UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

REATIVIDADE QUÍMICA E FOTOQUÍMICA DE ANTOCIANINAS
EM SISTEMAS ORGANIZADOS

Adilson Alves de Freitas
Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Frank Herbert Quina

SÃO PAULO
09 de Dezembro de 2005

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documenação do Conjunto das Químicas da USP.

F866r Freitas, Adilson Alves de
Reatividade química e fotoquímica de antocianinas em
sistemas organizados / Adilson Alves de Freitas. -- São
Paulo, 2005.
208p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Quina, Frank Herbert

1. Fotocromismo : Físico-química 2. Fotoisomerização :
Físico-química 3. Polifenol I. T. II. Quina, Frank Herbert,
orientador.

541.35 CDD

“Reatividade química e fotoquímica de antocianinas em sistemas organizados”

ADILSON ALVES DE FREITAS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Físico-Química.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. FRANK HERBERT QUINA
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. JOSEF WILHELM BAADER
IQ – USP

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BORIN
IQ – USP

Prof. Dr. MARCELO HENRIQUE GEHLEN
IQ – SC – USP

Prof. Dr. PAULO MARCOS DONATE
FFCL – RP – USP

SÃO PAULO
09 DE DEZEMBRO 2005

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Frank Herbert Quina pela orientação, paciência e, acima de tudo, pela amizade durante tantos anos.

À Karina, por estar ao meu lado em todos os momentos, bons ou ruins.

Ao Prof. Dr. Antônio L. Maçanita, do Instituto Superior Técnico de Lisboa, Portugal, pelas discussões com relação à parte experimental e pelas amostras dos sais de flavílio e antocianinas.

Ao Luís G. Dias, pela amizade e por ter colaborado na parte dos cálculos computacionais.

Ao Prof. Dr. Ivan P. de Arruda Campos, pela assistência com reagentes e pela supervisão na síntese do sal de flavílio sem substituintes.

Ao Prof. Dr. João P. S. Farah, pela amizade.

Aos colegas de laboratório.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido (projeto no. 01/00973-1).

Índice

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas	xii
Índice de Esquemas	xv
Símbolos e Abreviaturas	xvi
Resumo	xviii
Abstract.....	xx
1-Introdução.....	1
1.1-Histórico	1
1.2-Antocianinas	2
1.3-Sais de flavílio sintéticos	10
1.4-Ambiente Micelar	12
1.5-Estudos computacionais de sais de flavílio	13
2-Objetivos.....	14
3-Parte Experimental	15
3.1-Materiais	15
3.2-Equipamentos	15
3.3-Determinação das constantes de equilíbrio do CHMF em água por espectrofotometria de absorção	16
3.4-Fluorescência do CHMF no estado estacionário em água.....	17
3.5-Determinação das constantes de protonação (k_p) e de desprotonação (k_d) do CHMF em soluções aquosas.....	18
3.6-Determinação das constantes de equilíbrio do CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ por espectrofotometria de absorção	19
3.7-Fluorescência do CHMF no estado estacionário em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	19
3.8-Determinação das constantes de protonação e de desprotonação para CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	20
3.9-Síntese do sal de flavílio sem substituintes	20
3.10-Estudos das transformações do sal de flavílio sem substituintes em soluções aquosas e em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	22
3.11-Estudos das transformações do 4'-metoxiflavílio em soluções aquosas e em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	24

3.12-Determinação das constantes de incorporação (K_S) das formas ácidas do HMF, DHF, oenina e CHMF em micelas de detergentes não aniônicos	25
4-Estudo computacional de sais de flavílio substituídos	26
4.1-Metodologia Computacional Empregada	26
4.2-Escolha dos sais de flavílio utilizados nos cálculos quânticos	26
4.3-Cálculo de transições eletrônicas do cátion flavílio e da base quinonoidal dos sais de flavílio substituídos	28
4.4-Determinação do pK_a dos sais de flavílio através de cálculos <i>ab initio</i>	29
4.5-Cálculo de potenciais de oxidação e redução para os sais de flavílio	29
5-Resultados e Discussão.....	30
5.1-Determinação das constantes de equilíbrio do CHMF em água por espectrofotometria de absorção	30
5.2-Fluorescência do CHMF no estado estacionário em água.....	45
5.3-Determinação das constantes de protonação (k_p) e de desprotonação (k_d) do CHMF em soluções aquosas.....	53
5.4-Determinação das constantes de equilíbrio do CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ por espectrofotometria de absorção	59
5.5-Fluorescência do CHMF no estado estacionário em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	68
5.6-Determinação das constantes de protonação (k_p) e desprotonação (k_d) do CHMF em soluções de SDS 0,1 mol.L ⁻¹	71
5.7-Síntese do tetracloroferrato de 2-fenilbenzopirílio (íon flavílio)	79
5.8-Estudos preliminares das transformações do sal de flavílio em soluções aquosas.....	81
5.9-Estudos das transformações do 2-fenilbenzopirílio em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	88
5.10-Estudos preliminares das transformações do 4'-metoxiflavílio em água.	101
5.11-Estudos das transformações do 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ ...	104
5.12-Determinação das constantes de incorporação (K_S) das formas ácidas do HMF, DHF, oenina e do zwitterion do CHMF em micelas de detergentes não aniônicos	114
5.13-Cálculo de transições eletrônicas das formas ácida e básica dos sais de flavílio.....	117
5.14-Estudo computacional das espécies responsáveis pela coloração do CHMF	140

5.15-Reatividade dos sais de flavílio	143
5.16-Determinação do pK_a dos sais de flavílio através de cálculos <i>ab initio</i> ...	154
5.17-Cálculo de potenciais de redução para os sais de flavílio	162
6-Conclusões.....	169
7-Bibliografia.....	173

Índice de Figuras

Figura 1: Cromóforo básico das antocianinas e exemplos de antocianinas monoglicosídeas e diglicosídeas.....	3
Figura 2: Espectros de absorção eletrônica do 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF) em soluções aquosas. A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio ($\lambda_{\text{max}} = 484 \text{ nm}$) em $\text{pH} = -0,54$. A linha tracejada representa o espectro de uma solução em $\text{pH} = 1,65$ contendo a forma zwitteriônica ($\lambda_{\text{max}} = 458 \text{ nm}$). A linha pontilhada mostra uma solução a $\text{pH} = 7,17$ contendo a base quinonoidal ($\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$), 2 segundos após a dissolução da amostra.	32
Figura 3: Espectros de absorção em função do tempo ilustrando a cinética de hidratação do CHMF a 40°C , $\text{pH} = 6,00$ (1) imediatamente após a dissolução; (2) 10 segundos após a dissolução; (3) 20 segundos após a dissolução; (4) 120 segundos após a dissolução.....	33
Figura 4: Espectros de absorção eletrônica de soluções aquosas de CHMF em função do pH, utilizados no cálculo do $\text{pK}_{\text{a}1}$. Os espectros foram coletados 2 segundos após a dissolução da amostra.	36
Figura 5: Frações molares do cátion flavílio (●) e do zwitterion flavílio (□) do CHMF em água a $25,0^\circ\text{C}$	36
Figura 6: Espectros de absorção eletrônica de soluções aquosas de CHMF em função do pH, utilizados no cálculo do $\text{pK}_{\text{a}2}$. Os espectros foram coletados 2 segundos após a dissolução da amostra.	37
Figura 7: Frações molares do zwitterion flavílio (□) e da base quinonoidal (●) do CHMF em soluções aquosas a $25,0^\circ\text{C}$, determinadas 2 segundos após a dissolução das amostras.	37
Figura 8: Espectros de absorção eletrônica de soluções aquosas de CHMF em função do pH, utilizados no cálculo do pK_{a} . Os espectros foram coletados 12 horas após a preparação das amostras.....	42
Figura 9: Frações molares do zwitterion flavílio (□) do CHMF em soluções aquosas a $25,0^\circ\text{C}$, determinadas após o período de equilíbrio das soluções em ausência de luz.	42

Figura 10: Frações molares em função do pH do cátion flavílio (HA^+), zwitterion flavílio (Z), base quinonoidal (A^-) e mistura hemicetal/chalcona ($\text{B} + \text{C}$), para o CHMF em soluções aquosas, calculadas a partir das constantes de equilíbrio obtidas a 25,0 °C. As linhas tracejadas representam as frações molares de soluções medidas imediatamente após a dissolução das amostras e as linhas contínuas representam as frações molares de soluções equilibradas.	43
Figura 11: Deslocamento de pH 8,02→2,00. Variação da absorção eletrônica em função do tempo para uma solução de CHMF previamente equilibrada por 12 horas. No destaque, o gráfico da variação da absorção do zwitterion em 458 nm ($\Delta A = A_t - A_0$, onde A_0 é a absorção inicial e A_t é a absorção no tempo t) em função do tempo, em segundos.	44
Figura 12: Espectros de emissão de fluorescência da espécie zwitteriônica do CHMF em meio ácido. Os espectros foram coletados com $\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm.	46
Figura 13: Espectro de emissão de fluorescência da base quinonoidal do CHMF em meio básico. Os espectros foram coletados com $\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm.	46
Figura 14: Espectros de excitação de fluorescência do CHMF em função do pH, obtidos a partir da emissão em 605 nm.	47
Figura 15: Espectros de emissão de fluorescência em função do pH para o CHMF em água utilizados na determinação de $\text{pK}_{\text{a}2}^*$	52
Figura 16: Espectros de emissão de fluorescência em função do pH para o CHMF em água utilizados na determinação de $\text{pK}_{\text{a}1}^*$	52
Figura 17: Espectro de transientes de absorção para CHMF em pH = 3,85.	56
Figura 18: Transientes de decaimento da base quinonoidal (○) e recuperação do zwitterion flavílio (■) do CHMF à 20,0 °C, em pH = 3,85.	56
Figura 19: Determinação da dinâmica de protonação de CHMF ($\text{pK}_{\text{a}2}$) em soluções aquosas. Gráfico das constantes de velocidade observadas para o desaparecimento da base quinonoidal em função da concentração de H^+	57
Figura 20: Espectros de absorção eletrônica do 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF) em soluções de SDS 0,1 mol.L ⁻¹ . A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio ($\lambda_{\text{max}} = 494$ nm) em pH = 1,26. A linha tracejada representa o espectro de uma solução em pH = 4,18 contendo a forma zwitteriônica ($\lambda_{\text{max}} = 464$ nm). A linha pontilhada mostra uma solução	

a pH = 8,66 contendo a base quinonoidal ($\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$), 2 segundos a dissolução da amostra.	61
Figura 21: Espectros de absorção eletrônica de CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , em função do pH, utilizados no cálculo do pK _{a1} . Os espectros foram coletados 2 segundos após a dissolução da amostra.	62
Figura 22: Frações molares do cátion flavílio (●) e do zwitterion flavílio (□) do CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ a 25,0 °C.	62
Figura 23: Espectros de absorção eletrônica de CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , em função do pH, utilizados no cálculo do pK _{a2} . Os espectros foram coletados 2 segundos após a dissolução da amostra.	63
Figura 24: Frações molares do zwitterion flavílio (□) do CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ a 25,0 °C.	63
Figura 25: Espectros de absorção eletrônica de CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , em função do pH, utilizados no cálculo da constante aparente pK _{ap} . Os espectros foram coletados 12 horas após a preparação das amostras, a 25,0 °C.	66
Figura 26: Frações molares do zwitterion flavílio (□) do CHMF em soluções de SDS 0,1 mol.L ⁻¹ a 25,0 °C, determinadas após o período de equilíbrio das soluções em ausência de luz.	66
Figura 27: Frações molares em função do pH do cátion flavílio (HA ⁺), zwitterion flavílio (Z), base quinonoidal (A ⁻) e mistura hemiacetal/chalcona (B + C), para o CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , calculadas a partir das constantes de equilíbrio determinadas a 25,0 °C. As linhas tracejadas representam as frações molares de soluções medidas imediatamente após a dissolução das amostras e as linhas contínuas representam as frações molares de soluções que atingiram o equilíbrio termodinâmico.	67
Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência em função do pH para o CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , usados na determinação de pK _{a2} *.	70
Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência em função do pH para o CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	70
Figura 30: Transiente de recuperação do zwitterion flavílio do CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , coletado pH = 4,34. Os dados foram ajustados através de uma função biexponencial.	74

Figura 31: Espectro de transientes de absorção para CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , obtidos em pH = 4,69 logo após o disparo do laser.....	76
Figura 32: Determinação da dinâmica de protonação de CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ (pK _{a2}). Gráfico das constantes de velocidade observadas (obtidas dos ajustes biexponenciais dos transientes) em função da concentração de H ⁺	76
Figura 33: Espectro de absorção do tetracloroferrato de 2-fenilbenzopirílio em HCl 0,1 mol.L ⁻¹ , obtido cerca de 5 segundos após a dissolução da amostra.	80
Figura 34: Espectros de absorção do 2-fenilbenzopirílio em soluções aquosas. A linha pontilhada mostra o espectro de uma solução em pH = 6,11 contendo trans-chalcona (C _t , λ _{max} = 350 nm), obtido logo após a dissolução da amostra. A linha tracejada representa o espectro da mesma solução em pH = 6,11 após 10 minutos de irradiação a 366 nm, contendo hemiacetal (B, λ _{max} = 258 nm) e cis-chalcona (C _c , λ _{max} = 302 nm). A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio (HA ⁺ , λ _{max} = 394 nm), em pH = 1,33.....	82
Figura 35: Espectros de absorção do 2-fenilbenzopirílio em meio ácido, equilibrada no escuro, em função do tempo de exposição a radiação de comprimento de onda de 366 nm: (1) antes da irradiação; (2) 15 s de exposição; (3) 45 s; (4) 105 s; (5) 315 s.	82
Figura 36: Espectros de absorção eletrônica do 2-fenilbenzopirílio em soluções aquosas, em função do pH, utilizados no cálculo do pK _{ap} . Os espectros foram coletados 5 segundos após a dissolução da amostra.	84
Figura 37: Frações molares do cátion flavílio do 2-fenilbenzopirílio, determinadas para o cálculo do pK _{ap} (■) e do pK _{ap2} (○) em soluções aquosas a 25,0 °C.....	84
Figura 38: Variação dos máximos de absorção das espécies do 2-fenilbenzopirílio (pH = 2,68) em função do tempo: (1) cis-chalcona, 300 nm; (2) trans-chalcona, 350 nm; (3) hemiacetal, 258 nm; (4) cátion flavílio, 400 nm. A linha tracejada indica o momento de disparo da lâmpada.	87
Figura 39: Espectros de absorção eletrônica do 2-fenilbenzopirílio em soluções de SDS 0,1 mol.L ⁻¹ . A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio (HA ⁺ , λ _{max} = 402 nm) em pH = 0,95. A linha pontilhada refere-se ao espectro da solução em pH = 5,12 contendo trans-chalcona (C _t , λ _{max} = 350 nm), logo após a preparação da solução. A linha tracejada mostra uma contendo	

hemicetal (B, $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$) e cis-chalcona (C_c , $\lambda_{\text{max}} = 302 \text{ nm}$), cerca de 2 segundos após o deslocamento de pH da solução de 0,95 para 6,01.....	89
Figura 40: Espectros de absorção eletrônica em função do pH para o 2-fenilbenzopirílio em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, utilizados na determinação do pK_{ap}	90
Figura 41: Frações molares do cátion flavílio do 2-fenilbenzopirílio em soluções de SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, determinadas a $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, usadas no cálculo de pK_{ap}	90
Figura 42: Espectros de absorção eletrônica em função do pH para o 2-fenilbenzopirílio em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, utilizados no cálculo do $pK_{\text{ap}2}$. Os espectros foram coletados 7 dias após a preparação das amostras.	92
Figura 43: Frações molares determinadas para o cátion flavílio do 2-fenilbenzopirílio em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ a $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, calculadas após o período de equilíbrio das soluções em ausência de luz.	92
Figura 44: Determinação da dinâmica de hidratação do íon 2-fenilbenzopirílio. Gráfico da constante de velocidade observada $I_2 = k_{-w}[H^+] + k_w$ em função da concentração de H^+	94
Figura 45: Gráfico de Arrhenius para a cinética de abertura da cis-chalcona em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	97
Figura 46: Gráfico de Arrhenius para a cinética de ciclização da trans-chalcona em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	97
Figura 47: Frações molares do 2-fenilbenzopirílio em soluções aquosas e em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. As linhas tracejadas referem-se à condição de pseudoequilíbrio e as linhas contínuas referem-se às espécies envolvidas no equilíbrio termodinâmico.	100
Figura 48: Espectros de absorção do cloreto de 4'-metoxiflavílio em soluções aquosas. A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio (HA^+ , $\lambda_{\text{max}} = 434 \text{ nm}$) em $\text{pH} = 2,12$. A linha pontilhada representa o espectro de uma solução em $\text{pH} = 7,41$ contendo hemicetal (B, $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ nm}$) e cis-chalcona (C_c , $\lambda_{\text{max}} = 306 \text{ nm}$), 5 segundos após a dissolução da amostra. A linha tracejada mostra uma solução a $\text{pH} = 7,01$, contendo cis-chalcona e trans-chalcona (C_t , $\lambda_{\text{max}} = 354 \text{ nm}$), após uma semana em equilíbrio no escuro.....	102
Figura 49: Espectros de absorção eletrônica usados na determinação de pK_{ap} para o 4'-metoxiflavílio água. Os espectros foram coletados 5 segundos após a preparação das amostras, a $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$	103

Figura 50: Determinação de pK_{ap} : frações molares do cátion flavílio em função do pH, obtidas a 25,0 °C.	103
Figura 51: Espectros de absorção eletrônica usados na determinação de pK_{ap2} para o 4'-metoxiflavílio em soluções aquosas.	105
Figura 52: Determinação de pK_{ap2} : frações molares do cátion flavílio em função do pH, obtidas a 25,0 °C.	105
Figura 53: Espectros de absorção eletrônica usados na determinação de pK_{ap} para o 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , obtidos 5 segundos após a dissolução da amostra. No destaque, a fração molar do cátion flavílio em função do pH, determinada a 25,0 °C.	106
Figura 54: Espectros de absorção eletrônica usados na determinação de pK_{ap2} para o 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ . No destaque, a fração molar do cátion flavílio em função do pH. Os espectros foram coletados a 25,0 °C.	106
Figura 55: Variação dos máximos de absorção eletrônica em função do tempo das espécies do 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , a pH = 6,02: (1) hemiacetal em 258 nm; (2) cis-chalcona em 310 nm; (3) trans-chalcona em 358 nm; (4) cátion flavílio em 448 nm. A linha tracejada indica o momento de disparo da lâmpada.	108
Figura 56: Determinação da dinâmica de conversão cis-chalcona/base quinonoidal do 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ . Gráfico das constantes de velocidade observadas $I_2 = k_w + k_{-w}[H^+]$ em função da concentração de H ⁺	108
Figura 57: Gráfico de Arrhenius para a reação de isomerização cis-chalcona/trans-chalcona em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	111
Figura 58: Gráfico de Arrhenius para a reação de isomerização trans-chalcona/cis-chalcona em SDS 0,1 mol.L ⁻¹	111
Figura 59: Frações molares das espécies do 4'-metoxiflavílio em água e em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ . As linhas tracejadas referem-se à condição de pseudoequilíbrio e as linhas contínuas referem-se às espécies envolvidas no equilíbrio termodinâmico.	113
Figura 60: Gráfico de 1/k' em função da concentração de CTAB micelizado para o cátion flavílio: (■) oenina; (◇) DHF; (●) CHMF; (*) HMF.	116
Figura 61: Espectros de absorção do CHMF em soluções de CTAB 0,1 mol.L ⁻¹ , coletados a 25,0 °C: a linha contínua corresponde ao espectro de uma	

solução em pH = 5,89; a linha tracejada representa o espectro de uma solução com pH = 1,8.	116
Figura 62: Relação entre as transições eletrônicas experimentais dos cátions flavílios e os valores calculados através de diferentes métodos. A linha tracejada representa a identidade.	130
Figura 63: Relação entre as transições eletrônicas experimentais das bases quinonoidais e os valores calculados através de diferentes métodos. A linha tracejada representa a identidade.	131
Figura 64: Absorções corrigidas para os cátions flavílios. As transições foram corrigidas subtraindo-se 0,11 eV e 0,22 eV das energias de excitação calculadas por B3LYP e mPW1PW91, respectivamente.	133
Figura 65: Absorções corrigidas para as bases quinonoidais. As transições foram corrigidas subtraindo-se 0,11 eV e 0,22 eV das energias de excitação calculadas por B3LYP e mPW1PW91, respectivamente.	134
Figura 66: Máximos de absorção (●) e diferenças de energia (○) entre a geometria mais plana, otimizada, e os demais confôrmeros, calculados por mPW1PW91/6-31+G(d) para a base quinonoidal do composto 02.	137
Figura 67: Densidades de HOMO (a) e LUMO (b) para alguns dos cátions flavílios estudados.	145
Figura 68: Densidades de HOMO (a) e LUMO (b) para algumas das bases quinonoidais estudadas.	146
Figura 69: Gráfico das durezas absolutas em função das energias de excitação dos cátions flavílios.	152
Figura 70: Gráfico de pK_{ap} dos sais de flavílio em função das durezas absolutas calculadas para os cátions flavílios: (●) conjunto com substituintes nos anéis A e C; (○) conjunto com substituintes apenas no anel B.	152
Figura 71: Gráfico de pK_{ap} em função da energia de excitação dos cátions flavílios: (●) conjunto com substituintes nos anéis A e C; (○) conjunto com substituintes apenas no anel B.	153
Figura 72: Gráfico de pK_a calculados para os sais de flavílio em função dos valores experimentais. As energias de solvatação das espécies foram calculadas por (□) SM5.4 e por (●) RHF/6-31G(d) com o modelo de solvatação PCM reparametrizado. A linha contínua representa a função identidade ($x = y$) e as linhas tracejadas correspondem à $pK_a (exp) \pm 0,5$	161

Índice de Tabelas

Tabela 1: Estrutura das seis antocianidinas majoritárias encontradas na natureza. Todas estas antocianidinas possuem grupos OH nas posições C3, C5, C7 e C4' .	3
Tabela 2: Sais de flavílio substituídos selecionados para o estudo computacional.	27
Tabela 3: Comprimentos de onda da transição 0-0 (λ_{0-0}), pK_a e resultados de pK_a^* calculados para CHMF em soluções aquosas a partir do ciclo termodinâmico de Förster.	49
Tabela 4: Constantes de protonação (k_p), desprotonação (k_d) e pK_a para o CHMF, 4-metil-7-hidroxiflavílio (HMF), 4',7-dihidroxiflavílio (DHF) e oenina em soluções aquosas.	58
Tabela 5: Resultados de pK_a^* obtidos para CHMF em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , a partir do ciclo termodinâmico de Förster.	68
Tabela 6: Constantes cinéticas e termodinâmicas determinadas para o cloreto de 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF) em soluções aquosas e em presença de micelas de SDS 0,1 mol.L ⁻¹ .	78
Tabela 7: Constantes de velocidade observadas $\lambda_1 = k_t + k_{-t}$ para soluções aquosas de 2-fenilbenzopirílio, determinadas a partir da análise dos decaimentos da cis-chalcona (em 300 nm) e do surgimento do cátion flavílio (394 nm).	86
Tabela 8: Constantes de velocidade determinadas para as reações de isomerização entre as formas <i>cis</i> e <i>trans</i> da chalcona.	96
Tabela 9: Constantes de equilíbrio e de velocidade das transformações químicas do sal de flavílio sem substituintes, determinadas neste trabalho a 25,0 °C, em soluções de SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , comparadas com os dados em soluções aquosas obtidos por McClelland & Gedge (1980), na mesma temperatura.	98
Tabela 10: Constantes de velocidade observadas (em s ⁻¹) para o 4'-metoxiflavílio em SDS pelo experimento de fotólise de relâmpago convencional. As medidas foram feitas à temperatura constante de 25,0 °C.	109
Tabela 11: Constantes de velocidade determinadas para a reação de isomerização das chalconas em SDS 0,1 mol.L ⁻¹ .	110

Tabela 12: Constantes de equilíbrio e de velocidade das transformações químicas do 4'-metoxiflavílio, determinadas neste trabalho a 25,0 °C, em soluções de SDS 0,1 mol.L ⁻¹ , comparadas com os dados em soluções aquosas obtidos por McClelland & Gedge (1980), na mesma temperatura.	112
Tabela 13: Constantes de incorporação (em L.mol ⁻¹) dos solutos em ambiente micelar, determinadas a temperatura constante de 30,0 °C.	115
Tabela 14: Resumo das informações referentes à geometria dos cátions flavílios, otimizadas no vácuo por AM1, HF/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p) e mPW1PW91/6-31+G(d,p). As distâncias de ligação r(O-C2) e r(C2-C1') estão em Angstroms, o ângulo de ligação α (C9-O-C2) e o ângulo de torção θ (O-C2-C1'-C6') estão em graus.	119
Tabela 15: Resumo das informações referentes à geometria das bases quinonoidais, otimizadas no vácuo por AM1, HF/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p) e mPW1PW91/6-31+G(d,p). As distâncias de ligação r(O-C2) e r(C2-C1') estão em Angstroms, o ângulo de ligação α (C9-O-C2) e o ângulo de torção θ (O-C2-C1'-C6') estão em graus.....	120
Tabela 16: Resumo das informações referentes à geometria dos cátions flavílios, otimizadas no solvente por B3LYP/6-31G(d) e mPW1PW91/6-31G(d). As distâncias de ligação r(O-C2) e r(C2-C1') estão em Angstroms, o ângulo de ligação α (C9-O-C2) e o ângulo de torção θ (O-C2-C1'-C6') estão em graus.	121
Tabela 17: Resumo das informações referentes à geometria das bases quinonoidais, otimizadas no solvente por B3LYP/6-31G(d) e mPW1PW91/6-31G(d). As distâncias de ligação r(O-C2) e r(C2-C1') estão em Angstroms, o ângulo de ligação α (C9-O-C2) e o ângulo de torção θ (O-C2-C1'-C6') estão em graus.	122
Tabela 18: Máximos de absorção eletrônica experimental (λ_{max} exp.), forças de oscilador (f), contribuição da excitação HOMO→LUMO (%H→L) para a transição e máximos de absorção (λ_{max}) para os cátions flavílios, calculados para a transição S ₀ →S ₁ pelos diferentes métodos empregados neste estudo.....	124
Tabela 19: Máximos de absorção eletrônica experimental (λ_{max} exp.), forças de oscilador (f), contribuição da excitação HOMO→LUMO (%H→L) para a transição e máximos de absorção (λ_{max}) para as bases quinonoidais,	

calculados para a transição $S_0 \rightarrow S_1$ pelos diferentes métodos empregados neste estudo.....	126
Tabela 20: Ângulo diedro O-C2-C1'-C6' (θ), forças de oscilador (f), contribuição da excitação HOMO $\rightarrow$ LUMO (%H $\rightarrow$ L) para a transição e máximos de absorção (λ_{max}), calculados para a transição $S_0 \rightarrow S_1$ por mPW1PW91/6-31+G(d) para os sais de flavílio selecionados.	136
Tabela 21: Momentos de Dipolo (Debye) calculados por mPW1PW91 para as duas espécies dos sais de flavílio estudados.	139
Tabela 22: Ângulos diedros entre o anel pirílio e o grupo carboxílico ($\theta_{\text{anel-COOH}}$), comprimentos de onda de absorção experimentais e calculados para a transição $S_0 \rightarrow S_1$ ($\lambda_{\text{máx}}$, em nm), emissões de fluorescência experimentais e calculadas (Φ_{em} , em nm) e energias livres de solvatação (ΔG_{solv} , em kcal.mol $^{-1}$) para o cátion flavílio (HA $^+$), zwitterion flavílio (Z), forma neutra (AH) e base quinonoidal do CHMF.....	142
Tabela 23: Cargas atômicas de Mulliken para os carbonos das posições C2 e C4, obtidas a partir das geometrias otimizadas em mPW1PW91/6-31G(d) com efeito de solvente.	147
Tabela 24: Energias dos orbitais HOMO e LUMO dos cátions flavílios, computadas por mPW1PW91/6-31G(d) com efeito do solvente, durezas absolutas dos cátions flavílios e valores de pK_{ap}	151
Tabela 25: Valores de energia livre de Gibbs na fase gasosa (kcal.mol $^{-1}$) e nos modelos de solvatação PCM e SM5.4, calculados para os termos do ciclo termodinâmico proposto no cálculo de pK_{a} . O termo G_{gH^+} é igual a -6,28 kcal.mol $^{-1}$ e o termo ΔG_{sH^+} é igual a -263,98 kcal.mol $^{-1}$. As moléculas em fase gasosa foram calculadas no nível mPW1PW91/6-311+G(2d,2p)//mPW1PW91/6-31+G(d,p).	159
Tabela 26: Dados termodinâmicos experimentais (kcal.mol $^{-1}$) empregados no ciclo referente ao eletrodo normal de hidrogênio (T = 298,15 K).....	163
Tabela 27: Potenciais de redução experimentais e calculados para os cátions flavílios, em Volts. Os potenciais listados têm como referência o eletrodo padrão de hidrogênio.	165
Tabela 28: Dados termodinâmicos no vácuo (G_{g} , ΔG_{g}^0 , em kcal.mol $^{-1}$), energias livres de solvatação (ΔG_{s}^0 , em kcal.mol $^{-1}$) e potenciais de redução (em Volts)	

relativos ao eletrodo de hidrogênio, à $T = 298,15 \text{ K}$, calculados para uma parte do conjunto estudado de cátions flavílios e bases quinonoidais.....167

