



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA
LABORATÓRIO DE FOTOQUÍMICA DAVID ERNEST NICODEM

MONOGRAFIA DO PROJETO FINAL DE CURSO

Título: Estudo Fotoquímico da β -Naftoflavona

Aluno: Guilherme Lopes da Cruz Santos

Orientadora: Nanci Câmara de Lucas Garden

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: ESTUDO FOTOQUÍMICO DA β -NAFTOFLAVONA

ALUNO: Guilherme Lopes da Cruz Santos

ORIENTADORA: Nanci Câmara de Lucas Garden, DQO – Instituto de Química – UFRJ

A reatividade do estado excitado triplete de β -naftoflavona (1) frente a fenóis, ao éster metílico do N-acetil-L-triptofano e DABCO foi determinada empregando a técnica de fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL). A FPL ($\lambda = 355$ nm) de soluções desoxigenadas de 1, em acetonitrila, resultou na formação de um transiente com máximo em 500 nm e tempo de vida de 2 μ s, que foi caracterizado como o estado excitado triplete de 1. Em 2-propanol e cicloexano observou-se a formação de um novo transiente com máximo em 400 nm de tempo de vida mais longo, que foi atribuído ao radical cetila formado via reação de abstração de hidrogênio. O estado triplete de 1 foi suprimido eficientemente por fenóis, pelo éster metílico do N-acetil-L-triptofano e por DABCO, com a constante de velocidade de supressão por fenóis se encontrando na ordem 4-metoxifenol > fenol > 4-cianofenol. Para os fenóis e o éster metílico do N-acetil-L-triptofano, novos transientes foram formados no processo de supressão, que foram atribuídos aos radicais resultantes de uma transferência inicial de elétron do supressor para 1 no estado excitado, seguido por uma transferência rápida de próton. Com DABCO observou-se a formação do ânion radical derivado de 1 com máximo em 390 nm. O rendimento quântico para a formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) a partir de 1 foi determinado, tendo-se obtido o valor de 0,51.

Dedicatória

*Dedico esta monografia a todos
que estiveram sempre a meu lado,
através de colaboração e
incentivo: minha avó, meus pais,
meus tios e também minha
companheira de todas as horas -
Talita Araújo de Oliveira;*

*Dedico também a: Érica de
Melo Azevedo, Vanessa Santos
Antunes e Alline Viana Barbosa
(amigas), que são as melhores
amigas que alguém pode querer.*

1. Introdução

Flavonas são pigmentos naturais que apresentam atividade antioxidante. Elas possuem a unidade 2-fenil-4-benzopirona e um grande número de derivados resultam da combinação de diversos substituintes do tipo hidroxila e/ou metoxila. Estes compostos são encontrados na maioria das plantas, variando em concentração dependendo das famílias, estando presentes em muitas plantas típicas de regiões tropicais. **Erro! Indicador não definido.** O controle fotoquímico na sua produção tem sido bastante estudado e parece que está envolvido em vários pontos ao longo do caminho biossintético.² Devido à grande eficiência em absorver luz UV, as flavonas parecem estar envolvidas em processos de proteção contra danos causados por UV em plantas.^{3,4} Vários estudos fotoquímicos e fotofísicos destas substâncias foram realizados. Sabe-se que para flavona, o estado excitado reativo é o estado triplete.⁵ A fosforescência de flavona a baixa temperatura indica um estado triplete de caráter misto $n,\pi^*-\pi,\pi^*$ e energia de 62 kcal/mol.^{6,7}

β -Naftoflavona (**1**), ou 5,6-benzoflavona, é um derivado sintético de flavonóides naturais que possui ação farmacológica como inibidores enzimáticos. Estudos recentes mostram que **1** induz uma produção considerável de estresse oxidativo em fígados de ratos, e efeitos secundários, como o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos oxidativos ao DNA e peroxidação lipídica, podem estar contribuindo para a promoção de tumores.⁸

A absorção de luz por um medicamento pode afetar a sua atuação, seja por alteração de sua formulação comercial final, por degradação fotoquímica do princípio ativo, ou por ação farmacológica indesejável dos produtos dessa degradação. Outro processo de extrema importância que pode ocorrer a partir da absorção de luz é a fotossensibilização.

Danos oxidativos em sistemas biológicos, acidentais ou intencionais, são a maior causa de morte celular.⁹ Em particular, caminhos que levam à morte celular por apoptose ou necrose podem ser induzidos pelo uso combinado de um fármaco que pode ser fotoativado, chamado de fotossensibilizador, e de luz visível que, a princípio, não causaria danos celulares. Este processo envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de causar danos aos componentes suscetíveis da célula, tais como proteínas,^{10,11} lipídios¹² e ácidos nucleicos.¹³

Em uma reação fotossensibilizada, o sensibilizador no estado excitado (Sen*) leva a processos que resultam em alterações químicas no substrato. Isto pode ocorrer via dois mecanismos conhecidos como tipo I e tipo II.

No mecanismo tipo I, o estado excitado do sensibilizador reage diretamente com o substrato, produzindo um radical ou um íon radical, via abstração de H ou transferência de elétron, respectivamente. Na presença de oxigênio molecular estes radicais podem reagir produzindo outras espécies reativas de oxigênio, como radical peroxila e ânion superóxido, e produtos oxigenados.

No mecanismo tipo II, o estado excitado do fotossensibilizador (Sen*), particularmente um estado triplete de vida longa, é eficientemente suprimido pelo oxigênio molecular devido à transferência de energia entre estas duas espécies, gerando oxigênio singlete e regenerando o sensibilizador no estado fundamental. Oxigênio singlete pode então reagir com os substratos biológicos, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, gerando produtos oxidados que podem desencadear outros processos biológicos.

O grupo de Fotoquímica da UFRJ e UFRRJ tem estudado a reação de abstração de hidrogênio pelo triplete de cetonas aromáticas e quinonas utilizando as técnicas de fotólise por pulso de laser, fotólise no estado estacionário e cálculos teóricos.¹⁴⁻¹⁹

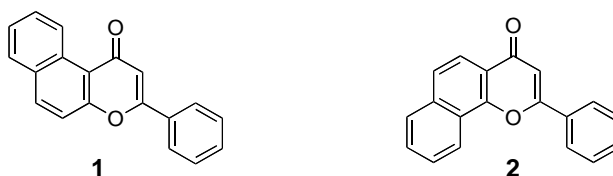
A reatividade de cetonas aromáticas depende do estado excitado triplete de menor energia, sendo o estado n,π^* o estado reativo. Porém mesmo para o caso de cetonas que apresentam o estado triplete de menor energia de natureza π,π^* , acredita-se que sua reação ocorra, predominantemente, via o estado n,π^* de maior energia. Neste caso, o estado n,π^* é populado termicamente a partir do estado de menor energia.²⁰ Em casos onde a diferença de energia entre os dois estados é muito grande, a cetona torna-se não reativa. Porém, se uma etapa de transferência de elétron preceder a transferência do hidrogênio, acredita-se que a configuração eletrônica do estado triplete de menor energia não seja importante.²¹ Além disso, a abstração de hidrogênio pelo estado triplete de cetonas aromáticas depende também da energia da ligação X-H e do potencial de ionização do doador de hidrogênio. Desta forma, o mecanismo pode variar de uma abstração semelhante à de um radical alcooxila, que ocorre com alcanos e álcoois (mecanismo HAT, que normalmente ocorre a uma $k_{\text{vel}} = 10^5 - 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a uma abstração iniciada por uma completa transferência de elétron, seguida de transferência de próton, como com aminas (mecanismo PCET, $k_{\text{vel}} \sim 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Todavia, vale ressaltar que um mecanismo que varre ambos os extremos tem sido proposto para fenóis. Pan *et.al.* usaram cálculos DFT para elucidar a fotorredução de *o*-naftoquinonas.²² Os autores

mostraram a existência de uma boa correlação entre potencial de ionização/afinidade eletrônica das quinonas com os parâmetros de Hammett. Lucas *et.al.*, usando DFT também mostraram que para fenantrenoquinona e pirenoquinona existe um grau de transferência de carga nos estados de transição para abstração de hidrogênio, mesmo com 2-propanol, o que está relacionado ao maior potencial de redução destas quinonas.¹⁶

Recentemente, a caracterização e reatividade do triplete de α -naftoflavona (**2**), um isômero de **1**, foi estudada via fotólise por pulso de laser e cálculos teóricos.¹⁷ Neste sentido, um estudo fotoquímico da β -naftoflavona (**1**), caracterizando o seu estado excitado triplete, esclarecendo os seus mecanismos reacionais de desativação, poderá auxiliar no entendimento da ação farmacológica desta classe de molécula.

2. Objetivos

Geral: Estudo fotoquímico da β -naftoflavona, caracterizando o estado excitado triplete, bem como as suas interações com doadores de H, doadores de elétron e com substratos biológicos, visando buscar informações sobre a sua fotoestabilidade e capacidade de atuar como fotossensibilizador do tipo I e/ou tipo II.



