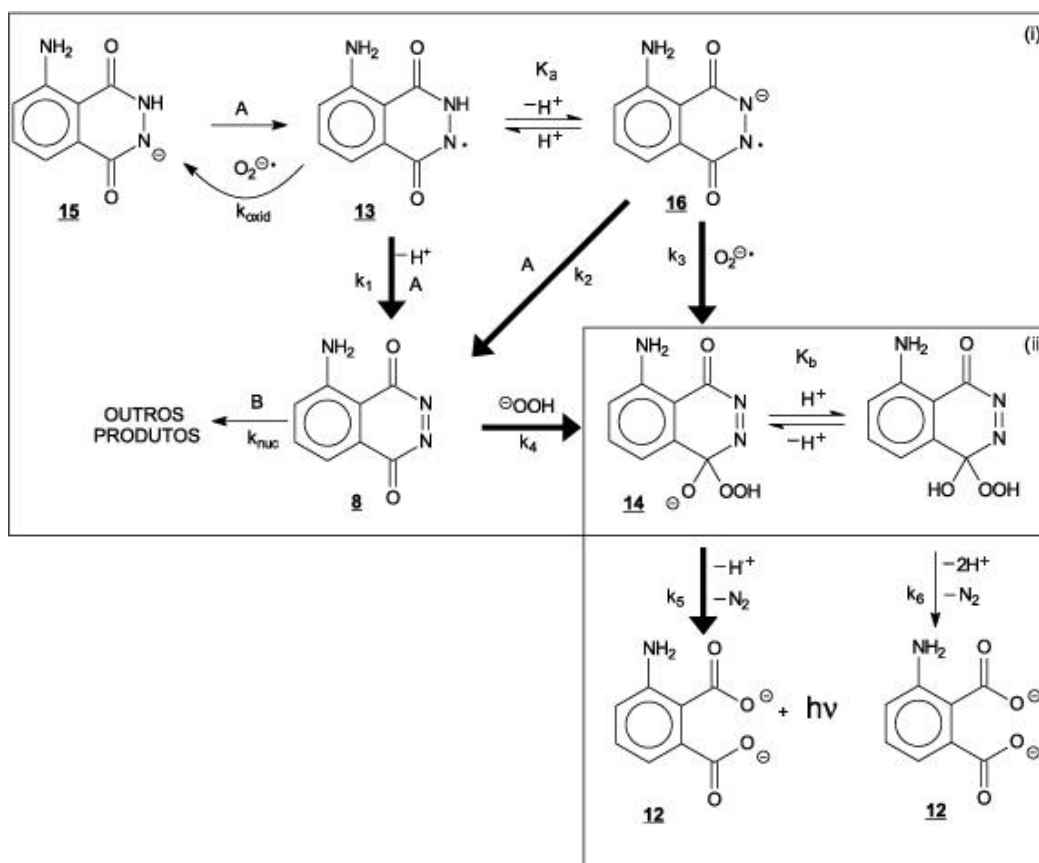
No final da década de 1880 os cientistas Radziszewski e Wiedemann se tornaram importantes para os estudos de luminescência. Radziszewski conseguiu descrever o primeiro composto orgânico luminescente sintético, já Wiedemann definiu o que é a luminescência. O primeiro composto ficou conhecido como lofina (também conhecida por 2,4,5 1*H*-trifenilimidazol) e a partir dos experimentos realizados em 1887 foi possível afirmar que tal substância não emite luz após aquecimento, mas sim em condições básicas e sem a presença de oxigênio. Essa afirmação fez diferença para que Wiedemann, em 1888, verificasse que incandescência e quimiluminescência são fenômenos distintos e então ele definiu o segundo termo como *uma emissão de luz proveniente de processos químicos* [2, 3, 4, 5, 6]. É importante chamar atenção para o fenômeno da bioluminescência, que é um processo de quimiluminescência que ocorre em alguns organismos vivos. Essa capacidade foi desenvolvida por esses organismos por vários motivos, dentre eles, pode-se chamar atenção da predação, reprodução e sobrevivência. As reações que ocorrem para essa emissão de luz são catalisadas por processos enzimáticos [7].

Já no século XX, mais precisamente em 1928, o cientista Albrecht publicou um trabalho onde o luminol (ou 5-amino-2,3-dihidroftalazin-1,4-diona) era oxidado por peróxido de hidrogênio em meio alcalino [1, 2].

Desde então, estudar o mecanismo dessa reação luminescente foi um caminho cada vez mais seguido. E partindo de modelos computacionais, estudos cinéticos, técnica de radiólise (que emprega a radiação ionizante para produzir radicais que possam iniciar reações ou para decomposição de substâncias), dentre outras metodologias, foram propostos vários mecanismos da reação quimiluminescente que convergem na formação de um importante intermediário chamado diazoquinona (**8**, figura 1). Esse intermediário dará origem ao intermediário principal, alfa-hidróxi-hidroperóxido (**14**, figura 1) que por fim formará o diânion do ácido ftálico (**12**, figura 1), liberando energia na forma de luz. O processo de oxidação do luminol para a emissão de luz é dependente da concentração de peróxido de hidrogênio e do pH do meio [2].

Existem dois caminhos diferentes propostos para a formação do intermediário principal (figura 1). O começo da proposição é a oxidação do monoânion do luminol (**15**, figura 1) por uma espécie denominada A, capaz de “receber” elétrons, gerando um radical (**13**, figura 1). O radical formado possui um equilíbrio com sua forma desprotonada (**16**, figura 1). A partir desse momento, o caminho (i) ocorrerá se a concentração de O_2 no meio for maior que H_2O_2 , porque este favorece a formação do superóxido, ou o caminho (ii) quando a concentração de H_2O_2 é maior, pois neste caso há uma modificação na cinética que favorece a reação entre HO_2^- e diazoquinona [2].

Figura 1 - Possíveis caminhos para oxidação do Luminol

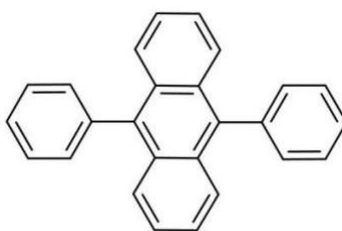


Fonte: Retirada de Rossi e Ferreira, 2002 [2]

Hoje, o luminol possui inúmeras aplicações no meio científico, como estudos que determinam e até quantificam metais de transições, peróxido de hidrogênio, calibração de luminômetro, análises que utilizam injeção por fluxo, imunoenaios, estudos cinéticos, dentre outros [2]. Numa busca pelo termo luminol na base de dados Web of Science, entre 2010 e 2020 foram 2751 artigos que usavam o luminol na pesquisa. No ano de 2021, 116 publicados até o mês de julho. O luminol ainda é muito empregado na área da química forense, principalmente por ajudar a identificar sangue em cenas de crime e essa aplicação é extremamente apresentada em séries e filmes de investigação criminal [8].

Anos depois da primeira publicação de uma reação quimiluminescente, em 1963, Edwin A. Chandross publica um artigo pioneiro. Nele, Chandross apresenta o sistema peróxi-oxalato, explicando que ao reagir cloreto de oxalila e peróxido de hidrogênio na presença de 9,10-difenilantraceno (DPA - Figura 2) ocorre a emissão de uma luz azulada intensa [1, 9].

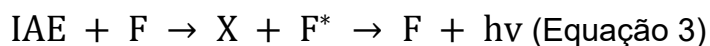
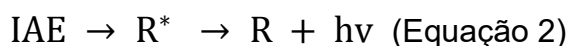
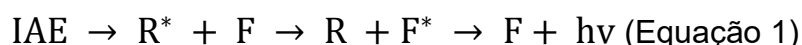
Figura 2 - Estrutura do fluoróforo DPA



Fonte: Retirada de Ladeira, 2014 [1]

Durante a reação quimiluminescente, as espécies quimicamente excitadas podem ser formadas de maneira *indireta*, *direta* e *ativada* partindo do Intermediário de Alta Energia (IAE) formado.

Nos *processos indiretos*, o IAE formado com os reagentes se decompõe formando uma espécie no estado excitado (R^*) que interage com uma ou mais espécies (F) no meio reacional gerando um produto no estado excitado por transferência de energia intermolecular (F^*). Este (F^*) retornará ao estado fundamental emitindo luz, forma de liberação da energia absorvida (equação 1). No *processo direto*, o estado excitado ocorre no próprio IAE, que passa por uma decomposição unimolecular (R^*), decaindo para o estado fundamental (R) liberando a energia do estado excitado como luz (equação 2) [1, 3]. O *processo ativado*, por sua vez, dará origem à espécie excitada a partir do intercâmbio de elétrons entre o IAE e uma outra espécie que será a responsável pela emissão de luz (F). No caso do sistema QL-PO, o intercâmbio de elétrons ocorre entre o IAE e o fluoróforo (equação 3).



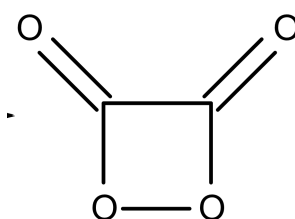
1.1.1. Sistema quimiluminescente peróxi-oxalato

O sistema QL-PO funciona com o uso dos seguintes reagentes: peróxido de hidrogênio, derivado de ácido oxálico e um fluoróforo que será o responsável pela emissão de luz, pois essa molécula será excitada a partir do IAE por um mecanismo

conhecido como Luminescência Quimicamente Iniciada por intercâmbio de Elétron (sigla do inglês, CIEEL) [1].

Chandross, com seus experimentos, já havia concluído que era possível que ocorresse a formação de um intermediário reacional, porém não descreveu o mecanismo. Estudos sobre mecanismo vieram apenas no final da década de 1960 com o pesquisador Rauhut. Ele constatou que 98% dos reagentes do sistema haviam sido consumidos após 4 minutos de reação, porém somente 58% da emissão quimiluminescente ocorreu. Isso foi um grande indicativo pra que a crença na possível formação de um intermediário-chave fosse reforçada. Para Rauhut, esse intermediário seria a 1,2 - dioxetanodiona (figura 3) [1]. Em suas proposições de mecanismo, Rauhut afirma que esse intermediário cíclico é volátil e é responsável pela excitação do fluoróforo [10].

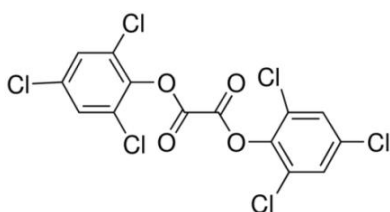
Figura 3 - Estrutura da 1,2 - dioxetanodiona (IAE do sistema QL-PO)



Fonte: Ladeira, 2014 [1]

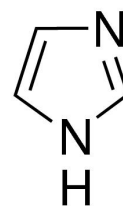
Como o mecanismo da reação não havia sido totalmente elucidado ainda, logo novos trabalhos apareceram e em 1996 um mecanismo foi proposto por Stevani e seu grupo de pesquisa num sistema com peróxido de hidrogênio, oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO - figura 4), DPA como fluoróforo e o imidazol (figura 5) como catalisador básico nucleofílico, tudo isso em meio de acetato de etila.