Índice de Esquemas

Esquema 1: Transformações químicas das antocianinas em soluções aquosas, representada para a malvidina-3-glicosídeo (oenina).	6
Esquema 2: Mecanismos de estabilização de antocianinas.	9
Esquema 3: Sais de flavílio empregados neste estudo.....	11
Esquema 4: Síntese do tetracloroferrato de 2-fenilbenzopirílio.	22
Esquema 5: Estrutura do cromóforo do sal de flavílio.	27
Esquema 6: Ciclo termodinâmico de Förster.....	48
Esquema 7: Transformações químicas do CHMF no estado excitado e estrutura da espécie neutra AH.	50
Esquema 8: Transformações químicas do sal de flavílio sem substituintes no estado fundamental.	81
Esquema 9: Representação esquemática das energias de ativação (em kJ.mol^{-1}) para a reação de interconversão das formas <i>cis</i> e <i>trans</i> da chalcona. As energias foram determinadas em soluções aquosas e em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	96
Esquema 10: ciclo termodinâmico empregado no cálculo de pK_a absoluto dos sais de flavílio.....	155
Esquema 11: Ciclo termodinâmico para a determinação do potencial de redução absoluto das espécies estudadas.....	162
Esquema 12: Ciclo termodinâmico para a determinação do potencial absoluto do eletrodo normal de hidrogênio.....	163

Símbolos e Abreviaturas

Φ	intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias
τ	tempo de vida de uma espécie
λ_{0-0}	comprimento de onda da transição 0-0
λ_{em}	comprimento de onda de emissão de fluorescência
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
λ_{max} e λ_{exp}	comprimento de onda de absorção eletrônica máxima
λ_1, λ_2 e λ_3	constantes de velocidade
$[C]_0$	concentração total de sal de flavílio em solução
$[C]$	concentração total de chalcona
HA^+	cátion flavílio
A	base quinonoidal
A^-	base quinonoidal do CHMF
AH	espécie neutra do CHMF
Z	forma zwitteriônica do CHMF
B	hemicetal
C_c	cis-chalcona
C_t	trans-chalcona
CB	base conjugada
Brij-35	polioxetileno (23) dodecil éter
Triton X-100	polioxetileno (10) isoocetilfenil éter
CTAB	brometo de trimetil-hexadecilamônio
SDS	dodecilsulfato de sódio
CHMF	4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio
DHF	4',7-dihidroxiflavílio
HMF	4-metil-7-hidroxiflavílio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
MLC	Cromatografia Líquida Micelar
K_a	constante de equilíbrio da reação de desprotonação
K_{a1} e K_{a2}	constantes de acidez do CHMF no estado fundamental
K_{a1}^* e K_{a2}^*	constantes de acidez do CHMF no estado excitado
K_{ap} e K_{ap2}	constantes de equilíbrio aparente

K_w	constante de equilíbrio da reação de hidratação
K_t	constante de equilíbrio da reação de tautomerização
K_i	constante de equilíbrio da reação de isomerização
K_S	constante de incorporação micelar
k_{obs}	constante de velocidade observada
k_d	constante de velocidade de desprotonação
k_p	constante de velocidade de protonação
k_i	constante de velocidade de isomerização da cis-chalcona
k_{-i}	constante de velocidade de isomerização da trans-chalcona
k_w	constante de velocidade de hidratação do cátion flavílio
k_{-w}	constante de velocidade de desidratação do hemiacetal
k_m	constante de velocidade de entrada na micela
k_{-m}	constante de velocidade de saída da micela
ΔG_x	Energia Livre de Gibbs
ΔG_{sX}	Energia Livre de Gibbs de solvatação
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia
LUMO	Orbital Molecular Vazio de Mais Baixa Energia
S_0	estado fundamental
S_1	primeiro estado excitado singlete
PCM	Modelo de Contínuo Polarizado
SM5.4	Modelo de Solvatação 5.4
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
TD-DFT	Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo
E_a	energia de ativação
E_{calc}	potencial de redução calculado
E_{corr}	potencial de redução corrigido
E_{exp}	potencial de redução experimental
$r(a-b)$	distância de ligação
$\alpha(a-b-c)$	ângulo de ligação
$\theta(a-b-c-d)$	ângulo de torção

Resumo

As antocianinas compreendem o maior conjunto de pigmentos solúveis em água do reino vegetal. A absorção da luz por estes compostos, responsáveis pelas cores vermelha, azul e roxa da maioria das frutas e flores, é produto de combinações de vários fatores, como o número de substituintes, a presença ou não de outras moléculas capazes de estabilizar a cor (“co-pigmentos”), o pH local do meio e a natureza do microambiente em que a antocianina se encontra. A reatividade química e fotoquímica das antocianinas já é relativamente complexa em solução aquosa na ausência de micelas, onde cada um dos processos químicos e fotoquímicos ocorre numa faixa de tempo distinta. Uma forma de se diminuir o número de espécies em solução é o emprego de antocianinas sintéticas com estruturas simplificadas, conhecidas como sais de flavílio, cuja variação no número, posição e tipo químico de substituinte permite um certo controle sobre as frações molares das espécies.

Neste estudo procurou-se compreender os processos que regem o equilíbrio ácido-base e a hidratação do cátion flavílio em ambiente micelar. Estes dois processos exercem um papel central na estabilização da cor em antocianinas. Foram utilizados três sais de flavílio: o 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF), o 2-fenilbenzopirílio e o 4'-metoxiflavílio.

Os dois grupos ionizáveis do CHMF possuem pK_a s distintos ($pK_{a1} = 0,73$; $pK_{a2} = 4,84$), cujas dinâmicas de protonação/desprotonação são influenciadas pelas micelas de SDS de modos diferentes. O cátion é estabilizado preferencialmente pelas micelas aniônicas em relação ao zwitterion ($pK_{a1SDS} = 2,77$), que por sua vez é mais favorecido que a base quinonoidal ($pK_{a2SDS} = 5,64$). A estabilização do cátion está relacionada com as fortes interações eletrostáticas entre a espécie e a micela carregada negativamente. A base quinonoidal, que no caso específico do CHMF tem carga negativa, é desfavorecida em relação ao zwitterion. Adicionalmente, em SDS praticamente não se observa hidrólise da espécie zwitteriônica.

Com relação ao 2-fenilbenzopirílio ($pK_w = 3,01$) e o 4'-metoxiflavílio ($pK_w = 4,47$), a primeira observação feita é que a inclusão do grupo metoxi na posição C4' estabiliza o cátion flavílio, diminuindo a extensão da hidrólise por meio de transferência de carga para o anel central. O efeito de estabilização do cátion pelo ambiente micelar, verificado pelo aumento do pK_w , é mais pronunciado no 2-fenilbenzopirílio ($pK_{wSDS} = 4,73$) do que no 4'-metoxiflavílio ($pK_{wSDS} = 5,05$). Os processos cinéticos mostram que

a reação de hidratação (k_w) do flavílio sem substituintes diminui 65 vezes em SDS, enquanto que a reação no sentido inverso se mantém dentro da mesma ordem de magnitude. Já no caso do 4'-metoxiflavílio, foi verificado que ambas as constantes de velocidade aumentam, mas a constante de desidratação do hemicetal (k_{-w}), que depende da concentração de prótons, é a mais afetada, aumentando cerca de 15 vezes. Este fato é um indicativo de que o pH na interface micelar é o fator de estabilização do cátion do 4'-metoxiflavílio.

Adicionalmente foram feitos cálculos computacionais de transições eletrônicas, pK_a e potenciais de redução em nível *ab initio* para um conjunto cátions flavílios e respectivas bases quinonoidais. Os valores de pK_a calculados apresentaram um desvio médio de $\pm 0,5$ unidade de pK_a .

Abstract

Anthocyanins comprise the major water-soluble pigment group in the Plant Kingdom. Light absorption by these compounds is responsible for the diverse colors in many flowers and fruits and can be modulated by phenomena such as self-association of flavylum cations or anhydrobases, copigmentation with other polyphenols and flavonoids, complexation with metal ions, incorporation of anthocyanins into microaggregates like micelles and the pH of the medium. The chemical and photochemical reactivity of anthocyanins is quite complex in aqueous solution and each process occurs in a different time range. The use of structurally simplified synthetic flavylum salts permits a certain control over the mole fractions of the various species in solution.

In this study we used the synthetic flavylum ions 4-carboxy-7-hydroxy-4'-methoxyflavylum (CHMF), 2-phenylbenzopyrylium and 4'-methoxyflavylum to investigate the main processes that influence the acid-base equilibrium and hydration of the flavylum cation in micellar environments. Such reactions play a central role in color stabilization of anthocyanins.

CHMF has two ionizable groups with distinct pK_a s ($pK_{a1} = 0,73$; $pK_{a2} = 4,84$), and the protonation/deprotonation dynamics of these groups are affected differently by SDS micelles. The results show that SDS micelles stabilize the cationic form rather than the zwitterion ($pK_{a1SDS} = 2,77$), which is favored relative to the quinonoidal base ($pK_{a2SDS} = 5,64$). The preferential stabilization of the cation is related to electrostatic interactions of this form with the anionic micelle. The quinonoidal base, which in the specific case of CHMF is an anion, is disfavored relative to the zwitterion. In addition, the hydrolysis of the zwitterionic form is substantially reduced in micellar SDS solutions.

The comparison of 2-phenylbenzopyrylium ($pK_w = 3,01$) and 4'-methoxyflavylum ($pK_w = 4,47$) shows that the methoxy group at the C4' position stabilizes the cationic form, reducing the hydration by charge transfer to the central ring. The stabilization of the cationic form by the micellar environment, which is reflected in the increase of the pK_w , is more pronounced for the 2-phenylbenzopyrylium cation ($pK_{wSDS} = 4,73$) than for 4'-methoxyflavylum ($pK_{wSDS} = 5,05$). Kinetic studies of the 2-phenylbenzopyrylium ion in SDS indicate a 65-fold reduction in the hydration rate constant (k_w), while the inverse reaction has the same magnitude as in water. In the case

of the 4'-methoxyflavylium ion, both rate constants associated with the equilibrium between the flavylium cation and hemiacetal increased. However, the $[H^+]$ -dependent rate constant for dehydration of the hemiacetal is affected to a greater extent, increasing about 15 fold, indicating stabilization of the 4'-methoxyflavylium cation by the micellar interface.

Finally, computational calculations were performed at the ab initio level for several flavylium cations and anhydrobases to estimate the electronic transitions, pK_a and reduction potentials. The quality of the calculated pK_a results were compared with experimental data and the mean absolute deviation is ± 0.5 pK_a unit.

1-Introdução

1.1-Histórico

O termo antocianina, derivado das palavras gregas *anthos* (flor) e *kyanos* (azul), foi introduzido em 1835 por Ludwig Clamor Marquart, em seu livro *Die Farben der Blüthen*, para designar substâncias azuis extraídas de algumas flores. Atualmente, o termo é empregado para indicar genericamente toda esta família de pigmentos naturais, independentemente da coloração que possam apresentar (Shibata et al., 1919; Whiting, 2001; Curtright et al., 1994). O estudo sistemático de antocianinas começou na metade do século XIX. A cianina, uma das antocianinas mais abundantes, foi isolada em 1854, mas sua fórmula molecular só foi estabelecida em 1913 (Whiting, 2001). Os trabalhos genéticos de Mendel sobre a ligação entre hereditariedade e coloração de ervilhas despertaram o interesse na busca de relações entre a estrutura química de antocianinas e a evolução das espécies vegetais. As flores de pétalas azuis atraem especialmente as abelhas, favorecendo a polinização. Em regiões de clima temperado, onde a polinização é um fator dominante, as espécies vegetais aparentemente evoluíram na direção do azul. Gottlieb (1982) mostrou que as flores de coloração azul, cuja pigmentação é resultado da presença de derivados da delfinidina, estão restritas às famílias mais evoluídas de angiospermas, enquanto que as plantas mais primitivas possuem floração vermelha/rosa, baseada na cianidina (Harborne & Williams, 2000). Em geral, não se encontra antocianinas em plantas menos evoluídas como hepáticas, algas, musgos e samambaias, entre outras.

O interesse recente no estudo de antocianinas deve-se ao potencial de aplicação que estes compostos podem ter como corantes na indústria de alimentos. Além do apelo mercadológico que têm por serem produtos naturais, as antocianinas fazem parte da dieta humana há milhares de anos e é apropriado afirmar que os seres humanos estão bem adaptados ao consumo destes compostos. Adicionalmente, o emprego de pigmentos sintéticos, muitos dos quais derivados de petróleo, tem sido severamente restringido pelos países desenvolvidos (Vargas et al., 2000). Alguns extratos vegetais contendo antocianinas já são empregados comercialmente na forma de concentrados, obtidos do bagaço de uvas (subproduto da indústria viticultora), repolho roxo, batata-doce e hibisco, entre outros. Historicamente, um extrato obtido de uvas vermelhas conhecido como enocianina é comercializado na Itália desde 1879 (Bridle &

Timberlake, 1997). Entretanto, a aplicação destes concentrados de antocianinas está limitada à indústria de doces e geléias, pois os extratos obtidos têm alta concentração de açúcares, além de desbotarem rapidamente quando são utilizados em bebidas, por exemplo.

1.2-Antocianinas

As antocianinas são moléculas pertencentes ao grupo dos flavonóis (polifenóis) e compreendem o maior conjunto de pigmentos solúveis em água do reino vegetal. Diferentemente das clorofilas e dos carotenóides, a absorção eletrônica das antocianinas está distribuída por toda a região visível do espectro eletrônico (400 nm – 700 nm). Além de serem responsáveis pelas lindas cores vermelha, azul e roxa da maioria das frutas e flores (Bridle & Timberlake, 1997; Brouillard et al., 1997; Costa et al., 2000), as mais de 450 antocianinas já isoladas e caracterizadas também estão presentes em folhas, raízes, bulbos, tubérculos, sementes, caules, cereais e legumes. As moléculas das antocianinas são encontradas nas plantas no interior dos vacúolos de células epidérmicas, tanto na forma de cristais como dissolvidas, dando origem a íons com carga positiva, o cátion flavílio, que podem desprotonar e formar uma estrutura eletricamente neutra, denominada base quinonoidal.

A estrutura central das antocianinas, também chamada de aglicona, tem como cromóforo básico o 2-fenilbenzopirílio, também conhecido como cátion flavílio, representada na Figura 1. O cromóforo é formado por 15 átomos de carbono e 1 de oxigênio como heteroátomo, todos em hibridização sp^2 (Maçanita et al., 1997). As antocianinas são classificadas de acordo com o número de moléculas de carboidrato (ou glicosídeo) ligadas ao cromóforo em monoglicosiladas, diglicosiladas e triglicosiladas. Em geral, esta glicosilação está situada na posição C3 ou então simultaneamente em C3 e C5, mas são conhecidos casos de antocianinas com unidades de carboidratos nas posições C7, C3', C4' e C5' (Figueiredo, 1994).

malvina - $R_3', R_5' = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{Glicosil}$

oenina - $R_3', R_5' = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{H}$

pelargonina - $R_3', R_5' = \text{H}$; $R_5 = \text{Glicosil}$

peonina - $R_3' = \text{OCH}_3$; $R_5' = \text{H}$; $R_5 = \text{Glicosil}$

cianina - $R_3' = \text{OH}$; $R_5' = \text{H}$; $R_5 = \text{Glicosil}$

delfinina - $R_3', R_5' = \text{OH}$; $R_5 = \text{Glicosil}$

Figura 1: Cromóforo básico das antocianinas e exemplos de antocianinas monoglicosídeas e diglicosídeas.

Quando as antocianinas são tratadas a quente em meio ácido, ocorre a hidrólise das unidades de carboidratos ligados ao cromóforo. Esta aglicona livre dos segmentos glicosídeos é conhecida como antocianidina e também é encontrada eventualmente em alguns tecidos vegetais. Na Tabela 1 estão listadas as 6 antocianidinas mais comuns desta classe de pigmentos, entre as mais de 25 conhecidas.

Tabela 1: Estrutura das seis antocianidinas majoritárias encontradas na natureza. Todas estas antocianidinas possuem grupos OH nas posições C3', C5, C7 e C4'.

antocianidina	C3'	C5'	Cores
Delfinidina	OH	OH	azul e roxo
Cianidina	OH	H	vermelho e carmim
Pelargonidina	H	H	laranja e salmão
Peonidina	OCH ₃	H	roxo
Petunidina	OCH ₃	OH	vermelho
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	vermelho

A infinidade de cores observadas nas antocianinas e antocianidinas é produto de combinações de vários fatores, como o número de substituintes, a presença ou não de

outras moléculas capazes de estabilizar a cor (“co-pigmentos”), a associação com outros flavonóis, a complexação, a autoassociação, o pH local do meio e a natureza do microambiente em que a antocianina se encontra (El Hajji et al., 1997; Brouillard et al., 1997; Pina et al., 1997b; Pina, 1998a, 1998b; Pina & Roque, 1998; Costa et al., 2000; Melo et al., 2000). Com relação aos substituintes, podemos imaginar o número de combinações possíveis se tomarmos como ponto de partida o conjunto de cerca de 25 antocianidinas. A inclusão de uma molécula de carboidrato incrementa o conjunto inicial com antocianinas monoglicosadas. As combinações aumentam se considerarmos as diferentes posições de glicosilação e o número de glicosídeos que a molécula pode ter, além da diversidade de carboidratos possíveis, cuja ocorrência natural em antocianinas é glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose (Vargas et al., 2000; Figueiredo, 1994; Lima, 1996). Muitas antocianinas apresentam ainda ligações acila entre os carboidratos e ácidos orgânicos como ácido cumárico, cafeíco, ferúlico, malônico e acético, entre outros. Além disso, a posição e o número de grupos metoxi e hidroxí também influencia a absorção eletrônica, pois altera o número de átomos de oxigênio que podem delocalizar a carga pelo sistema π (Maçanita et al., 1997).

As antocianinas e antocianidinas estão sujeitas à transformações químicas em meio aquoso no estado fundamental, envolvendo uma série de equilíbrios reversíveis e dependentes do pH do meio, representadas no Esquema 1. Todas estas transformações provocam profundas mudanças na coloração das antocianinas. A desprotonação do cátion flavílio (HA^+) resulta na formação da base quinonoidal (A) que, dependendo do número de grupos OH presentes na molécula, pode estar em equilíbrio de tautomerização com as demais formas. O cátion flavílio e a base quinonoidal são as únicas espécies que absorvem na região visível, sendo que o cátion sempre absorve em comprimentos de onda menores que a base.

Em meios moderadamente ácidos é observada a hidratação do cátion flavílio. A carga positiva do cátion está delocalizada por todo o anel pirílio (anéis A e C), mas as posições C2 e C4 são as que apresentam a maior densidade de carga positiva, tornando-as suscetíveis a um ataque nucleofílico pela molécula de água (Amic et al., 1990). Entretanto, o aduto cineticamente formado pela adição nucleofílica em C4 é convertido via cátion flavílio no produto de hidratação na posição C2, dando origem a dois hemiacetais enantioméricos (B). Os hemiacetais formados absorvem em torno de 260 nm, resultado da diminuição no tamanho do sistema π conjugado com o ataque da água ao carbono C2. Através da abertura do anel pirílio os hemiacetais estão em equilíbrio

tautomérico com a espécie chalcona, que existe em solução como isômeros *cis* e *trans*. A *trans*-chalcona absorve entre 320 nm e 360 nm, enquanto que o máximo de absorção da forma *cis* situa-se ao redor de 300 nm, pois sua conformação não é planar (McClelland & Gedge, 1980). A diferenciação de ambos os isômeros através de absorção eletrônica é dificultada pela sobreposição espectral das espécies. Adicionalmente, em meios básicos ocorre a ionização do hemicetal, dos dois isômeros da chalcona e de bases quinonoidais que eventualmente tenham vários grupos OH.

No estado excitado, são observados processos de transferência de próton ultrarápida no estado singlete do cátion flavílio (Lima et al., 1998; Pina et al., 1998b), fotocromismo *trans*-chalcona/*cis*-chalcona (Figueiredo et al., 1994; Pina et al., 1996, 1997a, 1998a; Matsushima et al., 1995, 1997; Matsushima & Murakami, 2000; Horiuchi et al., 1999; Maestri et al., 2000) e degradação fotoquímica do cátion (Figueiredo, 1994; Furtado et al., 1993). Em geral, as antocianinas naturais não fluorescem ou são muito pouco fluorescentes, possuindo rendimentos quânticos de fluorescência, ϕ_f , da ordem de 4×10^{-3} (Lima, 1996; Moreira et al., 2003).

Cada um dos processos químicos e fotoquímicos descritos acima ocorre em faixas de tempo distintas. As transferências de prótons nos estados excitado e fundamental são os processos mais rápidos observados para as antocianinas, demorando algumas dezenas de picossegundos no primeiro caso e centenas de nanossegundos no estado fundamental. A hidratação do cátion pode demorar de alguns milissegundos a minutos e a isomerização das chalconas dura de minutos a horas. Esta amplitude na escala temporal das reações torna necessário emprego de diversas técnicas para se estudar as transformações químicas das antocianinas. A transferência de prótons no estado excitado é examinada por fluorescência resolvida no tempo gerada com pulso de laser de picossegundos e a transferência de prótons no estado fundamental é acompanhada por fotólise de laser com pulso de nanossegundos (Lima et al., 1998, 2002; Maçanita et al., 2002; Giestas et al., 2003; Giongo et al., 2002; Moreira et al., 2003; Silva et al., 2004). As reações de hidratação do cátion flavílio e tautomerização do hemicetal são estudadas por salto de pH, salto de temperatura e por fotólise de relâmpago convencional (Brouillard & Dubois, 1977; Brouillard & Delaporte, 1977; Brouillard et al., 1978; McClelland & Gedge, 1980; 1982; Pina et al., 1997c). Os processos mais lentos como a formação da *trans*-chalcona podem ser seguidos pela variação dos espectros de absorção eletrônica e por ressonância magnética nuclear em função do tempo (Figueiredo et al., 1994; Pina et al., 1996; Pina et al., 1998a).

Esquema 1: Transformações químicas das antocianinas em soluções aquosas, representada para a malvidina-3-glicosídeo (oenina).

O cátion flavílio das antocianinas, entretanto, só é termodinamicamente estável em soluções fortemente ácidas, com $\text{pH} < 2$. Em soluções com menor concentração de H^+ , a coloração tende a desaparecer em função do tempo, com a conversão do cátion em hemiacetal e posterior formação das chalconas. Macroscopicamente, quando o pH de uma solução ácida de antocianina é deslocado rapidamente para próximo da neutralidade, a cor da solução passa de vermelha para violeta/azul, pois ocorre a desprotonação do cátion e formação da base quinonoidal como produto cinético. Após atingir o equilíbrio termodinâmico, as soluções de antocianinas são incolores ou apresentam um amarelo pálido muito tênue.

A faixa de pH encontrada nos vacúolos celulares das plantas não é favorável termodinamicamente à presença do cátion flavílio, o que levou a natureza a empregar várias técnicas para estabilizar as espécies responsáveis pela coloração das antocianinas. Em pétalas de rosas e no tecido epidérmico de uvas, por exemplo, o pH vacuolar situa-se entre 3,70 – 4,15 e 2,6 – 3,2 respectivamente (Chen & Hrazdina, 1981). Um dos casos mais ilustrativos é o da hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), cujo pigmento encontrado tanto nas flores azuis como nas rosas é a delfinidina 3-glicosídeo (Yoshida et al., 2003). Nas plantas de floração azul, o máximo de absorção situa-se em 589 nm e o pH dos vacúolos celulares é 4,1. Já nas hortênsias de pétalas rosas, a absorção máxima é em 537 nm e o pH vacuolar é 3,3. Os fatores que explicam a existência do cátion flavílio em pHs tão elevados e a diferença de cores para a mesma antocianina são a atuação de outros polifenóis como co-pigmentos e a concentração de íons Al^{3+} nos vacúolos.

A co-pigmentação de antocianinas é conhecida desde 1916 (Figueiredo, 1994) e é um dos fatores mais importantes na variedade e estabilidade de cores no reino vegetal. O fenômeno é resultado da associação do cátion flavílio e da base quinonoidal com outros metabólitos presentes no meio celular, denominados co-pigmentos. Os co-pigmentos são geralmente polifenóis e flavonóides que não absorvem na região visível, mas ao interagirem com a antocianina provocam um desvio da absorção para comprimentos de onda maiores (efeito batocrômico) e um aumento na intensidade da cor da antocianina (efeito hiperocrômico), resultado das interações π - π entre os orbitais moleculares do co-pigmento e das espécies coloridas das antocianinas (Brouillard et al., 1989). A presença do co-pigmento diminui consideravelmente a constante de hidratação K_w do cátion flavílio, protegendo os sítios mais propensos ao ataque nucleofílico pela água e tornando possível a existência da espécie em meios próximos da neutralidade. Os

principais fatores que influenciam a co-pigmentação são a temperatura, o solvente, a concentração salina, o pH e as concentrações do co-pigmento e da antocianina (Dangles & Brouillard, 1992). A controvérsia sobre qual é a força motriz por trás da estabilização dos complexos antocianina/co-pigmento é proporcional à grande quantidade de artigos publicados sobre o assunto, mas as principais candidatas são o efeito hidrofóbico da antocianina e do co-pigmento (Goto & Kondo, 1991; Dangles & Brouillard, 1992), as ligações de hidrogênio entre o co-pigmento e a antocianina (Chen & Hrazdina, 1981; Baranac et al., 1997) e a transferência de carga do co-pigmento para o cátion flavílio. Recentemente, entretanto, foi observado que a excitação eletrônica dos complexos induz a transferência de elétrons do co-pigmento para o cátion flavílio, resultando em uma total supressão da fluorescência do complexo (Silva et al., 2004). Adicionalmente, propriedades redox de antocianinas e co-pigmentos determinadas experimentalmente (potenciais de ionização e afinidades eletrônicas) e cálculos computacionais para alguns complexos mostraram que o primeiro estado excitado tem um caráter de transferência de carga (transição pouco intensa e muito deslocada para o vermelho), resultando da transição do orbital ocupado de maior energia (HOMO) do co-pigmento para o orbital vazio de menor energia (LUMO) do cátion flavílio (Silva et al., 2005). Estes fatos indicam que a transferência de cargas exerce um papel central no fenômeno de co-pigmentação entre antocianinas e polifenóis.

Em soluções de antocianinas com concentrações maiores que $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, a absorção eletrônica apresenta um desvio em relação à lei de Beer-Lambert, e as moléculas tendem a se agregarem através de empilhamento vertical, resultado das interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos. Este fenômeno, conhecido como auto-associação, é observado para os cátions flavílios e bases quinonoidais, pois a estrutura planar de ambas as espécies favorece este tipo de interação, e provoca uma intensificação da absorção, além de diminuir a hidratação da forma catiônica (Hoshino et al., 1981; Goto & Kondo, 1991; Hoshino 1991; 1992). Foi observado também que em concentrações elevadas de oenina ocorre a associação do cátion flavílio com a espécie trans-chalcona (Houbiers et al., 1998).