Específicos: (a) Caracterizar espectroscopicamente **1**. (b) Caracterizar, via fotólise por pulso de laser, o estado triplete de **1**, bem como avaliar a sua reatividade frente a 2-propanol, fenóis, aminas e éster metílico do N-acetil-L-triptofano. (c) Determinar o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete para **1**.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e solventes

β -Naftoflavona foi obtida da Aldrich e purificada por cristalização, utilizando-se hexano: acetato de etila 1:1 como solvente, antes de ser utilizada. Os solventes acetonitrila, cicloexano, etanol, diclorometano e 2-propanol todos de grau espectroscópico foram adquiridos da Tédia Brasil. Os reagentes 1,3-cicloexadieno, 1-metilnaftaleno, fenol, 4-metoxifenol, 4-cianofenol, 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octano (DABCO), β -caroteno e perinaftenona, todos da Aldrich, foram usados como recebidos. N-Acetil-L-Triptofano foi sintetizado a partir do L-Triptofano por Garden S. J., e usado como recebido.

3.2 Espectroscopia no UV-VIS

As análises por espectrometria no UV-VIS foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2450, na região de 300 a 500 nm. Foram registrados espectros empregando como solventes acetonitrila, etanol, diclorometano e cicloexano.

3.3 Fotólise por pulso de laser (FPL)

Os experimentos de FPL foram realizados em um equipamento da Luz Chem, modelo LFP 112/112, utilizando o terceiro harmônico ($\lambda_{exc} = 355$ nm) de um laser Nd/YAG, Quantel, modelo Brilliant B. As amostras (3 ml de soluções de **1** com absorção de $\sim 0,3$ em 355 nm) foram colocadas dentro de cubetas 10x10 mm de quartzo Suprasil e foram desoxigenadas através de passagem de argônio por 15 minutos.

Experimentos de supressão: As constantes de velocidade da reação do estado triplete de **1** com diferentes supressores empregados neste trabalho foram obtidas através de gráficos de Stern-Volmer,²³ de acordo com a equação 1.

$$k_{obs} = k_o + k_q [Q] \quad (1)$$

Onde k_o é a constante de velocidade de decaimento do estado excitado triplete na ausência de supressor, k_q é a constante de velocidade de decaimento do estado excitado triplete na presença do supressor e $[Q]$ é a concentração do mesmo.

3.4 Determinação do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete

Oxigênio singlete pode ser facilmente observado através da sua fosforescência em 1270 nm. Assim, o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete foi determinado pelo monitoramento da fosforescência de soluções com absorção a 355 nm opticamente equivalentes ($A = 0.3$) de **1**, em relação a uma solução de um padrão conhecido (perinaftenona, $\phi=1$).²⁴ Estas medidas foram feitas no Fluorímetro FS920 da Edinburgh Instruments acoplado a um detector de oxigênio singlete (fotomultiplicadora da Hamamatsu no infravermelho). Estas medidas foram realizadas em acetonitrila. O valor do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete foi determinado a partir da inclinação de gráficos de intensidade do sinal de fosforescência em 1270 nm versus intensidade de luz de excitação (laser YAG 355 nm), utilizando filtros de densidade neutra, e comparados com o padrão.

4. Resultados e Discussão

4.1 Espectroscopia UV-Vis

O espectro de absorção no UV-Vis (Figura 1) apresentou quatro máximos de absorção (tabela 1), que com a mudança de solvente, se deslocaram ligeiramente.

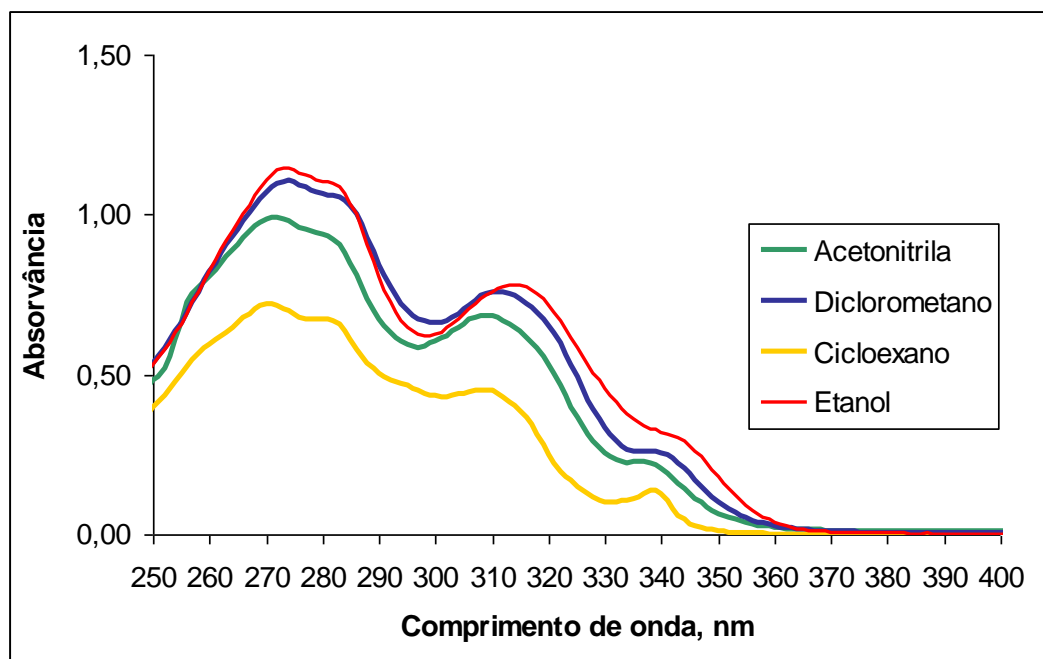


Figura 1. Espectros de absorção no UV-Vis da β -naftoflavona em diversos solventes.

O registro dos espectros UV-vis da β -naftoflavona em solventes de diferentes polaridades pode informar sobre a natureza do estado excitado de menor energia. Ocorrem deslocamentos de máximos de absorção, devido à polaridade do solvente, que acarreta na estabilização, ou não, do estado fundamental e excitado envolvido na transição eletrônica. Com o aumento da polaridade do solvente, transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ se deslocam para comprimentos de onda mais baixos (deslocamento hipsocrômico), enquanto que transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ se deslocam para comprimento de onda mais altos (deslocamento batocrômico). Estes resultados são consistentes com um caráter $n \rightarrow \pi^*$ para a transição eletrônica $S_0 \rightarrow S_1$ de menor energia.

Tabela 1. Correlação entre o deslocamento do comprimento de onda com a mudança de polaridade e a natureza da transição eletrônica.

λ_{ACN} (nm)	λ_{ETOH} (nm)	$\lambda_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ (nm)	$\lambda_{\text{Cicloexano}}$ (nm)	Transição
272	271	270	269	$\pi \rightarrow \pi^*$
282	281	281	280	$\pi \rightarrow \pi^*$
310	312	311	311	$n \rightarrow \pi^*$
340	344	341	342	$n \rightarrow \pi^*$

4.2 Fotólise por pulso de laser (FPL)

Caracterização do triplete

A fotólise por pulso de laser de uma solução de **1** em acetonitrila levou à formação de um transiente com um máximo de absorção em 500 nm e tempo de vida de aproximadamente 2 μs que foi suprimido por oxigênio (Figura 2).

Vale lembrar que o triplete de **2** foi estudado via FPL, e apresenta uma banda de absorção em 430 nm em acetonitrila, com tempo de vida de 10 μs .¹⁷ O menor valor de tempo de vida observado para o triplete de **1** deve estar relacionado a auto supressão, normalmente observado para tripletes.

Na presença de β -caroteno, um supressor de triplete frequentemente utilizado devido ao seu baixo valor de energia triplete ($E_T=20$ kcal/mol), observou-se a formação de uma banda em 520 nm devido ao triplete de β -caroteno.²⁵