Figura 4 - Estrutura TCPO



Fonte: Site da Sigma Aldrich [11]

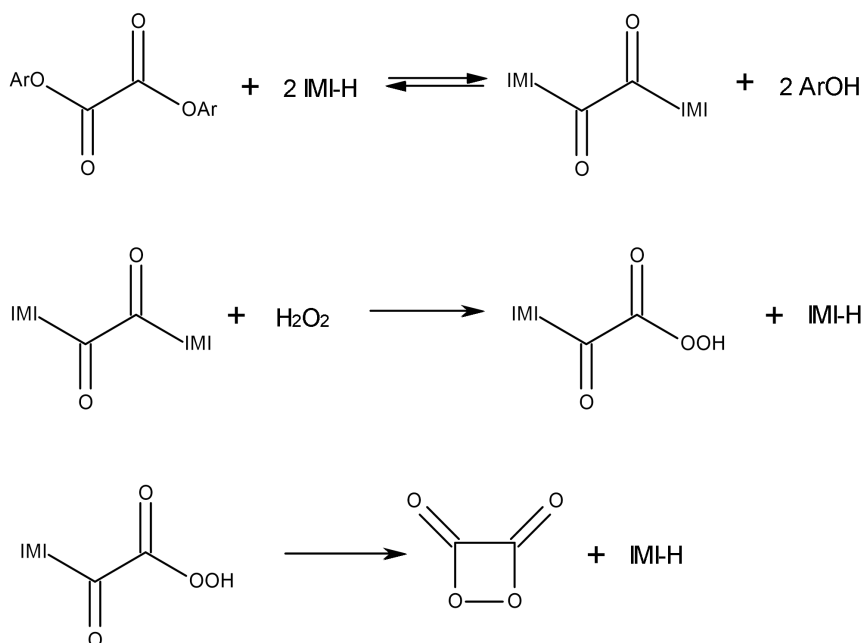
Figura 5 - Estrutura Imidazol



Fonte: Site da Sigma Aldrich [12]

O mecanismo então ocorreria da seguinte maneira: (i) reação de substituição entre TCPO e imidazol originando o 1,1'-oxalildiimidazolidina; (ii) a carbonila do produto formado é atacado nucleofilicamente pelo peróxido formando um perácido; (iii) por último, ocorre a ciclização do perácido gerando a 1, 2 - dioxetanodiona (figura 6) [1, 13].

Figura 6 - Formação da 1,2 - dioxetanodiona



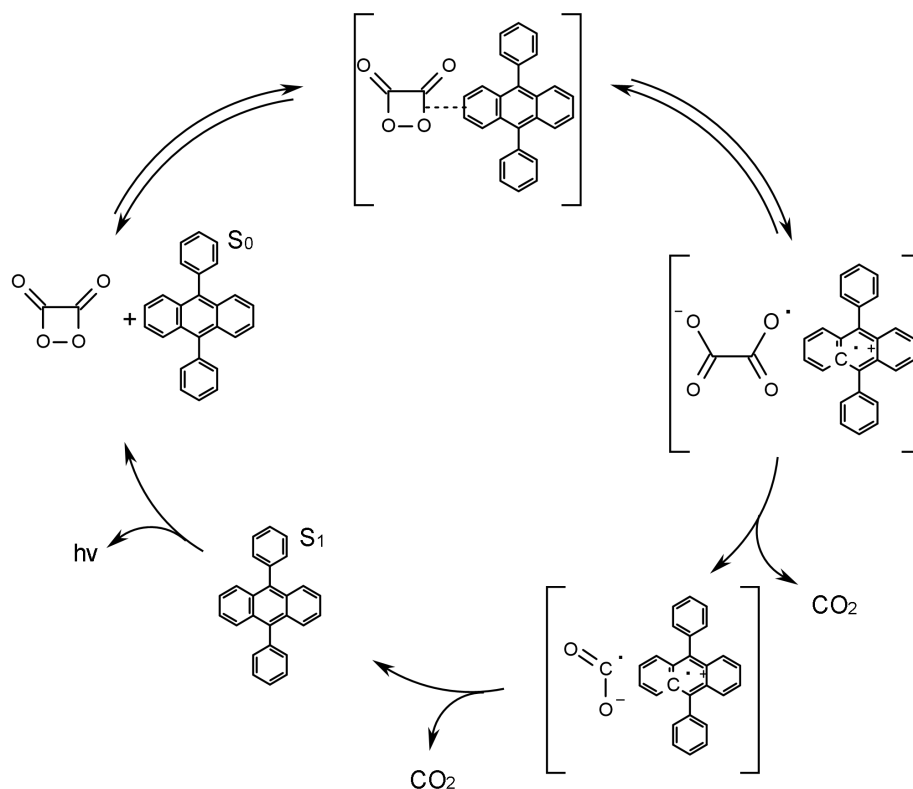
Fonte: Stevani (1996), conforme apresentado por Ladeira (2014) [1]

Essa questão foi explorada de diversas formas durante os anos que se passaram e em 2010, duas teses de doutorado do mesmo grupo de pesquisa estudaram o sistema para compreender o mecanismo em meio tamponado. Demonstrou-se que um diferente mecanismo do descrito anteriormente pode chegar no mesmo IAE. Ocorre um ataque nucleofílico no derivado de ácido pelo peróxido de hidrogênio desprotonado por causa da hidroxila presente no meio, proveniente do equilíbrio ácido-base do tampão. O produto gerado a partir do ataque é o que irá ciclar, dando origem ao IAE [1, 14, 15].

A 1,2-dioxetanodiona então é responsável por interagir com o fluoróforo, fazendo com que ele passe para o estado excitado e possa emitir luz. A interação que ocorre para formação do complexo excitado é o mecanismo CIEEL. O IAE e o fluoróforo se aproximam formando um complexo, a ligação fraca oxigênio-oxigênio será então alongada e um elétron do fluoróforo é transferido para o IAE, formando dois radicais e por consequência a clivagem da ligação citada acima. Ocorre então a formação de

dióxido de carbono e um novo ânion radical a partir da cisão da ligação carbono-carbono do ânion radical gerado anteriormente. A excitação do fluoróforo para seu estado singlete vai acontecer a partir da energia liberada com a extinção do par de íons radicais e, por fim, essa molécula sai do seu estado excitado para o fundamental com liberação de energia na forma de luz (figura 7) [1].

Figura 7 - Mecanismo CIEEL do sistema QL-PO



Fonte: Ciscato (2012), conforme apresentado por Ladeira (2014) [1]

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Conhecer as reações quimiluminescentes e suas aplicações analíticas.

2.2. Específicos

- Identificar abordagens e metodologias para o emprego de sistemas quimiluminescentes de peróxi-oxalato;

- Reconhecer quais são os fluoróforos mais empregados nesses sistemas e como seus rendimentos quânticos de fluorescência e quimiluminescência influenciam nessa escolha;
- Verificar as possibilidades de utilização da hipericina como fluoróforo da reação;
- Exemplificar os vários usos do sistema QL-PO em análises químicas;
- Identificar possíveis caminhos futuros para aplicações desse sistema.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi baseado no levantamento bibliográfico de estudos sobre o sistema quimiluminescente peróxi-oxalato (QL-PO) e suas aplicações analíticas. Um levantamento bibliográfico segundo Carbuloni *et al* (2017) tem por característica essencial o mapeamento de referências de um determinado assunto com o objetivo de reuni-las. Neto (2018) ainda afirma que esse tipo de trabalho tem por propósito reunir ideias oriundas de trabalhos e fontes diversas para a incorporação de uma nova teoria ou até mesmo uma nova maneira de desenvolver um assunto a partir da análise crítica do que foi coletado [16, 17].

Partindo da Dissertação de Ladeira (2014), escolheu-se o período de 11 anos - 2010 a 2020 - para o estudo das referências, já que novos métodos e aplicações para o sistema QL-PO foram surgindo em maior quantidade neste momento.

Ladeira, por exemplo, estudou diversas variáveis do meio reacional, visando o uso de meios aquosos ou parcialmente aquosos. Como em sua maioria os ésteres e os fluoróforos são insolúveis ou pouco solúveis em meio aquoso, estudar ciclodextrinas (CD) para aumento de solubilidade e faixas de pH que propiciam a reação foi o caminho escolhido. Além disso a ordem de adição dos reagentes e um novo fluoróforo, a hipericina também foram testadas [1].

Pesquisas bibliográficas foram feitas nas seguintes plataformas: Periódicos Capes/Web of Science, Google Acadêmico, e Repositórios de Universidades Públicas, principalmente o da USP, onde o grupo de pesquisa do Prof. Dr Josef Wilhelm Baader — expoente pesquisador da área — estuda os mecanismos do sistema QL-PO.

O trabalho escrito foi dividido em 5 partes, sendo elas: (I) Abordagens para uso do sistema quimiluminescente peróxi-oxalato; (II) Fluoróforos; (III) Principais

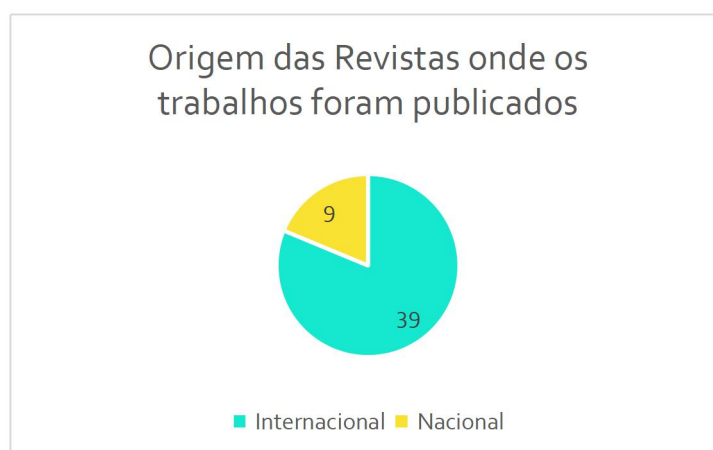
instrumentos; (IV) Rendimento quântico e intensidade de sinais e (V) Aplicações do sistema QL-PO atualmente. Cada uma dessas partes é um tópico essencial para a discussão do sistema QL-PO, e estes foram identificados a partir da leitura da dissertação de Ladeira.

A análise e a discussão foram feitas a partir dos dados dos artigos que foram organizados em uma tabela para comparação entre os sistemas, estudos e aplicações que foram feitas. Partindo dessa tabela foi possível produzir as figuras, gráficos e tabelas que estão no trabalho.

4. ABORDAGENS PARA USO DO SISTEMA QUIMILUMINESCENTE PERÓXI-OXALATO

Os 48 trabalhos utilizados foram classificados em origem (internacional e nacional), ano e tipo de trabalho. Os tipos de “trabalhos” analisados foram artigos, teses ou dissertações (gráficos 1, 2 e 3).

Gráfico 1: Origem



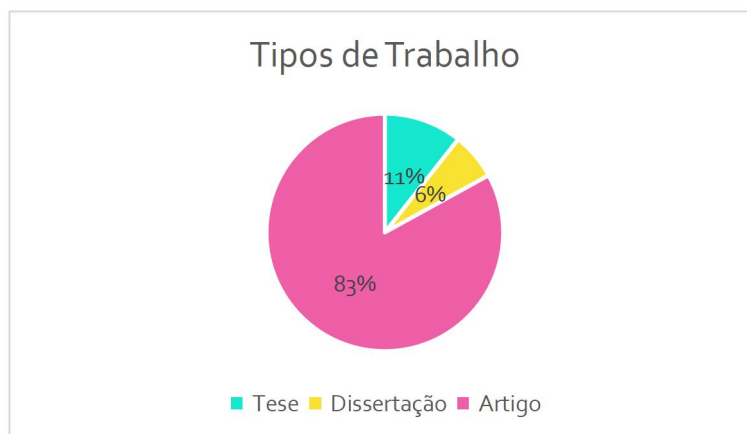
Fonte: Autoria própria

Gráfico 2: Ano dos artigos



Fonte: Autoria própria

Gráfico 3: Tipo



Fonte: Autoria própria

Os anos com maior volume de publicações aqui empregadas foram 2014 com 8 publicações, 2012 com 7 e os anos de 2010 e 2016 com 6 publicações cada. A média anual gira em torno de 4 trabalhos.

Ao pesquisar o sistema QL-PO, percebe-se que existem várias possibilidades, abordagens de pesquisa e seus estudos. Dentro do período escolhido, para busca dos artigos, foi possível identificar que há mais trabalhos que focam no estudo do próprio sistema. A partir de 2014, os artigos trazem aplicações em conjunto com outras técnicas analíticas.