Além da co-pigmentação intermolecular e da auto-associação, alguns cátions flavílios de antocianinas cujas unidades de carboidratos são aciladas apresentam uma excepcional resistência à hidrólise em pH neutro, mesmo em soluções diluídas e na ausência de outras moléculas que possam atuar como co-pigmentos. Uma das explicações possíveis para este efeito de estabilização é a interação dos grupos acila

com o cromóforo central, formando uma estrutura empacotada do tipo sanduíche, onde o anel pirílio, fica cercado pelos substituintes e protegido da hidratação. A remoção dos grupos acila ligados aos carboidratos tornam a antocianina suscetível à hidrólise (Goto & Kondo, 1991; Brouillard & Chahime, 1980).

Os flavonóides e outros polifenóis formam complexos com todas as antocianinas. Um outro tipo de complexação observado, mas relacionada somente a antocianinas que possuem grupos OH simultaneamente nas posições C3' e C4', é a formação de quelatos com íons metálicos como potássio, magnésio, ferro e alumínio. Estas metalocianinas apresentam um desvio batocrômico no espectro de absorção e, em alguns casos, formam complexos com polifenóis e flavonóides ou estão coordenados com vários íons metálicos (Goto & Kondo, 1991; Vargas et al., 2000; Yoshida et al., 2003). Uma das possíveis aplicações de quelatos de cianidina-3-glicosídeo (cianina) e delfinidina com TiO_2 é na construção de células fotoeletroquímicas, que convertem a luz solar em corrente elétrica (Cherepy et al., 1997; Dai & Rabani, 2001; 2002).

No Esquema 2 estão reunidos os diferentes processos de associação que a natureza encontrou para promover a diversificação e estabilização de cores das antocianinas. Este esquema foi adaptado de Goto & Kondo, 1991.

Esquema 2: Mecanismos de estabilização de antocianinas.

1.3-Sais de flavílio sintéticos

Foi visto acima que a química de antocianinas naturais é extremamente rica e afetada por uma série de fatores, o que torna essencial a busca por compostos que sirvam como modelo de estudo destes pigmentos. Uma forma de se reduzir o número de espécies presentes em solução é o emprego de antocianinas sintéticas com estruturas simplificadas, conhecidas como sais de flavílio, que possuem o mesmo cromóforo dos pigmentos naturais e estão sujeitas às mesmas transformações químicas e fenômenos de associação. Entretanto, a variação no número, posição e tipo químico de substituinte permite um certo controle sobre as frações molares das espécies em solução, tornando promissor o estudo de sais de flavílio como meio ativo de lasers de corante (Haucke et al., 1993; Czerney et al., 1995), dispositivos para armazenamento de dados baseado em efeitos fotocrômicos (Pina et al., 1997c; 1998b; 1999a; 1999b; Roque et al., 2003), sondas termocrômicas, solvatocrômicas e vapocrômicas em conjunto com co-pigmentos (Matsushima et al., 2000; 2001; 2003), além de corantes alimentares (Jurd 1966; 1967a; 1967b). Contudo, todas estas aplicações esbarram no problema da resistência do cátion flavílio à hidratação.

A primeira síntese de um sal de flavílio foi feita em 1901, e a descoberta destes compostos teve importância na elucidação de especulações teóricas acerca de estruturas químicas e nas pesquisas posteriores de Willstätter, que estabeleceram as relações entre os sais sintéticos e antocianinas naturais (Hill, 1936). Atualmente, sabe-se que a presença de grupos OH nas posições C6, C8, C3' e especialmente em C3, tornam o cátion flavílio propenso à hidratação (Amic et al., 1990; Baranac et al., 1990a; 1990b). Por outro lado, foi visto que antocianinas naturais não possuem hidroxil na posição C3, mas sim glicosídeos ou glicosídeos acilados, que promovem a estabilização do cátion (Timberlake & Bridle, 1967). Foi observado também que substituintes nas posições C5, C7 e C4' estabilizam o cátion, mas o grupo metoxi em C4' combinado com OH em C7 favorece a hidratação (Amic & Trinajstić, 1991). Grupos metílicos e carboxílicos na posição C4 no anel central tornam o cátion flavílio excepcionalmente estável ao ataque nucleofílico, mas foi constatado que alguns sais com o grupo metil em C4 podem ser precursores de compostos potencialmente mutagênicos (Sweeny & Iacobucci, 1981; 1983).

Neste estudo foram empregados três sais de flavílio: o 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF), o 2-fenilbenzopirílio e o 4'-metoxiflavílio, que estão

representados no Esquema 3. O CHMF possui um grupo COOH na posição C4 que lhe confere algumas peculiaridades em relação a outros sais de flavílio já estudados. Este grupo ioniza antes do grupo hidroxí e em uma faixa de pH bem distinta, formando em pHs moderadamente ácidos um zwitterion relativamente estável à hidratação e que não existe em outros casos. Conseqüentemente, a base quinonoidal formada pela desprotonação do OH na posição C7 é um ânion, enquanto que para os outros sais de flavílio estudados a base é uma espécie neutra. Este composto foi o modelo utilizado neste trabalho para o estudo da dinâmica de protonação/desprotonação em água e em micelas de SDS 0,1 mol.L⁻¹.

O 2-fenilbenzopirílio (o sal de flavílio sem substituintes) e o 4'-metoxiflavílio não formam a base quinonoidal, pois não possuem grupos OH. A ausência da base quinonoidal permite que o foco do estudo seja direcionado para a reação de hidratação. Adicionalmente, ambos os sais de flavílio também formam os dois isômeros da chalcona e a conversão trans-chalcona/cis-chalcona pode ser feita tanto via caminho térmico quanto por processo fotoquímico.

Esquema 3: Sais de flavílio empregados neste estudo.

1.4-Ambiente Micelar

A estrutura dos compostos conhecidos como anfifílicos, detergentes ou tensoativos consiste de uma parte hidrofílica unida a uma parte hidrofóbica. A parte hidrofílica pode ser formada por um grupo iônico ou um grupo polar sem carga e a parte hidrofóbica é geralmente constituída por uma cadeia alquílica de 8 a 18 grupos metilênicos ou por uma cadeia alquil-aromática. Os detergentes são classificados, de acordo com o segmento hidrofílico, em aniônicos, catiônicos, não-iônicos e zwitteriônicos ou anfóteros.

Diferentemente do comportamento de solventes homogêneos, os sistemas micelares apresentam uma gama de possíveis microambientes de solubilização, que vão do núcleo apolar das micelas, formado pelas cadeias hidrocarbônicas, à interface polar micela-água. Deste modo, dependendo da polaridade, a molécula pode solubilizar no interior micelar, na região superficial ou orientar-se como os monômeros do detergente, nos casos de moléculas anfifílicas. Esta variação nas condições de solubilização está refletida na forma como o soluto particiona entre o meio micelar e a água e pode revelar quais são os fatores que influenciam na solubilização.

Entre as mais importantes propriedades de soluções aquosas de detergentes (soluções micelares) está a capacidade de incorporar substâncias orgânicas pouco solúveis em água. Esta solubilização é capaz de afetar a velocidade de reações químicas, deslocar equilíbrios, controlar regiosseletividade e modificar o comportamento de espécies geradas fotoquimicamente (Fendler, 1982; Kalyanasundaram, 1987; Bunton et al., 1991). Ela também pode servir como uma base para a compreensão de fenômenos biológicos que ocorrem em ambientes hidrofóbicos próximos a uma interface aquosa, tais como membranas e enzimas (Sepúlveda et al., 1986). O desenvolvimento de produtos de menor custo e menos poluentes tem levado a substituição total ou parcial de solventes orgânicos por água, tornando cada vez maior a presença de detergentes nas formulações sob a forma de agentes dispersantes, emulsificantes e estabilizantes.

A influência de micelas e outros sistemas organizados na reatividade de antocianinas e sais de flavílio só começou a ser estudada de forma sistemática recentemente (Roque et al., 1999; Pina et al. 2001; Giongo et al., 2002; Lima et al., 2002; Giestas et al. 2003; Kim et al., 2003). Pouco se sabe ainda sobre como o ambiente micelar afeta os processos de hidratação do cátion flavílio e o equilíbrio ácido-base e

quais as influências que os diversos substituintes podem ter nas transformações químicas.

1.5-Estudos computacionais de sais de flavílio

Algumas propriedades de antocianinas e sais de flavílio são difíceis de serem quantificadas experimentalmente por causa da complexidade das transformações observadas em solução. As determinações de constantes de equilíbrio ácido-base, K_a , ou mesmo os espectros eletrônicos de algumas bases quinonoidais possuem uma grande incerteza dada a efemeridade da base formada, e algumas reações são transformações irreversíveis, como a redução do cátion em soluções aquosas para a determinação de potenciais redox. Estas observações tornam o cálculo computacional de propriedades de antocianinas e sais de flavílio uma ferramenta útil na compreensão da reatividade destes pigmentos.

Apesar da importância das antocianinas na natureza, surpreendentemente há poucos trabalhos teóricos reportados na literatura, mesmo para os sais de flavílio sintéticos menores. Quase todos os estudos são em nível semi-empírico e voltado apenas ao cátion flavílio. A gama de assuntos abordados nos estudos vai desde os primeiros cálculos de transições eletrônicas dos cátions com a teoria de Hückel (Boyd & Singer, 1965), o método de Pariser-Parr-Pople (Bendz et al. 1967; Kurtin & Song, 1967; Nilsson, 1969; Singer et al. 1970) e CNDO/2 (Martensson & Warren, 1970; Martensson, 1970) à cálculos de constante de equilíbrio aparente entre o cátion e as demais espécies em solução, pK_{ap} , usando descritores moleculares (Amic et al., 1999; Peruzzo et al., 2001). A previsão da estabilidade do cátion flavílio e base quinonoidal foi feita a partir de conceitos de dureza química relativa e absoluta (Amic & Trinajstić, 1991). Importantes trabalhos sobre a estrutura e a barreira de rotação interna de cátions flavílios foram feitos por Pereira et al. (1996; 1997) em nível semi-empírico e, posteriormente, por Meyer (Meyer, 2000) em nível *ab initio*. O solvatocromismo e espectros eletrônicos de uma série de cátions flavílios foram investigados em nível semi-empírico por Pereira et al. (1998) e por Roshal et al. (2002).

Não há nenhum estudo sistemático em nível *ab initio* para os cátions flavílios e bases quinonoidais. Com as atuais ferramentas de cálculos computacionais disponíveis,

é possível quantificar diversas propriedades termodinâmicas que podem ser úteis no desenvolvimento racional de novos sais de flavílio.

2-Objetivos

O presente projeto propõe um estudo comparativo da reatividade química de três análogos sintéticos das antocianinas (os sais de flavílio) em meio aquoso e em soluções micelares. No estado fundamental, esta reatividade inclui equilíbrios ácido-base, o equilíbrio de hidratação e abertura do anel flavílio e a isomerização das chalconas resultantes da abertura do anel flavílio. No estado excitado, inclui os processos de transferência de prótons no estado singleto excitado do cátion e o fotocromismo trans-chalcona/cis-chalcona. A cinética destas etapas de reação será investigada por uma combinação de técnicas fotoquímicas convencionais (rendimentos quânticos de fotorreação) e técnicas de cinética rápida (fluorescência resolvida no tempo; fotólise por pulso de laser; espectroscopia de absorção resolvida no tempo). A reatividade em meio aquoso será comparada àquela em presença de micelas e à modelos desenvolvidos para explicar quantitativamente as mudanças de reatividade encontradas. Adicionalmente, algumas questões mais difíceis de responder por meio de experimentos serão abordadas através de metodologia computacional adequada.

3-Parte Experimental

3.1-Materiais

Os seguintes reagentes foram usados sem purificação prévia: HCl 35 % (Merck), HClO₄ p.a. (Merck), H₂SO₄ mín. 95 % (Merck), HBF₄ 35 % (Merck), ácido acético glacial (Merck), NaOH p.a. (Merck), NaClO₄ p.a. (Acros Organics), P₂O₅ p.a. (Merck), FeCl₃ p.a. (Reagen), metanol para cromatografia (Mallinckrodt), etanol p.a. (Merck), dodecil sulfato de sódio (SDS) mín. 99 % (Merck), CTAB (Aldrich), Triton X-100 para cintilografia (Sigma), Brij-35 (Ultra Química), benzeno p.a. (Merck), salicil aldeído puro (Carlo Erba). O éter etílico (Merck) utilizado na síntese do borofluoreto de flavílio foi previamente destilado e tratado com fios de sódio metálico. A acetofenona (Merck) também empregada na síntese foi destilada antes de ser utilizada.

As amostras de cloreto de 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF), cloreto de 4',7-dihydroxiflavílio (4',7-DHF), cloreto de 4-metil-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (HMF), cloreto de oenina e cloreto de 4'-metoxiflavílio foram generosamente cedidas pelo grupo do Professor Doutor Antônio L. Maçanita, do Instituto Superior Técnico de Lisboa, Portugal, e utilizadas conforme recebidas.

Para a calibragem dos eletrodos de pH foi utilizado um conjunto de cápsulas para preparação de soluções tampões (pHs 4,00, 7,00 e 10,00) da Aldrich. A água utilizada para preparar todas as soluções aquosas foi purificada por um sistema Milli-Q da Millipore.

3.2-Equipamentos

As medidas de fluorescência no estado estacionário foram feitas em um fluorímetro Hitachi Modelo F-4500 e as medidas espectrofotométricas foram efetuadas em um espectrofotômetro Diode Array 8452A da Hewlett Packard, no qual foi acoplado um banho refrigerado Lauda Ecoline RE 106. Nos experimentos de fotólise de relâmpago convencional foi empregado a lâmpada de uma câmera fotográfica Mirage AW920 como fonte de excitação. Os experimentos de fotólise por pulso de laser foram realizados em um sistema LP-900 da Edinburgh Analytical Instruments, equipado com um laser pulsado Surelite I-10 de Nd:YAG como fonte de excitação e uma lâmpada de Xenônio de 450 W para o monitoramento dos transientes de absorção.

Os experimentos de fotoconversão chalcona-cátion flavílio foram realizados em um aparelho para determinação de rendimentos quânticos de fotorreação, de fabricação própria, que consiste em uma lâmpada de mercúrio Sylvania Modelo H44GS de 100 Watts, com máximo de emissão em 365 nm, ligada a uma fonte de alimentação. A distância entre a lâmpada e a amostra foi fixada em 15 cm. O dispositivo está montado dentro de uma caixa de papel-cartão.

Para os estudos de cromatografia líquida micelar (MLC) foi empregado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o qual consiste de um controlador de sistema modelo SCL-6A, duas bombas modelo LC-9A, um injetor Rheodyne com loop de injeção de 20 μ L, um detector espectrofotométrico uv-vis modelo SPD-6AV e um módulo de comunicação CBM-011, todo este equipamento da Shimadzu. A coluna utilizada para as medidas foi uma coluna de fase reversa Hypersil ODS 5 μ m (150 x 4,6 mm) da Sigma-Aldrich. O equipamento de HPLC está conectado a um computador PC 486 para a coleta e tratamento dos cromatogramas.

Na preparação do sal de flavílio sem substituintes foi empregado um liofilizador Lyphe Lock 4.5 da Labconco.

As determinações de pH foram feitas com um medidor de pH/conductividade da Fisher Scientific, Modelo Accumet 50, utilizando-se um semi-microeletrodo combinado de Ag/AgCl Modelo 91-03, da Thermo Orion.

3.3-Determinação das constantes de equilíbrio do CHMF em água por espectrofotometria de absorção

Dois conjuntos de experimentos foram efetuados para a determinação das constantes de equilíbrio do cloreto de 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF). No primeiro experimento, as medidas de absorção eletrônica em função do pH foram realizadas imediatamente após a preparação das soluções. No segundo experimento a determinação das absorbâncias foi feita após 14 horas do preparo das soluções para se detectar eventuais produtos formados a partir da hidratação do cátion flavílio, zwitterion e da base quinonoidal.

No primeiro caso foi preparada uma solução-estoque da substância em 1 mL de metanol, com concentração final de cerca de $2,3 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, de tonalidade laranja intenso. Para a determinação de pK_{a1} foram usadas soluções de HClO₄ 6 mol.L⁻¹ e 1

mol.L⁻¹ para os ajustes de pH. Foi preparada uma série amostras a partir da diluição do HClO₄, cujo volume final de 1,00 mL foi completado com NaClO₄ 1 mol.L⁻¹. No caso do pK_{a2}, a concentração de H⁺ das amostras foi ajustada com soluções de HClO₄ 0,1 mol.L⁻¹ e NaOH 0,1 mol.L⁻¹, sendo que a força iônica foi regulada com uma solução de NaClO₄ 0,1 mol.L⁻¹. Em seguida, a partir das amostras já termostatizadas a 25,0 ± 0,1 °C, foi diluída uma alíquota de 10 µL da solução estoque do CHMF e o espectro de absorção foi coletado 2 segundos após a diluição.

No segundo conjunto de experimentos, as amostras preparadas previamente foram deixadas ao abrigo da luz por cerca de 14 horas, a 25,0 °C. Após o período no escuro, os espectros de absorção foram coletados para cada solução.

Para todas as amostras os espectros foram coletados em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm (Hellma) e para a determinação do branco foram usadas soluções de NaClO₄ 1 mol.L⁻¹ (e NaClO₄ 0,1 mol.L⁻¹, nos experimentos do pK_{a2}).

Não foi aplicado nenhum tipo de correção do erro ácido do eletrodo aos valores de pH medidos.

3.4-Fluorescência do CHMF no estado estacionário em água

Os espectros de emissão e excitação de fluorescência a 25,0 °C de soluções aquosas de CHMF foram obtidos a partir de amostras mantidas no escuro por pelo menos 12 horas após a preparação das soluções. As amostras foram preparadas adicionando-se alíquotas de 50 µL da solução-estoque de CHMF 1 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹ em uma série de microtubos. O solvente foi evaporado com um fluxo de Argônio, produzindo-se um filme do soluto. Os filmes foram então diluídos em 1,00 mL de NaClO₄ 0,1 mol.L⁻¹ e a concentração de H⁺ das amostras foi ajustada com alíquotas de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, HClO₄ 1 mol.L⁻¹ ou 0,1 mol.L⁻¹. Para a obtenção de espectros de emissão de fluorescência foram utilizados os comprimentos de onda de excitação do zwitterion (458 nm) e da base (494 nm), determinados a partir dos espectros de absorção eletrônica obtidos previamente. Os espectros de excitação de fluorescência foram então determinados a partir dos máximos observados nos espectros de emissão das soluções de CHMF. As fendas de excitação e emissão foram fixadas em 2,5 mm.

Para a determinação dos pK^* s a 25,0 °C do CHMF em água, inicialmente foram preparadas soluções do sal de flavílio com concentração final de cerca de $1,2 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, a partir de filmes da solução-estoque. O pH das soluções foi ajustado para valores entre 0 e 8 e as amostras foram deixadas no escuro pelo período de uma noite antes da coleta dos espectros. Para os comprimentos de onda de excitação, foram escolhidos os pontos isobésticos em 474 e 478 nm, determinados a partir dos espectros de absorção eletrônica obtidos previamente. As fendas de excitação e emissão foram fixadas em 5 mm.

3.5-Determinação das constantes de protonação (k_p) e de desprotonação (k_d) do CHMF em soluções aquosas

A partir de alíquotas de 100 µL de uma solução estoque de CHMF $3,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em metanol, foram preparados filmes da substância em 10 microtubos, aos quais foram adicionados alíquotas de HClO₄ 0,1 ou 0,01 mol.L⁻¹ de modo que o pH final das soluções ficasse entre 4,50 e 2,80. Em seguida, o volume das soluções foi completado para 1,00 mL com NaClO₄ 0,1 mol.L⁻¹ para se manter a força iônica constante. As soluções foram agitadas ao abrigo da luz por 12 horas e o pH foi determinado antes de se iniciar as medidas com o laser.

Inicialmente foi feita uma varredura no equipamento de fotólise por laser para localizar os máximos e mínimos de absorção em função dos comprimentos de onda, com a solução de pH 3,85. Com cubetas de quartzo para fluorescência com caminho ótico de 1 cm, as medidas foram efetuadas utilizando-se para a excitação a 3^a harmônica (355 nm) do laser de Nd:YAG. Para cada um dos comprimentos de onda escolhidos, os transientes de absorção foram obtidos a partir de uma média de 10 disparos do laser, sendo que a solução era agitada entre cada disparo. O tratamento dos dados para a obtenção dos tempos de vida foi efetuado a partir dos programas de análise cinética que acompanham o equipamento. O ajuste por uma função monoexponencial foi adequado para reproduzir o decaimento de todos os comprimentos de onda selecionados (entre 400 e 540 nm).

Para as determinações das constantes de protonação e desprotonação, foram colhidos, para cada amostra, os transientes de absorção em 458 e 500 nm, que correspondem aos máximos de absorção das formas zwitteriônica e básica,

respectivamente. Cada transiente foi obtido a partir da média de 10 disparos do laser, mantendo-se a agitação da solução entre cada disparo. Os dados foram correlacionados através de funções monoexponenciais, ajustadas pelos programas que acompanham o equipamento. Todas as medidas foram feitas à temperatura constante de $20,0 \pm 0,1$ °C.

3.6-Determinação das constantes de equilíbrio do CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹ por espectrofotometria de absorção

As determinações do pK_{a1} e pK_{a2} do CHMF em presença de SDS foram feitas através da preparação de uma série de soluções com volume final de 1 mL e concentração final de cerca de 2×10^{-5} mol.L⁻¹ do sal de flavílio. Para as determinações do pK_{a1}, as soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹ tiveram o pH ajustado com alíquotas de HClO₄ 1 mol.L⁻¹. Para as medidas do pK_{a2} foram utilizadas soluções de HClO₄ 0,1 mol.L⁻¹ e NaOH 0,1 mol.L⁻¹ para o ajuste do pH. As soluções foram termostatizadas a 25,0 °C e os espectros de absorção eletrônica foram coletados imediatamente (cerca de 2 s) após a adição de uma alíquota de 10 µL da solução-estoque de CHMF.

Posteriormente, as soluções foram deixadas sob agitação constante no escuro por pelo menos 12 horas, antes das novas determinações da absorção eletrônica. Após o período de repouso foram obtidos novos espectros de absorção, também a 25,0 °C. Foi utilizado uma amostra de SDS 0,1 mol.L⁻¹ como branco.

3.7-Fluorescência do CHMF no estado estacionário em SDS 0,1 mol.L⁻¹

As amostras foram preparadas pela evaporação de alíquotas de 50 µL da solução-estoque de CHMF 1×10^{-4} mol.L⁻¹. Os filmes foram diluídos em 1,00 mL de SDS 0,1 mol.L⁻¹ e o pH das amostras foi ajustado com NaOH 0,1 mol.L⁻¹, HClO₄ 1 mol.L⁻¹ ou 0,1 mol.L⁻¹. Antes da aquisição dos espectros de emissão e excitação de fluorescência a 25,0 °C, as amostras foram mantidas sob agitação no escuro por pelo menos 12 horas. A partir dos espectros de absorção eletrônica obtidos previamente, foram utilizados os comprimentos de onda de excitação do zwitterion (464 nm) e da base quinonoidal (492 nm) para a obtenção dos espectros de emissão. Os espectros de

excitação de fluorescência foram coletados nos máximos de emissão das soluções. As fendas de excitação e emissão foram fixadas em 2,5 mm.

Para se determinar os pK^* s a 25,0 °C do CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em função do pH. Inicialmente, foram preparadas soluções com concentração final de cerca de $1,2 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Em seguida, as amostras foram deixadas no escuro pelo período de uma noite antes da coleta dos espectros. Para os comprimentos de onda de excitação, foram escolhidos os pontos isobésticos 488 e 478 nm, determinados a partir dos espectros de absorção eletrônica. As fendas de excitação e emissão foram fixadas em 5 mm.

3.8-Determinação das constantes de protonação e de desprotonação para CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹

A partir de alíquotas de 100 µL de uma solução estoque de CHMF $3,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em metanol, foram preparados filmes da substância pela evaporação do solvente em uma série de microtubos. Em seguida, foram adicionadas quantidades de HClO₄ 0,1 ou 0,01 mol.L⁻¹ para ajustar o pH das soluções entre 3,50 e 6,00. O volume das soluções foi então completado para 1,00 mL com SDS 0,1 mol.L⁻¹. As soluções foram agitadas ao abrigo da luz por uma noite e o pH final foi determinado antes do início das medidas com o laser.

Como comprimento de onda de excitação foi utilizada a 3^a harmônica do laser de Nd:YAG, situada em 355 nm. Os transientes de absorção em 460 nm (espécie zwitteriônica) e 495 nm (formas ácida e básica) foram obtidos a partir de uma média de 15 disparos do laser, com agitação constante entre os disparos. O tratamento dos dados para a obtenção dos tempos de vida foi efetuado a partir dos programas de análise cinética que acompanham o equipamento, sendo que os transientes obtidos foram ajustados através de funções biexponenciais. Todas as medidas foram feitas à temperatura constante de $20,0 \pm 0,1$ °C.

3.9-Síntese do sal de flavílio sem substituintes

O primeiro procedimento testado na síntese do 2-fenilbenzopirílio foi uma adaptação da síntese proposta por Perkin & Robinson (1908). Em um balão de três

bocas de 125 mL contendo 50 mL de éter etílico foram adicionados 10,0 g (0,09 mol) de salicilaldeído e 10,72 g (0,09 mol) de acetofenona. O balão foi mantido com agitação constante em um banho de gelo e sob um fluxo de HCl por cerca de uma hora. O HCl foi gerado a partir da adição de H₂SO₄ concentrado ao NaCl sólido e mantido em um banho frio para evitar a formação de Cl₂. Antes de entrar no balão, o fluxo de HCl gerado foi passado por uma coluna contendo CaCl₂. Ao final da adição de HCl, o balão com a mistura reacional foi retirado do banho de gelo e mantido sob agitação por 24 horas.

Nesta etapa era esperada a formação de um sólido vermelho, o cloreto de 2-fenilbenzopirílio, que seria recolhido posteriormente através de filtração em um funil de vidro sinterizado. Entretanto, apesar de a mistura reacional adquirir uma coloração vermelha muito intensa, não houve a precipitação do sólido. Optou-se então pela adição à mistura reacional de uma quantidade de HBF₄ concentrado (cerca de 20 mL) que seria suficiente para dissolver todo o íon flavílio obtido, caso tivesse ocorrido a formação do sólido. Em seguida, o solvente foi evaporado em um rotoevaporador, a fim de induzir a precipitação do sal. O material obtido se mostrou muito viscoso e foi guardado em um dessecador sob vácuo, P₂O₅ e parafina por 20 dias, ao abrigo da luz. O produto final se mostrou bastante higroscópico e não houve formação de sólido. Como última tentativa, uma alíquota do material obtido foi dissolvida em benzeno, formando uma solução amarela. Em seguida, foi adicionada uma pequena quantidade de P₂O₅ e a mistura foi agitada por dois minutos, que foi então filtrada e liofilizada. Ao final do processo de liofilização um sólido amarelo foi obtido, mas os espectros de absorção eletrônica mostraram que havia grande contaminação do produto final por acetofenona.

O segundo procedimento utilizado na síntese foi o descrito por Manfredi & McGrew (1996), que permite a obtenção da trans-chalcona (2-hidroxibenzalacetofenona) como precursora do cátion flavílio (Esquema 4). Em um balão de 125 mL contendo 0,05 mol de salicilaldeído dissolvidos em 25 mL de etanol, foram adicionados 25 mL de solução de NaOH 10 %. Em seguida foram acrescentados 0,025 mol de acetofenona e a mistura foi deixada em refluxo por 30 minutos. A proporção 2:1 de salicilaldeído:acetofenona visa minimizar a auto-condensação da acetofenona. Ao final do tempo de refluxo, a mistura reacional foi resfriada em banho de gelo e foi instilado HCl concentrado até a neutralização da mistura, verificada através de papel indicador. O precipitado formado, 2-hidroxibenzalacetofenona, foi isolado através de filtração e lavado com água destilada. Em seguida, o produto foi recristalizado em

metanol por duas vezes e lavado com água destilada. O rendimento da síntese da 2-hidroxi-benzalacetofenona foi calculado em 45 %.