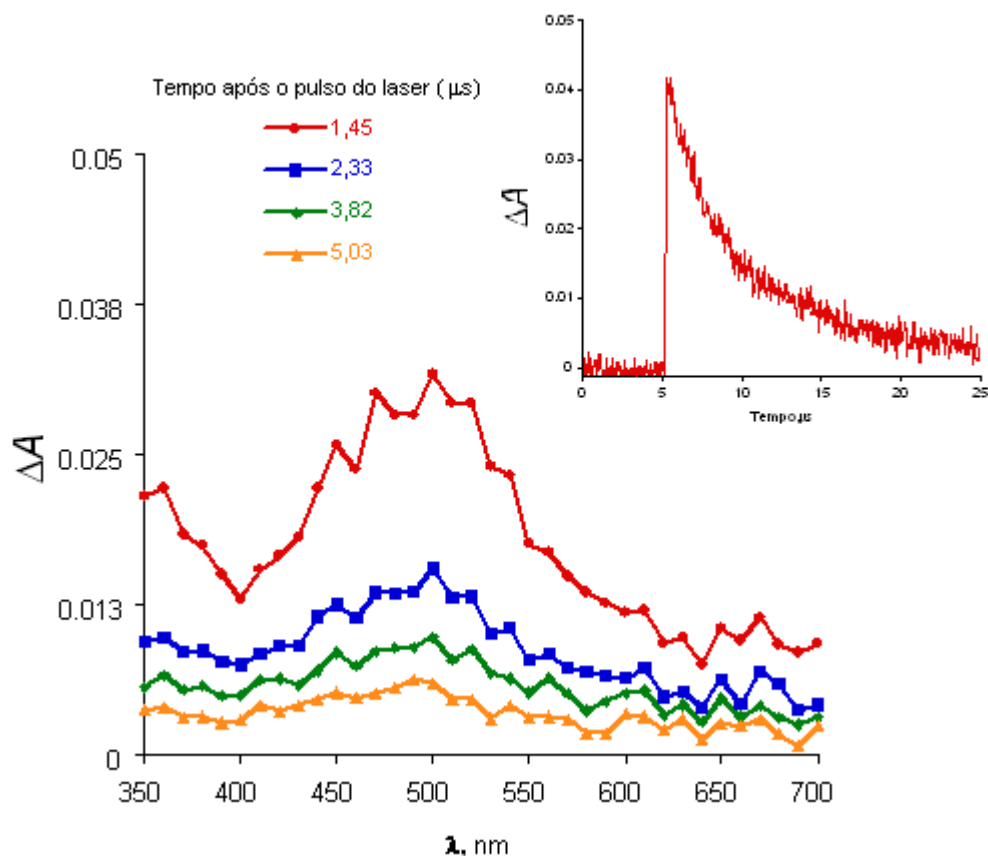


Figura 2. Espectro do transiente gerado através da fotólise por pulso de laser de **1** em acetonitrila ($\lambda_{exc} = 355\text{nm}$ e $A_{355\text{nm}} = 0,3$). Anexo, decaimento do transiente formado ($\lambda_{mon} = 500\text{nm}$).

A caracterização do estado excitado triplete de **1** foi também realizada através de experimentos de supressão com 1,3-cicloexadieno e 1-metilnaftaleno.

A fotólise por pulso de laser de uma solução de **1** em acetonitrila na presença de 1-metilnaftaleno levou à formação de um novo transiente com um máximo de absorção em 420nm (Figura 3). Sabe-se que o triplete de 1-metilnaftaleno tem energia de 60,6kcal/mol e absorve em 420nm.²⁵ O aparecimento da banda em 420 nm confirma o processo de supressão por transferência de energia do triplete de **1** para o triplete de 1-metilnaftaleno.

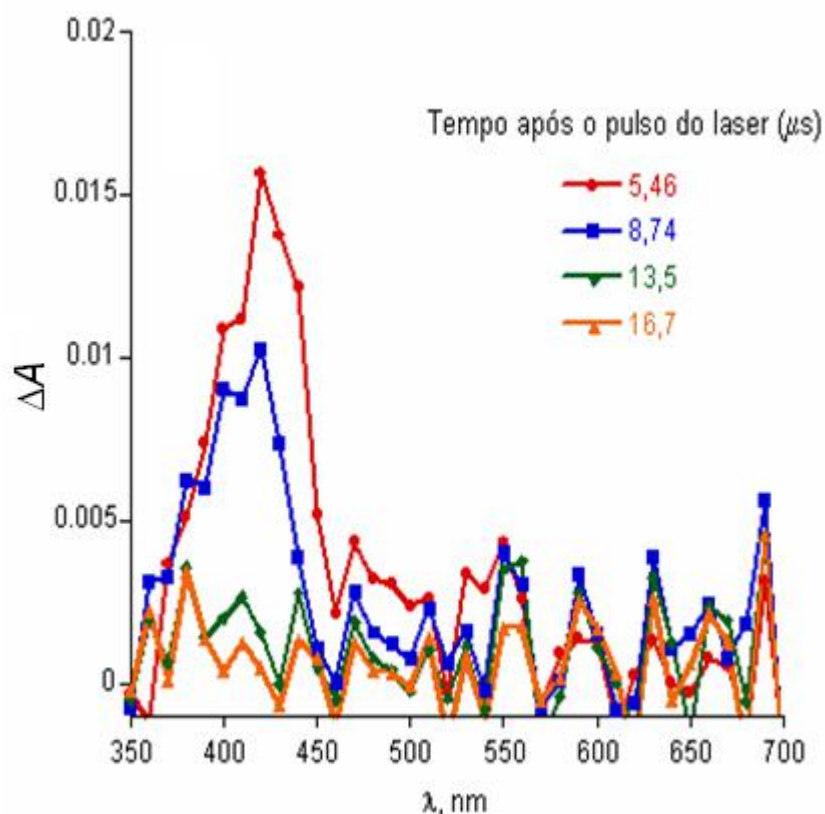


Figura 3. Espectro do transiente gerado através da fotólise por pulso de laser de **1** em acetonitrila ($\lambda_{exc} = 355\text{nm}$, $A_{355\text{nm}} = 0,3$) na presença de $3,5 \times 10^{-4}$ mol/l de 1-metilnaftaleno.

Após medirem-se os valores de k_{obs} para a banda em 500 nm na presença de diversas concentrações de 1-metilnaftaleno, construiu-se o gráfico de Stern-volmer (Figura 4) e a partir dele se obteve o valor de $2,3 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a constante de supressão do triplete de **1** por 1-metilnaftaleno.

Este resultado é consistente para um processo de transferência de energia triplete-triplete exotérmico, indicando que o triplete de **1** possui energia maior do que 60,6 kcal/mol.

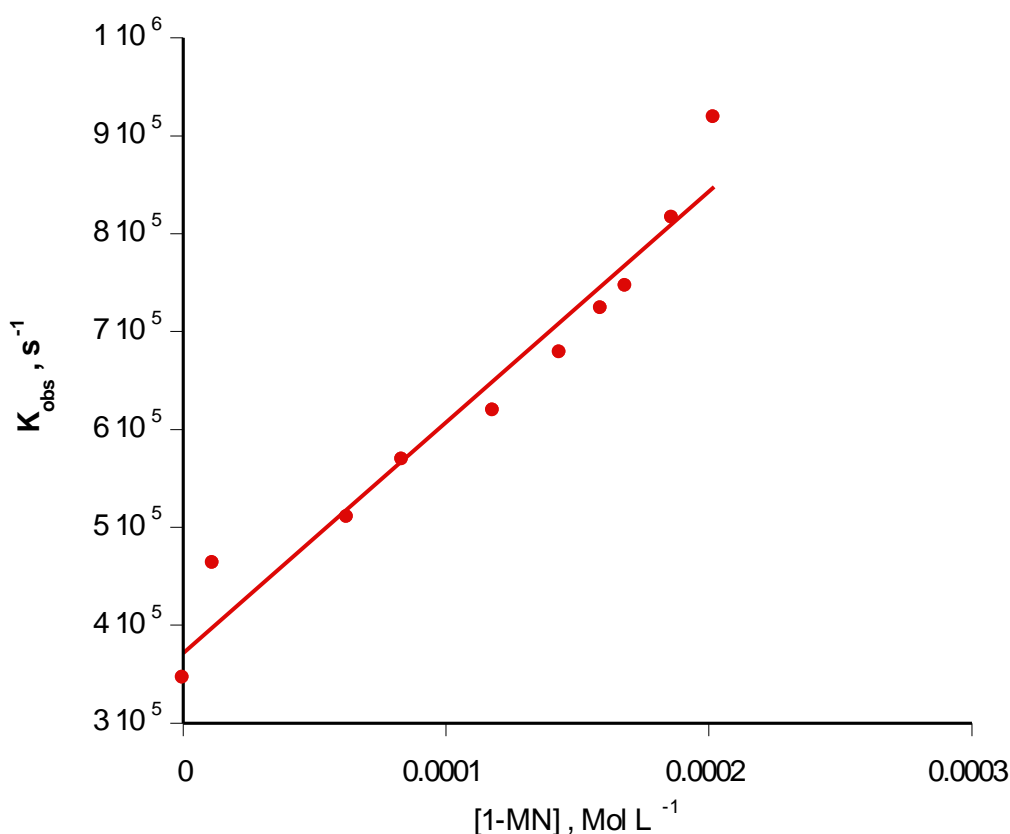


Figura 4. Gráfico de Stern-Volmer para supressão de **1** em acetonitrila por 1-metilnaftaleno, $\lambda_{\text{mon}} = 500\text{nm}$.

Na presença de 1,3-cicloexadieno o sinal em 500 nm também foi eficientemente suprimido (Figura 5), o que também está de acordo com um processo exotérmico para a transferência de energia do estado tripleto de **1** para o tripleto de 1,3-cicloexadieno. Vale ressaltar que o tripleto de 1,3-cicloexadieno possui energia de 52,4kcal/mol e absorve abaixo de 300nm, e por isso não pode ser observado.²⁵

Após medirem-se os valores de k_{obs} para diversas concentrações de 1,3-cicloexadieno, construiu-se o gráfico de Stern-volmer (Figura 5) e a partir dele se obteve o valor de $4,0 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a constante de supressão do tripleto de **1** por 1,3-cicloexadieno.