O sistema estudado neste trabalho permite estudos mecanísticos, cinéticos, focados em características ou reagentes ali presentes. Isto é, ao mudar algum parâmetro reacional (reagentes, temperatura, meio, pH, entre outros) é possível que

o próprio mecanismo da reação quimiluminescente muda, a cinética pode mudar também e isso é discutido amplamente dentro da área de pesquisa. Tais resultados podem ser usados para comparação entre os reagentes do sistema, outros parâmetros e até ordem de adição dos reagentes em busca de uma reação otimizada.

Os estudos do grupo do Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader são, em sua maioria, voltados para o mecanismo da reação modificando o meio (aquoso, orgânico e/ou misto), os fluoróforos [14, 15, 18] e até mesmo adicionando outros compostos como imidazol e salicilatos para atuarem como catalisadores da reação [14, 15, 19]. O imidazol já vinha sendo estudado antes de 2010 pelo próprio grupo de pesquisa e outros trabalhos internacionais mostram a importância deste composto quando trata-se de catálise básica neste sistema [20]. Já os salicilatos, principalmente o de sódio, se tornou um composto de interesse para o mesmo fim do imidazol em meados da última década [21, 22].

Esse mesmo grupo de pesquisa apresenta também trabalhos que utilizam tampões e soluções especiais como, por exemplo, líquidos iônicos, utilizados para melhorar o rendimento quântico em meios mistos e aquosos [14]. O trabalho de Ladeira (2014) explora as ciclodextrinas (alfa, beta e gama) buscando verificar a influência de sua presença na reação se dando em meio parcialmente aquoso [1]. Em pesquisas mais recentes, verificou-se a presença do Pluronic L64 (surfactante copolimérico) visando a formação de clusters, que são agregados formados com o copolímero que melhorariam o rendimento quântico também, por conta de uma maior solubilização para análise de amostras biológicas [23, 24].

O meio reacional, da maioria dos trabalhos, é o meio orgânico por causa da solubilização dos reagentes. O derivado do ácido oxálico e os fluoróforos, os quais possuem anéis aromáticos em suas estruturas e grandes cadeias carbônicas, tornam a solubilização em meios mistos e aquosos mais difíceis. Então, trabalhos como os citados acima são importantes por trazer uma opção quando é necessário meios aquosos ou parcialmente aquosos.

Algo que deve ser pontuado também é que a mudança dos meios reacionais para mistos e aquosos não se faz necessário apenas por causa do tipo de amostra analisada, mas também porque atualmente existe um movimento para a diminuição de uso de solventes orgânicos e agressivos. Analisando os trabalhos publicados antes de 2010 é muito comum ver benzeno e tolueno como solventes nesse sistema,

mas atualmente álcoois e ésteres são mais empregados para esse fim, além desses mesmos solventes serem misturados com diferentes proporções em água. Assim é possível empregar o quinto Princípio da Química Verde (Solventes e Auxiliares Seguros) que afirma que caso não seja possível fazer um processo sem solvente ou reagente auxiliar, que os mesmos sejam inofensivos [25].

Sobre o meio, ainda há a perspectiva de considerar o pH como uma variável importante para a reação e assim estudá-la variando o pH com tampões. O pH do meio reacional é essencial para a compreensão do mecanismo da reação, já que o peróxido de hidrogênio é a chave para o ataque nucleofílico que origina o perácido que ciclicizará e o pH pode garantir um intermediário que force esse ataque [1, 14, 26, 27].

Além dos catalisadores e do meio reacional, o estudo da ordem de adição dos reagentes e suas concentrações se mostrou um caminho de pesquisa viável. Dentro desse tipo de investigação, o objetivo é entender qual a interferência desses parâmetros na eficiência da reação e na intensidade de luz emitida. Estudos de variações nas concentrações são mais comuns, e essas são sempre informadas no texto. Em contrapartida, a ordem dos reagentes é pouco citada dentre as publicações entre 2010 e 2020. Isso é explicado pelo fato desse parâmetro já estar bem estabelecido.

Existe ainda a possibilidade de estudar novos derivados de ácidos oxálicos e fluoróforos. Lendo os trabalhos, na sua maioria o derivado empregado é o TCPO. Alguns poucos artigos usam outros derivados, como as 1,2-dioxetanonas e os 1,2-dioxetanos nessa reação quimiluminescente, mas o mecanismo para a formação da espécie excitada se dá por uma decomposição unimolecular [14].

Já para o caso dos fluoróforos, existe uma gama imensa de moléculas que podem ser utilizadas para este fim. No geral, possuem anéis aromáticos em sua estrutura, muitas vezes anéis condensados e essa condição é primordial para sua ação.

Existem fluoróforos que aparecem com maior frequência que outros, sendo um exemplo que pode ser citado o DPA. Até mesmo em artigos, teses e dissertações que estudam novos fluoróforos para o sistema QL-PO, o DPA é usado como padrão de comparação, já que ele vem sendo usado nesse sistema desde o início das pesquisas na área e há muita informação disponível sobre ele na literatura [1, 28, 29].

4.1. Sistemas Mais Empregados

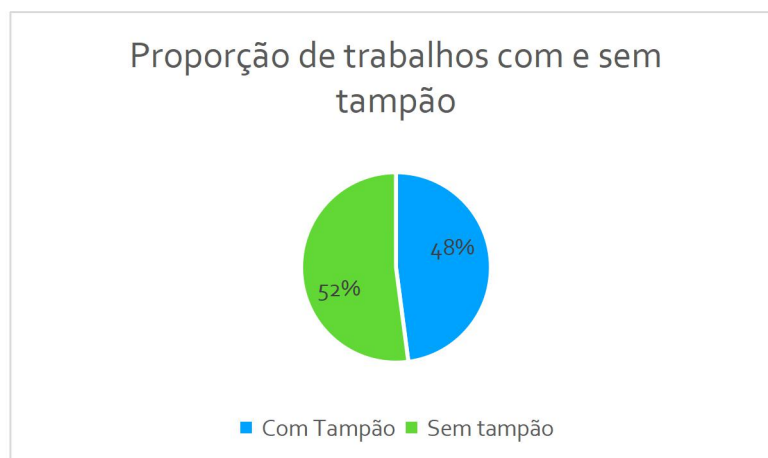
O sistema QL-PO é composto basicamente por um derivado de ácido oxálico, peróxido de hidrogênio e um fluoróforo em meio de solvente. Para cada um desses itens que formam o sistema, existe uma vasta gama de possibilidades de escolha e em muitas não é escolhido um único sistema, senão mais de um desses itens que são combinados entre si para buscar o otimizado.

Entre os derivados de ácido, o TCPO de longe é o mais utilizado, aparecendo em 34 dos 48 trabalhos analisados. O segundo é o oxalato de bis(2-carbopentiloxi-3,5,6-triclorofenil) (CPPO). Apenas o peróxido de hidrogênio foi empregado, tendo em vista o mecanismo de formação do IAE. O meio em sua maioria é orgânico, com solventes como acetato de etila, dimetil éter (DME), acetonitrila e tolueno. Os que são parcialmente aquosos usam o DME como parte orgânica e apenas 1 artigo usava acetonitrila [30]. Duas pesquisas usam meios totalmente aquosos [31, 32].

Em alguns dos sistemas que usam meios aquosos ou parcialmente aquosos, alguns reagentes são estudados visando a melhor solubilização dos fluoróforos e derivados do ácido oxálico. São exemplos: líquidos iônicos [14], ciclodextrinas [1], surfactantes [30] e surfactantes copoliméricos [23, 24, 33]. Ainda assim, são poucos os estudos que fazem isso.

Outro parâmetro do meio reacional que é modificado com maior frequência é o pH, utilizando-se soluções-tampão, em meios, em sua maioria, mistos (gráfico 4):

Gráfico 4 - Trabalhos que usam tampão ou não para controle de pH



Fonte: Autoria própria

Os tampões mais comuns são o tampão fosfato (pH's entre 5 e 9), borato (faixas que variam entre 8 e 10) e carbonato (trabalhos que usam pH em torno de 10). A mudança de pH pode influenciar na reação que ocorre para iniciar o processo, podendo protonar ou desprotonar tanto o derivado de ácido oxálico quanto o peróxido, e alterar da mesma maneira o fluoróforo.

Ou seja, o melhor pH para o sistema depende dos reagentes que são escolhidos e da aplicação que se quer dar. Em algumas pesquisas em meio aquoso ou parcialmente aquoso, o tampão é usado como substituinte do catalisador para o éster oxálico TCPO. Para o caso do uso de tampões para a catálise da reação, existem vários mecanismos que podem dar origem ao perácido que ciclicizará. Uma possibilidade mais comum é a que o peróxido de hidrogênio é desprotonado pela espécie em maior concentração do tampão, e este ânion ataca o éster, formando o perácido [8, 9]. Catálises básicas são permitidas tanto pelo pH do meio com tampões na região de pH 10 e 11, quanto com catalisadores como Imidazol. Para o uso do imidazol, é necessário que o pH esteja por volta de 7 [1, 14, 15].

Em sistemas biológicos é essencial o uso de tampão para as análises para preservação das amostras, simulação do ambiente vivo. Um exemplo que pode ser dado é um trabalho que tinha como objetivo estudar processos oxidativos em células tumorais. O derivado era um oxalato polimérico, num meio com DMF e THF tamponado com PBS pH 7,4, o fluoróforo era tetrametilhematoporfirina (TMHP) e a presença de Pluronic L64, um surfactante copolimérico empregado para formação de clusters visando a produção de dispersões [23].

4.2. Metodologias Mais Empregadas

O preparo dos reagentes e as soluções que serão utilizadas para a reação e consequentemente para a leitura do sinal quimiluminescente são importantes e para o estudo de revisão que foi feito aqui, esses processos foram denominados como **metodologia**.

São raros os trabalhos que se dedicam a estudar a influência da ordem de adição dos reagentes. O trabalho que se dedicou a fazer isso para descobrir se há influência no sinal analítico foi o de Ladeira, em 2014. Verificou-se que a ordem de adição é irrelevante para o sinal, desde que um dos reagentes principais seja o

último a ser colocado no meio reacional para que a leitura seja feita desde o início da reação. Se o meio for aquoso ou parcialmente aquoso, o derivado de ácido deve ser o último no sistema para evitar uma possível hidrólise do reagente [1].

Percebeu-se, ainda, que aproximadamente 33% dos artigos não informam a ordem de adição dos reagentes na cubeta. Informam, apenas, o volume de cada solução e como cada uma delas foi preparada. Alguns artigos de revisão citam apenas reações mais genéricas e aplicações específicas, não explicitando como esses reagentes são misturados na cubeta ou recipiente onde a leitura será feita. Dois artigos usaram sistema de injeção em fluxo (FIA) para a reação [26, 31].

Em algumas delas são feitas duas soluções diferentes, sendo a primeira com o derivado de ácido oxálico e junto a ele é comum a presença do fluoróforo e/ou do catalisador, e na segunda o peróxido, geralmente com o catalisador da reação. É possível encontrar trabalhos em que o derivado está sozinho em meio de solvente e é adicionado por último, sendo uma opção para evitar a decomposição desse reagente.

Existe ainda a possibilidade de mistura dos reagentes diretamente no recipiente de medida de emissão de luz. A ordem de adição geralmente não muda, iniciando pelo peróxido, depois o fluoróforo e o catalisador e por último o derivado é adicionado para início da reação.

É importante ressaltar que conhecer os reagentes e as limitações dos instrumentos que estão disponíveis. Isso faz com que a escolha da instrumentação seja adequada, visto que a intensidade de sinal pode mudar de um reagente para outro e o instrumento não possuir a sensibilidade necessária para a leitura. Bartoloni (2010) demonstrou isso em seu trabalho, onde inicialmente usava um fluorímetro, mas por causa dos resultados obtidos de sinal/ruído e a linha base do experimento, optou fazer uma mudança para um luminômetro para seguir com suas análises [15].