Uma fração do sólido obtido foi dissolvida em uma mistura de ácido acético glacial e HCl concentrado e aquecida por 30 minutos para que ocorresse a conversão da 2-hidroxi-benzalacetofenona no cátion flavílio, acompanhada pelo surgimento de coloração vermelha intensa. Após o resfriamento da mistura, o cátion flavílio foi precipitado através da adição de uma solução de FeCl_3 $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ em ácido acético glacial. O precipitado, formado por pequenas lâminas de cor verde metálico, foi em seguida recristalizado em ácido acético glacial três vezes e lavado com éter etílico para a remoção do excesso de ácido. O rendimento de formação do íon flavílio a partir da 2-hidroxi-benzalacetofenona foi estimado em 85 %.

Esquema 4: Síntese do tetracloferrato de 2-fenilbenzopirílio.

3.10-Estudos das transformações do sal de flavílio sem substituintes em soluções aquosas e em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

Para evitar possíveis interferências do ânion FeCl_4^- todas as soluções do cátion flavílio usadas nos experimentos foram preparadas a partir de uma solução-estoque $3,4 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-hidroxi-benzalacetofenona, a trans-chalcona, e irradiadas a 366 nm por pelo menos 10 minutos no pH desejado, para que houvesse a conversão total da trans-chalcona no cátion flavílio. Em seguida, dependendo do experimento, as soluções

eram ou utilizadas imediatamente ou guardadas por 14 horas (ou uma semana no caso das amostras em SDS) em temperatura constante e no escuro para que fosse estabelecido o equilíbrio entre as espécies em solução. As amostras foram preparadas a partir de alíquotas da solução estoque de trans-chalcona em metanol, que foi evaporado passando-se um fluxo de Argônio pela amostra. O filme formado era então dissolvido para fornecer 2,00 mL de solução final.

O estudo por fotólise de relâmpago convencional em água e SDS 0,1 mol.L⁻¹ foi efetuado com soluções equilibradas do cátion flavílio preparadas a partir de um filme de 50 µL da solução-estoque dissolvidos em 2,00 mL de solução. O equipamento utilizado consistiu fundamentalmente na adaptação de uma lâmpada de flash de uma câmera fotográfica ao espectrofotômetro diode array, disposta em um ângulo de 90° em relação ao sistema de detecção do aparelho, para se minimizar qualquer tipo de interferência luminosa. A aquisição dos dados foi feita através dos programas de cinética que acompanham o equipamento e a determinação dos tempos de vida por meio de funções exponenciais foi efetuada com o programa Microcal Origin 5.0.

As transformações entre o cátion flavílio, o hemiacetal e a cis-chalcona em água e em SDS 0,1 mol.L⁻¹ foram estudadas a 25,0 ± 0,1 °C, a partir dos máximos nos espectros de absorção de amostras não equilibradas em função do pH. As amostras foram preparadas dissolvendo-se um filme de 50 µL da solução-estoque em 2,00 mL de solução.

A determinação da constante de conversão cátion/trans-chalcona (pK_{ap2}) em SDS 0,1 mol.L⁻¹ foi feita a partir das absorções eletrônicas de soluções equilibradas por uma semana do cátion flavílio em função do pH, a 25,0 ± 0,1 °C. Prepararam-se as amostras a partir de filmes de 50 µL da solução-estoque formados por evaporação do solvente e dissolvidos em 2,00 mL de solução micelar.

Os estudos em SDS 0,1 mol.L⁻¹ da cinética de conversão cis-chalcona/trans-chalcona foram feitos a 20, 30, 40 e 50 °C. Com o pH ajustado para próximo da neutralidade, as amostras de trans-chalcona foram irradiadas a 366 nm por 10 minutos. Em seguida, os espectros de absorção foram coletados nas temperaturas estabelecidas em função do tempo.

O processo de ciclização da trans-chalcona em soluções micelares foi estudado a 50, 55 e 60 °C. As soluções utilizadas de trans-chalcona foram preparadas a partir de um filme feito com 50 µL da solução-estoque em metanol. O filme foi então dissolvido em

2,00 mL de SDS 0,1 mol.L⁻¹ e o pH foi ajustado à cerca de 1,5. Em seguida, os espectros de absorção foram coletados em função do tempo nas temperaturas estabelecidas.

3.11-Estudos das transformações do 4'-metoxiflavílio em soluções aquosas e em SDS 0,1 mol.L⁻¹

As determinações de pK_{ap} do cátion em água e em SDS 0,1 mol.L⁻¹ foram feitas a 25,0 ± 0,1 °C, a partir da coleta dos espectros de absorção das amostras não equilibradas em função do pH. As amostras foram preparadas dissolvendo-se um filme de 10 µL da solução-estoque (1 x 10⁻³ mol.L⁻¹) em 1,00 mL de solução no pH desejado e os espectros foram coletados 5 segundos após a adição do filme.

A determinação da constante de conversão cátion/trans-chalcona (pK_{ap2}) em água e SDS 0,1 mol.L⁻¹ foi feita a partir das absorções de soluções mantidas no escuro por uma semana do 4'-metoxiflavílio em função do pH, a 25,0 ± 0,1 °C. As amostras foram preparadas a partir de filmes de 10 µL da solução-estoque dissolvidas em 1,00 mL de solução no pH desejado.

O estudo por fotólise de relâmpago convencional em SDS 0,1 mol.L⁻¹ foi efetuado com soluções equilibradas do 4'-metoxiflavílio preparadas a partir de um filme de 10 µL da solução-estoque dissolvidos em 1,00 mL de solução de SDS. O equipamento adaptado para os ensaios foi o mesmo utilizado nos experimentos com o 2-fenilbenzopirílio.

Os estudos em SDS 0,1 mol.L⁻¹ da cinética de conversão cis-chalcona/trans-chalcona foram feitos a 30, 35 e 40 °C. A partir de soluções do cátion em pH 1,5 foi adicionada uma alíquota de NaOH 1 mol.L⁻¹ de modo que o pH final ficasse próximo a 7,6. Em seguida, os espectros de absorção eletrônica em função do tempo foram coletados nas temperaturas estabelecidas.

O processo de ciclização da trans-chalcona em soluções micelares foi estudado a 45, 50 e 60 °C. Inicialmente as soluções do 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹ foram preparadas em pH próximo de 7,5 e estas soluções foram em seguida deixadas no escuro por uma semana, de modo a se obter a trans-chalcona como produto termodinâmico. O pH das soluções foi então ajustado para cerca de 1,5 com 15 µL de

HClO₄ 6 mol.L⁻¹ e os espectros de absorção foram coletados em função do tempo nas temperaturas estabelecidas.

3.12-Determinação das constantes de incorporação (K_s) das formas ácidas do HMF, DHF, oenina e CHMF em micelas de detergentes não aniônicos

As constantes de incorporação dos cátions flavílios do 4-metil-7-hidroxi-flavílio (HMF), 4',7-dihidroxi-flavílio (DHF), oenina e CHMF foram determinadas através da técnica de cromatografia líquida micelar. A partir de uma solução de HCl 0,01 mol.L⁻¹, foram preparadas soluções de CTAB nas concentrações de 0,12, 0,10 e 0,08 mol.L⁻¹. Em seguida, foi produzido um filme com 100 µL das soluções estoque de HMF ($1,84 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹), DHF ($7,6 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹), oenina ($2,3 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) e CHMF ($2,3 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) em 4 microtubos, que foram dissolvidos em 1,00 mL de solução de CTAB 0,12 mol.L⁻¹.

Para fazer os registros dos tempos de retenção foi necessária a saturação prévia da coluna com as soluções de CTAB em pH = 2 a um fluxo de 1 mL/min. e temperatura constante de $30,0 \pm 0,1$ °C, por cerca de 40 minutos. Em seguida foram injetados 20 µL das soluções das substâncias em CTAB e os tempos de retenção em cada uma das concentrações do surfactante foram determinados acompanhando-se os respectivos máximos de absorbância das espécies dos flavílios: 422 nm para HMF, 458 nm para DHF, 520 nm para oenina e 460 nm para CHMF.

O mesmo procedimento foi repetido para a preparação das soluções de HMF, DHF e oenina em fase móvel e para as determinações dos tempos de retenção em micelas de Brij-35 (pH = 2,0) 0,08, 0,06 e 0,04 mol.L⁻¹ e Triton X-100 (pH = 2,0) 0,06, 0,04 e 0,02 mol.L⁻¹.

Ao término de cada sessão de experimentos, a coluna foi lavada com uma mistura metanol/água 50 % (v/v) por pelo menos 12 horas. Este mesmo procedimento foi utilizado antes de se guardar a coluna.

4-Estudo computacional de sais de flavílio substituídos

4.1-Metodologia Computacional Empregada

Os cálculos quânticos foram efetuados localmente em 2 microcomputadores IBM-PC com sistema operacional GNU/Linux e através de acesso remoto ao ITS Research Computing Systems, na Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill (EUA), em um grupo de estações Silicon Graphics Origin 3800 com 64 processadores e em outro grupo de estações IBM P690 com 32 processadores.

Os programas utilizados na construção das geometrias iniciais e análise dos resultados foram GaussView 2.0 e Moldem 4.0 (Schaftenaar & Noordik, 2000). Os cálculos quânticos foram efetuados no pacote Gaussian 03 (Frisch et al., 2003) e no programa Amsol 6.6 (Hawkins et al., 1999).

4.2-Escolha dos sais de flavílio utilizados nos cálculos quânticos

Para se formar o conjunto de sais estudados foram escolhidos a partir da literatura sais de flavílio que tivessem um grupo OH na posição C7 e informações referentes aos máximos de absorção eletrônica para as formas ácida e básica em soluções aquosas. Além dos dados de absorção eletrônica, procurou-se também constituir o conjunto com compostos que tivessem valores de pK_a ou pK_{ap} (equilíbrio entre o cátion e as demais espécies em solução, tratadas como uma base conjugada) conhecidos. Uma restrição adotada foi de que os compostos não deveriam apresentar substituintes muito grandes, para que os cálculos não se tornassem inviáveis em termos de recursos computacionais, como é o caso das antocianinas naturais.

No caso dos sais de flavílio encontrados com mais de um grupo OH foi feita uma análise preliminar para se averiguar a possibilidade da saída de um próton dos outros grupos OH que não fossem o da posição C7. A análise das energias obtidas por todos os métodos estudados mostrou que a base quinonoidal de menor energia era aquela originada pela desprotonação do grupo OH na posição C7.

Para o CHMF, que possui dois grupos ionizáveis quimicamente distintos, foi estudada a formação do zwitterion, a partir do carboxilato na posição C4, e a posterior formação da base quinonoidal pela ionização do grupo OH na posição C7, pois a desprotonação dos grupos ocorre em faixas de pH bem distintas. No Esquema 5 é

mostrado o cromóforo dos sais de flavílio e na Tabela 2 está reunido o conjunto final de 17 compostos escolhidos.

Esquema 5: Estrutura do cromóforo do sal de flavílio.

Tabela 2: Sais de flavílio substituídos selecionados para o estudo computacional.

No.	HA ⁺ (nm)	A (nm)	pK _a	pK _{ap}	C3	C4	C5	C3'	C4'	C5'
01	530	573	c	2,54	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
02	427	475	3,55	2,70	H	H	H	H	H	H
03	467	493	3,80	2,98	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
04	457	483	c	3,14	H	H	H	H	OCH ₃	H
05	468	495	c	3,17	H	H	H	OCH ₃	OH	H
06	507	559	c	3,21	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H
07	456	495	4,00	3,05	H	H	H	H	OH	H
08	462	500	c	3,92	H	H	OCH ₃	H	OH	H
09	480	498	3,96	c	H	H	OH	OH	OCH ₃	H
10	448	480	4,30	4,10	H	CH ₃	OH	H	OCH ₃	H
11	468	496	4,23	4,00	H	H	OH	H	OH	H
12	458	492	4,44	c	H	Ph	H	H	OCH ₃	H
13	417	464	4,44	d	H	CH ₃	H	H	H	H
14 ^a	484	458	0,73	d	H	COOH	H	H	OCH ₃	H
15 ^b	-	494	4,84	4,60	H	COO ⁻	H	H	OCH ₃	H
16	445	475	4,85	c	H	CH ₃	H	H	OCH ₃	H
17	442	575	4,84	c	H	CH ₃	H	H	OH	H
18	436	500	4,61	4,20	H	H	H	H	OH	H

^(a) CHMF: equilíbrio cátion/zwitterion; ^(b) CHMF: equilíbrio zwitterion/base; ^(c) valor não encontrado; ^(d) não sofre hidratação em soluções aquosas.

4.3-Cálculo de transições eletrônicas do cátion flavílio e da base quinonoidal dos sais de flavílio substituídos

As geometrias da forma ácida e da respectiva base quinonoidal de um conjunto de 17 sais de flavílio foram inicialmente otimizadas em nível semi-empírico utilizando-se o Hamiltoniano AM1 (Dewar et al., 1985). As geometrias obtidas a partir do nível semi-empírico foram então usadas como ponto de partida para uma otimização pelo método Hartree-Fock restrito (RHF), com o conjunto de funções-base 6-31G(d).

As geometrias de saída em RHF do conjunto foram posteriormente refinadas através da otimização pela Teoria do Funcional da Densidade (DFT), com o funcional híbrido mPW1PW91 (Adamo & Barone, 1998) e base 6-31+G(d,p) no vácuo. Para se considerar o efeito do solvente sobre as estruturas foram feitas otimizações de geometria com o funcional mPW1PW91/6-31G(d) e o modelo de contínuo polarizado (Polarized Continuum Model, PCM) de Mennucci et al. (1998), considerando a água como solvente. Paralelamente também foram otimizadas as geometrias com o funcional híbrido B3LYP/6-31G(d) (Becke, 1983) em PCM. Posteriormente foram feitas análises das constantes de força para constatação de que as geometrias otimizadas por DFT em ambos os funcionais se encontravam em um mínimo local/global dentro da hipersuperfície de energia eletrônica, ou seja, verificou-se a ausência de frequências vibracionais imaginárias.

As transições eletrônicas do conjunto de sais escolhidos foram determinadas através do método ZINDO (Zerner & Loew, 1980), para as geometrias obtidas por AM1. Para as estruturas obtidas por RHF, foram usados os métodos ZINDO e CIS/6-31G(d) (Foresman et al., 1992).

A partir das geometrias otimizadas com efeito de solvente por DFT, as transições eletrônicas foram calculadas considerando-se a ausência e presença do efeito de dielétrico pelo método TD-DFT, time-dependent density functional theory (Stratmann et al. 1998; Cossi & Barone, 2001), com os funcionais mPW1PW91 e B3LYP, ambos na base 6-31+G(d). Calcularam-se também as transições eletrônicas por ZINDO para as geometrias otimizadas na presença de dielétrico.

Todos os cálculos foram efetuados a partir do pacote Gaussian 03.

4.4-Determinação do pK_a dos sais de flavílio através de cálculos *ab initio*

A determinação dos pK_a s do conjunto de sais de flavílio escolhidos foi efetuada a partir do procedimento descrito por Saracino et al. (2003), que calcula o pK_a através de um ciclo termodinâmico considerando o equilíbrio de protonação/desprotonação no vácuo e na fase condensada. O *single point* no vácuo foi calculado em mPW1PW91/6-311+G(2d,2p) a partir das estruturas otimizadas anteriormente no vácuo por DFT em mPW1PW91/6-31+G(d,p), para se obter uma energia eletrônica mais precisa das formas catiônica e neutra. Foi calculado também o *single point* no solvente em mPW1PW91/6-31G(d) com a palavra-chave scfvac, a partir da geometria mPW1PW91/6-31G(d) em PCM obtida previamente, para a obtenção da Energia Livre de solvatação do cátion flavílio e da respectiva espécie básica. A energia de solvatação também foi calculada no modelo SM5.4, implementado no programa Amsol.

O cálculo de frequências vibracionais no Gaussian fornece adicionalmente resultados acerca da termoquímica das espécies. Estas contribuições dos termos translacionais, rotacionais e vibracionais para a energia livre das moléculas no vácuo são calculadas dentro da abordagem termodinâmica estatística (Hill, 1960). Desse modo, foi solicitado o cálculo de frequências vibracionais no vácuo com o funcional mPW1PW91/6-31+G(d,p) para a obtenção do termo de correção térmica para Energia Livre de Gibbs. Não foi empregado nenhum fator de escalonamento para as frequências.

4.5-Cálculo de potenciais de oxidação e redução para os sais de flavílio

Os potenciais de redução e oxidação foram calculados segundo o método apresentado por Lewis et al. (2004) que, de modo semelhante ao ciclo utilizado no caso do pK_a , desmembra o processo de transferência de elétrons em um ciclo termodinâmico com etapas no vácuo e na fase condensada. Para se calcular os potenciais de redução foram utilizados como ponto de partida as geometrias obtidas anteriormente por mPW1PW91/6-31+G(d,p) para os cátions e bases. Partindo-se destas geometrias com multiplicidade de spin 1 e camada restrita, foi feita a otimização de geometria das formas reduzidas dos cátions flavílios no vácuo em **u**mPW1PW91/6-31+G(d,p) e com multiplicidade de spin igual a 2, onde o termo **u** indica camada eletrônica aberta. A

energia eletrônica mais apurada das formas reduzidas dos cátions foi obtida a partir do *single point* em **umPW1PW91/6-311+G(2d,2p)** no vácuo. Na fase condensada foi feita a otimização da geometria das espécies reduzidas em **umPW1PW91/6-31G(d)** com PCM. A Energia Livre de solvatação foi obtida a partir do *single point* em **uhf/6-31G(d)**, com o termo *scfvac*, em PCM. O mesmo procedimento de otimização de geometria e obtenção das energias para as espécies reduzidas foi utilizado também para as bases quinonoidais na forma oxidada.

Para as espécies no estado de oxidação padrão (+1 para a forma catiônica e neutra para a base) os valores de energia necessários para o fechamento dos ciclos termodinâmicos de redução e oxidação foram obtidos a partir da etapa de cálculo do pK_a .

5-Resultados e Discussão

5.1-Determinação das constantes de equilíbrio do CHMF em água por espectrofotometria de absorção

O 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio possui dois grupos que ionizam em faixas de pH bem distintas. A partir dos espectros de absorção eletrônica apresentados na Figura 2, é possível observar que o cátion flavílio do CHMF, cuja absorção máxima é em 484 nm, existe apenas em meios fortemente ácidos onde o pH é menor que 1,0. Em meios menos ácidos ($1 < \text{pH} < 4,5$), a espécie predominante é formada pela desprotonação do grupo carboxílico, dando origem a uma estrutura zwitteriônica com absorção máxima em 458 nm. Em soluções mais próximas da neutralidade ($\text{pH} > 5$) ocorre a desprotonação do grupo OH da posição C7, levando à formação da base quinonoidal, que absorve em 494 nm.

Os testes cinéticos preliminares indicaram que o cátion flavílio do CHMF não sofre hidratação, resultado que é esperado dentro da faixa de pH onde é possível encontrar a forma catiônica. Com relação à formação de produtos por reações de hidratação a partir do zwitterion e da base quinonoidal, foi observado que em $\text{pH} = 6,00$ a 40°C , uma fração da mistura zwitterion/base quinonoidal é convertida em hemiacetal/cis-chalcona. Foi observado também que a formação dos produtos da hidratação não ocorre imediatamente após a dissolução da amostra, demorando cerca de

2 minutos para se atingir a condição de equilíbrio Na Figura 3 estão os espectros em função do tempo para cinética de hidratação do CHMF.

Os resultados iniciais permitem considerar que o tempo necessário para se estabelecer os equilíbrios químicos envolvendo as transferências de prótons entre as espécies coloridas do CHMF é menor algumas ordens de grandeza em comparação com o tempo de estabelecimento dos equilíbrios envolvendo a hidratação das espécies. A partir desta aproximação, em um dado momento após a dissolução da amostra haverá apenas as formas ácida, zwitteriônica e básica. A concentração total de CHMF $[C]_0$ em solução será:

$$[C]_0 = [HA^+] + [Z] + [A^-] \quad (1)$$

onde $[HA^+]$, $[Z]$ e $[A^-]$ representam as concentrações do cátion flavílio, do zwitterion e da base quinonoidal, respectivamente. Os equilíbrios de protonação/desprotonação serão descritos através das constantes de acidez:

e as constantes de equilíbrio ácido-base podem ser determinadas sem a interferência dos produtos de hidratação, através de titulações espectrofotométricas com soluções recém-preparadas do sal de flavílio.

A ordem de ionização dos grupos foi definida sabendo-se que o pK_a de ácidos carboxílicos é cerca de 5 unidades de pK_a menor que os valores observados para fenóis (March, 1985). Sabe-se também que o pK_a do grupo OH na posição C7 de sais de flavílio situa-se entre 3,5 e 4,5 (Maçanita et al., 2002; Lima et al., 2002; Costantino et al., 1995).

Figura 2: Espectros de absorção eletrônica do 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF) em soluções aquosas. A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio ($\lambda_{\text{max}} = 484 \text{ nm}$) em $\text{pH} = -0,54$. A linha tracejada representa o espectro de uma solução em $\text{pH} = 1,65$ contendo a forma zwitteriônica ($\lambda_{\text{max}} = 458 \text{ nm}$). A linha pontilhada mostra uma solução a $\text{pH} = 7,17$ contendo a base quinonoidal ($\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$), 2 segundos após a dissolução da amostra.

Figura 3: Espectros de absorção em função do tempo ilustrando a cinética de hidratação do CHMF a 40 °C, pH = 6,00 (1) imediatamente após a dissolução; (2) 10 segundos após a dissolução; (3) 20 segundos após a dissolução; (4) 120 segundos após a dissolução.

A determinação da primeira constante de desprotonação K_{a1} foi feita a partir dos espectros de absorção de soluções aquosas mostrados na Figura 4. O ponto isosbético em 474 nm confirma a hipótese de que somente o cátion flavílio e o zwitterion se encontram em equilíbrio em solução nesta faixa de pH. Sabendo-se que em $\text{pH} = -0,54$ o cátion flavílio é a única espécie presente em solução e que está convertido totalmente na forma zwitteriônica em $\text{pH} = 2$, as frações molares de ambas as espécies podem ser obtidas facilmente. A partir dos máximos de absorção do cátion flavílio em 484 nm e do zwitterion em 458 nm, foi então construído um gráfico das frações molares em função do pH, apresentado na Figura 5. A constante de equilíbrio pK_{a1} é obtida pela intersecção das duas curvas das frações molares, onde $\text{pH}_{\text{int}} = \text{pK}_{a1}$.

Para seis experimentos independentes realizados (um dos quais está apresentado na Figura 4 e na Figura 6), o valor médio de pK_{a1} do CHMF a $25,0 \pm 0,1$ °C foi de **0,73 $\pm$ 0,13**. Este valor de pK_a , que é relativamente baixo para um ácido carboxílico, pode ser explicado pelo fato da estrutura do cátion flavílio possuir uma carga positiva delocalizada pelos anéis (March, 1985), o que facilitaria a saída do próton do grupo carboxílico. Com a saída do próton, a molécula de CHMF torna-se eletricamente neutra.

A segunda constante de desprotonação K_{a2} foi calculada a partir dos espectros de absorção em função do pH, apresentados na Figura 6. Assim como foi verificado no caso do pK_{a1} , o ponto isosbético em 478 nm indica que as duas espécies presentes em solução estão interligadas por um equilíbrio químico. As frações molares das espécies em função do pH foram obtidas a partir dos dados de máximos de absorção relativos ao desaparecimento do zwitterion (458 nm) e ao surgimento da base quinonoidal (494 nm), mostrados na Figura 7. Assim como para a primeira constante de desprotonação, a constante K_{a2} foi obtida pela intersecção das duas curvas das frações molares.

O valor médio encontrado (para seis experimentos independentes) de pK_{a2} do CHMF a $25,0 \pm 0,1$ °C foi de **4,84 $\pm$ 0,20**. Este dado está de acordo com o valor de 4,92 determinado por Mazza & Brouillard (1987) na mesma temperatura, o único valor encontrado na literatura.

O valor de pK_{a2} da molécula de CHMF é um dos maiores valores conhecidos para sais de flavílio sintéticos (Amic et al., 1999). Tipicamente quando a base quinonoidal é formada a partir da desprotonação da espécie ácida, a estrutura do sal de flavílio e de antocianinas em geral passa de uma forma catiônica carregada positivamente para uma espécie neutra. No CHMF, entretanto, a formação da base

quinonoidal é em parte dificultada pois a espécie ácida do flavílio é um zwitterion, enquanto que a base formada possui uma carga negativa.

O efeito do íon carboxilato no pK_{a2} e nas bandas de absorção eletrônica da base quinonoidal e do zwitterion flavílio é semelhante ao efeito observado para o grupo metílico. O sal de flavílio 4'-metoxi-4-metil-7-hidroxi-flavílio tem um pK_a de 4,85 e as formas ácida e básica absorvem em 445 nm e 475 nm, respectivamente (Sweeny et al., 1983).

Figura 4: Espectros de absorção eletrônica de soluções aquosas de CHMF em função do pH, utilizados no cálculo do pK_{a1} . Os espectros foram coletados 2 segundos após a dissolução da amostra.

Figura 5: Frações molares do cátion flavílio (●) e do zwitterion flavílio (□) do CHMF em água a 25,0 °C.

Figura 6: Espectros de absorção eletrônica de soluções aquosas de CHMF em função do pH, utilizados no cálculo do pK_{a2} . Os espectros foram coletados 2 segundos após a dissolução da amostra.

Figura 7: Frações molares do zwitterion flavílio (□) e da base quinonoidal (●) do CHMF em soluções aquosas a 25,0 °C, determinadas 2 segundos após a dissolução das amostras.

Pelos resultados observados nos testes cinéticos preliminares, as soluções de CHMF contendo a espécie zwitteriônica e a base quinonoidal tendem a sofrer hidrólise em pequena extensão quando ficam guardadas por longos períodos. Nestas condições, a concentração total de CHMF em solução $[C]_0$ passa a ser descrita pela seguinte expressão:

$$[C]_0 = [Z] + [A^-] + [B] + [C] \quad (2)$$

sendo que $[B]$ é a concentração de hemicetal e $[C]$ representa a concentração total de chalcona.

Uma das medidas de estabilidade do cátion flavílio é a constante de equilíbrio aparente global K_{ap} , que envolve o equilíbrio entre o cátion flavílio e uma base conjugada (CB) formada pelas demais espécies presentes em solução (Pina et al., 1999b):

Esta constante aparente, entretanto, não revela informações sobre os processos de interconversão das espécies (Brouillard et al., 1982). No caso do CHMF, a constante aparente K_{ap} pode ser representada por:

$$K_{ap} = \frac{[CB][H^+]}{[Z]} \quad (4)$$

$$[CB] = [A^-] + [B] + [C] \quad (5)$$

Os equilíbrios químicos envolvendo o zwitterion, o hemicetal e a chalcona são representados pelas seguintes equações:

onde K_{a2} é a constante de ionização do zwitterion, K_w é a constante de hidratação e K_t é a constante de tautomerização hemiacetal/cis-chalcona. A constante K_{ap} do CHMF pode ser reescrita substituindo-se as concentrações das espécies que compõem a base conjugada pelas respectivas constantes de equilíbrio:

$$K_{ap} = \frac{\left(\frac{K_{a2}[Z]}{[H^+]} + \frac{K_w[Z]}{[H^+]} + \frac{K_w K_t[Z]}{[H^+]} \right) [H^+]}{[Z]} \quad (9)$$

resuntando em (Mazza & Brouillard, 1987):

$$K_{ap} = K_{a2} + K_w + K_w K_t \quad (10)$$

As concentrações das espécies em função do pH serão:

$$[Z] = \frac{[H^+]}{K_{ap} + [H^+]} C_0 \quad (11)$$

$$[A^-] = \frac{K_{a2}}{K_{ap} + [H^+]} C_0 \quad (12)$$

$$[B] = \frac{K_w}{K_{ap} + [H^+]} C_0 \quad (13)$$

$$[C] = \frac{K_w K_t}{K_{ap} + [H^+]} C_0 \quad (14)$$

A determinação da constante de equilíbrio aparente K_{ap} do CHMF foi feita através dos espectros de absorção em função do pH (Figura 8). As soluções foram mantidas ao abrigo da luz por uma noite antes das medidas para garantir o estabelecimento das concentrações de equilíbrio do hemiacetal (produto direto da hidratação do zwitterion) e das formas *cis* e *trans* da chalcona.