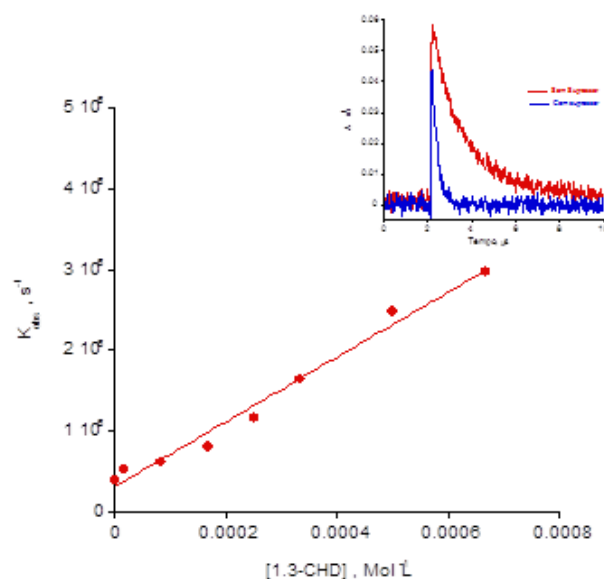
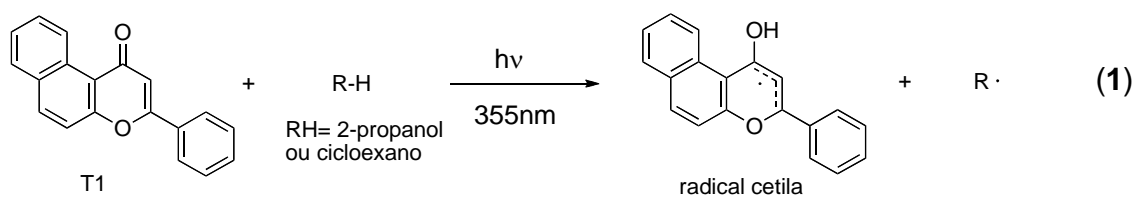


Figura 5. Gráfico de Stern-Volmer para supressão de **1** por 1,3-ciclohexadieno, em acetonitrila. Em anexo, decaimento do transiente na ausência e na presença de $2,3 \times 10^{-5}$ mol/l de 1,3-ciclohexadieno ($\lambda_{\text{mon}} = 500\text{nm}$).

Apesar de não ter sido possível determinar diretamente a energia do estado triplete de **1**, através do espectro de fosforescência a baixa temperatura, é possível inferir a energia triplete de **1** através do experimento de supressão por 1-metilnaftaleno. A elevada constante de velocidade de supressão por 1-metilnaftaleno indica que é um processo controlado por difusão, com o triplete de **1** tendo energia triplete superior à energia triplete do 1-metilnaftaleno, 60,6 kcal/mol. Este resultado está consistente com o valor de 62 kcal/mol para a energia triplete de flavona⁶ e 61,3 kcal/mol para **2**.¹⁷

Reatividade do triplete

O espectro para o transiente obtido após a FPL de **1** em cicloexano mostrou, além da banda correspondente ao triplete em 500nm de $\tau=2\mu\text{s}$, um novo transiente em 410 nm, de tempo de vida mais longo ($\tau=20\mu\text{s}$). A Figura 6 mostra o espectro para o transiente formado e os traços cinéticos para estas bandas. Espectro semelhante foi observado em 2-propanol, onde também se observa o transiente de tempo de vida longo em torno de 420 nm, conforme mostrado nos traços cinéticos para esta banda (Figura 7). Este transiente foi atribuído ao radical cetila de **1**, formado através da reação de abstração de hidrogênio pelo triplete de **1** (reação 1), o que foi confirmado por experimentos com metilviologênio.



Radicais cetilas são conhecidos como excelentes doadores de elétron e na presença de metilviologênio geram o cátion radical de metilviologênio que apresenta bandas de absorção em 398 nm e 603 nm (reação 2).²⁶ Experimentos de FPL de **1** em 2-propanol na presença de excesso de metilviologênio, levaram à formação das bandas de absorção na região correspondente ao cátion radical do metilviologênio (Figura 8). Vale ressaltar que o radical cetila de α -naftoflavona absorve em 470 nm.¹⁷

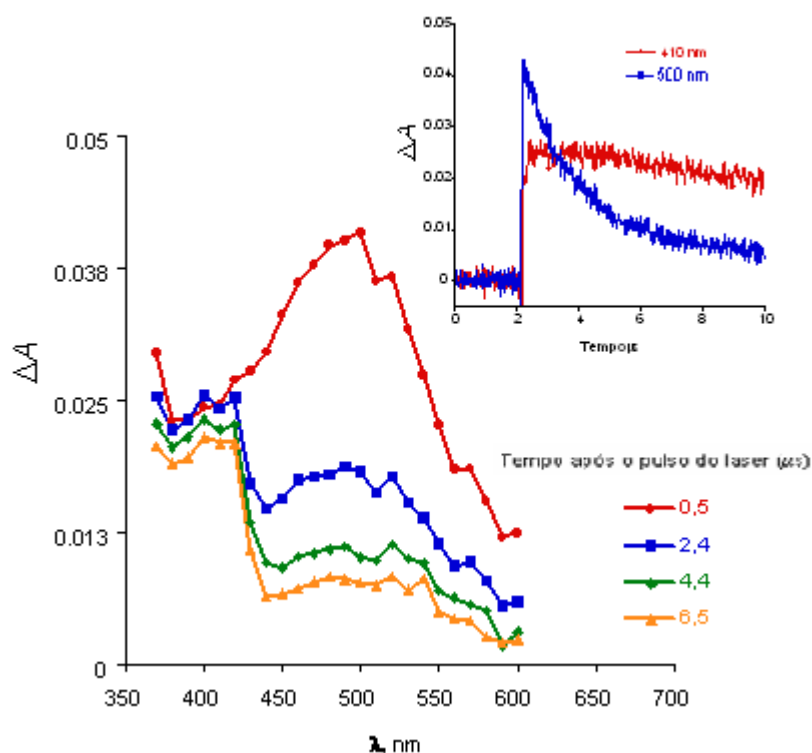
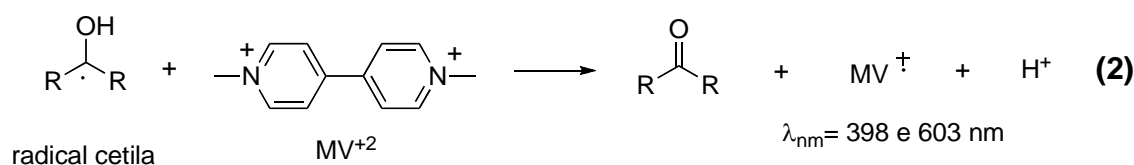


Figura 6. Espectro do transiente gerado através da fotólise por pulso de laser de **1** em cicloexano ($\lambda_{\text{exc}} = 355\text{nm}$ e $A_{355\text{nm}} = 0,3$). Em anexo, traços cinéticos monitorados em 410nm e 500nm.

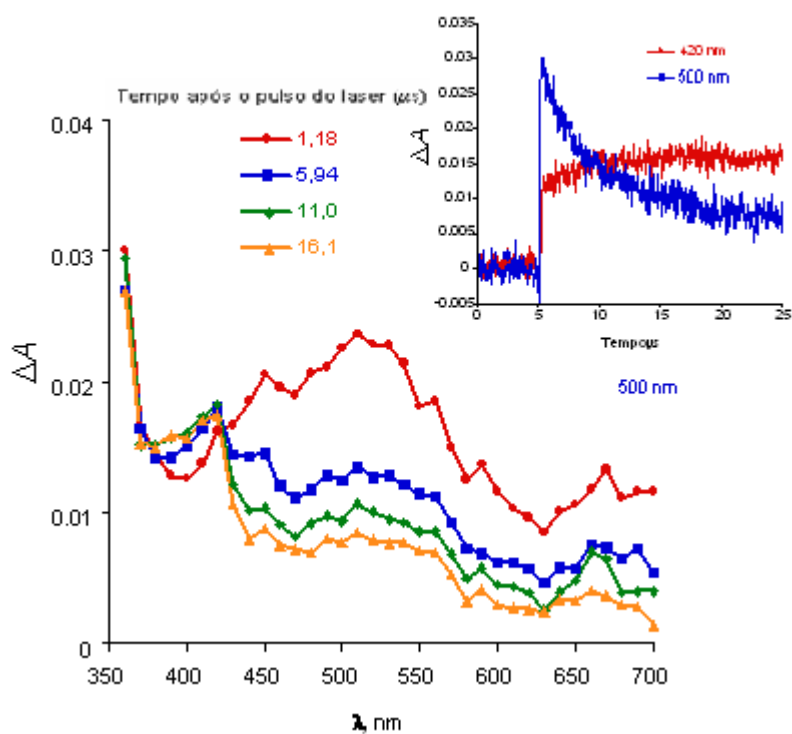


Figura 7. Espectro do transiente gerado através da fotólise por pulso de laser de **1** em 2-propanol ($\lambda_{exc} = 355\text{nm}$ e $A_{355\text{nm}} = 0,3$). Em anexo, traços cinéticos monitorados em 420nm e 500nm.