4.3. Sistemas Emergentes

Após a leitura e análise do conjunto de informações que foram agrupadas de acordo com suas semelhanças, o que é possível prever para pesquisas futuras nessa área é que a presença de sistemas aquosos e parcialmente aquosos podem ser cada vez mais fortes, principalmente por causa da ampla aplicabilidade do

sistema QL-PO em análises químicas e biológicas. Aplicações em sistemas biológicos tem aparecido com mais intensidade com o passar dos anos, destacando o foco em tratamentos para câncer [33, 34].

Além disso, existe a possibilidade de estudo de novos reagentes para o sistema, substituindo os comumente utilizados, como TCPO, DPA, imidazol. Novas moléculas podem ser sintetizadas, descobertas, encontradas na natureza e que podem ter grande potencial para uso no sistema QL-PO, podendo aumentar o rendimento quântico e intensidade de sinal do sistema. É o caso da hipericina (HYP), um fluoróforo aplicado em 3 pesquisas durante o período escolhido e com grande potencial.

A mudança desses parâmetros faz com que estudos mecanísticos e cinéticos também continuem mantendo presença nessa área de pesquisa, porque quando um deles é alterado é possível que um novo mecanismo apareça para que o derivado de ácido oxálico dê origem ao IAE, e assim o fluoróforo chegue no seu estado excitado e emita luz. Da mesma forma que a cinética da reação pode ser alterada, principalmente quando ocorre mudança de catalisador.

5. FLUORÓFOROS

Um dos principais componentes da reação quimiluminescente é o fluoróforo, ou também chamado de ativador. Assim como o explicado na introdução, o fluoróforo transfere um elétron para o Intermediário de Alta Energia (IAE), formando dois radicais, que ao serem extintos liberam energia suficiente para fazer o fluoróforo passaram para o estado excitado singlete, emitindo luz ao retornar para o estado fundamental [1].

A primeira vez que um fenômeno de fluorescência foi descrito foi no século XVI por um botânico chamado Nicolas Monardes ao produzir uma infusão (mistura dos pedaços de madeira em água), utilizada para fins medicinais, conhecida por *Lignum Nephriticum* que emitia uma luz azul. O termo fluorescência só apareceu no século XIX, quando Sir George Gabriel Stokes estava estudando soluções de sulfato de quinina (quinino). O termo fluorescência foi escolhido por causa de uma rocha que emite luz chamada *fluorspath*. Sir George propôs, ainda no século XIX, que a fluorescência seria uma forte aliada dentro da pesquisa analítica [35].

Os fluoróforos são moléculas capazes de emitir luz. Essa emissão de luz ocorre após a absorção de energia, onde essa molécula passa para o estado excitado e ao retornar para o estado fundamental, liberando a energia absorvida, a luz é emitida. Tal processo é chamado de fluorescência [36].

Para que uma molécula seja considerada um fluoróforo existem características estruturais importantes. Segundo Venturini Jr. [37], pode-se descrever essas características da seguinte maneira:

O fenômeno é observado geralmente em moléculas que têm uma estrutura rígida, sem substituintes fracamente acoplados pelos quais a energia vibracional pode fluir para fora do sistema. Esse mecanismo de desativação é tão eficiente que a maioria das moléculas não é fluorescente. (VENTURINI JR., 2008, p.18).

Estruturas que se encaixam muito bem nessa descrição são as que apresentam anéis aromáticos, principalmente os que contenham níveis de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ de baixa energia [1], onde os elétrons do orbital π (orbital molecular de maior energia ocupado - ligante) são excitados e passam para o estado excitado π^* (orbital molecular de menor energia desocupado - antiligante) [35]. Há a possibilidade de fluorescência em estruturas com ligações duplas conjugadas, alicíclicas carbonílicas e até mesmo alifáticas, porém, em menor quantidade. Além disso, a eficiência de moléculas com grupos funcionais aromáticos é superior às outras, inclusive, quanto maior o número de anéis conjugados, maior será a eficiência quântica. A eficiência quântica é uma razão que relaciona quantidade de moléculas que emitem luz e a quantidade que foi excitada [36].

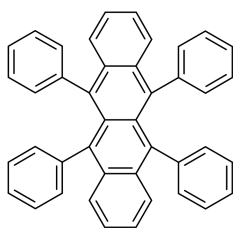
Informações que são essenciais para a caracterização de um fluoróforo são: o tempo de vida (τ), o rendimento quântico (ϕ - eficiência) e o comprimento de onda de emissão. O tempo de vida é o que expressa o tempo disponível para a molécula interagir com o meio ou dispersar, neste caso o tempo de vida é referente ao período da fluorescência [37].

5.1. Fluoróforos Empregados no Sistema QL-PO e suas Características

O 9, 10 - difenilantraceno (DPA) é um dos fluoróforos mais usados desde que a reação quimiluminescente do sistema QL-PO foi descrita pela primeira vez em 1960. Apresenta 5 anéis aromáticos conjugados.

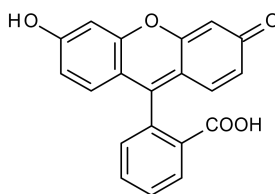
Além do DPA, existem outras moléculas muito utilizadas, são elas, o rubreno (RUB - figura 8), fluoresceína (FLU - figura 9), 2,5-difeniloxazol (PPO - figura 10), perileno (PER - figura 11), antraceno (ANT - figura 12), 9,10-dibromoantraceno (DBA - figura 13), 9,10-bis(feniletinil)antraceno (BPEA - figura 14), 9-cloroantraceno (CLA - figura 15), 9,10-dicianoantraceno (DCNA - figura 16), Rodamina (B ou 6G - figuras 17 e 18). Todas elas apresentam anéis aromáticos. Em sua maioria, há conjugações e em alguns casos aparecem grupos funcionais nas estruturas que são doadores de elétrons, o que facilita da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ [37].

Figura 8 - Estrutura rubreno



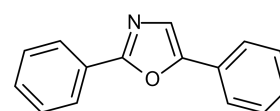
Fonte: Retirada de Ladeira, 2014 [1]

Figura 9 - Estrutura fluoresceína



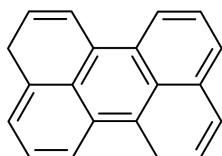
Fonte: Retirada de Ladeira, 2014 [1]

Figura 10 - Estrutura 2,5 - difeniloxazol



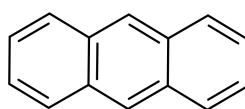
Fonte: Retirada de Ladeira, 2014 [1]

Figura 11 - Estrutura perileno



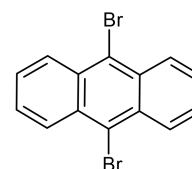
Fonte: Retirada de Ladeira, 2014 [1]

Figura 12 - Estrutura antraceno



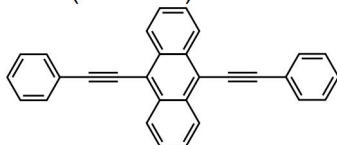
Fonte: Retirada de Ladeira, 2014 [1]

Figura 13 - Estrutura 9, 10 - dibromoantraceno



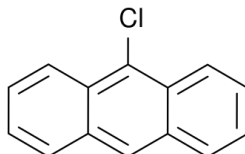
Fonte: Retirada de Ladeira, 2014 [1]

Figura 14 - Estrutura 9,10 - bis(feniletinil)antraceno



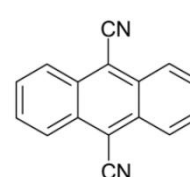
Fonte: Retirada de wikipedia [38]

Figura 15 - Estrutura 9 - cloroantraceno



Fonte: Retirada de wikipedia [39]

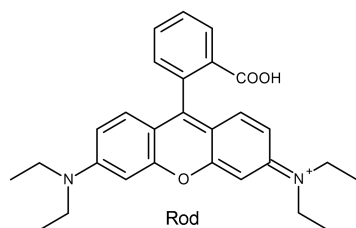
Figura 16 - Estrutura 9,10 - dicianoantraceno



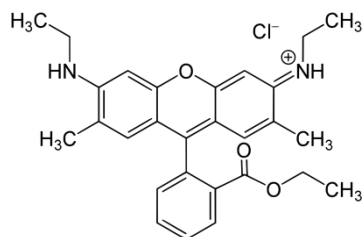
Fonte: Retirada de Bartoloni *et al*, 2010[18]

Figura 17 - Estrutura rodamina B

Figura 18 - Estrutura rodamina 6G



Fonte: Retirada de wikipedia
[40]



Fonte: Retirada de wikipedia
[41]

Dentre os artigos estudados, os fluoróforos mais empregados no sistema QL-PO são: DPA, PER, RUB, PPO, ANT, FLU, DBA e BPEA. Os artigos em que essas substâncias aparecem não tem como objetivo o estudo dos fluoróforos, e sim e outros parâmetros reacionais.

Os trabalhos, em sua maioria não exploram novos fluoróforos para a reação. Então o uso de um fluoróforo com características importantes da molécula conhecidas (rendimento quântico e comprimento de onda de emissão, por exemplo) é escolhido para que seja um fator da reação do qual o resultado já seja esperado. Abaixo há uma tabela (tabela 1) que esquematiza os fluoróforos mais usados, em quantas e quais referências das 48 eles aparecem:

Tabela 1 - Fluoróforos mais usados no sistema QL-PO entre 2010 e 2020

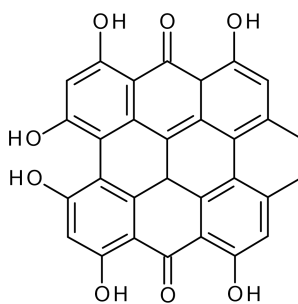
Fluoróforo	Número de trabalhos que aparece	Referências
DPA	17	[1, 14, 15, 19, 22, 28, 29, 30, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50]
RUB	8	[1, 14, 15, 33, 42, 47, 48, 51]
PER	8	[1, 14, 15, 42, 47, 48, 51, 52]
PPO	7	[1, 14, 15, 27, 29, 48, 53]
FLU	7	[1, 15, 53, 54, 55, 56, 57]
ANT	5	[1, 14, 15, 18, 48]
BPEA	5	[15, 26, 28, 42, 51]
DBA	4	[1, 15, 53, 54, 55, 56]

Fonte: Autoria própria

Vale ressaltar que metade das pesquisas usam apenas um fluoróforo e a outra metade usa mais de um. Das que usam apenas um fluoróforo, metade (12 trabalhos) delas escolheu um dos presentes na tabela 3. Já a outra metade dos trabalhos avaliados utilizou um ativador diferente, e a escolha foi feita por conta do meio em que a reação ocorreria, ou para avaliar o uso desse composto em específico como um novo fluoróforo. Esses novos fluoróforos começam a aparecer com mais intensidade a partir de 2014 [21, 23, 24, 32, 58, 59, 60]. Para os que escolhem mais de um, em sua maioria aparecem estudos cinéticos, mecanísticos e comparação de eficiência entre os ativadores.

Além dos mais comuns, existe um composto chamado hipericina (figura 19 - HYP) que pode ser empregado também como ativador nesse sistema. Dos 47 trabalhos, foram encontrados três que estudam esse composto. Foram publicados um em 2012 e dois em 2014, com objetivos semelhantes, de compreender seu potencial como fluoróforo para sistema QL-PO. O de 2012 era um estudo inicial do grupo de Kazemi com a HYP e em 2014 eles já deram uma aplicabilidade para o sistema com a HYP como fluoróforo. O segundo de 2014 compara os resultados da HYP com de outros ativadores mais conhecidos [1, 59, 61].