Comparando-se a Figura 6 com a Figura 8, é possível observar que não há diferenças entre os espectros eletrônicos abaixo de pH = 3,00. Nas amostras relativas à

região menos ácida, há uma pequena diminuição nas bandas do zwitterion e da base quinonoidal nos espectros coletados após a hidratação, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento muito tênue da absorção em 360 nm e 286 nm, regiões onde normalmente o hemiacetal e as chalconas absorvem. Entretanto, as absorções de outros estados excitados mais energéticos do zwitterion flavílio e da base quinonoidal coincidem com estas regiões, o que dificulta a caracterização dos produtos da hidratação através da absorção eletrônica (Lima, 1996).

O logaritmo da constante de equilíbrio aparente K_{ap} foi determinado a partir da fração molar do zwitterion em função do pH, calculada utilizando-se os máximos de absorção em 458 nm (Figura 9). Pela aproximação da base conjugada, a constante pK_{ap} é igual ao valor de pH no qual a fração molar do zwitterion corresponder a 0,5. O valor médio determinado de pK_{ap} foi de **4,64 ± 0,20** (a partir de seis experimentos independentes), a $25,0 \pm 0,1$ °C. Este valor é razoavelmente próximo ao valor de 4,78 determinado por Mazza & Brouillard (1987) na mesma temperatura.

A partir das constantes pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{ap} é possível construir um gráfico da variação das frações molares das espécies em função do pH, apresentado na Figura 10. Um ponto a se destacar é a proximidade dos valores de pK_{a2} e pK_{ap} . Apesar da diferença entre ambas as constantes ser de apenas 0,2 unidade de pK e de não se observar grandes alterações entre os espectros das soluções recém-preparadas e das amostras guardadas por 12 horas, as frações molares calculadas a partir das constantes de equilíbrio indicam que cerca de 37 % do CHMF em solução se encontra nas formas de hemiacetal e chalcona em pH = 7, um pouco acima dos 28 % estimados por Mazza & Brouillard (1987). O efeito da carga negativa do carboxilato aparentemente não inibe a reação de hidratação do zwitterion. Segundo Mazza & Brouillard (1987), o grupo CO_2^- na posição C4 tem muito pouca contribuição na estabilização da espécie zwitteriônica e promove consideravelmente a formação da chalcona, em comparação ao efeito do CH_3 na mesma posição.

Com relação aos produtos de hidratação, a formação da trans-chalcona não foi detectada nas amostras analisadas por ensaios de salto de pH. A cinética de ciclização da trans-chalcona para a forma *cis* é um processo que pode demorar de minutos a horas (Jurd, 1963a; 1963b). Em um ensaio para a detecção da trans-chalcona apresentado na Figura 11, uma amostra mantida no escuro por 12 horas e a $25,0$ °C teve o pH deslocado de 8,02 para 2,00. Os espectros foram coletados em função do tempo imediatamente

após a adição do ácido. Foi verificado que a absorção da solução após 15 segundos de reação era equivalente a uma solução recém-preparada com $\text{pH} = 2$, evidenciando que todos os produtos existentes na amostra estudada foram convertidos rapidamente em zwitterion, o que descarta a existência da espécie trans-chalcona em solução.

Em resumo, as transformações químicas sofridas pelo CHMF em soluções aquosas são:

- a) $\text{pH} \sim -1,0$. Apenas o cátion flavílio, que absorve em 484 nm, está presente em solução. A espécie é termodinamicamente estável.
- b) $\text{pH} \sim 2,0$. Mais de 95 % do CHMF em solução está na forma de zwitterion flavílio, cujo máximo de absorção é em 458 nm. O restante se encontra na forma de cátion. Neste pH não ocorre hidrólise do zwitterion.
- c) $\text{pH} \sim 7$. Imediatamente após a preparação de uma solução com $\text{pH} = 7,0$, o equilíbrio zwitterion-base quinonoidal é totalmente deslocado no sentido da base quinonoidal ($\lambda_{\text{máx}} = 494 \text{ nm}$). Após algumas horas, entretanto, ocorre a formação do hemiacetal (via hidrólise do zwitterion), que dá origem a cis-chalcona a partir de tautomerização. Em $\text{pH} = 7,0$ cerca de 65 % do flavílio está na forma de base quinonoidal e o restante se encontra em equilíbrio entre o hemiacetal e a cis-chalcona. Não foi detectada a presença da espécie trans-chalcona em solução.

Figura 8: Espectros de absorção eletrônica de soluções aquosas de CHMF em função do pH, utilizados no cálculo do pK_a . Os espectros foram coletados 12 horas após a preparação das amostras.

Figura 9: Frações molares do zwitterion flavílio (□) do CHMF em soluções aquosas a 25,0 °C, determinadas após o período de equilíbrio das soluções em ausência de luz.

Figura 10: Frações molares em função do pH do cátion flavílio (HA^+), zwitterion flavílio (Z), base quinonoidal (A^-) e mistura hemicetal/chalcona ($B + C$), para o CHMF em soluções aquosas, calculadas a partir das constantes de equilíbrio obtidas a 25,0 °C. As linhas tracejadas representam as frações molares de soluções medidas imediatamente após a dissolução das amostras e as linhas contínuas representam as frações molares de soluções equilibradas.

Figura 11: Deslocamento de pH 8,02→2,00. Variação da absorção eletrônica em função do tempo para uma solução de CHMF previamente equilibrada por 12 horas. No destaque, o gráfico da variação da absorção do zwitterion em 458 nm ($\Delta A = A_t - A_0$, onde A_0 é a absorção inicial e A_t é a absorção no tempo t) em função do tempo, em segundos.

5.2-Fluorescência do CHMF no estado estacionário em água

Em antocianinas naturais e sais de flavílio sintéticos são observadas reações de transferência de prótons no estado excitado (Moreira et al., 2003; Lima et al., 1994; 1998), assim como em fenóis e em muitos outros compostos hidroxiaromáticos. A análise de fluorescência, tanto no estado estacionário quanto resolvida no tempo, é uma ferramenta importante na compreensão dos processos envolvidos no estado excitado.

A fluorescência do CHMF no estado estacionário foi estudada em função do pH. Na Figura 12 são apresentados os espectros de emissão de fluorescência do CHMF em meio ácido obtidos no comprimento de onda de excitação de 450 nm, que corresponde à absorção do zwitterion flavílio. É possível notar que os espectros apresentam um máximo em 605 nm que aumenta de intensidade com o pH, com um ombro em 540 nm. A emissão em 605 nm também foi observada no espectro da base quinonoidal do CHMF (λ de excitação = 495 nm), visto na Figura 13. Os dados coletados indicam a presença de um equilíbrio ácido-base no estado excitado e que a emissão em 605 nm corresponde à base quinonoidal formada no estado excitado a partir do zwitterion flavílio. A emissão da base quinonoidal é observada mesmo em soluções com pH menor que 2, onde comprovadamente não existe a espécie no estado fundamental.

Os espectros de excitação a partir da emissão em 605 nm (Figura 14) comprovam que a absorção no estado fundamental em meio ácido é devida ao zwitterion flavílio e em meio básico provém da base quinonoidal. Os espectros obtidos também indicam que a constante de equilíbrio de desprotonação no estado excitado, K_a^* , é superior à do estado fundamental em algumas ordens de magnitude.

Figura 12: Espectros de emissão de fluorescência da espécie zwitteriônica do CHMF em meio ácido. Os espectros foram coletados com $\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm.

Figura 13: Espectro de emissão de fluorescência da base quinonoidal do CHMF em meio básico. Os espectros foram coletados com $\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm.

Figura 14: Espectros de excitação de fluorescência do CHMF em função do pH, obtidos a partir da emissão em 605 nm.

As constantes de acidez pK_a no estado fundamental podem ser determinadas diretamente por uma série de diferentes técnicas, como titulação espectrofotométrica ou potenciométrica. No caso do estado excitado, entretanto, as determinações de pK_a^* somente podem ser feitas através de métodos indiretos (Mulder, 2003). Um dos métodos mais empregados para a determinação de pK_a^* é o ciclo termodinâmico de Förster (Esquema 6), que relaciona as entalpias de dissociação (ΔH) do ácido nos estados fundamental e excitado com as transições eletrônicas do ácido e da base (E_i):

Esquema 6: Ciclo termodinâmico de Förster.

A partir de algumas suposições como, por exemplo, de que a entropia de protonação é a mesma em ambos os estados, de que as geometrias das espécies nos estados fundamental e excitado são semelhantes e de que a transferência do próton se dá através de um processo adiabático, chega-se na seguinte expressão:

$$pK_a^* = pK_a - \frac{(h\nu_1 - h\nu_2)}{2,303RT} \quad (15)$$

onde $h\nu_1$ e $h\nu_2$ correspondem à absorção da transição 0-0 do ácido e da base, respectivamente. A transição 0-0 para cada espécie foi calculada a partir da média dos comprimentos de onda de absorção e emissão.

Na Tabela 3 estão reunidos os resultados obtidos de pK_{a1}^* e pK_{a2}^* em soluções aquosas para o CHMF, determinados a partir do ciclo termodinâmico de Förster.

Tabela 3: Comprimentos de onda da transição 0-0 (λ_{0-0}), pK_a e resultados de pK_a^* calculados para CHMF em soluções aquosas a partir do ciclo termodinâmico de Förster.

Grupo funcional	λ_{0-0} ácido (nm)	λ_{0-0} base (nm)	pK_a	pK_a^*
COOH	535	495	0,73	3,90
OH	495	557	4,84	0,06

É interessante observar que o valor de pK_{a1}^* estimado pelo ciclo de Förster é maior que o respectivo valor de pK_{a1} , pois ácidos carboxílicos são ácidos mais fracos no estado excitado, em relação ao estado fundamental (Rohatgi-Mukherjee, 1978). Para pK_{a2}^* ocorre o inverso, pois os grupos fenólicos são mais ácidos no estado excitado. O ciclo de Förster não permite que se tire conclusões sobre detalhes mecanísticos da transferência de prótons (Schulman, 1976), mas os valores de pK_a^* estimados indicam o surgimento de uma segunda estrutura neutra no estado excitado (AH^*), cuja protonação dos grupos é inversa àquela observada para o zwitterion identificado no estado fundamental. Apesar das várias tentativas feitas de se obter evidências da presença da forma AH^* em solução através de fluorescência no estado estacionário, não foi possível coletar informações adicionais sobre a espécie.

O fato de o pK_{a2}^* ser aproximadamente 5 unidades menor que no estado fundamental implica na existência de um equilíbrio no estado excitado envolvendo o cátion flavílio e a forma neutra AH^* , além do equilíbrio HA^{+*}/Z^* . Com a excitação do cátion, a tendência é ocorrer primeiro a desprotonação do grupo hidroxílico, que é o grupo mais ácido. Assim, a estimativa de pK_{a1}^* pelo ciclo de Förster mostrada na Tabela 3 será uma aproximação, pois as transições eletrônicas de AH serão diferentes das transições do zwitterion, e um possível pK_a para o equilíbrio HA^+/AH seria mais próximo do valor de pK_{a2} .

O grupo do Prof. Maçanita elucidou recentemente as transformações químicas do CHMF no estado excitado através de fluorescência resolvida no tempo (Paulo et al., 2006), ilustradas no Esquema 7:

Esquema 7: Transformações químicas do CHMF no estado excitado e estrutura da espécie neutra AH.

Foi constatado que a desprotonação de Z^* resultando na base quinonoidal A^{*-} ocorre em 30 ps ($k_{d2}^* = 3 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$). Posteriormente, a base formada desaparece por meio de três processos: a reprotonação para Z^* ($k_{p2}^* = 4,2 \times 10^{10} \text{ mol.L}^{-1}$), o decaimento para o estado fundamental ($\tau = 120 \text{ ps}$) e a protonação do grupo carboxílico, formando a espécie neutra AH^* ($k_{p3}^* = 1,3 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$). Estes resultados mostram que a carga negativa de A^{*-} está localizada no carboxilato e refletem a diferença de acidez do grupo hidroxílico entre o estados fundamental ($pK_{a2} = 4,84$) e excitado ($pK_{a2}^* = -0,2$). Adicionalmente, os resultados confirmam a existência da forma neutra AH^* no estado excitado.

Os espectros de fluorescência em função do pH para as soluções de CHMF em água estão apresentados na Figura 15 e na Figura 16, com pontos isoemissivos em 536 nm e 584 nm, respectivamente. Em soluções onde a concentração de ácido é maior que $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, o cátion sofre supressão de fluorescência por H^+ , característica de moléculas que apresentam transferência de carga intramolecular no estado excitado (Venkatachalapathy et al., 1999). Na faixa entre 1,5 e 2,5 os pontos isoemissivos desaparecem, o que é uma evidência da presença das duas espécies neutras AH^* e Z^* , além da base quinonoidal. Em vista destas observações, evitou-se utilizar os dados

obtidos nesses intervalos. Considerando-se que os rendimentos quânticos das espécies são iguais, quando a intensidade de emissão de fluorescência do ácido for igual à intensidade da base, ou seja, quando a razão entre as emissões for igual a 1, as concentrações de ambas as espécies excitadas serão iguais e o valor do pH será igual ao pK_a^* . Desse modo, o valor de $pK_{a1}^* = 1,9$ foi determinado a partir da razão entre os máximos de fluorescência do cátion flavílio em 585 nm e do zwitterion em 530 nm. Este resultado é ligeiramente diferente do calculado pelo ciclo de Förster, indicando que as fluorescências observadas na faixa de pH estudado não são apenas do par HA^+/Z , mas também possuem contribuições de outras espécies em solução.

A partir da razão entre as emissões da base em 620 nm e do zwitterion flavílio, foi determinado que $pK_{a2}^* = 1,4$. O valor, que é maior que o calculado pelo ciclo de Förster e pelo determinado a partir da fluorescência resolvida no tempo, é aceitável para a metodologia empregada. Este tipo de comportamento é inerente da técnica de titulação fluorimétrica, pois os tempos de vida das espécies no estado excitado podem não ser suficientemente longos para que ocorra o estabelecimento do equilíbrio ácido-base. Entretanto, o emprego da fluorescência no estado estacionário parece não ser o método mais apropriado para se determinar os pK_a^* s do CHMF, pois os valores encontrados são relativamente próximos aos valores obtidos para os pK_a s no estado fundamental. Os resultados obtidos não permitem que se conclua com certeza que são derivados apenas das transferências de prótons no estado excitado, sem relação direta com a concentração das espécies no estado fundamental.

Um ponto que necessitaria ser investigado mais detalhadamente é o processo de mudança na protonação do zwitterion, que não foi claramente observada nos espectros de fluorescência obtidos.

Figura 15: Espectros de emissão de fluorescência em função do pH para o CHMF em água utilizados na determinação de pK_{a2}^*

Figura 16: Espectros de emissão de fluorescência em função do pH para o CHMF em água utilizados na determinação de pK_1^*

5.3-Determinação das constantes de protonação (k_p) e de desprotonação (k_d) do CHMF em soluções aquosas

A determinação das constantes de protonação e desprotonação do zwitterion flavílio foram determinadas através da técnica de fotólise por pulso de laser, aproveitando-se o fato de antocianinas e sais de flavílio apresentarem características fotoácidas. O pK_a^* destes compostos é menor do que o pK_a no estado fundamental. Em soluções com pH na faixa em que a forma ácida é predominante, a excitação em 355 nm leva rapidamente à desprotonação e formação da base quinonoidal no estado excitado. A base formada decai em seguida para o estado fundamental dentro de uma escala de tempo de algumas centenas de picossegundos, ou seja, numa escala de tempo muito inferior à duração do pulso do laser do equipamento, de 5 ns (Maçanita et al., 2002):

Experimentalmente, o pulso do laser representa o limite de detecção do equipamento. Pode-se considerar então que a perturbação do equilíbrio ácido-base é efetivamente instantânea dentro da duração do pulso do laser, o que reduz o sistema de quatro espécies para duas espécies apenas: o cátion flavílio e a base quinonoidal no estado fundamental.

O CHMF tem uma peculiaridade em relação aos demais flavílios já estudados pela fotólise por pulso de laser: a presença de dois grupos quimicamente diferentes que podem perder ou ganhar prótons dentro da região ácida do pH. Ambos os equilíbrios do CHMF serão perturbados pelo pulso do laser:

A evolução das concentrações das espécies em função do tempo pode ser escrita na forma matricial:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \text{HA}^+ \\ Z \\ \text{A}^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -X & b & 0 \\ a & -Y & d \\ 0 & c & -Z \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \text{HA}^+ \\ Z \\ \text{A}^- \end{bmatrix} \quad (17)$$

onde:

$$X = k_{d1}$$

$$Y = k_{d2} + k_{p1}[\text{H}^+]$$

$$Z = k_{p2}[\text{H}^+]$$

$$a = k_{d1}$$

$$b = k_{p1}[\text{H}^+]$$

$$c = k_{d2}$$

$$d = k_{p2}[\text{H}^+]$$

A resolução do seguinte determinante pelo método das matrizes (Steinfeld et al, 1989):

$$\begin{bmatrix} \lambda - X & b & 0 \\ a & \lambda - Y & d \\ 0 & c & \lambda - Z \end{bmatrix} = 0 \quad (18)$$

resulta em:

$$\lambda_3 = 0 \quad (19)$$

$$\lambda_{2,1} = \frac{X + Y + Z \pm \sqrt{(X - Y - Z)^2 + 4k_{p1}[\text{H}^+](k_{d1} - k_{p2}[\text{H}^+])}}{2} \quad (20)$$

O pK_{a1}^* (2,5) indica que a constante de desprotonação k_{d1}^* é cerca de $7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ (supondo a constante de protonação $k_{p1}^* \approx 2-3 \times 10^{10} \text{ mol.L}^{-1}$, próxima ao limite por difusão). No estado fundamental, entretanto, k_{d1} deveria ser muito maior (cerca de $4 \times$

10^9 s^{-1}), pois $\text{pK}_{a1} = 0,73$. As simulações dos inversos dos tempos de vida, λ_2 e λ_1 , mostram que λ_2 seria também da ordem de $4 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ (que resultaria em um transiente $\tau_2 \approx 250 \text{ ps}$). Isto significa que o transiente τ_2 está além do limite de detecção do equipamento, não sendo assim possível determinar k_{p1} e k_{d1} . Os transientes obtidos devem então ser adequadamente ajustados por funções monoexponenciais, como foi observado experimentalmente.

A constante de velocidade observada ($\lambda_1 = k_{\text{obs}}$) será uma função linear de $[\text{H}^+]$:

$$k_{\text{obs}} = k_{d2} + k_{p2}[\text{H}^+] \quad (21)$$

onde k_{obs} é o inverso do tempo de vida, τ , do transiente.

A partir dos valores máximos dos transientes de absorção obtidos imediatamente após a excitação com o laser e dos respectivos comprimentos de onda, foi construído o gráfico apresentado na Figura 17. Observa-se que, simultaneamente ao desaparecimento da banda centrada em 458 nm, surge outra com o máximo em cerca de 500 nm. A análise através de funções monoexponenciais da curva de decaimento em 500 nm e da curva de crescimento em 458 nm revela que ambos os transientes têm o mesmo tempo de vida, $\tau = 120 \text{ ns}$, como mostra a Figura 18. Estes dados, em conjunto com os transientes em diferentes valores de pH para o CHMF, confirmam que a banda que aparece em 500 nm é referente à base formada pela desprotonação da forma zwitteriônica, em 458 nm. Com estas informações foi construído um gráfico de k_{obs} em função da concentração de H^+ , a partir dos tempos de decaimento da espécie básica encontrados para as soluções com diferentes valores de pH (Figura 10).

A média das regressões lineares de k_{obs} para o desaparecimento da base e recuperação do zwitterion forneceu os valores de $k_{p2} = (4,21 \pm 0,12) \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e $k_{d2} = (1,23 \pm 1,14) \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, a partir dos coeficientes angular e linear, respectivamente. A exatidão da constante de desprotonação, entretanto, pode ser melhorada através da combinação de k_{p2} e $K_{a2} = 1,5 \times 10^{-5}$. O valor encontrado por este procedimento foi de $k_{d2} = 6,1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.

Figura 17: Espectro de transientes de absorção para CHMF em pH = 3,85.

Figura 18: Transientes de decaimento da base quinonoidal (O) e recuperação do zwitterion flavílio (■) do CHMF à 20,0 °C, em pH = 3,85.

Figura 19: Determinação da dinâmica de protonação de CHMF (pK_{a2}) em soluções aquosas. Gráfico das constantes de velocidade observadas para o desaparecimento da base quinonoidal em função da concentração de H^+ .

Na Tabela 4 estão listadas as constantes de protonação e desprotonação para o CHMF e para alguns sais de flavílio, determinadas por Maçanita et al. (2002). O que mais chama a atenção é que enquanto a constante de protonação aumenta cerca de 1,7 vezes do menor valor para o maior, k_d diminui cerca de 8 vezes. Isto parece indicar que as velocidades de protonação das espécies em água estão próximas do limite por difusão.

Os experimentos de fotólise por pulso de laser foram realizados com soluções equilibradas e com soluções recém-preparadas de CHMF. Em ambos os casos não foram observadas diferenças entre os tempos de vida coletados, indicando que as velocidades de transferência de prótons são muito maiores do que os demais processos e confirmando que podem ser tratadas cineticamente de forma isolada das outras reações que ocorrem em solução.

Tabela 4: Constantes de protonação (k_p), desprotonação (k_d) e pK_a para o CHMF, 4-metil-7-hidroxi-flavílio (HMF), 4',7-dihidroxi-flavílio (DHF) e oenina em soluções aquosas.

	$k_p/10^{10}$ (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹)	$k_d/10^6$ (s ⁻¹)	pK_a
CHMF	4,21	0,61	4,84
HMF ^a	3,56	1,4	4,4
DHF ^a	3,06	3,1	4,0
Oenina ^a	2,51	5,0	3,7

^a valores determinados por Maçanita et al. (2002)

5.4-Determinação das constantes de equilíbrio do CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹ por espectrofotometria de absorção

A adição de micelas aniônicas de SDS às soluções de CHMF promove profundas alterações na reatividade do sal de flavílio. A primeira observação feita é que o cátion flavílio passa a existir em pHs mais elevados do que em água. Outro ponto relevante é que o meio micelar desloca a absorção eletrônica do cátion flavílio e do zwitterion para o vermelho (efeito batocrômico). O máximo de absorção do cátion é deslocado de 484 nm em água para 494 nm em SDS e o zwitterion passa de 458 nm para 464 nm. O espectro de absorção da base quinonoidal não sofre alteração em comparação com soluções aquosas, e a absorbância máxima permanece em 494 nm. Na Figura 20 estão apresentados os espectros das espécies em soluções de SDS.

Sabe-se que quando o estado excitado de uma molécula é menos polar do que o estado fundamental, a banda de absorção eletrônica (π,π^*) é deslocada para a região do vermelho com a diminuição da polaridade do solvente, pois há uma redução na interação entre a polarização do solvente e os orbitais do estado fundamental do soluto (Rohatgi-Mukherjee, 1978). Como o ambiente micelar tem polaridade menor que a água, o deslocamento dos máximos de absorção pode revelar diferenças entre a polaridade das espécies nos estados fundamental e excitado. O deslocamento observado da primeira banda de absorção tanto para o cátion quanto para o zwitterion do CHMF em SDS é coerente com o que foi verificado em outras antocianinas (Lima et al., 2002) e indica que o estado fundamental é mais polarizado do que o estado estado excitado. O efeito não é evidente na base quinonoidal porque, devido à carga negativa, provavelmente ela se encontra em uma região mais externa na micela.

O efeito solvatocrômico observado para a base quinonoidal sugere que a constante de incorporação micelar (K_S) é pequena para o ânion, o que é coerente com o potencial eletrostático na superfície das micelas de SDS. Com relação às demais espécies, pode-se afirmar que todo o CHMF em solução está incorporado às micelas de SDS, uma vez que as concentrações empregadas do sal de flavílio nos ensaios de absorção eletrônica (cerca de $1-5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) são muito menores do que a concentração de detergente na forma micelar em solução. Considerando que o número de agregação do SDS é igual a 75 (Quina et al., 1995a), em uma solução de SDS 0,1 mol.L⁻¹ a concentração de micelas é da ordem de $1,3 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹.

Na Figura 21 são apresentados os espectros de absorção eletrônica de soluções de CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, usados na determinação de pK_{a1}, coletados cerca de 2 segundos após a dissolução da amostra. O ponto isosbético em 478 nm confirma que apenas o cátion flavílio e o zwitterion se encontram em equilíbrio em solução nesta região de pH. Em pH = 0,01 todo o CHMF em solução se encontra na forma de cátion flavílio, e em pH = 3,90 pode-se considerar o zwitterion como a única espécie presente. Com base nestas informações, as frações molares do cátion e do zwitterion foram determinadas a partir dos máximos de absorção em 494 nm e 464 nm, respectivamente (Figura 22). O valor de pK_{a1} foi obtido a partir do pH onde ocorre a intersecção das duas curvas, ou seja, onde a fração molar das duas espécies é igual a 0,5.

O valor médio encontrado de pK_{a1} a 25,0 ± 0,1 °C foi de **2,77 ± 0,2**, obtido a partir de seis ensaios independentes. Comparado ao pK_{a1} = 0,73 obtido em água, o valor determinado no meio micelar indica que a constante de equilíbrio entre o cátion e o zwitterion diminui cerca de 200 vezes, ou seja, as micelas aniônicas de SDS interagem fortemente com o cátion flavílio, promovendo a estabilização preferencial da espécie com carga positiva em relação à forma neutra.

A determinação do pK_{a2} foi feita com os espectros apresentados na Figura 23. Nesta região de pH (entre 4,0 e 8,5), onde apenas o zwitterion e a base quinonoidal são detectadas e se encontram em equilíbrio, surge um ponto isosbético em 488 nm. As frações molares do zwitterion flavílio foram calculadas a partir das absorbâncias em 464 nm (Figura 24) e o valor de pK_{a2} determinado foi de **5,64 ± 0,2**, a 25,0 ± 0,1 °C. Assim como foi observado para pK_{a1}, o valor determinado de pK_{a2} em SDS é maior que o encontrado em água (pK_{a2} = 4,84), indicando que o equilíbrio entre o zwitterion e a base quinonoidal, que possui carga negativa, está deslocado no sentido da formação da primeira espécie.

Figura 20: Espectros de absorção eletrônica do 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF) em soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹. A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio ($\lambda_{\text{max}} = 494$ nm) em pH = 1,26. A linha tracejada representa o espectro de uma solução em pH = 4,18 contendo a forma zwitteriônica ($\lambda_{\text{max}} = 464$ nm). A linha pontilhada mostra uma solução a pH = 8,66 contendo a base quinonoidal ($\lambda_{\text{max}} = 494$ nm), 2 segundos a dissolução da amostra.

Figura 21: Espectros de absorção eletrônica de CHMF em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, em função do pH, utilizados no cálculo do pK_{a1} . Os espectros foram coletados 2 segundos após a dissolução da amostra.

Figura 22: Frações molares do cátion flavílio (●) e do zwitterion flavílio (□) do CHMF em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ a $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 23: Espectros de absorção eletrônica de CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, em função do pH, utilizados no cálculo do pK_{a2}. Os espectros foram coletados 2 segundos após a dissolução da amostra.

Figura 24: Frações molares do zwitterion flavílio (□) do CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹ a 25,0 °C.