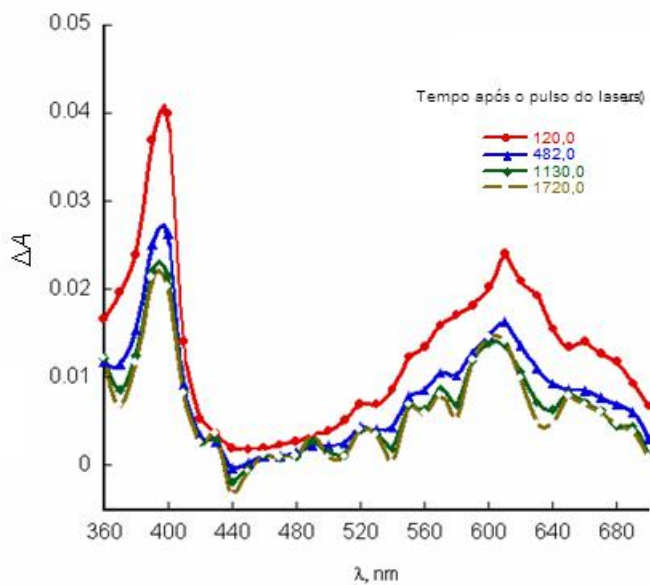


Figura 8. Espectro do transiente gerado através da fotólise por pulso de laser de **1** em 2-propanol ($\lambda_{exc} = 355\text{nm}$ e $A_{355\text{nm}} = 0,3$) na presença de metilviologênio em acetonitrila.

Não foi possível determinar a constante de velocidade de segunda ordem para a reação do triplete de **1** com 2-propanol ou com ciclohexano, o que sugere que esta reação ocorra com valores de $k_q < 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Na presença de fenóis o triplete de **1** foi eficientemente suprimido. As figuras 9, 10 e 11 mostram os gráficos de Stern-Volmer obtidos para fenol, 4-cianofenol e 4-metoxifenol, respectivamente, e a tabela 2 as constantes de velocidade de segunda ordem obtidas. A reatividade do triplete de **1** com fenóis é, como esperado, maior do que com álcoois e hidrocarbonetos, e pode ser atribuída à baixa energia de dissociação da ligação O-H e a fácil oxidação dos fenóis.^{14,18,27,28} Os valores de k_q obtidos indicam claramente que existe um efeito indutivo do substituinte, ou seja, o fenol com substituinte doador de elétron é mais reativo do que aquele com substituinte retirador de elétron. Os valores de k_q variam na ordem 4-metoxifenol > fenol > 4-cianofenol. Este efeito tem sido amplamente discutido, e é consistente com o conhecido caráter eletrofílico da carbonila triplete.^{18,29}

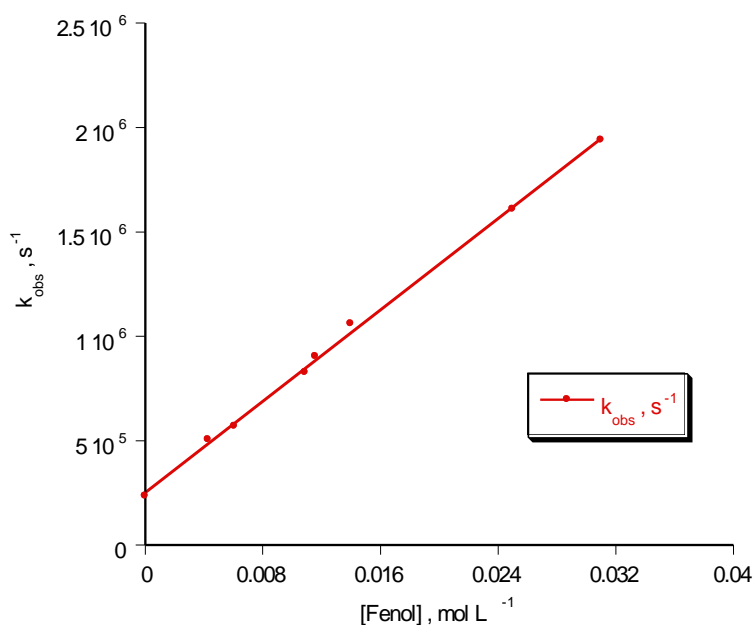


Figura 9. Gráfico de Stern-Volmer para supressão de **1** em acetonitrila por fenol, $\lambda_{\text{mon}} = 500\text{nm}$.

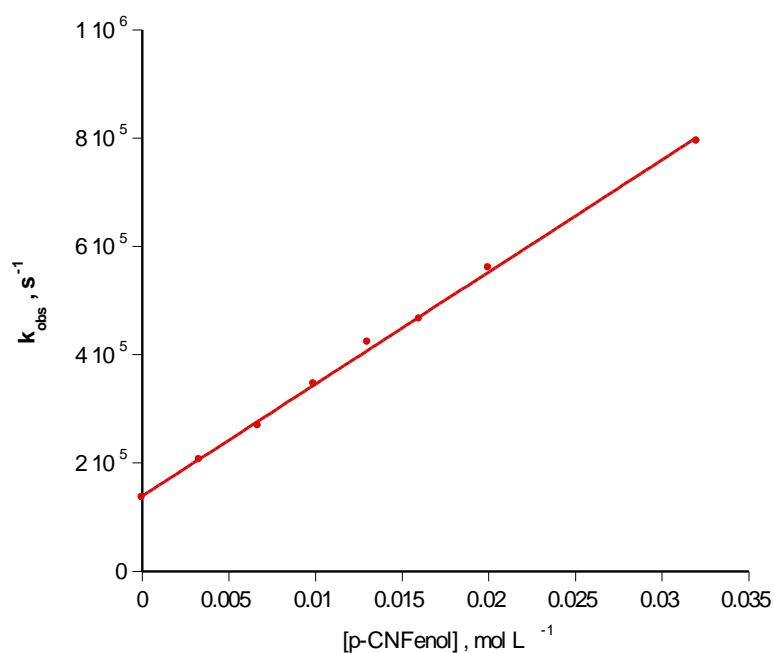


Figura 10. Gráfico de Stern-Volmer para supressão de **1** em acetonitrila por 4-cianofenol, $\lambda_{\text{mon}}=500\text{nm}$.

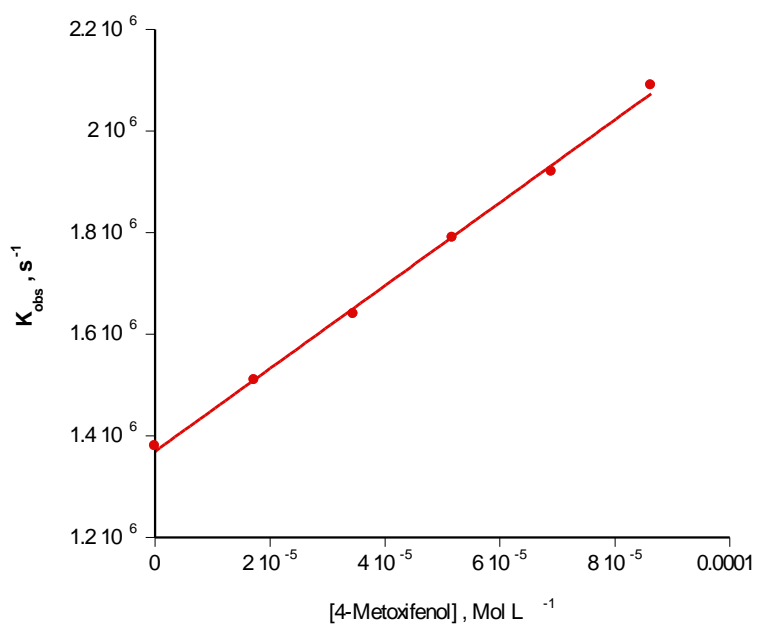


Figura 11. Gráficos de Stern-Volmer para supressão de **1** em acetonitrila por 4- metoxifenol, $\lambda_{\text{mon}}=500\text{nm}$.

A reação de abstração de hidrogênio do triplete de **1** por fenóis leva a formação do correspondente radical fenoxila. (Eq. 3) Estes radicais apresentam uma intensa banda de absorção na região de 370-505 nm, que pode ser facilmente observada nos experimentos de

FPL.³⁰ Por exemplo, a FPL de **1** na presença de $1,62 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de 4-metoxifenol (Figura 12) mostra claramente o decaimento da banda associada ao estado triplete de **1** em 500 nm e a formação de uma nova banda de absorção intensa em 400 nm. Esta nova banda pode ser atribuída tanto ao radical 4-metoxifenoxila quanto ao radical cetila de **1** que, de acordo com os experimentos em 2-propanol e cicloexano, também absorve nesta região.