Figura 19 - Estrutura da hipericina



Fonte: Ladeira, 2014 [1]

Ladeira, em 2014, concluiu que este composto, de origem natural, possui um ótimo potencial para tal aplicação, porque seu rendimento quântico de quimiluminescência foi o maior quando comparado com outros fluoróforos mais comuns para a função.

5.2. Hipericina

A hipericina é uma substância encontrada em plantas do gênero *Hypericum*. A espécie mais utilizada e conhecida deste gênero é a *Hypericum perforatum* L. (HP), que possui flores de pétalas amarelas e pode ser conhecida pelos seguintes nomes: Erva de São João, hipérico, alecrim-bravo, milfurada, orelha-de-gato, dentre outros. Ao macerar as pétalas em meio a um solvente é possível produzir um extrato dessa planta que possui alto poder de aplicação em tratamentos médicos, principalmente pela presença de metabólitos como a hipericina, que são biologicamente ativos [62, 63, 64].

Além da HYP, existem outros metabólitos presentes na HP, porém, essa naftodiantrona é uma das moléculas com maior aplicabilidade como um fármaco, reagente em algumas reações, dentre outros. Antes de estudos começarem com essa molécula especificamente, o extrato de HP era largamente utilizado na Europa para tratamento de inflamações, cicatrização de feridas e queimaduras, fazendo parte da medicina popular [63, 65, 66].

Atualmente, essa substância é utilizada como antidepressivo, antiviral, antisséptico e antitumoral. Essa última aplicação é feita a partir de uma técnica chamada Terapia Fotodinâmica ou fotoquimioterapia [65, 67, 68]. Essa terapia consiste no emprego de um fotossensibilizador que após um tempo de repouso será ativado com o uso de luz, formando radicais livres que atacam as células cancerígenas e as destroem. No caso, a HYP é o fotossensibilizador, por ser uma molécula que quando excitada produz oxigênio singlete, o radical livre responsável pelo tratamento do câncer [1, 64, 66].

Esse metabólito possui uma coloração amarela e sua estrutura e propriedades possibilitam seu uso como fluoróforo. Desde 2012, o grupo de pesquisa de Kazemi emprega a hipericina como fluoróforo para o sistema QL-PO com TCPO e peróxido de hidrogênio. Em 2014, estudos foram feitos da hipericina em sistema QL-PO com os mesmos reagentes, só que com a presença de glutathione para verificar se há mudança no sinal quimiluminescente [59, 61].

Ainda em 2014, Ladeira estuda o sistema QL-PO em meio aquoso com a HYP como fluoróforo para avaliar e comparar com outros fluoróforos tradicionais a aplicabilidade da mesma [1]. Macedo, em 2014 também, destaca que tal molécula

em meio aquoso pode auto agregar-se, portanto, isso pode interferir no sinal quimiluminescente [66].

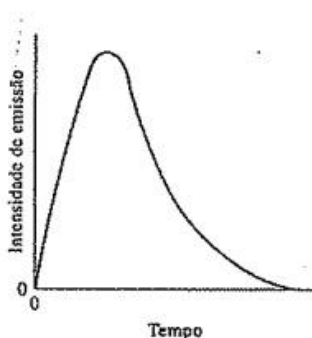
6. PRINCIPAIS INSTRUMENTOS

As reações quimiluminescentes tem como principal características a emissão de luz. Essa emissão pode ser medida com alguns instrumentos que estão disponíveis no mercado e a partir desse dado experimental é possível fazer análises para avaliar as características do sistema, bem como saber se o sistema precisa de alguma modificação, como troca de fluoróforo, concentração dos reagentes, alterações no meio reacional dentre outros. Além disso, essa medida também pode ser usada para saber se aquele sistema funcionará para a aplicação escolhida.

A instrumentação empregada para fazer essa medida não é muito complexa, de modo geral. Uma fotomultiplicadora e um reservatório adequado para a reação ocorrer que permita a visualização da emissão da luz já é suficiente para a medição [36].

O sinal mais comum, encontrado em trabalhos acadêmicos e nos livros didáticos de análise instrumental, são os sinais de intensidade em função do tempo (gráfico 5), porém, não é a única forma de análise e interpretação dos dados de quimiluminescência. Para análises quantitativas, o sinal de intensidade pode ser integrado num período de tempo fixo, e assim obter dados que podem ser comparados com padrões - devem ter passado pelo mesmo tratamento que a amostra [36].

Gráfico 5 - Exemplo de sinal de intensidade de emissão em função do tempo



Fonte: Retirada de Skoog, 2002 [36]

De maneira geral, na literatura são relatados os usos de dois instrumentos principais, o Luminômetro e o Espectrofotômetro de fluorescência.

Na maior parte das pesquisas estudadas, o luminômetro é usado para estudos cinéticos dos sistemas QL-PO que foram escolhidos. Com esse instrumento é possível construir a curva de decaimento da emissão do sistema em função do tempo [1]. A escolha do luminômetro para esses estudos cinéticos está relacionada à sensibilidade do instrumento, que é maior, quando comparada à do espectrofotômetro de fluorescência [14, 29, 43]. O uso do espectrofotômetro é bastante versátil porque, além da medida referente à quimiluminescência, ainda pode ser usado para espectroscopia de fluorescência. Esta análise é relevante principalmente para trabalhos que focam no estudo de vários fluoróforos ou na possibilidade de uma nova molécula agir como fluoróforo para o sistema peróxi-oxalato [15, 21, 32, 58, 69].

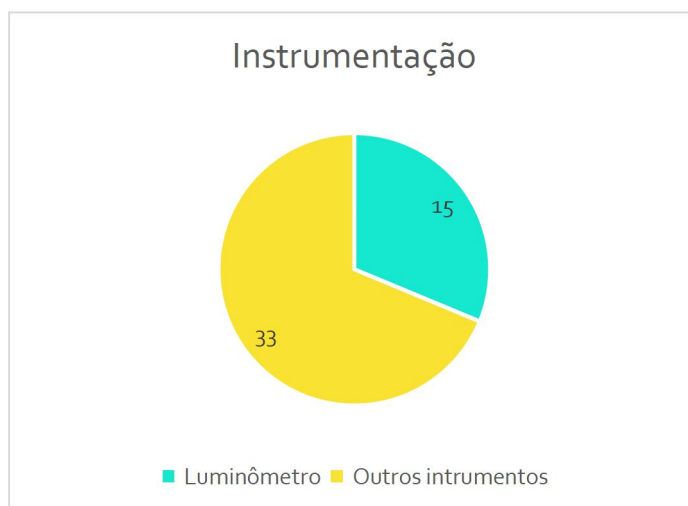
Alguns dos trabalhos fazem estudos de absorção de luz antes de verificar a fluorescência e posteriormente a quimiluminescência, e para isso o UV-Vis é a escolha mais comum [18, 29, 31, 42, 45].

Instrumentos que aparecem em pouca quantidade são os fluorímetros e dois trabalhos fazem as medições em luminômetro produzido pelo mesmo grupo de pesquisa [59, 70].

6.1. Luminômetro

O luminômetro é um dos instrumentos usados para medir a intensidade de luminescência da reação quimiluminescente. Dos 47 trabalhos encontrados no período definido inicialmente para a pesquisa, menos da metade usa o luminômetro (gráfico 6). Mais precisamente, 15 escolheram este instrumento para fazer as medições [1, 14, 15, 21, 29, 44, 47, 48, 58, 59, 61, 69, 70, 71, 72].

Gráfico 6 - Proporção de trabalhos que usam o luminômetro e os que usam outro instrumento



Fonte: Autoria própria

Desses 15 trabalhos, apenas três não foram feitos por grupos de pesquisa brasileiros. Em sua maioria, as pesquisas foram desenvolvidas pelo grupo de pesquisa que trabalha com esse sistema na USP e 2 deles pela UFABC.

Olhando as pesquisas que escolhem o luminômetro, existem duas justificativas que mais aparecem, que é o fato do luminômetro ser mais sensível para emissões de baixa intensidade e da possibilidade de fazer a construção de curvas cinéticas, ou seja, de verificar a intensidade em função do tempo. Mesmo sendo a melhor escolha para leituras de baixa intensidade, é possível ocorrer problemas com a sensibilidade relacionados a fotomultiplicadora, como foi descrito por Ladeira em 2014, se referindo ao ativador HYP [1].

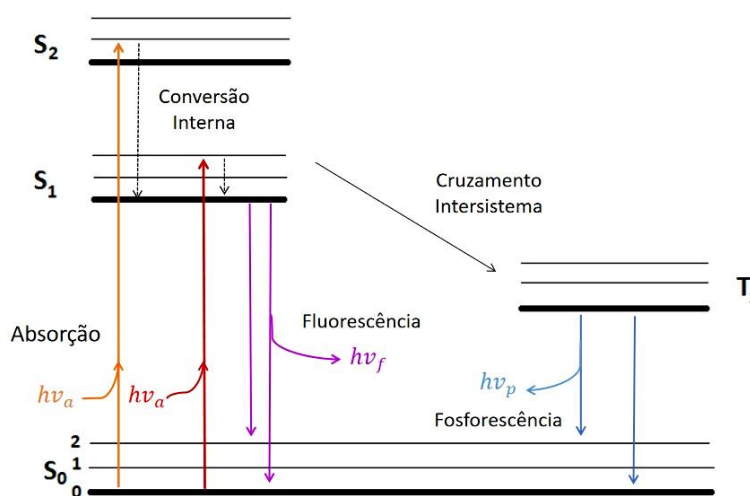
7. RENDIMENTO QUÂNTICO E INTENSIDADE DE SINAIS

O rendimento quântico é o parâmetro comumente utilizado para aferir a eficiência de um fluoróforo. É possível medir os rendimentos quânticos de fluorescência e de quimiluminescência.

7.1. Rendimento Quântico de Fluorescência e Rendimento Quântico e Quimiluminescência

O valor do rendimento quântico indica a eficiência do processo de luminescência de interesse. Quando se trata de um processo de fluorescência molecular, a emissão de luz provém da excitação de elétrons no estado fundamental para o estado excitado, após a absorção de um fóton de energia adequada. Para ser considerado fluorescência, o estado fundamental e o excitado devem ser de mesma multiplicidade, caso contrário, ocorre a fosforescência [73]. Na figura 20 está o Diagrama de Jablonski, que apresenta de forma simplificada esses dois processos.

Figura 20 - Diagrama de Jablonski



Fonte: Adaptado de Lakowicz, 1999 [74]

Para calcular o valor da eficiência de fluorescência, calcula-se a razão entre a constante de velocidade do processo (k_f) e a soma de todos os meios de desexcitação que ocorrem e que estão presentes no Diagrama de Jablonski (figura 21) (k_{CI} , k_P , ...). Na equação 3 é demonstrada a razão [73]:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{CI} + k_{CIS} + k_P} \text{ (Equação 3)}$$

Outra forma de encontrar o rendimento quântico de fluorescência é utilizando um padrão, espécie cujo rendimento quântico é conhecido, e disponibilizado na literatura junto com a informação do meio em que a leitura foi feita para o cálculo do rendimento de fluorescência obtido na literatura. Mantendo instrumento de análise, é possível chegar ao valor de rendimento desconhecido. Na equação 4 pode-se observar como obter o mesmo:

$$\phi_{fl} = \frac{\int I_{emissão}}{\int I_{emissão}^0} * \frac{A^0}{A} * \left(\frac{n}{n^0}\right)^2 * \phi_{fl}^0 \text{ (Equação 4)}$$

Onde ϕ_f é o rendimento quântico de fluorescência que será calculado, $\int I_{emissão}$ é a área de emissão fluorescente, A é a absorbância e n é o índice de refração do meio. Os parâmetros referentes ao padrão são indicados com o índice 0 [1, 75].

Conforme explicado anteriormente, o processo quimiluminescente, ou seja, a emissão de luz, é o produto de uma reação química. A sua eficiência pode ser definida como a quantidade de fótons emitidos pelas moléculas do reagente limitante, e a unidade de medida é Einstein por mol ($E \text{ mol}^{-1}$), onde o Einstein é a energia presente em 1mol de fótons [1, 75].