Os resultados obtidos anteriormente em soluções aquosas indicaram que a espécie zwitteriônica sofre hidrólise quando as soluções são deixadas em repouso por algumas horas, formando hemicetal e cis-chalcona como produtos da reação de hidratação, e que a constante de equilíbrio aparente K_{ap} obtida deste processo é uma das medidas de estabilidade do cátion flavílio:

$$K_{ap} = K_{a2} + K_w + K_w K_t \quad (22)$$

onde K_{a2} é a constante de ionização do zwitterion, K_w é a constante de hidratação e K_t é a constante de tautomerização hemicetal/cis-chalcona.

A hidratação do zwitterion flavílio também foi observada nas soluções de CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, conforme se observa nos espectros de absorção eletrônica de amostras que foram mantidas ao abrigo da luz por 12 horas, reunidos na Figura 25. Em comparação com os espectros obtidos logo após a preparação das soluções, observa-se uma pequena diminuição das intensidades de absorção na região do visível e um aumento da absorção em 250 nm e 350 nm, principalmente nos espectros coletados em pH > 5,00. Esta região do ultravioleta, assim como foi observado nas soluções aquosas, é de difícil caracterização espectral pela coincidência da absorção dos produtos da hidratação com a absorção de outros estados excitados mais energéticos do zwitterion e da base quinonoidal.

O gráfico da fração molar da espécie em função do pH, construído a partir dos máximos de absorção do zwitterion em 464 nm, está apresentado na Figura 26. O valor médio encontrado para o pK_{ap} foi de **5,63 ± 0,29** a $25,0 ± 0,1$ °C. Em comparação ao valor obtido em água ($pK_{ap} = 4,64$), a constante aparente indica que há uma grande estabilização da forma neutra em comparação aos produtos da hidratação e à base quinonoidal.

De um modo geral, a análise das constantes pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{ap} indica que o microambiente micelar formado pelo SDS estabiliza preferencialmente a forma ácida (que possui carga positiva) e, em um grau menor, favorece a forma zwitteriônica neutra. As frações molares da base quinonoidal e dos produtos de hidratação diminuíram consideravelmente em comparação com a água, indicando que a hidratação das formas coloridas do CHMF é bastante afetada pelo meio micelar. Na Figura 27 estão

apresentadas as frações molares calculadas a partir das constantes de equilíbrio determinadas.

A espécie *trans*-chalcona não foi detectada nas soluções micelares guardadas por períodos prolongados, resultado semelhante ao observado em soluções aquosas. Nos experimentos realizados para a detecção da *trans*-chalcona, as amostras em meio próximo da neutralidade tiveram o pH deslocado rapidamente para cerca de 1,5. O espectro de absorção da solução obtido após 15 segundos do salto de pH era idêntico ao espectro de uma solução fresca com pH = 1,5. Este resultado descarta a presença da forma *trans* em solução, uma vez que a cinética de ciclização *trans*-*cis* demora de minutos a horas.

As transformações químicas do CHMF em soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹ são:

- a) pH ~ 1,0. Somente o cátion flavílio, que absorve em 494 nm, está presente em solução. Neste pH a espécie é termodinamicamente estável.
- b) pH ~ 4,0. Cerca de 95 % do CHMF se encontra como zwitterion, cujo máximo de absorção é em 464 nm. O restante está na forma de cátion e há uma pequena fração na forma de base quinonoidal. Não ocorre hidrólise neste pH.
- c) pH ~ 7,0. Logo após a preparação da solução, todo o flavílio se encontra sob a forma básica, com absorção em 494 nm. Após algumas horas, ocorre formação do hemicetal, que está em equilíbrio de tautomerização com a *cis*-chalcona. Após o estabelecimento do equilíbrio termodinâmico, a fração do CHMF hidratada é cerca de 2 %. Assim como em soluções aquosas, não foi encontrada a espécie *trans*-chalcona em soluções de SDS.

Figura 25: Espectros de absorção eletrônica de CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, em função do pH, utilizados no cálculo da constante aparente pK_{ap}. Os espectros foram coletados 12 horas após a preparação das amostras, a 25,0 °C.

Figura 26: Frações molares do zwitterion flavílio (□) do CHMF em soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹ a 25,0 °C, determinadas após o período de equilíbrio das soluções em ausência de luz.

Figura 27: Frações molares em função do pH do cátion flavílio (HA^+), zwitterion flavílio (Z), base quinonoidal (A^-) e mistura hemicetal/chalcona ($B + C$), para o CHMF em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, calculadas a partir das constantes de equilíbrio determinadas a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$. As linhas tracejadas representam as frações molares de soluções medidas imediatamente após a dissolução das amostras e as linhas contínuas representam as frações molares de soluções que atingiram o equilíbrio termodinâmico.

5.5-Fluorescência do CHMF no estado estacionário em SDS 0,1 mol.L⁻¹

As constantes de equilíbrio ácido-base no estado excitado para o CHMF em SDS também foram estimados pelo ciclo termodinâmico de Förster, assim como em água. Na Tabela 5 encontram-se reunidos os dados referentes ao processo. No estado excitado é esperado o aumento do pK_{a1}^* e a diminuição do pK_{a2}^* , em relação aos respectivos valores do estado fundamental, resultando em uma inversão na protonação do zwitterion, de modo semelhante ao que foi especulado para as soluções aquosas. Coincidentemente, os pK_a^* s previstos pelo ciclo de Förster são muito parecidos com as constantes no estado fundamental, o que torna a interpretação dos resultados de pK_a^* a partir dos espectros de fluorescência bastante especulativa, na medida em que não se pode afirmar com certeza se estes resultados são de uma transferência de prótons no estado excitado ou se são reflexo da concentração das espécies no estado fundamental.

Tabela 5: Resultados de pK_a^* obtidos para CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, a partir do ciclo termodinâmico de Förster.

Grupo funcional	λ_{0-0} ácido (nm)	λ_{0-0} base (nm)	pK_a	pK_a^*
COOH	540	505	2,77	5,5
OH	505	555	5,64	1,9

Os espectros de fluorescência do CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹ em função do pH estão apresentados na Figura 28. Na presença de micelas de SDS, as intensidades de fluorescência do cátion e do zwitterion aumentam significativamente, enquanto que a da fluorescência da base quinonoidal não difere muito dos valores obtidos em soluções aquosas nas mesmas condições. Em meio ácido é possível observar um ponto isoemissivo em 579 nm, sendo que os máximos do cátion flavílio e do zwitterion se situam em 585 nm e 546 nm, respectivamente. Com essas informações, o $pK_{a2}^* = 2,7$ foi determinado a partir do ponto em que a razão entre as emissões do cátion flavílio e do zwitterion fosse igual a 1.

Já no processo entre o zwitterion e a base, com máximo em 615 nm (Figura 29), não foi observado ponto isoemissivo, indicando que as espécies não permanecem tempo suficiente no estado excitado para o estabelecimento da condição de equilíbrio. Outro ponto que confirma o não equilíbrio no estado excitado entre o zwitterion flavílio e a base quinonoidal é que a fluorescência obtida está diretamente relacionada com a concentração das espécies no estado fundamental. Supõe-se que k_{dl}^* em SDS seja menor que k_{dl}^* em água e que o tempo de vida da base no estado excitado em SDS seja da mesma ordem de grandeza de k_{dl}^* . Deste modo, as fluorescências observadas da base/zwitterion resultam essencialmente da concentração das espécies no estado fundamental e não de processos de transferência de prótons no estado excitado.

Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência em função do pH para o CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, usados na determinação de pK_{a2}^* .

Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência em função do pH para o CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹.

5.6-Determinação das constantes de protonação (k_p) e desprotonação (k_d) do CHMF em soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹

Foi visto através das determinações de pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{ap} em água e em SDS que a adição do surfactante em solução provoca grandes mudanças nos equilíbrios químicos entre espécies. Nas soluções contendo surfactante, além das reações já observadas em água há também a partição do soluto entre a fase aquosa e a fase micelar:

As equações determinadas para as soluções aquosas não são aplicáveis às soluções micelares, pois os transientes observados experimentalmente são de fato funções biexponenciais e os gráficos das constantes de velocidade λ_1 e λ_2 em função de $[H^+]$ mostram que as inclinações de λ_1 e λ_2 são bastante diferentes (cerca de $4 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ e $2 \times 10^{11} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente). A inclinação de λ_1 por $[H^+]$ ($4 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) sugere que a protonação também pode ocorrer na fase aquosa, quando a base A^- deixa a micela.

A resolução do sistema com todas as constantes de velocidade entre as espécies envolvidas é bastante complexa e não pode ser obtida, uma vez que os tempos de vida de protonação e desprotonação entre o cátion flavílio e o zwitterion em SDS são muito pequenos para serem detectados pelo equipamento, semelhante ao que foi observado anteriormente no estudo em soluções aquosas. Este fato permite desconsiderar os equilíbrios envolvendo o cátion e o zwitterion, simplificando-se o sistema estudado.

A consideração de todos os quatro equilíbrios (zwitterion-base na micela, zwitterion-base em água, partição do zwitterion e partição da base) resulta em um sistema envolvendo 8 constantes de velocidade, mas que pode ser simplificado para um sistema de apenas 3 espécies, se considerarmos que o zwitterion permanece dentro da micela na escala de tempo do experimento:

onde os índices w e m estão relacionados com os processos que ocorrem na fase aquosa e na fase micelar, respectivamente, k_m e k_{-m} são as constantes de entrada e de saída da base quinonoidal na micela. Neste caso, as concentrações das espécies em função do tempo podem ser descritas pela seguinte equação diferencial:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} Z_m \\ A_m^- \\ A_w^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -X & b & d \\ a & -Y & f \\ c & e & -Z \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} Z_m \\ A_m^- \\ A_w^- \end{bmatrix} \quad (23)$$

onde:

$$\begin{aligned} X &= k_{dm} + k_{dw} \\ Y &= k_{-m} + k_{pm}[H^+] \\ Z &= k_m + k_{pw}[H^+] \\ a &= k_{dm} \\ b &= k_{pm}[H^+] \\ c &= k_{dw} \\ d &= k_{pw}[H^+] \\ e &= k_{-m} \\ f &= k_m \end{aligned}$$

A partir da resolução da equação diferencial pelo método das matrizes, os autovalores são:

$$\lambda_3 = 0 \quad (24)$$

$$\lambda_{2,1} = \frac{X + Y + Z \pm \sqrt{(X - Y - Z)^2 + 4(ab + cd - bf - bd - ed)}}{2} \quad (25)$$

As concentrações das espécies serão dadas por (Maçanita et al., 2002):

$$[Z_m] = [Z_m]_{eq} + z_1 e^{-\lambda_1 t} + z_2 e^{-\lambda_2 t} \quad (26)$$

$$[A_m] = [A_m]_{eq} + a_{m1} e^{-\lambda_1 t} + a_{m2} e^{-\lambda_2 t} \quad (27)$$

$$[A_w] = [A_w]_{eq} + a_{w1} e^{-\lambda_1 t} + a_{w2} e^{-\lambda_2 t} \quad (28)$$

onde os fatores preexponenciais (a_{mi} , a_{wi} e z_i) são funções das concentrações iniciais das espécies, constantes de velocidade e pH.

As simulações de λ_1 e λ_2 em função do pH mostram que ambos são detectáveis, isto é, são previstos transientes biexponenciais, fato que está de acordo com as medidas experimentais (Figura 30). As inclinações de λ_1 e λ_2 *versus* a concentração de H^+ ($2 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ e $2 \times 10^{11} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente) também corroboram com os experimentos. É importante ressaltar que os coeficientes lineares destes gráficos não são os valores de k_{dm} e k_{dw} , mas sim:

$$\lim_{[H^+] \rightarrow 0} \lambda_1 = X = k_{dm} + k_{dw} \quad (29)$$

$$\lim_{[H^+] \rightarrow 0} \lambda_2 = Y + Z = k_{-m} + k_m \quad (30)$$

As intersecções têm significados diferentes pois tanto λ_1 quanto λ_2 não são funções lineares de $[H^+]$. Dentro do mesmo formalismo, isto também se aplica às inclinações, mas as simulações de λ_1 e λ_2 feitas e as constantes de velocidades observadas experimentalmente mostraram que os desvios da linearidade de k_{pm} e k_{pw} não são detectáveis dentro da faixa de pH estudado.

Quando o equilíbrio de soluções de CHMF é perturbado com o pulso do laser, observa-se que a forma básica é formada simultaneamente ao desaparecimento do zwitterion (Figura 31). Para a determinação das constantes de velocidade referentes ao equilíbrio zwitterion-base, foram monitorados em função do pH os transientes em 460 nm (absorção do zwitterion) e 510 nm (base quinonoidal). Todos os transientes obtidos foram ajustados adequadamente através de funções biexponenciais. Em cada pH estudado foram encontrados tempos de vida semelhantes, dentro do desvio padrão, para o decaimento em 510 nm e para o crescimento em 460 nm.

Figura 30: Transiente de recuperação do zwitterion flavílio do CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, coletado pH = 4,34. Os dados foram ajustados através de uma função biexponencial.

Com os dados coletados foi construído um gráfico dos inversos dos tempos de vida em função da concentração de ácido, sendo que um dos ensaios realizados está apresentado na Figura 32. A partir das regressões lineares, os valores de k_{pw} e k_{pm} foram obtidos dos coeficientes angulares de λ_1 e λ_2 , respectivamente. Os valores encontrados para as constantes de protonação foram $k_{pw} = (3,3 \pm 0,3) \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e $k_{pm} = (2,3 \pm 0,8) \times 10^{11} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$. O k_{pw} obtido é bastante próximo da mesma constante determinada em soluções aquosas ($k_{pw} = k_{p2} = 4,2 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

Apesar de ser possível determinar a soma $k_{dm} + k_{dw}$ pelo coeficiente linear da correlação de λ_1 , o valor encontrado, $(3,5 \pm 3,2) \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, é menor que a constante de desprotonação obtida em água ($k_{dw} = k_{d2} = 6,1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$), indicando que ambas as constantes estão muito próximas do limite no qual podem ser obtidas diretamente do gráfico, o que resulta em um erro considerável na medida e que não pode ser evitado. O fato de o erro ter um peso grande permite apenas que se tenha um indicativo da ordem de magnitude de $k_{dm} + k_{dw}$. Entretanto, com a constante aparente de equilíbrio em meio micelar $K_{a2} = 2,3 \times 10^{-6}$, chega-se a uma constante de desprotonação em SDS de $k_{dm} = 5,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.

Em comparação com a água, a constante de protonação em meio micelar da base quinonoidal aumenta cerca de 6 vezes, enquanto que k_{dm} diminui apenas 15 %. O aumento de k_{pm} é semelhante ao observado para HMF e oenina, 5 e 7 vezes, respectivamente (Giongo et al., 2002; Lima et al., 2002). Já a constante de desprotonação do zwitterion praticamente não se altera, diferentemente do que foi constatado para o cátion flavílio do HMF, cujo k_{dm} é 40 vezes menor que k_{dw} , e para a oenina (diminuição de 25 vezes). Isto ocorre essencialmente porque o zwitterion do CHMF, por ser eletricamente neutro, não é tão fortemente estabilizado pelo ambiente micelar como o cátion flavílio.

No caso do equilíbrio cátion flavílio-zwitterion, supondo-se que as constantes de velocidade de protonação determinadas para a base em água e em SDS fossem as mesmas para a protonação do zwitterion, a partir das constantes de equilíbrio K_{a1} chegasse a uma estimativa de que a desprotonação do cátion em SDS diminuiria 20 vezes, hipótese coerente com os dados experimentais de HMF e oenina.

Figura 31: Espectro de transientes de absorção para CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹, obtidos em pH = 4,69 logo após o disparo do laser.

Figura 32: Determinação da dinâmica de protonação de CHMF em SDS 0,1 mol.L⁻¹ (pK_{a2}). Gráfico das constantes de velocidade observadas (obtidas dos ajustes biexponenciais dos transientes) em função da concentração de H⁺.

O coeficiente linear do gráfico de λ_2 em função de $[H^+]$ fornece a soma das constantes de entrada e saída da base quinonoidal na micela, $k_m + k_{-m} = (1,4 \pm 0,6) \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Estes valores são da mesma ordem de grandeza de constantes de entrada e saída de co-íons orgânicos em micelas de detergentes iônicos (Ranganathan et al., 1999).

Entretanto, a constante de incorporação micelar K_S para a base quinonoidal pode ser escrita como:

$$K_S = \frac{k_m}{k_{-m}N_{ag}} \quad (31)$$

onde N_{ag} é o número de agregação do surfactante. Rearranjando-se os termos da equação acima e sabendo-se que $k_m + k_{-m} = 1,4 \times 10^7$:

$$k_m = \frac{K_S N_{ag}}{1 + K_S N_{ag}} 1,4 \times 10^7 \quad (32)$$

Se considerarmos para a base quinonoidal uma constante $K_S \geq 1$, o que é bastante provável, tem-se que a constante de velocidade de entrada da base quinonoidal em SDS é $k_m \gg 1,4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Na Tabela 6 estão agrupadas todas as constantes determinadas neste estudo para o CHMF em água e em soluções micelares de SDS.

Tabela 6: Constantes cinéticas e termodinâmicas determinadas para o cloreto de 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF) em soluções aquosas e em presença de micelas de SDS 0,1 mol.L⁻¹.

constantes	Soluções aquosas	SDS 0,1 mol.L ⁻¹
pK _{a1}	0,73	2,77
pK _{a2}	4,84	5,64
pK _{ap}	4,64	5,63
pK _{a1} [*]	3,9 ^a	5,5 ^a
	1,9 ^b	—
pK _{a2} [*]	0,06 ^a	1,9 ^a
	1,4 ^b	2,7 ^b
k _{p2} (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	4,2 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ¹¹
k _{d2} (s ⁻¹)	6,1 x 10 ⁵	5,2 x 10 ⁵
k _m (s ⁻¹)	—	1,4 x 10 ⁷

^a calculado pelo ciclo de Förster; ^b experimental

5.7-Síntese do tetracloroferrato de 2-fenilbenzopirílio (íon flavílio)

Inicialmente foi feita uma tentativa de síntese do sal de flavílio sem substituintes nos anéis com o contra-íon fluoroboreto, através da condensação do salicilaldeído e acetofenona com posterior ciclização *in situ* da chalcona, catalisada por ácido. A amostra obtida mostrou-se muito higroscópica e de difícil purificação. Optou-se então por uma nova rota sintética, baseada no trabalho de Manfredi & McGrew (1996) que obtém o precursor do cátion flavílio a partir da condensação aldólica cruzada entre salicilaldeído e acetofenona, catalisada por base. O tratamento do produto obtido com ácido leva à ciclização e formação do hemiacetal, que após desidratação fornece o cloreto de flavílio em solução (Esquema 4). O cátion pode ser isolado em uma etapa posterior por precipitação com cloreto de ferro. O resultado da análise elementar (laboratório de microanálise do IQ-USP) do produto final obtido mostrou resultados coerentes (calculado: 44,5 % C, 2,74 % H; encontrado: 45,4 % C, 3,11 % H). As pequenas diferenças entre os resultados foram atribuídas a eventuais traços de ácido acético usado na etapa de purificação.

Esta rota sintética permite também que a 2-hidroxibenzalacetofenona, a trans-chalcona, seja isolada e purificada com facilidade. Os máximos de absorção do espectro do cátion obtido dissolvido em metanol são coincidentes com os valores reportados na literatura (McClelland & Gedge, 1980). A 2-hidroxibenzalacetofenona possui propriedades fotocrômicas. Quando exposta à radiação de uma lâmpada de mercúrio, cujo máximo de emissão situa-se em 366 nm (próxima da absorção máxima da trans-chalcona em 350 nm), ocorre a isomerização via estado excitado com formação da cis-chalcona que, dentro de condições de pH favoráveis, forma o cátion flavílio.

Na Figura 33 está apresentado o espectro de absorção eletrônica do tetracloroferrato de 2-fenilbenzopirílio em HCl 0,1 mol.L⁻¹. O espectro obtido é idêntico aos encontrados para amostras do cátion flavílio produzidas a partir da trans-chalcona. Entretanto, para evitar possíveis interferências do íon FeCl₄⁻ optou-se por utilizar o 2-fenilbenzopirílio gerado fotoquimicamente em meio ácido a partir de 2-hidroxibenzalacetofenona.

Figura 33: Espectro de absorção do tetracloroferrato de 2-fenilbenzopirílio em HCl 0,1 mol.L⁻¹, obtido cerca de 5 segundos após a dissolução da amostra.

5.8-Estudos preliminares das transformações do sal de flavílio em soluções aquosas

O 2-fenilbenzopirílio (o sal de flavílio sem substituintes) está sujeito a uma série de transformações em meio aquoso, representadas no Esquema 8. Na Figura 34 estão apresentados os espectros de absorção eletrônica das diferentes espécies em água. Em meios com pH em torno de 1, o cátion flavílio é a única espécie existente. Quando o pH da solução é deslocado rapidamente para cerca de 4, é estabelecida uma série de equilíbrios entre o cátion (HA^+), o hemiacetal (B) e a *cis*-chalcona (C_c). Se a solução for mantida no escuro por alguns dias, ocorre isomerização da *cis*-chalcona para a forma *trans* (C_t) e a diminuição gradual das demais espécies.

A ciclização do anel pirílio na forma *trans* pode ser feito tanto por via térmica quanto por via fotoquímica. No processo fotoquímico, mostrado na Figura 35, a forma *trans* isomeriza em parte para a forma *cis* da chalcona, o que leva a ciclização e posterior desidratação do hemiacetal para a formação do cátion, dependendo das condições de pH (Pina et al., 1998b).

É interessante ressaltar que, ao contrário do CHMF, o 2-fenilbenzopirílio não possui grupos OH fenólicos que possam desprotonar e formar a base quinonoidal e já foi extensivamente estudado em soluções aquosas (McClelland & Gedge, 1980; Pina et al., 1999a), o que torna este composto um modelo adequado para o estudo das reações de hidratação em meio micelar.

Esquema 8: Transformações químicas do sal de flavílio sem substituintes no estado fundamental.

Figura 34: Espectros de absorção do 2-fenilbenzopirílio em soluções aquosas. A linha pontilhada mostra o espectro de uma solução em pH = 6,11 contendo trans-chalcona (C_t , $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm), obtido logo após a dissolução da amostra. A linha tracejada representa o espectro da mesma solução em pH = 6,11 após 10 minutos de irradiação a 366 nm, contendo hemiacetal (B, $\lambda_{\text{max}} = 258$ nm) e cis-chalcona (C_c , $\lambda_{\text{max}} = 302$ nm). A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio (HA^+ , $\lambda_{\text{max}} = 394$ nm), em pH = 1,33.

Figura 35: Espectros de absorção do 2-fenilbenzopirílio em meio ácido, equilibrada no escuro, em função do tempo de exposição a radiação de comprimento de onda de 366 nm: (1) antes da irradiação; (2) 15 s de exposição; (3) 45 s; (4) 105 s; (5) 315 s.

A isomerização $C_c \rightarrow C_t$ do sal de flavílio sem substituintes é um processo que leva algumas horas para ser concluído em temperatura ambiente, permitindo a determinação de uma constante aparente de equilíbrio pK_{ap} entre o cátion e os produtos de hidratação, a mistura *cis*-chalcona/hemicetal. A constante aparente entre o cátion e estes produtos pode ser definida como (Pina et al., 1999a):

$$K_{ap} = K_w + K_w K_t \quad (33)$$

onde K_w é a constante de equilíbrio entre o cátion e o hemicetal e K_t representa o equilíbrio de tautomerização entre o hemicetal e a *cis*-chalcona.

A titulação do cátion pode ser acompanhada pela diminuição da banda com máximo em 394 nm. Nos espectros apresentados na Figura 36 verifica-se pontos isobésticos em 290 nm e 322 nm, indicando que existe uma relação entre as três espécies ($K_t K_w = [C_c][H^+]/[HA^+]$). A presença de pontos isobésticos em soluções com $2 + n$ espécies indica que existem n relações entre os cromóforos (Harris & Bertolucci, 1978). A partir das absorções eletrônicas foi então construído o gráfico da fração molar do cátion flavílio em função da concentração de H^+ , mostrado na Figura 37. O valor de pK_{ap} encontrado foi de **2,94 ± 0,05** a $25,0 \pm 0,1$ °C. Este valor está de acordo com o valor de 2,98 encontrado por McClelland & Gedge (1980) na mesma temperatura.

Após algumas horas da preparação das soluções de 2-fenilbenzopirílio usadas na determinação do pK_{ap} , verifica-se o surgimento da espécie *trans*-chalcona como produto termodinâmico. A estabilidade do cátion flavílio pode então ser mensurada pela constante aparente global K_{ap2} , que representa o equilíbrio entre o cátion e uma base conjugada, formada pelo hemicetal e pelas formas *cis* e *trans* da chalcona. A constante K_{ap2} pode ser definida como (Pina et al., 1999a):

$$K_{ap2} = K_w + K_w K_t + K_w K_t K_i \quad (34)$$

onde K_i representa a constante de isomerização entre ambas as formas da chalcona.

A fração molar do cátion foi determinada a partir dos máximos de absorção em 394 nm para a espécie, sendo que o gráfico da fração molar em função do pH fornece o valor de pK_{ap2} (Figura 37). Foi determinado o valor de **$pK_{ap2} = 1,80 \pm 0,06$** a $25,0 \pm 0,1$ °C, coerente com o valor de 1,64 determinado por Pina et al. (1999a) a 25,0 °C.

Figura 36: Espectros de absorção eletrônica do 2-fenilbenzopirílio em soluções aquosas, em função do pH, utilizados no cálculo do pK_{ap} . Os espectros foram coletados 5 segundos após a dissolução da amostra.

Figura 37: Frações molares do cátion flavílio do 2-fenilbenzopirílio, determinadas para o cálculo do pK_{ap} (■) e do pK_{ap2} (○) em soluções aquosas a 25,0 °C.

No experimento de fotólise de relâmpago convencional, monitorado em uma escala de tempo de alguns segundos, espera-se observar a formação de hemicetal a partir da cis-chalcona gerada fotoquimicamente e, conseqüentemente, a formação do cátion flavílio. Após o disparo da lâmpada de flash, é observada a ocorrência de três processos cinéticos consecutivos: o primeiro processo, de isomerização de C_t para C_c , ocorre em uma escala de tempo inferior ao pulso da lâmpada e não pode ser acompanhado pelo equipamento, cuja resolução é de 0,1 segundo. O segundo processo observado é a formação de hemicetal a partir de C_c e dura cerca de 0,5 segundo. Em seguida, o cátion é formado a partir da mistura C_c/B em poucos segundos. Um quarto processo que ocorre e leva várias horas para ser concluído e não é considerado dentro da escala de tempo do experimento é a recuperação da espécie C_t inicial. Desse modo, tem-se então um sistema de três espécies interligadas por quatro constantes de velocidade:

A variação da concentração das espécies em função do tempo será:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} [HA^+] \\ [B] \\ [C_c] \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_w & k_{-w}[H^+] & 0 \\ k_w & -(k_{-w}[H^+] + k_t) & k_{-t} \\ 0 & k_t & -k_{-t} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} [HA^+] \\ [B] \\ [C_c] \end{bmatrix} \quad (36)$$

e a resolução da equação diferencial através do método das matrizes, resulta em uma equação de segundo grau cujas raízes são as constantes de velocidade λ_1 e λ_2 :

$$t_{2,1} = \frac{X \pm \sqrt{Y^2 + 4k_t k_{-w}[H^+]}}{2} \quad (37)$$

onde

$$X = k_w + k_{-w}[H^+] + k_t + k_{-t} \quad (38)$$

$$Y = k_w + k_{-w}[H^+] - k_t - k_{-t} \quad (39)$$

As simulações de λ_1 e λ_2 a partir das constantes de velocidade obtidas por McClelland & Gedge (1980) pela técnica de *stopped-flow* mostraram que, em soluções aquosas, a formação do cátion flavílio é limitada pela velocidade de formação de hemiacetal a partir da cis-chalcona. O transiente é ajustado adequadamente por uma função monoexponencial e a constante de velocidade λ_1 , obtida a partir do inverso do tempo de vida τ_1 , será $k_t + k_{-t}$, independente do pH.