Apesar de não ter realizado experimentos que forneçam informações sobre o mecanismo envolvido na abstração do H fenólico pelo triplete de **1**, o alto valor de k_q e uma série de dados da literatura para sistemas análogos sugerem que a abstração ocorre via transferência inicial de elétron seguida de transferência de próton (mecanismo PCET).^{17,31}

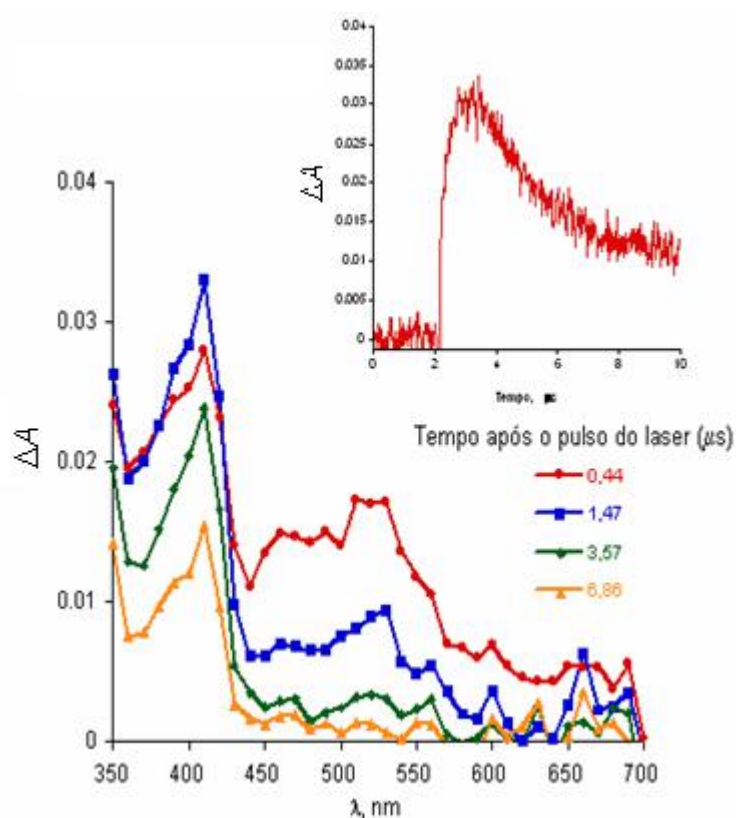
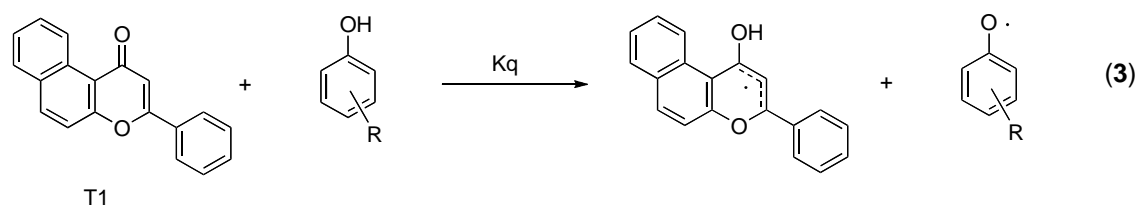


Figura 12. Espectro do transiente gerado através da fotólise por pulso de laser de **1** na presença de $1,62 \times 10^{-3}$ mol/l de 4-metoxifenol em acetonitrila. Em anexo, crescimento monitorado em 400nm.

O espectro para o transiente obtido após a FPL de **1** na presença de fenol e de 4-cianofenol também mostra a banda a 400 nm, correspondente ao radical fenoxila.

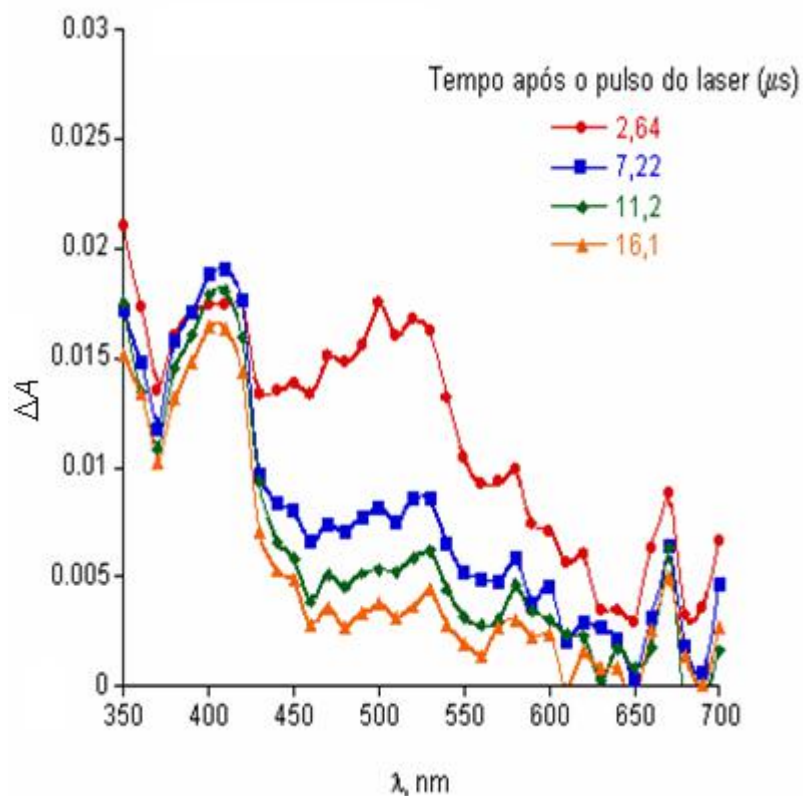


Figura 13. Espectro do transiente gerado através da FPL de **1** em acetonitrila na presença de $1,1 \times 10^{-2}$ mol/l de 4-cianofenol.

1,4-Diazobicyclo[2.2.2]octano (DABCO) é um excelente doador de elétron e não possui hidrogênio possível de ser abstraído. Desta forma, a supressão do estado excitado triplete para um composto carbonilado só ocorre por transferência de elétron. A constante de velocidade de supressão do triplete de **1** por DABCO ocorreu com uma constante próxima ao valor de difusão, $3,1 \times 10^9$ L mol⁻¹ s⁻¹, que é um valor típico para reações de transferência de elétron (Figura 14).³²

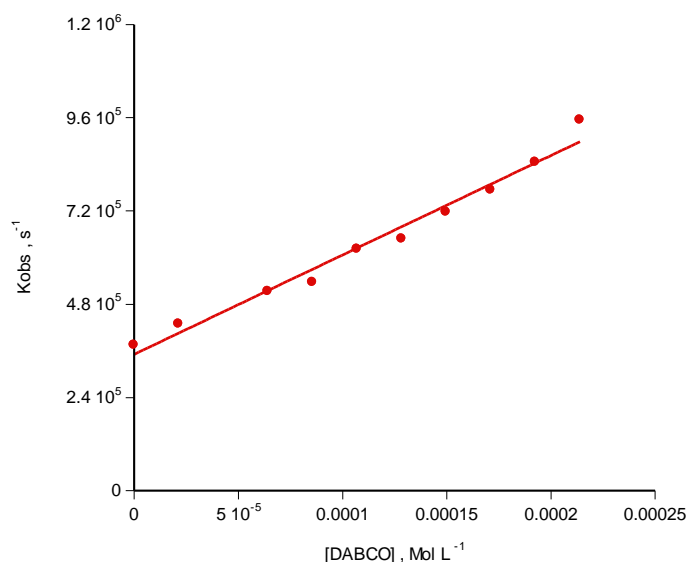


Figura 14. Gráfico de Stern-Volmer para supressão de **1** por DABCO em acetonitrila, $\lambda_{\text{mon}}=500\text{nm}$.

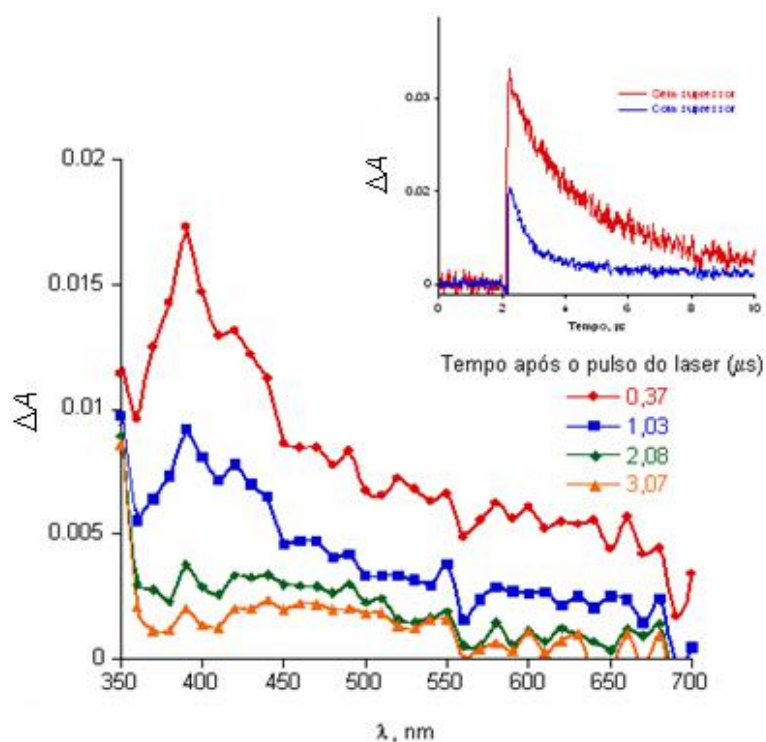
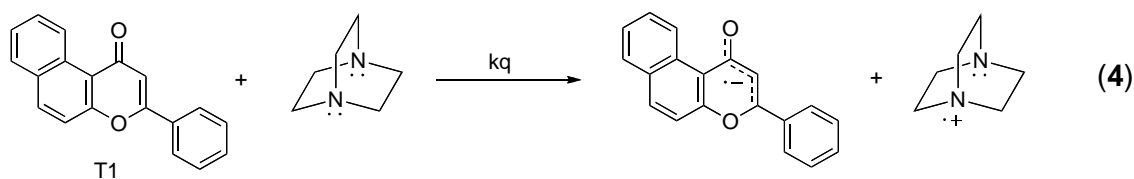


Figura 15. Espectro do transiente gerado através da FPL de **1** em acetonitrila na presença de $4,3 \times 10^{-4}$ mol/l de DABCO. Em anexo, decaimentos do transiente gerado na presença e na ausência do supressor, $\lambda_{\text{mon}} = 500\text{nm}$.