Assim como para a fluorescência, a quimiluminescência apresenta algumas formas de calcular o valor do rendimento quântico. Uma primeira maneira relaciona vários outros rendimentos em suas equações (equação 5):

$$\phi_{CL} = \phi_R * \phi_{ES} * \phi_F \text{ (Equação 5)}$$

Onde o ϕ_{CL} é o rendimento quimiluminescente, ϕ_R refere-se ao rendimento da reação química, ϕ_{ES} é o valor pertencente à porção de produto que estiver no estado excitado e ϕ_F é o rendimento fluorescência [75].

Outra maneira de obter este valor é relacionando informações conhecidas do sistema que não se sabe o rendimento com as de um padrão conhecido. Em sua dissertação, Ladeira fez as medidas com o luminômetro, e como padrão usou o luminol, encontrando o valor de rendimento quântico dos sistemas que estudava a partir da seguinte equação 6:

$$\phi_{QL} = \frac{Q_{QL} * f_{luminol} * f_{SF}}{n_{limitante}} \text{ (Equação 6)}$$

Os parâmetros presentes na equação 6 são: ϕ_{CL} que é o rendimento quimiluminescente, é igual a razão entre Q_{QL} (área de emissão quimiluminescente), $f_{luminol}$ (fator obtido após a calibração do luminômetro com o luminol), f_{SF} (fator de correção relacionado com o luminômetro, referente a sensibilidade da fotomultiplicadora - equação 7) e $n_{limitante}$ (que é o valor em mols do reagente limitante da reação) [1].

$$f_{luminol} = \frac{\phi_{luminol} * n_{luminol}}{Q_{luminol}} \text{ (Equação 7)}$$

Segundo Ladeira (2014), um fluoróforo que é escolhido como parte de um sistema QL-PO pode ser avaliado por esses dois parâmetros. Para que um fluoróforo seja considerado adequado para o sistema quimiluminescente, deve ter

um alto rendimento quântico de fluorescência, pois infere-se a partir desse dado que muitas moléculas passam do estado excitado para o fundamental [1].

Verificou-se que, dentre os artigos analisados para preparar este TCC, poucos são os que apresentam a eficiência de fluorescência do(s) fluoróforo(s) escolhido(s). Porém, o rendimento quântico de quimiluminescência é mais comum de ser apresentado, principalmente dentre os trabalhos que estudam diferentes sistemas QL-PO, seja modificando os fluoróforos como Ladeira (2014) para comparação da hipericina com outros, ou modificando o derivado do ácido oxálico como Cabello *et al* (2020), e até mesmo modificando o meio reacional como Peixoto (2010) que fez vários ensaios com diversos líquidos iônicos e proporções de DME/líquidos iônicos. [1, 14, 21].

Ao analisar os trabalhos, verificou-se que poucos deles fazem cálculos de rendimento e os discutem. São ao todo 22 trabalhos que usam rendimento quântico, distribuídos da seguinte maneira (tabela 2):

Tabela 2 - Rendimentos Quânticos

Rendimento Quântico	Quantidade de trabalhos	Referências
Fluorescência	12	[1, 14, 15, 18, 22, 29, 42, 46, 47, 48, 53, 56, 76]
Quimiluminescência	16	[1, 15, 18, 19, 24, 27, 29, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 56, 57, 76]
Estado Excitado Singlete	16	[14, 15, 18, 19, 21, 22, 27, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 56, 57, 76]

Fonte: Autoria própria

Este último valor de rendimento quântico é um dado característico das pesquisas de Baader e de seu grupo de pesquisa da USP. Com estudos relacionados com o mecanismo do sistema QL-PO, esse rendimento se faz

necessário, pois ele é essencial para a compreensão do mecanismo reacional, e o mesmo está relacionado com a concentração do fluoróforo.

O rendimento quântico de fluorescência aparece nos trabalhos por causa do próprio cálculo dos outros rendimentos e para avaliar a possibilidade de uso de um fluoróforo. A comparação entre os fluoróforos para discutir sua eficiência e sua possível aplicação em sistema quimiluminescente peróxi-oxalato normalmente começa dos rendimentos de fluorescência.

O rendimento quântico de quimiluminescência em relação ao de fluorescência auxilia na melhor compreensão do sistema estudado. Como o que foi explicado anteriormente, é uma razão entre as moléculas que emitiram luz e as que foram excitadas. Quanto mais próximo de 1 essa razão, isso quer dizer que o fluoróforo é mais eficiente para uma determinada condição experimental. Quando o valor do rendimento é comparado entre os fluoróforos, pode-se afirmar que o que tem o maior valor é o que melhor interage com o IAE para formar o complexo que dará origem ao fluoróforo no estado excitado. Trabalhos que comparam fluoróforos e que estudam o mecanismo reacional são os que fazem o cálculo deste parâmetro.

Das pesquisas de Baader e seu grupo, que apontam o rendimento quântico do estado excitado singlete, de 16 trabalhos (Tabela 2), 12 deles também apresentam os valores de rendimento quântico de quimiluminescência e os utilizam para encontrar o rendimento do estado excitado singlete.

7.2. Intensidade de Fluorescência e Intensidade de Quimiluminescência

A intensidade de fluorescência tem relação direta com a concentração do fluoróforo. Quando o fluoróforo absorve os fótons, é excitado e ao retornar para o estado fundamental emite luz. Essa luz emitida é a resposta que o instrumento lê, faz o tratamento e transforma nos dados usados para fazer os gráficos de Intensidade *versus* tempo de emissão ou comprimento de onda (nm), que são os mais comuns. Segundo Skoog (2002), “a potência de emissão de fluorescência F é proporcional à potência radiante do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema” [36]. Essa excitação pode ser representada pela seguinte expressão (equação 8):

$$F = K'(P_0 - P) \text{ (Equação 8)}$$

K' é uma constante que sofre dependência da eficiência quântica do sistema, P_0 é relativo à potência do feixe incidente e P é a potência obtida após o feixe transpor uma distância b . Ao estabelecer uma relação entre tal expressão e a lei de Lambert Beer, é possível obter a seguinte relação (equação 9), simplificada (considerando P_0 constante):

$$F = K * c \text{ (Equação 9)}$$

Onde c é a concentração. Ou seja, a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração. Essa afirmação vale até que a concentração não seja grande a ponto de a absorbância ser maior que 0,05, pois neste momento o sistema perde a linearidade [36].

Para a intensidade de quimiluminescência, essa relação é um pouco diferente porque a emissão de luz não depende apenas da concentração do fluoróforo, mas da reação química que ocorre no meio. A intensidade radiante I_{QL} é dependente do rendimento quântico, da velocidade reacional (dC/dt) e do rendimento quântico de excitação, definido como a relação entre as moléculas que chegaram ao estado excitado e as que efetivamente reagiram (equação 10).

$$I_{QL} = \phi_{QL} * \frac{dC}{dt} = \phi_{EX} * \phi_{EM} * \frac{dC}{dt} \text{ (Equação 10)}$$

A intensidade de quimiluminescência pode ser empregada na discussão de qual é o melhor fluoróforo para um dado sistema QL-PO. Porém, apenas essa informação não esclarece sobre a sua eficiência. Para concluir com informações mais exatas, sobre a eficiência do fluoróforo, é necessário o cálculo de rendimento quimiluminescente. Esse parâmetro ainda pode ser usado para verificar quais as melhores condições do meio para um determinado fluoróforo, como no trabalho de Zargoosh *et al* (2013) [58].

Quando se compara os perfis de intensidade *versus* comprimento de onda — de fluorescência e de quimiluminescência —, segundo Ladeira (2014), é necessária uma sobreposição destes espectros para que seja possível afirmar que a emissão QL provém da excitação do fluoróforo pela reação química ali ocorrida e, que quando do retorno para o estado fundamental, emite luz no respectivo comprimento de onda de fluorescência. Zargoosh *et al* (2011) comparam os perfis de intensidade fluorescente e quimiluminescente em seu artigo, como sendo este um estudo

preliminar de sua pesquisa, para investigar o uso de um fluoróforo específico para aplicar em determinações de glucose usando o sistema QL-PO [1, 69].

Como já abordado, as intensidades de fluorescência e de quimiluminescência são informações obtidas a partir de diferentes sistemas para o mesmo fluoróforo. Essa molécula passa para o estado excitado partindo de diferentes processos, o primeiro por luz e o segundo por uma reação química.

Quando se trata de um sistema quimiluminescente, espera-se que informações relacionadas à intensidade possam aparecer em trabalhos que o utilizam. Já a intensidade de fluorescência está muito mais relacionada com o fluoróforo, isso pode ser um dos motivos para que dados e gráficos de intensidade de fluorescência tenham aparecido mais em pesquisas que estudam um possível novo fluoróforo ou que comparam fluoróforos. Abaixo há uma tabela que informa quantos trabalhos possuem essas informações e quais são eles (tabela 3).

Tabela 3 - Trabalhos que utilizam intensidade de fluorescência e quimiluminescência

Intensidade	Número de trabalhos	Referências
Quimiluminescência	25	[1, 14, 15, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 43, 45, 49, 58, 59, 61, 69, 70, 71, 72, 77, 78, 79]
Fluorescência	17	[1, 29, 31, 32, 33, 42, 43, 51, 58, 59, 60, 69, 70, 72, 77, 78, 79]

Fonte: Autoria própria

A intensidade de quimiluminescência é citada em muitos trabalhos que fazem estudos cinéticos. A observação do comportamento do sistema é verificada a partir de uma curva intensidade em função do tempo.

Outros parâmetros que podem ser estudados junto com as informações de intensidade de sinal são, por exemplo, as concentrações dos reagentes e valores de pH que oferecem uma maior intensidade, consequentemente um maior sinal analítico. São essas aplicações para a intensidade de quimiluminescência nesse

sistema que foram observadas nos artigos, teses e dissertações no período de 2010 a 2020.

A intensidade de fluorescência é dada em curvas de intensidade *versus* comprimento de onda (nm), com o objetivo de comparar o comprimento de onda máximo de um determinado sistema com outro. O fluoróforo é colocado em meio de solvente onde a reação quimiluminescente ocorrerá, sem a presença dos outros reagentes, assim é possível saber se outro componente do meio influencia na emissão de luz. Exemplos de mudanças que podem ocorrer são: diminuição da intensidade, descolamento do comprimento de onda máximo em relação ao fluoróforo apenas em meio de solvente [1, 36].

Os trabalhos que não apresentam nenhum desses dados são os de aplicação, onde a resposta analítica é o foco, como o de Hu *et al*, em 2013 que usou o sistema quimiluminescente como um detector num microchip de eletroforese [55]; os de revisão que abordam brevemente os sistemas; e os mecanísticos que dedicam sua atenção mais aos dados de rendimento quântico fluorescente e quimiluminescente.

8. APLICAÇÕES DO SISTEMA QL-PO ATUALMENTE

Segundo Skoog (2002), os sistemas quimiluminescentes possuem várias aplicações analíticas porque geralmente eles possuem uma alta sensibilidade, por serem fáceis de monitorar, com ausência de ruído e baixos níveis de luz. Seus limites de detecção podem chegar a partes por bilhão. Alguns exemplos trazidos são análises de gases, espécies orgânicas e inorgânicas [36].

A primeira aplicação do sistema QL-PO surgiu entre 1960 e 1970 sendo idealizado com o objetivo de ser uma fonte de luz para momentos de emergência, quando não há como recorrer à energia elétrica.