Para avaliar a viabilidade do equipamento adaptado para os estudos por fotólise de relâmpago convencional, foram feitos experimentos exploratórios em soluções aquosas de 2-fenilbenzopirílio (Figura 38), equilibradas no escuro por 1 dia. Os comprimentos de onda selecionados foram 258 nm, 300 nm, 350 nm e 394 nm, que correspondem aos máximos de absorção do hemiacetal, cis-chalcona, trans-chalcona e cátion flavílio, respectivamente. A partir das análises do decaimento em 300 nm e do surgimento do cátion em 394 nm, foi determinado o valor de $k_t + k_{-t} = 2,5 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ a 25,0 °C, resultado semelhante a $2,4 \text{ s}^{-1}$ determinado por Pina et. al. (1999a) e próximo ao valor de $1,9 \text{ s}^{-1}$ obtido por McClelland & Gedge (1980), indicando que a adaptação do espectrofotômetro para estes ensaios é bastante razoável. Na Tabela 7 estão listados os valores de λ_1 obtidos em cada experimento.

Tabela 7: Constantes de velocidade observadas $\lambda_1 = k_t + k_{-t}$ para soluções aquosas de 2-fenilbenzopirílio, determinadas a partir da análise dos decaimentos da cis-chalcona (em 300 nm) e do surgimento do cátion flavílio (394 nm).

pH	λ_1 (300nm)	λ_1 (394 nm)
2,68	2,3	2,68
3,15	1,8	2,62
3,39	2,7	2,87
média	$2,5 \pm 0,4$

Figura 38: Variação dos máximos de absorção das espécies do 2-fenilbenzopirílio (pH = 2,68) em função do tempo: (1) cis-chalcona, 300 nm; (2) trans-chalcona, 350 nm; (3) hemiacetal, 258 nm; (4) cátion flavílio, 400 nm. A linha tracejada indica o momento de disparo da lâmpada.

5.9-Estudos das transformações do 2-fenilbenzopirílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹

Em soluções micelares de SDS o 2-fenilbenzopirílio sofre as mesmas transformações químicas observadas em água. Em pH próximo de 2, o cátion flavílio é a única espécie em solução e é termodinamicamente estável. Em soluções cujo pH é deslocado rapidamente para 5, formam-se o hemiacetal em equilíbrio com a cis-chalcona, que posteriormente isomeriza resultando na forma *trans* em um processo que demora vários dias na presença do surfactante.

Os espectros de absorção eletrônica das espécies do 2-fenilbenzopirílio são influenciados pela mudança de polaridade do meio. O cátion flavílio tem o $\lambda_{\text{máx}}$ deslocado de 392 nm em água para 402 nm na presença de micelas de SDS e a absorção da trans-chalcona muda de 350 nm em soluções aquosas para 360 nm em SDS 0,1 mol.L⁻¹ (Figura 39). Não se observam alterações significativas nos espectros do hemiacetal e da cis-chalcona. O efeito fotocromico característico da espécie trans-chalcona também foi verificado em soluções micelares.

A constante aparente de equilíbrio pK_{ap} entre o cátion e os produtos de hidratação foi determinada a partir da titulação do cátion, acompanhada pelos espectros de absorção de soluções recém-preparadas obtidos em função do pH. Na Figura 40 são apresentados os espectros eletrônicos em SDS e na Figura 41 encontram-se as frações molares do cátion calculadas para cada pH. É possível notar que, com a diminuição da banda do cátion centrada em 402 nm, surge uma banda com máximo em 302 nm. Os pontos isobésticos em 288 nm e 328 nm evidenciam a existência de uma relação entre as concentrações das três espécies em solução. Em SDS 0,1 mol.L⁻¹, o valor determinado foi de $pK_{\text{ap}} = 4,46 \pm 0,02$ a 25,0 °C. Este valor, quando comparado com o dado obtido em água, mostra que o microambiente micelar favorece a maior formação do cátion em relação aos produtos da reação de hidratação.

Figura 39: Espectros de absorção eletrônica do 2-fenilbenzopirílio em soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹. A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio (HA⁺, $\lambda_{\text{max}} = 402$ nm) em pH = 0,95. A linha pontilhada refere-se ao espectro da solução em pH = 5,12 contendo trans-chalcona (C_t, $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm), logo após a preparação da solução. A linha tracejada mostra uma contendo hemiacetal (B, $\lambda_{\text{max}} = 258$ nm) e cis-chalcona (C_c, $\lambda_{\text{max}} = 302$ nm), cerca de 2 segundos após o deslocamento de pH da solução de 0,95 para 6,01.

Figura 40: Espectros de absorção eletrônica em função do pH para o 2-fenilbenzopirílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹, utilizados na determinação do pK_{ap}.

Figura 41: Frações molares do cátion flavílio do 2-fenilbenzopirílio em soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹, determinadas a 25,0 °C, usadas no cálculo de pK_{ap}.

O fato de o cátion flavílio e a trans-chalcona estarem interconectados por uma série de equilíbrios permite que se determine uma constante de equilíbrio aparente K_{ap2} entre o cátion e a base conjugada formada pelo hemicetal e as duas formas da chalcona, de modo semelhante ao determinado em soluções aquosas.

Para a determinação de pK_{ap2} em SDS, os espectros de absorção de soluções do 2-fenilbenzopirílio foram obtidos em função do pH. As amostras foram armazenadas ao abrigo da luz por tempo suficiente para que atingissem o equilíbrio termodinâmico com a formação da trans-chalcona (Figura 42), observada pelo surgimento de uma banda com máximo em 360 nm. A seguir, foi determinada a fração molar de cátion presente em cada pH estudado e foi construído o gráfico da fração em função da concentração de ácido, apresentado na Figura 43. O valor estimado a 25,0 °C para pK_{ap2} foi de **3,09 ± 0,09**, indicando que o ambiente micelar estabiliza em cerca de 20 vezes o cátion flavílio em comparação com a constante determinada em água.

É interessante observar que os dois processos mais importantes na estabilização da cor em antocianinas são influenciados pelo ambiente micelar. Nos ensaios com o CHMF verificou-se que a constante de equilíbrio entre o cátion e o zwitterion é deslocada no sentido da espécie carregada positivamente em SDS e nos experimentos com o 2-fenilbenzopirílio foi constatado que a forma catiônica é favorecida em detrimento das demais espécies.

Figura 42: Espectros de absorção eletrônica em função do pH para o 2-fenilbenzopirílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹, utilizados no cálculo do pK_{ap2}. Os espectros foram coletados 7 dias após a preparação das amostras.

Figura 43: Frações molares determinadas para o cátion flavílio do 2-fenilbenzopirílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹ a 25,0 °C, calculadas após o período de equilíbrio das soluções em ausência de luz.

Através da fotólise de relâmpago convencional, a transformação C_c-B-HA^+ foi monitorada em função do pH a partir do surgimento do cátion em 402 nm e pelo desaparecimento da cis-chalcona em 302 nm. A análise dos transientes coletados mostrou que tanto a tautomerização da cis-chalcona originando o hemiacetal como a formação do cátion flavílio são detectáveis em SDS, ou seja, todos os transientes foram ajustados por funções biexponenciais, de modo que as constantes de velocidade observadas são:

$$I_1 = k_t + k_{-t} \quad (40)$$

$$I_2 = k_{-w}[H^+] + k_w \quad (41)$$

onde λ_1 está relacionado com a reação de tautomerização entre C_c e B e λ_2 descreve os processos de hidratação/desidratação do cátion flavílio.

Foi construído um gráfico das constantes observadas λ_2 em função da concentração de prótons em solução, mostrado na Figura 44. O coeficiente angular da reta forneceu o valor de $k_w = (3,8 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$, e do coeficiente linear é obtido $k_w = 0,14 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$. A comparação entre os dados encontrados em SDS 0,1 mol.L⁻¹ com os resultados obtidos para soluções aquosas ($k_w = 4,7 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e $k_w = 4,59 \text{ s}^{-1}$, determinados por McClelland & Gedge, 1980) mostra que ambas as constantes diminuem em SDS. Entretanto, no ambiente micelar a redução de k_w é de aproximadamente 20 %, enquanto que a constante de hidratação diminui numa proporção muito maior, indicando que, no balanço global da reação, a hidratação do cátion flavílio é desfavorecida em micelas de SDS.

A estimativa do pK_w em SDS a partir de k_w e k_{-w} fornece o valor de $4,43 \pm 0,41$, mas pela própria definição de K_{ap} , o valor de pK_w é necessariamente maior que pK_{ap} , uma vez que a constante de equilíbrio de hidratação deve ser menor que K_{ap} . Esta imprecisão na constante K_w é resultado da incerteza inerente à k_w obtido experimentalmente, fenômeno análogo ao observado para a constante de desprotonação nos experimentos de fotólise de laser do CHMF.

Com relação à reação de tautomerização, a partir de λ_1 , a constante de velocidade observada independente do pH, tem-se que $k_t + k_{-t} = 9,3 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ a 25,0 °C.

Figura 44: Determinação da dinâmica de hidratação do íon 2-fenilbenzopirílio. Gráfico da constante de velocidade observada $k_2 = k_{-w}[H^+] + k_w$ em função da concentração de H^+ .

A cinética de abertura da *cis*-chalcona em SDS foi estudada em função da temperatura a pH = 6,30. A partir dos espectros de absorção coletados, para cada temperatura foi elaborado um gráfico de $\ln(A_f - A)$ em função do tempo, onde A_f é a absorbância em 360 nm ao final da reação e A é a da *trans*-chalcona em função do tempo. A seguir foi construído um gráfico de Arrhenius com as constantes de velocidade e a energia de ativação foi obtida a partir do coeficiente angular da reta, mostrada na Figura 45.

O tratamento dos dados para o processo de ciclização da *trans*-chalcona foi realizado de forma semelhante. A absorção máxima (402 nm) referente à formação do cátion flavílio em pH = 1,51 foi acompanhada em função do tempo e as constantes de velocidade para cada temperatura foram determinadas do mesmo modo usado previamente. A energia de ativação foi então calculada a partir da inclinação da reta em um gráfico de Arrhenius apresentado na Figura 46.

Os valores obtidos para as energias de ativação (Esquema 9) mostram que a energia necessária para a ciclização de C_t (108 kJ.mol^{-1}) aumenta em SDS, enquanto que no sentido contrário a barreira diminui (78 kJ.mol^{-1}). O aumento da barreira energética de isomerização $C_t \rightarrow C_c$ reflete, entretanto, apenas as diferenças de volume entre as formas *cis* e *trans*. A *trans*-chalcona, por ter um volume excluído maior, provavelmente é melhor incorporada pelas micelas de SDS do que C_c , pois o trabalho de cavitação na micela é menor do que em água (Quina et al., 1995b). Quando se observa o processo como um todo, a estabilização do cátion carregado positivamente é o fator mais relevante, que é refletido nas constantes K_{ap} e K_{ap2} . Na Tabela 8 estão listadas as constantes de velocidades determinadas em função da temperatura para a isomerização.

Esquema 9: Representação esquemática das energias de ativação (em kJ.mol^{-1}) para a reação de interconversão das formas *cis* e *trans* da chalcona. As energias foram determinadas em soluções aquosas e em SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Tabela 8: Constantes de velocidade determinadas para as reações de isomerização entre as formas *cis* e *trans* da chalcona.

T (°C)	$k_i \text{ (s}^{-1}\text{)}$	T (°C)	$k_{-i} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
20	$3,0 \times 10^{-5}$	50	$2,3 \times 10^{-5}$
30	$8,0 \times 10^{-5}$	55	$6,0 \times 10^{-5}$
40	$2,1 \times 10^{-4}$	60	$1,0 \times 10^{-4}$
50	$6,0 \times 10^{-4}$

Figura 45: Gráfico de Arrhenius para a cinética de abertura da cis-chalcona em SDS 0,1 mol.L⁻¹.

Figura 46: Gráfico de Arrhenius para a cinética de ciclização da trans-chalcona em SDS 0,1 mol.L⁻¹.

Com as informações obtidas sobre os equilíbrios aparentes K_{ap} e K_{ap2} e com as constantes de velocidade k_i e k_t pode-se determinar os equilíbrios K_w e K_t do 2-fenilbenzopirílio em SDS a partir das seguintes relações:

$$K_{ap} = K_w + K_w K_t \quad (42)$$

$$K_{ap2} = K_w + K_w K_t + K_w K_t K_i \quad (43)$$

Com base nas relações acima, tem-se que $pK_w = 4,73$. Este resultado é mais consistente que o valor calculado anteriormente pela relação entre k_w e k_{-w} , pois havia uma grande incerteza na constante k_w . Relacionando-se então as constantes de equilíbrio calculadas com $k_t + k_{-t}$ e k_w é possível quantificar todas as transformações químicas envolvendo o sal de flavílio sem substituintes. Na Tabela 9 estão reunidas as informações coletadas para o 2-fenilbenzopirílio em soluções aquosas e em SDS 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 9: Constantes de equilíbrio e de velocidade das transformações químicas do sal de flavílio sem substituintes, determinadas neste trabalho a 25,0 °C, em soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹, comparadas com os dados em soluções aquosas obtidos por McClelland & Gedge (1980), na mesma temperatura.

constantes	Soluções aquosas	SDS 0,1 mol.L ⁻¹
K_w	$9,77 \times 10^{-4}$	$1,85 \times 10^{-5}$
pK_w	3,01	4,73
K_t	0,06	0,88
K_i	400 ^(b)	50
k_w (s ⁻¹)	4,59	0,07
k_{-w} (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	$4,7 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$
k_t (s ⁻¹)	0,11	4,3
k_{-t} (s ⁻¹)	1,78	4,9
k_i (s ⁻¹)	$4,10 \times 10^{-4}$	$4,92 \times 10^{-5}$ ^(a)
k_{-i} (s ⁻¹)	$1,10 \times 10^{-6}$ ^(b)	$1,04 \times 10^{-6}$ ^(a)
E_a C _c →C _t (kJ.mol ⁻¹)	89 ^(b)	78
E_a C _c ←C _t (kJ.mol ⁻¹)	104 ^(b)	108

^a calculado; ^b Pina et al., 1999b.

O pK_w determinado a partir das relações entre as constantes de equilíbrio mostra que a hidratação do cátion flavílio é dificultada em SDS. A análise das constantes de velocidade indica que o processo de formação do hemiacetal é muito influenciado pelo microambiente micelar e apresenta uma redução de cerca de 65 vezes em comparação com os resultados em água. As velocidades da reação no sentido da desidratação na presença e na ausência de micelas estão dentro da mesma ordem de grandeza.

A constante K_t indica que a diferença entre as concentrações de hemiacetal e cis-chalcona diminui no meio micelar. Com relação à isomerização da chalcona, a velocidade de formação da trans-chalcona é reduzida em quase uma ordem de grandeza em SDS, enquanto que a reação de ciclização não é alterada significativamente. Todos estes resultados apontam na direção da estabilização do cátion pelas micelas de SDS. Na Figura 47 são mostradas as frações molares em soluções aquosas e em soluções micelares de SDS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ das espécies do sal de flavílio sem substituintes, calculadas a partir das constantes determinadas neste estudo e dos dados obtidos por McClelland & Gedge (1980).

Figura 47: Frações molares do 2-fenilbenzopirílio em soluções aquosas e em SDS 0,1 mol.L⁻¹. As linhas tracejadas referem-se à condição de pseudoequilíbrio e as linhas contínuas referem-se às espécies envolvidas no equilíbrio termodinâmico.

5.10-Estudos preliminares das transformações do 4'-metoxiflavílio em água

O 4'-metoxiflavílio está sujeito a transformações químicas em meio aquoso semelhantes às observadas para o 2-fenilbenzopirílio. Em meios fortemente ácidos (pH ~ 2), o cátion flavílio é a única espécie presente. Com a mudança rápida do pH da solução para a região situada entre 4 e 6 são estabelecidos equilíbrios químicos entre o cátion (HA^+), o hemiacetal (B) e a *cis*-chalcona (C_c). Após manter a solução algumas horas no escuro, ocorre a isomerização da *cis*-chalcona à forma *trans* (C_t), com a redução da concentração das demais espécies. O que se observa macroscopicamente é a descoloração da solução ao longo do tempo após a mudança súbita do pH, pois o cátion flavílio é a única espécie que absorve na região visível do espectro. Na Figura 48 estão apresentados os espectros de absorção eletrônica das diferentes espécies em soluções aquosas.

Como já foi observado anteriormente para o 2-fenilbenzopirílio e para outros sais de flavílio (Pina et al., 1996), a ciclização da *trans*-chalcona resultando na forma *cis* pode ser feita termicamente ou pela via fotoquímica, através da excitação da *trans*-chalcona em 354 nm.

O 4'-metoxiflavílio é um modelo adequado para o estudo das reações de hidratação em meio micelar pois não forma base quinonoidal e, analogamente ao 2-fenilbenzopirílio, já foi bastante estudado em soluções aquosas (McClelland & Gedge, 1980; Pina et al., 1997c; 1999b).

Assim como foi observado para o flavílio sem substituintes, a isomerização $C_c \rightarrow C_t$ do 4'-metoxiflavílio é um processo que leva algumas horas para ser concluído, o que permite a determinação de uma constante de equilíbrio aparente pK_{ap} entre o cátion e os produtos da hidratação:

$$K_{ap} = K_w + K_w K_t \quad (44)$$

Nas soluções aquosas, a titulação do cátion foi acompanhada pela diminuição da banda com máximo em 434 nm (Figura 49). A partir das absorções do cátion flavílio foi construído um gráfico da fração molar em função do pH, mostrado na Figura 50. O valor de pK_{ap} encontrado em água foi de $4,50 \pm 0,04$ a 25,0 °C, que está de acordo com o valor de 4,30 encontrado por McClelland & Gedge (1980), na mesma temperatura.

Figura 48: Espectros de absorção do cloreto de 4'-metoxiflavílio em soluções aquosas. A linha contínua mostra a absorção do cátion flavílio (HA^+ , $\lambda_{\text{max}} = 434 \text{ nm}$) em $\text{pH} = 2,12$. A linha pontilhada representa o espectro de uma solução em $\text{pH} = 7,41$ contendo hemicetal (B, $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ nm}$) e cis-chalcona (C_c , $\lambda_{\text{max}} = 306 \text{ nm}$), 5 segundos após a dissolução da amostra. A linha tracejada mostra uma solução a $\text{pH} = 7,01$, contendo cis-chalcona e trans-chalcona (C_t , $\lambda_{\text{max}} = 354 \text{ nm}$), após uma semana em equilíbrio no escuro.

Figura 49: Espectros de absorção eletrônica usados na determinação de pK_{ap} para o 4'-metoxiflavílio água. Os espectros foram coletados 5 segundos após a preparação das amostras, a 25,0 °C.

Figura 50: Determinação de pK_{ap} : frações molares do cátion flavílio em função do pH, obtidas a 25,0 °C.

O cátion flavílio e a trans-chalcona estão interconectados por uma série de equilíbrios que permite a determinação da constante de equilíbrio K_{ap2} entre o cátion e uma base conjugada formada pelo hemiacetal, cis-chalcona e trans-chalcona:

$$K_{ap2} = K_w + K_w K_t + K_w K_t K_i \quad (45)$$

Para a determinação de pK_{ap2} em água foram coletados os espectros de absorção em função do pH de soluções do 4'-metoxiflavílio equilibradas por um tempo longo o suficiente para que ocorresse a formação de trans-chalcona (Figura 51). A seguir, foi determinada a fração molar de cátion presente em cada pH e foi construído o gráfico da fração em função do pH (Figura 52). O valor determinado para pK_{ap2} é $3,74 \pm 0,04$ a 25,0 °C é superior ao valor de 1,10 especulado por Pina et al. (1997c) em água na mesma temperatura.

5.11-Estudos das transformações do 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹

Em soluções micelares de SDS 0,1 mol.L⁻¹ não há alterações significativas nos máximos de absorção eletrônica das espécies neutras do 4'-metoxiflavílio. O cátion flavílio, entretanto, tem o máximo deslocado de 434 nm em água para 448 nm em SDS, indicando a diminuição da polaridade do meio.

Na Figura 53 são mostrados os espectros obtidos em SDS para soluções recém-preparadas e a fração molar do cátion calculada. Em SDS 0,1 mol.L⁻¹, o valor de pK_{ap} determinado foi de $5,59 \pm 0,04$ a 25,0 °C. Este valor é um indicativo de que o microambiente micelar favorece a estabilização do cátion em comparação com o hemiacetal e a cis-chalcona.

No caso das soluções equilibradas do 4'-metoxiflavílio em SDS, o valor encontrado de pK_{ap2} foi de $4,88 \pm 0,04$ a 25,0 °C. Na Figura 54 estão os espectros da solução em SDS 0,1 mol.L⁻¹ e a fração molar calculada para o cátion flavílio. Analisando-se as constantes obtidas em água e em SDS, tanto a constante de equilíbrio aparente K_{ap} quanto a constante de equilíbrio K_{ap2} indicam um favorecimento na estabilização do cátion flavílio pelas micelas aniônicas em relação às demais espécies.

Figura 51: Espectros de absorção eletrônica usados na determinação de pK_{ap2} para o 4'-metoxiflavílio em soluções aquosas.

Figura 52: Determinação de pK_{ap2} : frações molares do cátion flavílio em função do pH, obtidas a 25,0 °C.

Figura 53: Espectros de absorção eletrônica usados na determinação de pK_{ap} para o 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹, obtidos 5 segundos após a dissolução da amostra. No destaque, a fração molar do cátion flavílio em função do pH, determinada a 25,0 °C.

Figura 54: Espectros de absorção eletrônica usados na determinação de pK_{ap2} para o 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹. No destaque, a fração molar do cátion flavílio em função do pH. Os espectros foram coletados a 25,0 °C.

Pelo experimento de fotólise de relâmpago convencional de soluções contendo trans-chalcona em meio ácido, espera-se observar a formação de hemicetal a partir da cis-chalcona gerada fotoquimicamente. Posteriormente, o cátion flavílio é formado pela desidratação do hemicetal. Os transientes coletados devem ser ajustados por funções biexponenciais, onde as constantes de velocidade observadas λ_1 e λ_2 serão:

$$I_1 = k_t + k_{-t} \quad (46)$$

$$I_2 = k_w + k_{-w}[H^+] \quad (47)$$

analogamente ao tratamento feito anteriormente para os dados do 2-fenilbenzopirílio.

As simulações de λ_1 e λ_2 para o 4'-metoxiflavílio com as constantes de velocidade determinadas em soluções aquosas por McClelland & Gedge (1980) mostraram que o surgimento do cátion flavílio é limitado pela reação de tautomerização da cis-chalcona, formando o hemicetal.

Em soluções micelares de SDS, na faixa de pH entre 7,0 e 5,8 foi constatado que os transientes obtidos são funções biexponenciais, sendo que a maior constante de velocidade observada (λ_1) é independente do pH. Em soluções com pH < 5,8 os transientes coletados passaram a ser descritos por funções monoexponenciais e independentes de pH. Este fato parece indicar que, abaixo deste pH, a formação do cátion flavílio em SDS passa a ser limitada pela velocidade de surgimento do hemicetal em solução.

Os estudos por fotólise de relâmpago convencional em SDS 0,1 mol.L⁻¹ foram feitos em função do pH com soluções equilibradas por 1 dia no escuro de 4'-metoxiflavílio (Figura 55). Os comprimentos de onda selecionados foram 258 nm, 310 nm, 358 nm e 448 nm, que correspondem aos máximos de absorção do hemicetal, cis-chalcona, trans-chalcona e cátion flavílio, respectivamente. Na Figura 56 estão plotados os dados de λ_2 em função de $[H^+]$ e na Tabela 10 estão listadas as constantes de velocidade obtidas a partir da análise dos transientes.

Figura 55: Variação dos máximos de absorção eletrônica em função do tempo das espécies do 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹, a pH = 6,02: (1) hemiacetal em 258 nm; (2) cis-chalcona em 310 nm; (3) trans-chalcona em 358 nm; (4) cátion flavílio em 448 nm. A linha tracejada indica o momento de disparo da lâmpada.

Figura 56: Determinação da dinâmica de conversão cis-chalcona/base quinonoidal do 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹. Gráfico das constantes de velocidade observadas $I_2 = k_w + k_{-w}[H^+]$ em função da concentração de H⁺.

Tabela 10: Constantes de velocidade observadas (em s^{-1}) para o 4'-metoxiflavílio em SDS pelo experimento de fotólise de relâmpago convencional. As medidas foram feitas à temperatura constante de 25,0 °C.

pH	λ_1	λ_2
9,14	4,67	-
8,02	2,15	-
7,07	4,07	1,84
6,53	2,16	1,89
6,31	4,26	-
6,14	3,78	1,99
6,02	4,70	2,02
5,80	4,27	2,15
média	3,76	-

A partir da inclinação da reta mostrada na Figura 56 tem-se que $k_{-w} = (2,05 \pm 0,8) \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e da intersecção $k_w = 1.83 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ em SDS 0,1 mol.L⁻¹. Em comparação com os valores obtidos em água de $k_{-w} = 1,38 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e $k_w = 0,47 \text{ s}^{-1}$, por McClelland et al. (1980), é possível verificar que a velocidade de hidratação do cátion aumenta cerca de 4 vezes no meio micelar, enquanto que a velocidade de desidratação aumenta cerca de 15 vezes. Isto mostra que, assim como no caso do íon flavílio sem substituintes, as micelas de SDS também favorecem a espécie catiônica do 4'-metoxiflavílio em solução, mas por motivos diferentes. No primeiro caso foi observado que a constante de velocidade de hidratação do cátion k_w , que não depende de $[H^+]$, diminuiu 65 vezes em SDS, ficando evidente que o efeito eletrostático exercido pelas micelas aniônicas é o fator de estabilização do cátion. No caso do 4'-metoxiflavílio, o que se observa é que o pH na interface micelar, menor que na fase aquosa, é o fator dominante, pois a constante de velocidade k_w , dependente de $[H^+]$, é a mais afetada pelo SDS, ou seja, o cátion flavílio é estabilizado pelo pH local.

A cinética de formação da trans-chalcona em SDS foi estudada a partir de soluções do cátion flavílio submetidas a um deslocamento do pH de 1,5 para 7,6. Após a obtenção dos espectros de absorção nas diferentes temperaturas, a variação da

absorção da trans-chalcona em 358 nm foi monitorada a partir do gráfico de $\ln(A_f - A)$ em função do tempo, onde A_f é a absorbância ao final da reação e A é a absorção em função do tempo, em segundos. Posteriormente foi construído o gráfico de Arrhenius com as constantes de velocidade determinadas nas diferentes temperaturas, e a seguir foi obtida a partir do coeficiente angular da regressão (Figura 57) a energia de ativação de **$97 \pm 3 \text{ kJ.mol}^{-1}$** .

Os dados para o processo inverso, de ciclização da trans-chalcona, foram tratados de forma semelhante. A formação do cátion flavílio (448 nm) em pH = 1,5 foi acompanhada em função do tempo e as constantes de velocidade para cada temperatura foram determinadas do mesmo modo usado previamente. A energia de ativação para a reação de ciclização foi determinada em **$146 \pm 2 \text{ kJ.mol}^{-1}$** , calculada a partir da inclinação da reta em um gráfico de Arrhenius (Figura 58).

É interessante observar o efeito do substituinte nas energias de ativação das interconversões *cis* e *trans*. No estudo feito anteriormente com o íon flavílio sem substituintes em SDS, a energia de ativação determinada para o processo $C_c \rightarrow C_t$ foi de 78 kJ.mol^{-1} e para o sentido inverso $C_t \rightarrow C_c$ foi 108 kJ.mol^{-1} . O acréscimo no volume molecular do 4'-metoxiflavílio provocado pelo grupo CH_3O aumenta a barreira energética da reação de isomerização em ambos os sentidos. Isto parece indicar que o efeito do grupo CH_3O na incorporação de ambas as chalconas pelas micelas de SDS é muito semelhante.

Na Tabela 11 encontram-se reunidas as constantes de velocidade determinadas em função da temperatura para as reações cis-trans (k_i) e trans-cis (k_{-i}) das chalconas em SDS.

Tabela 11: Constantes de velocidade determinadas para a reação de isomerização das chalconas em SDS 0,1 mol.L⁻¹.