A figura 15 mostra o espectro para o transiente obtido após a FPL de **1** na presença de $4,3 \times 10^{-4}$ mol/l de DABCO em acetonitrila. Este espectro mostra que a banda correspondente ao triplete de **1**, em 500nm, desapareceu e surgiu uma nova banda em 390nm. Esta nova banda foi atribuída ao ânion radical derivado de **1**, uma vez que o cátion radical do DABCO absorve fracamente entre 460-480 nm (reação 4).³³⁻³⁵



Pode-se avaliar o efeito fotobiológico da β -naftoflavona através do estudo da reatividade do seu estado excitado triplete com biomoléculas, assim como a capacidade deste estado triplete em gerar espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete.

Como modelo para o estudo de supressão do triplete de **1** por aminoácidos foi empregado o éster metílico de N-acetiltriptofano (NATME). Este derivado foi preparado a fim de possibilitar a sua solubilização em acetonitrila.

O espectro de absorção do transiente obtido após a FPL de **1** na presença do NATME mostra o aparecimento de um novo transiente de tempo de vida longo com absorção entre 450-550 nm, atribuído ao radical do L-triptofano (Figura 16).^{36,37} O surgimento deste transiente na mesma região onde o triplete de **1** absorve dificultou a determinação de k_q .

Experimentos de supressão foram realizados monitorando o sinal em 560nm e 440nm, montando-se dois gráficos de Stern-volmer (Figura 17). Ambos experimentos forneceram um valor semelhante para a constante de supressão, com valor médio de $3,1 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este resultado demonstra que o triplete de **1** é eficientemente suprimido pelo aminoácido triptofano, inferindo que **1** é um bom fotossensibilizador do tipo II.

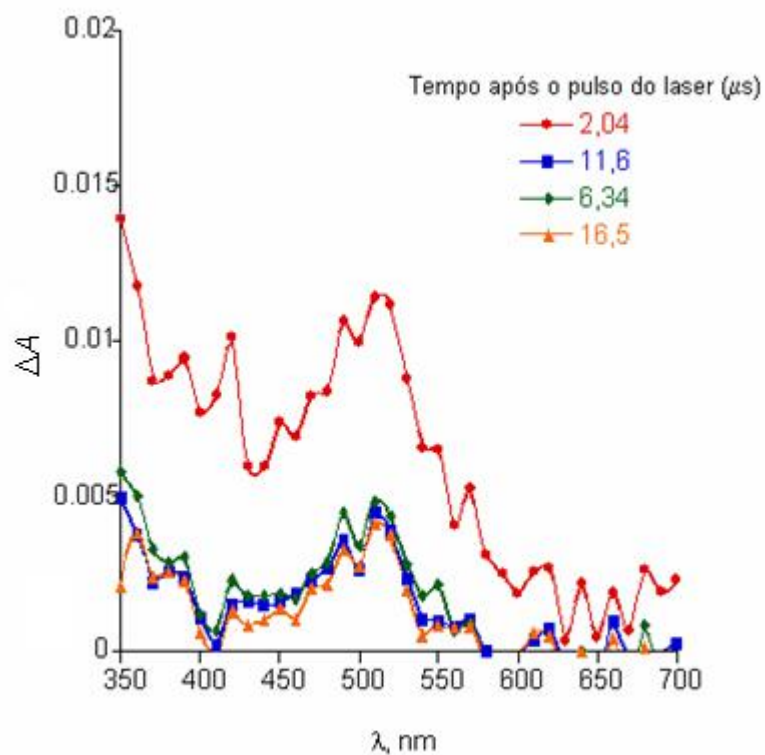


Figura 16. Espectro do transiente gerado através da fotólise por pulso de laser de **1** em acetonitrila ($\lambda_{exc}=355\text{nm}$, $A_{355\text{nm}}=0,3$) na presença de $2,1 \times 10^{-3}$ mol/l de NATME.

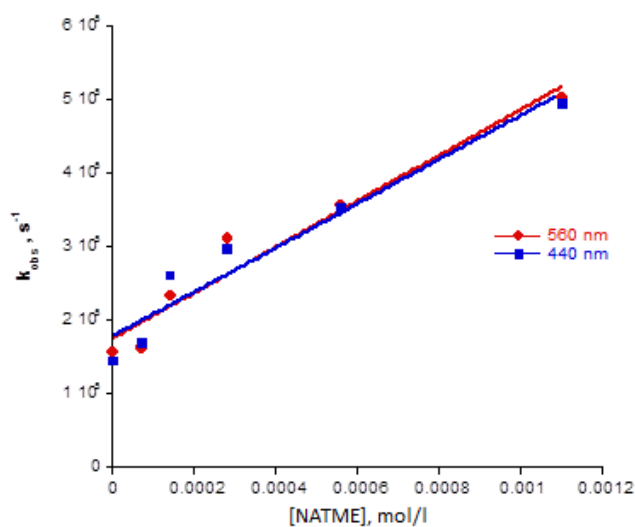


Figura 17. Gráfico de Stern-Volmer para supressão de **1** por NATME em acetonitrila, $\lambda_{mon}=560\text{nm}$.

Os valores obtidos de constantes de velocidade de segunda ordem de **1** com as moléculas supressoras são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Constantes de velocidade de segunda ordem para a supressão do estado excitado triplete da β -naftoflavona (**1**) por diversos supressores, em acetonitrila.

Supressor	k_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹) ^a
1,3-Cicloexadieno	$4,0 \times 10^9$
1-Metilnaftaleno	$2,3 \times 10^9$
Fenol	$5,5 \times 10^7$
4-Cianofenol	$2,1 \times 10^7$
4-Metoxifenol	$8,2 \times 10^9$
DABCO	$3,1 \times 10^9$
NATME	$3,1 \times 10^8$

^a Erro estimado: $\pm 10\%$

As constantes de supressão do triplete de **1** por 1,3-cicloexadieno e 1-metilnaftaleno são muito elevadas ($>10^9$ L mol⁻¹ s⁻¹), da ordem de difusão, o que condiz com a interpretação da natureza da interação entre o triplete de **1** e estes supressores, que é puramente transferência de energia.

Os valores para as constantes de velocidade de supressão de **1** frente a fenóis são altos ($>10^7$ L mol⁻¹ s⁻¹), e nos mostram a ordem de reatividade que pode ser associada ao efeito indutivo dos grupos substituintes (grupos ciano e metoxila) ligados à posição 4 do fenol. Este resultado também pode ser interpretado pelo viés do efeito solvente: Como cada tipo de supressor (fenol, 4-cianofenol e 4-metoxifenol) é solvatado pelas moléculas de acetonitrila de maneira diferente no meio, isto altera a velocidade da transferência de elétron e de próton para **1**, e conseqüentemente, afeta as constantes de velocidade de supressão.

Para a supressão do triplete de **1** com DABCO, observa-se uma constante de velocidade elevada ($>10^8$ L mol⁻¹ s⁻¹), resultado esperado para supressão do triplete por transferência de elétron.

No experimento de supressão do estado excitado triplete de **1** por NATME, observa-se um valor médio para a constante de velocidade bem elevado ($>10^8$ L mol⁻¹ s⁻¹), esperada para supressão via abstração de hidrogênio.

4.3 Determinação do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete

Oxigênio singlete pode ser facilmente formado a partir do processo de transferência de energia de um doador adequado mostrando uma emissão na região do IV próximo, em torno de 1270nm (Eq. 2). Esta fosforescência extremamente fraca fornece o método mais direto para detecção de oxigênio singlete. Soluções de **1** em acetonitrila mostraram claramente o sinal de emissão em 1270nm.



O rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$) foi determinado a partir do sinal de emissão na região do IV próximo usando um padrão conhecido (perinaftenona, $\phi=1,0$).²⁴ Foram obtidos gráficos lineares a partir da intensidade do sinal de fosforescência versus intensidade da luz de excitação para soluções de perinaftenona (padrão), de **1** e **2** em acetonitrila com oxigênio dissolvido (Figura 18). A partir da inclinação destes gráficos pode-se determinar os valores de 0,51 e 0,83 para o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete para **1** e **2** respectivamente.