O dispositivo desenvolvido e patenteado por Michael McKay Rauhut ficou conhecido como “light stick”, que significa “bastão de luz”, um nome literal para o objeto em questão. O bastão foi projetado da seguinte maneira: uma ampola de vidro, envolta em um bastão de material flexível. Entre a ampola de vidro e o bastão há um reagente e dentro da ampola, outros reagentes. Ao dobrar todo o dispositivo, rompe-se a ampola de vidro e os reagentes necessários para a reação quimiluminescente ocorrer. Em uma parte do objeto que emitia luz estava o derivado

do ácido oxálico, normalmente um éster, e o ativador; na outra parte ficava o peróxido de hidrogênio e um catalisador que no caso era uma base forte [14].

Para o sistema QL-PO existem inúmeras aplicações, como determinação da atividade de antioxidantes; quantificação para reações que tem como produto o peróxido de hidrogênio ou que o destrói, de íons metálicos, de ácido oxálico e derivados em meios biológicos, de tensoativos em amostras ambientais (como Triton X-100) dentre outros [29, 80].

Atualmente, ele é muito aplicado em análise instrumentais com cromatografia líquida de alta eficiência (HLPC), eletroforese capilar (EC) e até mesmo sistemas mais complexos de análise por FIA. Com esses métodos é possível fazer detecção de peróxido de hidrogênio e até mesmo de compostos fluorescentes, sendo um método muito sensível e seletivo. É possível ainda identificar se compostos que não são fluorescentes naturalmente, após derivatizações com outros compostos, podem apresentar fluorescência nesse sistema (aminoácidos, ácidos carboxílicos, catecolaminas, aminas e compostos carbonílicos são exemplos de espécies que passam por esse procedimento) [14, 34, 80].

As catecolaminas são substâncias que quando derivatizadas, podem ser quantificadas pelo emprego do sistema QL-PO. A detecção de catecolaminas é importante, porque quando encontradas em amostras biológicas como urina e sangue, podem indicar a presença de doenças. Hipertensão é um exemplo de doença que pode ser detectada por esse método [14].

Ainda, pode-se citar o emprego desse sistema quimiluminescente para quantificação de compostos em reações enzimáticas, quando a reação ocorre em pH 7, ótimo para a maior parte das reações enzimáticas. É o caso do trabalho de Zargoosh et al (2011), que usa para a quantificação de glicose em soro e urina humanos. Para isso, utilizaram a enzima glicose oxidase numa mistura de glicose, água e gás oxigênio, formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Partindo do peróxido formado na reação, quantifica-se a glicose no meio em questão. A reação se deu com TCPO e como fluoróforo o di(terc-butil)-2-(terc-butilamino)-5-[(E)-2-fenil-1-etenil]-3,4-furandicarboxilato, os dois preparados em laboratório [69, 75].

Liu, Lin e Lin (2010) apresentaram em seu trabalho de revisão exemplos de aplicações do sistema quimiluminescente aqui estudado em análises de comida. Análise de leite para detecção de compostos N-nitrosos com limite de detecção (LD)

de $0,04 \text{ ug mL}^{-1}$ e análise de suco de frutas para detecção de N-metilcarbamatos (NMC's) com LOD 4 ug L^{-1} [81].

Uma outra proposta de uso do sistema QL-PO é descrita no trabalho de Romanyuk *et al* (2017). A ideia é usar a luz produzida a partir do sistema para a eliminação de células tumorais sobre estresse oxidativo. Além disso, as células estudadas produziam peróxido de hidrogênio que não era liberado e foi utilizado como o reagente do sistema. Os radicais formados durante a reação causavam danos nas células, e unindo isso aos compostos usados para gerar o estresse oxidativo, induziram a citotoxicidade [23].

9. CONCLUSÃO

A partir da pesquisa, leitura e esquematização dos dados dos artigos selecionados dentro do período que foi definido no começo da pesquisa, foi possível conhecer o funcionamento das reações químicas luminescentes, mais especificamente do sistema quimiluminescente peróxi-oxalato.

Este sistema possui reagentes com características muito específicas para seu funcionamento, podendo ser considerados reagentes base, os quais não impedem a sua versatilidade porque existem vários derivados de ácido e fluoróforos que possuem potencial para serem aplicados. Existem reagentes que são mais utilizados do que outros, até porque a funcionalidade deles, mecanismo e sinal analíticos já são bastante conhecidos na área de pesquisa, sendo assim eles podem ser utilizados como parâmetro para comparação. São eles o TCPO como derivado de ácido, DPA como fluoróforo e o peróxido de hidrogênio.

Em relação aos fluoróforos, ainda é uma área com grande capacidade de expansão, pois são diversas as moléculas que podem ser empregadas e estudadas para essa função. Percebeu-se que nesse momento de investigação da possibilidade de uso de um novo composto é de grande valia ter as informações de intensidades e rendimentos quânticos de fluorescência e quimiluminescência do possível fluoróforo.

Um dos focos desse trabalho de conclusão de curso foi averiguar a possibilidade da hipericina como fluoróforo nesse sistema, porém nada novo foi publicado sobre esse composto desde a dissertação usada como base para o início deste trabalho

do ano de 2014. Os 3 trabalhos encontrados são da primeira metade da década de 2010 e apontam que a HYP pode sim ser usada como fluoróforo e que seu rendimento quântico de quimiluminescência é satisfatório para tal.

O sistema QL-PO é versátil e sua aplicação é viável, para análise de sistemas biológicos e até de tratamentos para células tumorais. Os caminhos da área a partir de agora são bem diversos, tanto para futuras aplicações quanto para estudos de novos sistemas, onde cinética e mecanismos sempre estarão presentes.

10. REFERÊNCIAS

1. LADEIRA, Patrícia Cristina Costa. **Estudo da reação quimiluminescente do sistema peróxi-oxalato, em meio parcialmente aquoso, na presença de ciclodextrinas naturais e hipericina sintética**. Orientador: Profa Dra Patrícia Dantoni. 2014. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência & Tecnologia - Química) - Universidade Federal do ABC, Santo André - SP, 2014.
2. Ferreira, E.C.; Rossi, A.V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1003–1011, 2002.
3. Stevani, C.V.; Baader, W.J. O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 715–723, 1999.
4. BARTOLONI, Fernando Heering *et al.* Luz: Um Raro Produto de Reação. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 544 - 554, 2011.
5. Wiedemann, E.; **Ann. Phys. Chem.** 1888, 24, 446.
6. Radziszewski, B; **Ber. Chem. Ges.** 1877, 10, 70.
7. SANTOS, Roberto Márcio Souza; SANTOS, Maiza Ferreira. Quimiluminescência e Bioluminescência. **Química Nova**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 200 - 209, 1993.
8. OLIVEIRA JR., Adil de Souza *et al.* Ensino do modelo atômico de Bohr, quimiluminescência e luminol: análise dos livros didáticos de Campo Mourão com base nas diretrizes curriculares da educação básica de química do Paraná. **ACTIO: Docência em ciências**, Curitiba - PR, v. 3, n. 1, p. 75 - 90, 2018.
9. Chandross, E.A. A new chemiluminescent system. **Tetrahedron Letters**, n. 12, p. 761–765, 1963.
10. Rauhut, M. M.; Chemiluminescence from concerted peroxide decomposition reactions. **Acc. Chem. Res.** Vol. 2, p. 80 - 87, 1969.
11. BIS(2,4,6-TRICHLOROPHENYL) oxalate. Sigma Aldrich, 2019. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/75707?context=product>. Acesso em: 4 fev. 2021.
12. IMIDAZOLE. Sigma Aldrich, 2019. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/i2399?context=product>. Acesso em: 4 fev. 2021.
13. Stevani, C. V; Campos, I.P. de A.; Baader, W.J. Synthesis and characterisation of an intermediate in the peroxyoxalate chemiluminescence: 4-chlorophenyl O,O-hydrogen monoperoxyoxalate. **Journal of Chemical Society- Perkin Transactions 2**, v. 8, p. 1645–1648, 1996.

14. PEIXOTO, Mônica Melchiorretto de Medeiros. **Estudo do mecanismo da quimiluminescência do sistema peróxi-oxalato em meio aquoso com tampão fosfato e em líquidos iônicos**. 2010. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-02032011-094641/>>. Acesso em: 12 de maio de 2020.
15. BARTOLONI, Fernando Heering. **Mecanismos do sistema peróxi-oxalato em meios aquosos e da quimiluminescência de 1,2-dioxetanonas**. 2010. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-26112010-085325/>>. Acesso em: 12 de maio de 2020.
16. CARBULONI, Caroline Franco *et al.* Levantamento bibliográfico em revistas brasileiras de ensino: artigos sobre o conteúdo tabela periódica. **ACTIO: Docência em ciências**, Curitiba - PR, v. 2, ed. 1, p. 225 - 242, Agosto 2017.
17. ETO, WANDERLINO DE SOUSA AGUIAR. **UM BREVE LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE OS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E SUAS CARACTERÍSTICAS**. Orientador: Welington de Oliveira Cruz. 2018. 39 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2018.
18. 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**, v. 33, n. 10, p. 2055–2063, 2010.
19. Boaro, Andreia & Bartoloni, Fernando. Peroxyoxalate High Energy Intermediate is Efficiently Decomposed by the Catalyst Imidazole. **Photochemistry and photobiology**. 92. 10.1111/php.12608, 2016.
20. PEIXOTO, Mônica Melchiorretto de Medeiros; BARTOLONI, Fernando Heering; BAADER, Wilhelm Josef. Constante bimolecular de catálise com imidazol e rendimentos quânticos do sistema peróxi-oxalato em 1,2-dimetoxietano. **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindoia - SP, 2007.
21. CABELLO, Maidileyvis C.; SOUZA, Gláucia A.; BELLO, Liana V.; BAADER, Wilhelm Josef. Mechanistic Studies on the Salicylate-Catalyzed Peroxyoxalate Chemiluminescence in Aqueous Medium. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], p. 28 - 36, 2020.
22. Souza GA, Lang AP, Baader WJ. Mechanistic Studies on the Peroxyoxalate Chemiluminescence Using Sodium Salicylate as Base Catalyst. **Photochemistry and Photobiology**. 93(6):1423-1429; Nov. 2017.
23. ROMANYUK, Andrey V. *et al.* Peroxyoxalate Chemiluminescent Reaction as a Tool for Elimination of Tumour Cells Under Oxidative Stress. **Nature: Scientific Reports**, [s. l.], Junho 2017.

24. ROMANYUK, Andrey V. *et al.* Micelles of Amphiphilic Copolymers as a Medium for Peroxyoxalate Chemiluminescent Reaction in Water Environment. **Polymer Science**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 360 - 369, 2015.
25. LENARDÃO, Eder João *et al.* "GREEN CHEMISTRY" – OS 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE E SUA INSERÇÃO NAS ATIVIDADES DE ENSINO E PESQUISA. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 123 - 129, 2003.
26. JAMIL, Lazgin A.; FAIZULLAH, Azad T; SALEEM, Parween Hashem. FLOW INJECTION ANALYSIS OF HYDROGEN PEROXIDE WITH PEROXYOXALATE CHEMILUMINESCENCE DETECTION. **Science Journal of University of Zakho**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 88 - 92, Março 2017.
27. SOUZA, Gláci A. *et al.* General Acid and Base Catalysis by Phosphate in Peroxyoxalate Chemiluminescence. **Chemistry Select: Organic & Supramolecular Chemistry**, [s. l.], n. 1, p. 2307 - 2315, 2016.
28. FERRAZ, Ruy Carvalho Mattosinho de Castro. **Avaliação da viabilidade da quimiluminescência como fonte de luz em terapia fotodinâmica para controle microbiano**. Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi. 2010. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2010.
29. CAETITE, LEILIAN CRISTINE DE OLIVEIRA. **Utilização de DPKSH e DPKBH como novos fluoróforos da reação quimiluminescente do sistema peróxi-oxalato para desenvolvimento de procedimento analítico de determinação de íons chumbo (II)**. Orientador: Prof^a. Dr^a. Ivanise Gaubeur. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência & Tecnologia - Química) - Universidade Federal do ABC, Santo André - SP, 2014.
30. DANTONI, Patrícia. Effect of some surfactants on the chemiluminescent reactions of bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate and bis(2-nitrophenyl)oxalate with hydrogen peroxide. **Canadian Journal of Chemistry**, [s. l.], p. 534 - 541, 24 maio 2012.
31. CHAI, Na; YANG, DongQin; CHEN, FuNan. A novel chemiluminescence system based on bis(2,4,6-Trichlorophenyenyl) oxalate and hydrogen peroxide induced by CdTe QDs for determination of phloroglucinol. **Microchemical Journal**, [s. l.], p. 345 - 350, 2019.
32. MOHAMMADI, Sanam Sadeghi *et al.* Chemiluminescent liposomes as a theranostic carrier for detection of tumor cells under oxidative stress. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], p. 113 - 123, 2019.
33. LI, Zengjin *et al.* The imaging of local glucose levels in tumor periphery via peroxyoxalate chemiluminescent nanoparticle–glucose oxidase–doped alginate hydrogel. **Royal Society of Chemistry: Analytical Methods**, [s. l.], p. 2763 - 2768, 2019.

34. WASEEM, Amir; YAQOOB, Mohammad; NABI, Abdul. Analytical Applications of Flow Injection Chemiluminescence for the Determination of Pharmaceuticals—A Review. **Current Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 363 - 395, 2013.
35. REZENDE, Lucas Cunha Dias de. **Síntese, caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY**. Orientador: Prof. Dr. Flávio da Silva Emery. 2016. 199 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2016.
36. SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; NIEMAN, Timothy A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª. ed. Porto Alegre - RS: Bookman, 2002. 839 p.
37. VENTURINI JR., JANIO. **ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DE ÁCIDOS HIDRÓXI-NAFTÓICOS**. Orientador: Profa. Dra. Haidi Dálida Lentz Fiedler e Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera. 2008. 199 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2008.
38. 9,10-BIS(PHENYLETHYNYL)ANTHRACENE. Wikipédia, 2021. Disponível em: [https://en.wikipedia.org/wiki/9,10-Bis\(phenylethynyl\)anthracene](https://en.wikipedia.org/wiki/9,10-Bis(phenylethynyl)anthracene). Acesso em: 4 fev. 2021.
39. 9-COLOROANTRACENO. Wikipédia, 2014. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/9-Cloroantraceno>. Acesso em: 4 fev. 2021.
40. RODAMINA B. Wikipedia, 14 out. 2018. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Rodamina_B. Acesso em: 4 fev. 2021.
41. RODAMINA 6G. Wikipedia, 9 set. 2016. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Rodamina_6G. Acesso em: 4 fev. 2021.
42. Petre, Razvan & Zecheru, Teodora & Petrea, Nicoleta & Rotariu, Traian. Comparative study of commercially available fluorescers versus bis(2,4,5-trichloro-6-carbobutoxyphenyl) oxalate. Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition-. 12. 2464-2468, 2016.
43. AUGUSTO, Felipe Alberto. **Desvendando a alta eficiência do sistema peroxioxalato**. Orientador: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader. 2016. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2016.
44. SANTOS, Ana Paula Fileno dos. **Estudos Cinéticos da Reação Peróxi-oxalato com Ésteres Oxálicos Assimétricos e Determinação dos Parâmetros de Ativação na Decomposição de 1,2 - Dioxetanos**. Orientador: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader. 2011. 231 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2011.
45. SOUZA JR., Sergio Pereira de. **Influência dos Parâmetros de Solvente Sobre a Eficiência de Quimi-Excitação do Sistema Peróxi-oxalato**. Orientador: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader. 2014. 131 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2014.

46. BASTOS, Erick Leite *et al.* Four-membered cyclic peroxides: Carriers of chemical energy. **Journal of Physical Organic Chemistry**, [s. l.], p. 1 - 18, 2017.
47. OLIVEIRA, Marcelo Almeida de *et al.* Revision of Singlet Quantum Yields in the Catalyzed Decomposition of Cyclic Peroxides. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], 2012.
48. BARTOLONI, Fernando Heering *et al.* Chemiluminescence Efficiency of Catalyzed 1,2-Dioxetanone Decomposition Determined by Steric Effects. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], 2015.
49. SOUZA JR., Sergio Pereira de *et al.* Peroxyoxalate chemiluminescence efficiency in polar medium is moderately enhanced by solvent viscosity. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [s. l.], p. 143 - 150, 2016.
50. BASTOS, Erick L.; SILVA, Sandra M. da; BAADER, Wilhelm J. Solvent Cage Effects: Basis of a General Mechanism for Efficient Chemiluminescence. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], p. 4432 - 4439, 2013.
51. PETRE, Răzvan; ZECHERU, Teodora. Synthesis and characterization of new oxalate ester-polymer composites for practical applications. **Journal of Luminescence**, [s. l.], p. 238 - 294, 2013.
52. CAMBREA, Lee R. *et al.* A Soluble, Halogen-Free Oxalate from Methyl Salicylate for Chemiluminescence Demonstrations. **Journal of Chemical Education**, [s. l.], 2013.
53. AUGUSTO, Felipe A. *et al.* Kinetic studies on 2,6-lutidine catalyzed peroxyoxalate chemiluminescence in organic and aqueous medium: Evidence for general base catalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [s. l.], 2019.
54. DELAFRESNAYE, Laura *et al.* All Eyes on Visible Light Peroxyoxalate Chemiluminescence Read-Out Systems. **Chemistry: A European Journal**, [s. l.], 2019.
55. Hu HM, Yin XF, Wang XZ, Shen H. A study on the system of nonaqueous microchip electrophoresis with on-line peroxyoxalate chemiluminescence detection. **J Sep Sci.** 36(4):713-20, Feb. 2013.
56. CABELLO, Maidileyvis C.; EL SEOUD, Omar A.A.; BAADER, Wilhelm J. Effect of ionic liquids on the kinetics and quantum efficiency of peroxyoxalate chemiluminescence in aqueous media. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [s. l.], 2018.
57. AUGUSTO, Felipe A. *et al.* Mechanistic Study of the Peroxyoxalate System in Completely Aqueous Carbonate Buffer. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 97, n. 2, 2020.

58. Zargoosh, K.; Ghayeb, Y.; Azmoon, B.; Qandalee, M. Simple and fast PO-CL method for the evaluation of antioxidant capacity of hydrophilic and hydrophobic antioxidants. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 112, p. 1–6, 2013.
59. Kazemi, S.Y.; Abedirad, S.M. Effect of glutathione on peroxyoxalate chemiluminescence of hypericin as the fluorophore. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 118, p. 782–6, 2014.
60. NAKANO, Koji *et al.* Carbon Quantum Dots as Fluorescent Component in Peroxyoxalate Chemiluminescence for Hydrogen Peroxide Determination. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, [s. l.], 2018.
61. Kazemi, S.Y.; Abedirad, S.M.; Zali, S.H.; Amiri, M. Hypericin from St . John ' s Wort (*hypericum perforatum*) as a novel natural fluorophore for chemiluminescence reaction of bis (2,4,6-trichlorophenyl)oxalate – H₂O₂–imidazole and quenching effect of some natural lipophilic hydrogen peroxide scavengers. **Journal of Luminescence**, v. 132, n. 5, p. 1226–1231, 2012.
62. SANTARÉM, Eliane Romanato; ASTARITA, Leandro Vieira. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. **Braz. J. Plant Physiol.**, [s. l.], p. 43 - 47, 2003.
63. ALVES, A. C. S. *et al.* Aspectos Botânicos, Químicos, Farmacológicos e Terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n. 3, p. 593 - 606, 2014.
64. BERNAL, Claudia. **Hipericina, Photodithazine e Photogem: Um Estudo Comparativo da Atividade Fotodinâmica**. Orientador: Prof^a. Dr^a. Janice Rodrigues Perussi. 2011. 157 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2011.
65. BARBOZA, Lurian B. *et al.* Estudo Sobre a Espectroscopia da Hipericina. **Revista Processos Químicos**, [s. l.], p. 123 - 125, 2018.
66. MACEDO, Paula Dellelo. **Avaliação dos efeitos da Terapia Fotodinâmica com Hipericina-glucamina no tratamento da doença periodontal induzida em ratos**. Orientador: Profa . Dra . Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio. 2014. 61 p. Dissertação (Mestre em Odontologia) - Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara - SP, 2014.
67. GONÇALVES, Joyce Laura da Silva. **Caracterização Físico-Química e Fotodinâmica de Fotossensibilizadores: Efeito da Modificação Química para Aumentar a Solubilidade em Meio Aquoso**. Orientador: Prof. Dr. Hidetake Imasato. 2015. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2015.
68. ANDREAZZA, Nathália Luíza. **PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E FITODERIVADOS BIOATIVOS EM *Guatteria blepharophylla***

(ANNONACEAE) E Indigofera truxillensis (FABACEAE) PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA E DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS. Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador. 2014. 428 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - UNICAMP, Campinas - SP, 2014.

69. Zargoosh, K.; Shamsipur, M.; Qandalee, M.; Piltan, M; Moradi, L. Sensitive and selective determination of glucose in human serum and urine based on the peroxyoxalate chemiluminescence reaction of a new Fluorophore. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 81, n. 1, p. 679–683, 2011.

70. KAZEMI, Sayed Yahya *et al.* A study of chemiluminescence characteristics of a novel peroxyoxalate system using berberine as the fluorophore. **Elsevier: Dyes and Pigments**, [s. l.], p. 751 - 756, 2012.

71. ALI, Marwa Fathy Bakr *et al.* A study of chemiluminescence characteristics of a novel peroxyoxalate system using berberine as the fluorophore. **Elsevier: Journal of Chromatography B**, [s. l.], p. 147 - 152, 2014.

72. CHAICHI, M. J. *et al.* Determination of vitamin B6 using an optimized novel TCPO–indolizine–H₂O₂ chemiluminescence system. **The Journal of Biological and Chemical Luminescence**, [s. l.], p. 1169 - 1176, 2014.

73. GASPAR, Caio Sereno. **CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA DE DERIVADOS DE FENANTROLINA FLUORESCENTES.** Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Nanci Camara de Lucas Garden. 2017. 70 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2017.

74. LAKOWICZ, J. R., **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** 3rd ed.; New York, 954 p., 2006.

75. RODA, Aldo. **Chemiluminescence and Bioluminescence: Past, Present and Future.** UK: RSC Publishing, 2011. 608 p.

76. ALVES, J. *et al.* Lophine derivatives as activators in peroxyoxalate chemiluminescence. **Royal Society of Chemistry: Photochemical & Photobiological Sciences**, [s. l.], p. 320 - 328, 2015.

77. FAAL, A.YEGANEH; AMINI, M.; BORDBAR, M. DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN RIVER WATER BASED ON CATALYTIC EFFECT OF TiO₂ NANO PARTICLE ON PEROXY OXALATE CHEMILUMINESCENC OF TRIAZIN DYE DERIVATIVE. **Global NEST Journal**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 48 - 54, 2012.

78. CHAICHI, M. J. *et al.* Chemiluminescence Characteristics of Furan Derivatives as Blue Fluorescers in Peroxyoxalate-Hydrogen Peroxide System. **J Fluoresc**, [s. l.], p. 1209 - 1216, 2012.

79. Samadi-Maybodi, A.; Akhoondi, R. Studies of New Peroxyoxalate-H₂O₂ Chemiluminescence System Using Quinoxaline Derivatives as Green Fluorophores. **Journal of Fluorescence**, v. 20, p. 671–679, 2010.
80. 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**, n. iii, p. 1–40, 2012.
81. LIU, Meilin; LIN, Zhen; LIN, Jin-Ming. A review on applications of chemiluminescence detection in food analysis. **Elsevier: Analytica Chimica Acta**, [s. l.], p. 1 - 10, 2010.