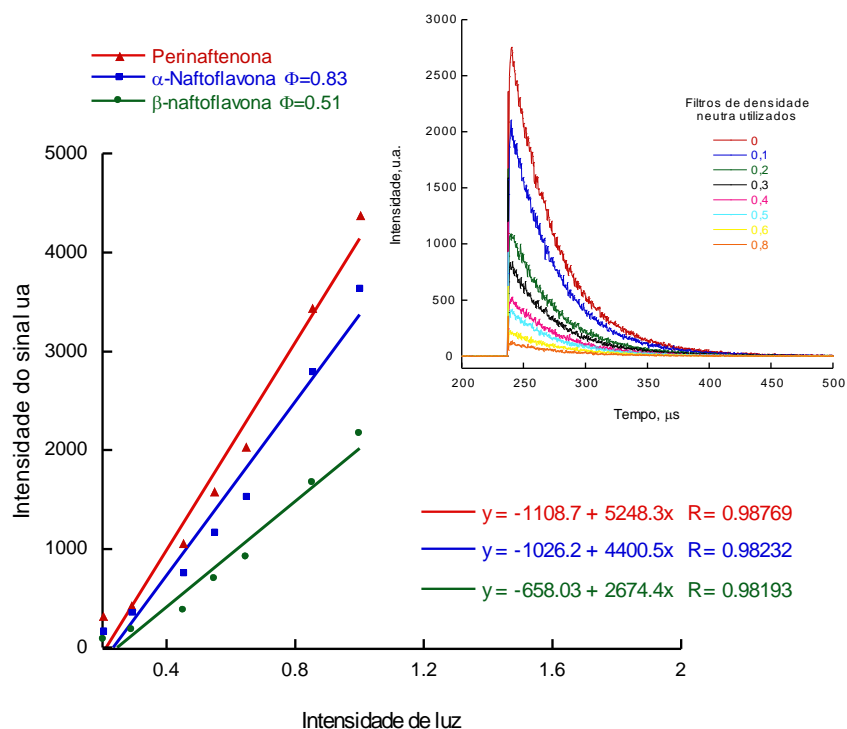


Figura 18. Gráfico da intensidade do sinal de fosforescência do oxigênio singlete versus intensidade da luz para soluções de **1**, **2** e perinaftenona (padrão) em acetonitrila. Em anexo, decaimentos do sinal de fosforescência em 1270nm de solução de **1** em acetonitrila variando a intensidade de luz de excitação.

Comparando-se os resultados de rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, observa-se que **2** apresenta rendimento quântico superior ao de **1**, mas ambas possuem rendimentos elevados, superiores a 50%, o que faz de ambas boas moléculas geradoras de oxigênio singlete. Pode-se supor que a semelhança entre os cromóforos das duas moléculas seja o fator determinante para o rendimento quântico, justificando a alta eficiência de formação de oxigênio singlete de ambas.

5. Conclusões

A técnica de fotólise por pulso de Laser (FPL) de nanosegundos se mostrou adequada para a caracterização espectroscópica e o estudo da reatividade do triplete de **1**.

Através destes experimentos de FPL, foi demonstrado que o estado triplete é capaz de reagir eficientemente com doadores de hidrogênio e de elétron, apresentando constantes de supressão diferentes.

As supressões do transiente por β -caroteno, 1,3-cicloexadieno e 1-metilnaftaleno sugerem que a energia do triplete seja maior que 60 kcal/mol.

Os resultados obtidos para a supressão do triplete de **1** com fenóis foram elevados, e condizem com o esperado aumento da constante de supressão com grupamentos doadores de densidade eletrônica ligados ao fenol e diminuição da mesma na presença de fenóis com grupos retiradores de densidade eletrônica. Os resultados mostraram que o valor de k_q segue a seguinte ordem de reatividade: 4-metoxifenol > fenol > 4-cianofenol.

Foi possível observar o ânion radical de **1** na supressão com DABCO, comprovando a natureza do processo de supressão por transferência de elétron.

Os experimentos de supressão com o aminoácido triptofano mostraram que **1** pode agir como fotossensibilizador do tipo II.

O rendimento de formação de oxigênio singlete foi elevado para **1** e **2**, portanto ambas podem ter aplicação na área de terapia fotodinâmica, para tratamento contra tumores. Estes resultados indicam, portanto, que **1** pode fotossensibilizar substratos biológicos por ambos os mecanismos, tipo I e tipo II.

6. Referências Bibliográficas

- (1) Caldwell, M. M.; Giese, A. C., Ed.; Academic Press: New York, 1971; Vol. VI, p 131.
- (2) Harborne, J. B.; Goodwin, T. W. *Plants Pigments*; Oval Road, Academic Press: London, 1987.
- (3) Stafford, H. A. *Plant Physiol.* **1991**, *96*, 680.
- (4) Wilson, M. I.; Greenberg, B. M. *Photochem. Photobiol.* **1993**, *53*, 845.
- (5) Kawata, H.; Kumagai, T.; Suzuki, E.; Niizuma, S. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* **1996**, *101*, 201.
- (6) Bhattacharyya, K.; Ramaiah, D.; Das, P. K.; George, M. V. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 5984.
- (7) Nakayama, T.; Shimizu, T.; Torii, Y.; Miki, S.; Hamanoue, K. *J. Photochem. Photobiol.A: Chem.* **1997**, *111*, 35.
- (8) Shimada, Y.; Dewa, Y.; Ichimura, R.; Suzuki, T.; Mizukami, S.; Hayashib, S.; Shibutania, M.; Mitsumori, K. *Toxicology* **2010**, *268*, 213.
- (9) Martindale, J. L.; Holbrook, N. J. *J. Cell. Physiol.* **2002**, *192*, 1.
- (10) Michaeli, A.; Feitelson, J. *Photochemistry and Photobiology* **1994**, *59*, 284.
- (11) Michaeli, A.; Feitelson, J. *Photochemistry and Photobiology* **1995**, *61*, 255.
- (12) Stark, G. *J. Membr. Biol.* **2005**, *205*, 1.
- (13) Ravanat, J. L.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40601.

- (14) de Lucas, N. C.; Correa, R. J.; Albuquerque, A. C. C.; Firme, C. L.; Garden, S. J.; Bertoti, A. R.; Netto-Ferreira, J. C. *Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 1117.
- (15) de Lucas, N. C.; Corrêa, R. J.; Garden, S. J.; Santos, G.; R., R.; Carvalho, C. E. M.; Ferreira, S.; Netto-Ferreira, J. C.; Ferreira, V. F.; Miro, P.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Photochem. and Photobiol. Science* **2012**, *11*, 1201-1209.
- (16) de Lucas, N. C.; Elias, M. M.; Firme, C. L.; Corrêa, R. J.; Garden, S. J.; Netto-Ferreira, J. C.; Nicodem, D. E. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* **2009**, *201*, 1.
- (17) de Lucas, N. C.; Fraga, H. S.; Cardoso, C. P.; Correa, R. J.; Garden, S. J.; Netto-Ferreira, J. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 10746
- (18) de Lucas, N. C.; Netto-Ferreira, J. C. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1998**, *116*, 203.
- (19) de Lucas, N. C.; Silva, M. T.; Gege, C.; Netto-Ferreira, J. C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 2795.
- (20) Wagner, P. J.; Park, B.-S. *Org. Photochem.* **1991**, *11*, 227.
- (21) Wagner, P. J.; Truman, R. J.; Puchalski, A. E.; Wake, R. *J. Am. Chem. Soc* **1986**, *108*, 7727.
- (22) Pan, Y.; Fu, Y.; Liu, S.; Yu, H.; Gao, Y.; Guo, Q.; Yu, S. *J. Phys. Chem. A.* **2006**, *110*, 7316.
- (23) Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Sciano, J. C. *Principals of Molecular Photochemistry: An Introduction.* , 2009.
- (24) Nonell, S.; Gonzalez, M.; Trull, F. R. *Afinidad* **1993**, *50*, 445.
- (25) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekler, Inc.: New York, 1993.
- (26) Scaiano, J. C. *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 252.
- (27) Das, P. K.; Encimas, M. V.; Steenken, S.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4162.
- (28) Foti, M. C.; Daquino, C.; DiLabio, G. A.; Ingold, K. U. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7440.
- (29) Das, P. K.; Bhattacharyya, S. N. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 1391.
- (30) Das, P. K.; Encinas, M. V.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4154.
- (31) Lathioor, E. C.; Leigh, W. J. *Photochem. and Photobiol.* **2006**, *82*, 291.
- (32) Rehm, D.; Weller, A. *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259.
- (33) Davies, M. J.; Truscott, R. J. W. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **2001**, *63*, 114.
- (34) Devadoss, C.; Fessenden, R. W. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 4540.
- (35) Dunn, D. A.; Schuster, D. I. *J. Am. Chem. Soc* **1985**, *107*, 2802.
- (36) Merenyi, G.; Lind, J.; Shen, X. H. *Journal of Physical Chemistry* **1988**, *92*, 134.
- (37) Netto-Ferreira, J. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; da Silva, A. R.; da Silva, A. M.; Ferreira, A. B. B.; Miranda, M. A. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 966.