T (°C)	$k_i \text{ (s}^{-1}\text{)}$	T (°C)	$k_{-i} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
30	$5,00 \times 10^{-5}$	45	$1,45 \times 10^{-4}$
35	$9,00 \times 10^{-5}$	50	$2,57 \times 10^{-4}$
40	$1,70 \times 10^{-4}$	60	$1,67 \times 10^{-3}$

Figura 57: Gráfico de Arrhenius para a reação de isomerização cis-chalcona/trans-chalcona em SDS 0,1 mol.L⁻¹.

Figura 58: Gráfico de Arrhenius para a reação de isomerização trans-chalcona/cis-chalcona em SDS 0,1 mol.L⁻¹.

A partir dos dados de fotólise de relâmpago convencional, das constantes de velocidade de abertura e ciclização das chalconas e das relações entre as constantes de equilíbrio aparentes K_{ap} e K_{ap2} é possível elucidar todas as transformações envolvendo o 4'-metoxiflavílio. Na Tabela 12 estão todas as constantes obtidas para o 4'-metoxiflavílio em SDS 0,1 mol.L⁻¹ e os dados em soluções aquosas, determinados por McClelland & Gedge (1980).

Tabela 12: Constantes de equilíbrio e de velocidade das transformações químicas do 4'-metoxiflavílio, determinadas neste trabalho a 25,0 °C, em soluções de SDS 0,1 mol.L⁻¹, comparadas com os dados em soluções aquosas obtidos por McClelland & Gedge (1980), na mesma temperatura.

constantes	Soluções aquosas	SDS 0,1 mol.L⁻¹
K_w	$3,41 \times 10^{-5}$	8.93×10^{-6}
pK_w	4,47	5,05
K_t	0,5	0,14
K_i	$\sim 100^{(b)}$	9 ^(a)
k_w (s ⁻¹)	0,47	1,83
k_{-w} (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	$1,38 \times 10^4$	$2,05 \times 10^5$
k_t (s ⁻¹)	0,23	0,46
k_{-t} (s ⁻¹)	0,46	3,30
k_i (s ⁻¹)	$5,80 \times 10^{-5}$	$2,60 \times 10^{-5}$ (a)
k_{-i} (s ⁻¹)	$< 10^{-6}$ (b)	$3,00 \times 10^{-6}$ (a)
E_a C _c →C _t (kJ.mol ⁻¹)	93 ^(b)	97
E_a C _c ←C _t (kJ.mol ⁻¹)	114 ^(b)	146

^a calculado; ^b Pina et al. (1999b)

Essencialmente o que se observa é que o ambiente micelar provoca um efeito de estabilização preferencial do cátion flavílio em relação ao hemiacetal, cis-chalcona e trans-chalcona, resultando em profundas mudanças na hidratação do cátion, um dos processos-chave envolvidos na estabilização da cor das antocianinas. Na Figura 59 estão representadas as frações molares das espécies em água e em SDS, calculadas a partir das constantes de equilíbrio determinadas.

Figura 59: Frações molares das espécies do 4'-metoxiflavílio em água e em SDS 0,1 mol.L⁻¹. As linhas tracejadas referem-se à condição de pseudoequilíbrio e as linhas contínuas referem-se às espécies envolvidas no equilíbrio termodinâmico.

5.12-Determinação das constantes de incorporação (K_S) das formas ácidas do HMF, DHF, oenina e do zwitterion do CHMF em micelas de detergentes não aniônicos

A constante de incorporação no meio micelar (K_S) é definida como a partição do soluto entre a fase aquosa e uma fase formada pelas micelas do surfactante:

$$K_S = \frac{[S_{mic}]}{[S_{aq}]C_D} \quad (48)$$

onde $[S_{mic}]$ e $[S_{aq}]$ são as concentrações do soluto nas fases micelar e aquosa, respectivamente, e C_D é a concentração de surfactante micelizado, ou seja, a concentração de surfactante total em solução menos a concentração micelar crítica.

Em condições de fluxo constante e considerando-se que a quantidade de surfactante adsorvido na fase estacionária não se altera durante as medidas, é possível determinar os fatores de capacidade (k') do soluto a partir dos tempos de retenção obtidos:

$$k' = \frac{(t_r - t_l)}{t_d} \quad (49)$$

sendo que t_r é o tempo de retenção do soluto, t_l é o tempo morto do sistema (1,42 minutos) e t_d é o tempo morto da coluna (1,29 minutos).

Com os valores de fator de capacidade foram construídos os gráficos de $1/k'$ em função da concentração de detergente micelizado, como mostra a Figura 60. A razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear da reta fornece o valor da constante de incorporação do soluto no meio micelar.

No caso do CHMF, as medidas de K_S foram efetuadas apenas em CTAB. Em soluções de CTAB com pH próximo a 2,0 é possível distinguir pelos cromatogramas as formas ácida, básica e zwitteriônica do CHMF em solução pois, ao contrário do que ocorre em SDS, as micelas catiônicas de CTAB promovem a estabilização da base quinonoidal, conforme pode ser verificado nos espectros de absorção apresentados na Figura 61. Em uma amostra de CTAB $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ com $\text{pH} = 5,89$, apenas a base

quinonoidal está presente em solução e mesmo em soluções com pH = 1,8 ainda é possível observar uma pequena fração de base quinonoidal, que absorve na mesma região do cátion flavílio.

Na Tabela 13 estão reunidos os valores de K_S encontrados para os sais de flavílio nos surfactantes estudados.

Tabela 13: Constantes de incorporação (em $L \cdot mol^{-1}$) dos solutos em ambiente micelar, determinadas a temperatura constante de 30,0 °C.

soluto	CTAB	Triton X-100	Brij-35	SDS
HMF	3,2	36	100	1200 ^a
DHF	2,4	21	16	
Oenina	12	28	26	
CHMF cátion	21			
CHMF zwitterion	44			
CHMF base	240			

^a Giongo et al., 2002

Estes resultados, em conjunto com outros dados obtidos (Giongo et al., 2002), sugerem que dois fatores regem a estabilidade do cátion flavílio no microambiente micelar: o efeito eletrostático e o efeito do meio micelar. O primeiro efeito favorece a estabilização do cátion em micelas aniônicas, como SDS, e a incorporação da base quinonoidal com carga negativa do CHMF em CTAB, em relação às outras espécies.

O segundo efeito estabiliza preferencialmente as espécies neutras, hemiacetal e base quinonoidal, nas micelas não iônicas de Triton e Brij-35. No caso de micelas catiônicas de CTAB, tanto o efeito eletrostático quanto o efeito do meio micelar desfavorecem a incorporação do cátion flavílio.

Figura 60: Gráfico de $1/k'$ em função da concentração de CTAB micelizado para o cátion flavílio: (■) oenina; (◇) DHF; (●) CHMF; (*) HMF.

Figura 61: Espectros de absorção do CHMF em soluções de CTAB 0,1 mol.L⁻¹, coletados a 25,0 °C: a linha contínua corresponde ao espectro de uma solução em pH = 5,89; a linha tracejada representa o espectro de uma solução com pH = 1,8.

5.13-Cálculo de transições eletrônicas das formas ácida e básica dos sais de flavílio

Uma análise inicial dos dados da Tabela 2 permite a observação de algumas características dos sais de flavílio. A partir dos compostos 07, 08, 05, 06 e 01 é possível verificar que substituintes retiradores de elétrons como OCH_3 deslocam a absorção eletrônica das espécies para a região do vermelho, levando a uma diminuição na diferença de energia entre os estados fundamental e excitado do cátion e da base. Ao mesmo tempo, estes substituintes tornam o cátion flavílio mais ácido. Substituintes doadores na posição C4 têm pouco efeito sobre as transições eletrônicas, como nos pares de sais de flavílio 02 e 13, 07 e 17 e no conjunto 04, 12 e 15, mas exercem forte influência no pK_a .

Na Tabela 14 estão listadas algumas informações referentes às geometrias dos cátions flavílios obtidas no vácuo. No geral, os resultados encontrados pelos vários métodos são bastante semelhantes. As diferenças mais significativas estão no ângulo C9-O-C2 e no diedro $\text{O-C2-C1}'\text{-C6}'$, entre o anel pirílico e o anel fenílico. No primeiro caso, o método AM1 estima ângulos menores que 120° , enquanto que os métodos *ab initio* indicam ângulos entre 123° e 126° . Com relação aos diedros, os resultados obtidos por AM1 mostraram um maior grau de rotação interna do que o indicado pelos demais métodos.

Com relação às geometrias das bases quinonoidais no vácuo, listadas na Tabela 15, foi observado que as ligações O-C2 e $\text{C2-C1}'$ têm um comprimento maior do que os determinados para os respectivos cátions. Todos os métodos mostraram que a rotação interna $\text{O-C2-C1}'\text{-C6}'$ é maior para as bases quinonoidais do que para os cátions flavílios.

Na Tabela 16 estão as informações mais relevantes a respeito da geometria dos cátions flavílios otimizados com o efeito de solvente. A comparação entre as geometrias do cátion flavílio otimizadas por mPW1PW91 e B3LYP no vácuo e no solvente mostra que não há diferenças significativas com a inclusão do efeito do dielétrico. As geometrias das bases quinonoidais, entretanto, apresentam uma diminuição da rotação interna sob o efeito do solvente (Tabela 17). A comparação entre as frequências vibracionais das estruturas obtidas reforça a suposição de que não há diferenças significativas entre as geometrias no vácuo e na fase condensada, uma vez que os valores encontrados apresentam diferenças inferiores a 10 cm^{-1} .

As distâncias calculadas pelos métodos *ab initio* estão de acordo com os dados cristalográficos determinados para alguns polihidroxi flavílios através de difração de raios-X (Busetta et al., 1974; Ueno & Saito, 1977a; 1977b), assim como os ângulos de ligação e o ângulo de torção O-C2-C1'-C6'. No caso do método AM1, o comprimento calculado da ligação O-C2 é ligeiramente maior que a média dos resultados obtidos experimentalmente e o ângulo C9-O-C2 é menor do que os dados experimentais. Estas semelhanças permitem supor que a estrutura dos sais de flavílio não sofre grandes alterações durante o processo de solvatação.

Sabe-se que os sais de flavílio em solução têm uma razoável liberdade rotacional e podem eventualmente apresentar confôrmeros onde o anel fenílico se encontra em posição perpendicular em relação ao plano do anel pirílico. Entretanto, os métodos DFT tendem a sobreestimar a barreira de rotação O-C2-C1'-C6' em pelo menos 2 kcal.mol⁻¹, em comparação com métodos perturbativos MPx (Meyer, 2000). Esta tendência deve ser esperada tanto para os cátions flavílios como para as bases quinonoidais.

Tabela 14: Resumo das informações referentes à geometria dos cátions flavílios, otimizadas no vácuo por AM1, HF/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p) e mPW1PW91/6-31+G(d,p). As distâncias de ligação $r(\text{O-C2})$ e $r(\text{C2-C1}')$ estão em Angstroms, o ângulo de ligação $\alpha(\text{C9-O-C2})$ e o ângulo de torção $\theta(\text{O-C2-C1}'\text{-C6}')$ estão em graus.

Sal de flavílio	$r(\text{O-C2})$				$r(\text{C2-C1}')$				$\alpha(\text{C9-O-C2})$				$\theta(\text{O-C2-C1}'\text{-C6}')$			
	AM1	HF	B3LYP	mPW1	AM1	HF	B3LYP	mPW1	AM1	HF	B3LYP	mPW1	AM1	HF	B3LYP	mPW1
01	1,367	1,317	1,350	1,339	1,443	1,444	1,442	1,437	120,4	126,3	125,6	125,6	156,4	164,3	170,9	170,6
02	1,366	1,314	1,345	1,355	1,445	1,458	1,452	1,448	119,2	124,4	123,4	123,3	167,4	180,0	179,9	171,0
03	1,368	1,314	1,348	1,338	1,436	1,444	1,439	1,435	119,3	124,4	123,3	123,3	176,9	180,0	177,4	177,9
04	1,368	1,315	1,348	1,338	1,433	1,439	1,438	1,434	119,3	124,4	123,3	123,3	179,9	180,0	179,9	180,0
05	1,367	1,314	1,347	1,337	1,440	1,446	1,442	1,438	119,3	124,4	123,3	123,3	175,3	180,0	180,0	177,1
06	1,368	1,317	1,348	1,339	1,437	1,441	1,443	1,438	120,5	126,3	125,4	125,6	159,4	167,2	167,2	180,0
07	1,368	1,340	1,347	1,337	1,435	1,434	1,441	1,437	119,3	125,1	123,3	123,3	180,0	180,0	180,0	180,0
08	1,371	1,320	1,350	1,340	1,438	1,444	1,443	1,439	119,4	124,6	123,5	123,6	180,0	180,0	180,0	180,0
09	1,370	1,318	1,349	1,339	1,441	1,449	1,443	1,439	119,4	124,6	123,5	123,6	178,8	180,0	180,0	180,0
10	1,371	1,317	1,346	1,336	1,438	1,443	1,442	1,438	119,2	124,0	122,9	123,0	179,9	180,0	179,9	180,0
11	1,371	1,320	1,349	1,340	1,436	1,442	1,442	1,438	119,4	124,6	123,5	123,6	179,9	180,0	179,9	180,0
12	1,369	1,316	1,347	1,334	1,439	1,444	1,444	1,444	118,9	123,6	122,4	122,5	172,5	177,2	178,1	177,4
13	1,367	1,313	1,342	1,333	1,447	1,459	1,455	1,451	118,9	123,7	122,6	122,6	164,8	180,0	179,1	170,1
14	1,365	1,308	1,344	1,334	1,430	1,434	1,436	1,432	119,3	124,4	123,1	123,2	179,5	180,0	179,8	179,9
16	1,369	1,314	1,346	1,336	1,436	1,441	1,441	1,437	119,0	123,7	122,6	122,6	180,0	180,0	180,0	180,0
17	1,368	1,314	1,345	1,336	1,438	1,443	1,444	1,439	119,0	123,7	122,6	122,6	180,0	180,0	180,0	180,0
18	1,362	1,306	1,340	1,331	1,433	1,435	1,438	1,434	119,3	124,5	123,4	123,4	180,0	180,0	180,0	180,0

Tabela 15: Resumo das informações referentes à geometria das bases quinonoidais, otimizadas no vácuo por AM1, HF/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p) e mPW1PW91/6-31+G(d,p). As distâncias de ligação $r(\text{O-C2})$ e $r(\text{C2-C1}')$ estão em Angstroms, o ângulo de ligação $\alpha(\text{C9-O-C2})$ e o ângulo de torção $\theta(\text{O-C2-C1}'\text{-C6}')$ estão em graus.

Sal de flavílio	$r(\text{O-C2})$				$r(\text{C2-C1}')$				$\alpha(\text{C9-O-C2})$				$\theta(\text{O-C2-C1}'\text{-C6}')$			
	AM1	HF	B3LYP	mPW1	AM1	HF	B3LYP	mPW1	AM1	HF	B3LYP	mPW1	AM1	HF	B3LYP	mPW1
01	1,383	1,350	1,365	1,354	1,461	1,477	1,463	1,459	119,1	124,4	124,8	124,9	148,3	153,2	167,4	167,8
02	1,383	1,343	1,357	1,347	1,462	1,479	1,470	1,465	118,2	123,6	122,7	122,7	154,6	180,0	165,7	163,0
03	1,384	1,342	1,356	1,347	1,462	1,476	1,466	1,461	118,5	123,6	122,9	122,8	179,8	180,0	179,4	165,2
04	1,383	1,342	1,357	1,347	1,459	1,474	1,465	1,460	118,3	123,7	122,9	122,8	156,0	180,0	179,8	168,1
05	1,383	1,342	1,356	1,346	1,461	1,477	1,466	1,461	118,2	123,6	122,8	122,8	155,8	180,0	172,6	168,9
06	1,383	1,350	1,365	1,355	1,459	1,475	1,463	1,458	119,2	124,4	124,7	124,8	149,3	152,9	166,8	168,8
07	1,383	1,341	1,357	1,347	1,459	1,475	1,466	1,460	118,2	123,8	122,9	122,8	155,8	180,0	179,1	170,2
08	1,382	1,342	1,358	1,348	1,460	1,475	1,466	1,461	118,4	123,8	123,1	122,9	155,8	180,0	179,9	165,5
09	1,382	1,340	1,357	1,347	1,462	1,478	1,468	1,462	118,3	123,7	123,1	122,9	153,9	180,0	179,9	164,3
10	1,380	1,333	1,350	1,341	1,460	1,474	1,466	1,460	118,3	123,3	122,5	122,4	155,8	180,0	168,2	164,4
11	1,382	1,341	1,357	1,347	1,460	1,474	1,465	1,461	118,4	123,8	122,9	123,0	155,9	179,9	168,3	166,5
12	1,382	1,338	1,354	1,344	1,460	1,473	1,466	1,461	118,1	122,9	122,3	122,3	156,6	158,2	171,7	170,0
13	1,381	1,338	1,352	1,343	1,462	1,480	1,471	1,466	118,0	123,1	122,2	122,1	154,0	180,0	165,6	163,2
14	1,375	1,325	1,356	1,346	1,452	1,462	1,459	1,455	118,3	122,7	121,4	121,4	165,0	174,5	169,9	168,1
15	1,389	1,347	1,362	1,352	1,461	1,478	1,470	1,465	117,7	122,1	121,4	121,5	160,6	166,0	174,9	177,5
16	1,382	1,337	1,353	1,344	1,460	1,475	1,466	1,460	118,1	123,2	122,4	122,3	155,4	180,0	180,0	169,1
17	1,382	1,337	1,353	1,344	1,460	1,475	1,466	1,461	118,0	123,2	122,3	122,2	155,1	180,0	179,9	166,8
18	1,394	1,352	1,373	1,363	1,374	1,356	1,391	1,387	118,5	123,8	122,7	122,7	180,0	180,0	180,0	180,0

Tabela 16: Resumo das informações referentes à geometria dos cátions flavílios, otimizadas no solvente por B3LYP/6-31G(d) e mPW1PW91/6-31G(d). As distâncias de ligação $r(\text{O-C2})$ e $r(\text{C2-C1}')$ estão em Angstroms, o ângulo de ligação $\alpha(\text{C9-O-C2})$ e o ângulo de torção $\theta(\text{O-C2-C1}'\text{-C6}')$ estão em graus.

Sal de flavílio	$r(\text{O-C2})$		$r(\text{C2-C1}')$		$\alpha(\text{C9-O-C2})$		$\theta(\text{O-C2-C1}'\text{-C6}')$	
	B3LYP	mPW1	B3LYP	mPW1	B3LYP	mPW1	B3LYP	mPW1
01	1,349	1,339	1,449	1,445	124,7	124,7	164,6	163,8
02	1,342	1,332	1,457	1,453	123,2	123,2	179,9	176,6
03	1,344	1,334	1,447	1,443	123,1	123,2	179,7	179,8
04	1,344	1,335	1,445	1,441	123,1	123,1	179,9	179,9
05	1,344	1,335	1,445	1,441	123,1	123,2	180,0	179,9
06	1,344	1,334	1,445	1,440	125,2	125,2	164,4	164,3
07	1,345	1,335	1,443	1,440	123,1	123,2	180,0	180,0
08	1,347	1,337	1,445	1,441	123,4	123,5	179,9	180,0
09	1,346	1,336	1,449	1,445	123,4	123,5	180,0	178,1
10	1,342	1,333	1,449	1,445	122,8	122,9	179,9	179,9
11	1,346	1,337	1,445	1,441	123,4	123,5	179,9	177,6
12	1,343	1,334	1,448	1,444	122,4	122,5	177,5	177,4
13	1,339	1,330	1,458	1,454	122,5	122,5	179,0	170,3
14	1,340	1,331	1,441	1,437	123,2	123,3	179,4	180,0
16	1,341	1,332	1,447	1,443	122,5	122,6	180,0	180,0
17	1,342	1,333	1,445	1,441	122,6	122,6	179,9	180,0
18	1,338	1,329	1,439	1,435	123,2	123,2	180,0	180,0

Tabela 17: Resumo das informações referentes à geometria das bases quinonoidais, otimizadas no solvente por B3LYP/6-31G(d) e mPW1PW91/6-31G(d). As distâncias de ligação $r(\text{O-C2})$ e $r(\text{C2-C1}')$ estão em Angstroms, o ângulo de ligação $\alpha(\text{C9-O-C2})$ e o ângulo de torção $\theta(\text{O-C2-C1}'\text{-C6}')$ estão em graus.

Sal de flavílio	$r(\text{O-C2})$		$r(\text{C2-C1}')$		$\alpha(\text{C9-O-C2})$		$\theta(\text{O-C2-C1}'\text{-C6}')$	
	B3LYP	mPW1	B3LYP	mPW1	B3LYP	mPW1	B3LYP	mPW1
01	1,361	1,350	1,460	1,455	124,8	124,9	165,2	166,1
02	1,355	1,346	1,467	1,462	122,8	122,8	168,0	167,5
03	1,356	1,346	1,461	1,456	122,9	123,0	179,9	179,5
04	1,355	1,346	1,459	1,456	122,9	123,0	179,8	179,7
05	1,356	1,346	1,459	1,455	122,9	123,0	177,5	176,9
06	1,360	1,350	1,458	1,454	124,7	124,8	162,3	161,9
07	1,355	1,346	1,458	1,454	123,0	123,0	179,1	179,9
08	1,357	1,347	1,459	1,455	123,2	123,2	180,0	173,4
09	1,357	1,347	1,462	1,458	123,1	123,2	179,9	172,7
10	1,351	1,341	1,461	1,457	122,5	122,6	172,0	172,9
11	1,357	1,347	1,459	1,455	123,1	123,2	178,9	169,8
12	1,353	1,343	1,461	1,456	122,3	122,4	170,9	168,7
13	1,351	1,342	1,467	1,463	122,3	122,3	168,9	168,8
14	1,346	1,336	1,451	1,447	122,3	122,4	177,4	176,4
15	1,356	1,347	1,462	1,458	122,1	122,3	173,7	174,3
16	1,351	1,342	1,460	1,456	122,4	122,5	180,0	175,0
17	1,352	1,342	1,459	1,455	122,4	122,4	179,9	170,5
18	1,361	1,350	1,403	1,399	122,8	122,9	180,0	180,0

Na Tabela 18 estão reunidos os dados relativos à absorção eletrônica do cátion flavílio, calculada através dos diferentes métodos, assim como a força do oscilador e a contribuição da configuração HOMO→LUMO para a transição. Esta contribuição é calculada levando-se em conta a normalização dos coeficientes de expansão CIS (Frisch et al., 2003), ou seja, a soma dos quadrados dos coeficientes de expansão CIS é igual a 0,5 (para cálculos efetuados em camada fechada). Na Tabela 19 encontram-se os dados referentes às transições eletrônicas das bases quinonoidais.

A análise dos resultados mostrou que todos os métodos usados no cálculo das transições eletrônicas $S_0 \rightarrow S_1$ dos cátions flavílios apontam a transição HOMO-LUMO como a mais intensa. O exame destes orbitais indicou também que as transições eletrônicas são sempre do tipo $\pi-\pi^*$. Para as bases quinonoidais foram observados os mesmos resultados. Em geral, comparando-se os vários métodos empregados no cálculo das transições eletrônicas, foi observado que as forças de oscilador previstas para as transições calculadas por ZINDO são maiores do que as calculadas por TD-DFT e semelhantes ao CIS. Adicionalmente, a contribuição HOMO-LUMO estimada para a primeira excitação também foi maior por ZINDO.

Entretanto, para o zwitterion do CHMF (a forma básica do composto 14), as excitações calculadas por ZINDO e TD-DFT sem efeito de solvente não detectam a contribuição HOMO-LUMO na transição mais intensa, na região do espectro visível. A diferença mais marcante desta estrutura molecular em relação às demais bases quinonoidais é a presença do grupo carboxilato na posição C4. Aparentemente, os modelos sem efeito de solvente não estão descrevendo corretamente a influência do grupo COO^- na transição eletrônica.

Na Figura 62 estão reunidos os gráficos das transições calculadas, através dos vários métodos empregados, em função dos dados experimentais para o cátion flavílio. Na Figura 63 estão reunidos os gráficos para as bases quinonoidais.

Para as estruturas otimizadas por AM1, o cálculo das transições eletrônicas permite verificar que existe uma correlação razoável entre os valores experimentais e os calculados para os cátions flavílios. No caso das bases, entretanto, não foi observada correlação entre os valores experimentais e calculados. De modo geral, apesar de a metodologia semi-empírica AM1/ZINDO ser eficiente e rápida na estimativa da absorção eletrônica do cátion flavílio, ela não é adequada na descrição da forma básica.

Tabela 18: Máximos de absorção eletrônica experimental (λ_{max} exp.), forças de oscilador (f), contribuição da excitação HOMO→LUMO (%H→L) para a transição e máximos de absorção (λ_{max}) para os cátions flavílios, calculados para a transição $S_0 \rightarrow S_1$ pelos diferentes métodos empregados neste estudo.

Sal de flavílio	λ_{max} exp.	AM1/ZINDO			HF/ZINDO			HF/CIS			B3LYP/ZINDO		
		f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}
01	530	0,858	87,1	511	0,878	89,8	497	0,951	88,0	364	0,905	88,5	503
02	427	0,809	94,3	447	0,811	94,0	425	0,834	89,5	316	0,823	93,9	438
03	467	0,946	90,5	476	0,921	86,3	457	1,038	77,3	334	0,927	86,1	468
04	456	0,948	93,1	471	0,967	92,5	451	1,089	88,5	328	0,952	92,2	461
05	468	0,906	87,7	471	0,900	85,8	451	0,963	75,9	329	0,920	86,7	465
06	507	0,862	93,5	504	0,856	93,9	485	0,919	91,4	352	0,869	93,6	498
07	456	0,924	93,4	469	0,931	92,9	446	0,990	88,5	324	0,935	92,8	459
08	462	0,928	92,3	472	0,911	91,1	451	0,982	87,6	324	0,930	91,5	461
09	480	0,931	86,6	475	0,922	85,1	455	1,011	78,1	330	0,937	85,4	466
10	448	0,923	90,5	453	0,918	89,5	438	1,058	86,6	316	0,911	89,2	446
11	468	0,933	92,4	470	0,923	91,5	449	0,972	87,6	323	0,935	91,5	460
12	458	0,745	91,2	458	0,924	90,7	439	1,071	87,2	323	0,912	90,6	450
13	417	0,759	93,5	430	0,763	93,4	412	0,799	86,7	307	0,775	93,3	424
14	484	0,908	93,1	507	0,926	92,5	475	0,988	88,6	352	0,910	92,1	487
16	445	0,908	91,9	455	0,925	91,4	437	1,076	88,8	319	0,909	91,2	447
17	442	0,883	92,3	452	0,891	91,9	433	0,979	87,8	316	0,892	91,9	444
18	436	0,915	92,9	476	0,938	92,7	449	0,992	88,0	312	0,931	92,5	440

Tabela 18: Continuação.

Sal de flavílio	λ_{max} exp.	B3LYP/ TD-DFT-PCM			mPW1PW91/ ZINDO			mPW1PW91/ TD-DFT			mPW1PW91/ TD-DFT-PCM		
		f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}
01	530	0,627	77,5	484	0,891	89,8	509	0,562	70,3	479	0,642	76,8	485
02	427	0,654	80,7	407	0,818	93,9	434	0,636	78,3	387	0,683	82,4	394
03	467	0,506	82,2	483	0,920	86,0	465	0,687	77,8	434	0,929	83,0	421
04	456	0,930	81,6	430	0,948	92,1	458	0,846	78,3	416	0,929	82,9	415
05	468	0,510	81,1	476	0,915	86,5	462	0,638	77,2	424	0,897	82,4	419
06	507	0,535	74,9	487	0,863	93,6	495	0,473	68,7	458	0,582	77,4	470
07	456	0,884	81,0	428	0,932	92,8	456	0,786	77,6	407	0,914	82,4	414
08	462	0,609	71,5	445	0,925	91,4	458	0,508	60,4	422	0,670	74,8	429
09	480	0,625	77,6	466	0,930	85,2	463	0,429	77,7	462	0,676	78,2	447
10	448	0,530	69,5	435	0,906	89,0	442	0,738	73,4	408	0,589	73,0	419
11	468	0,538	67,6	444	0,930	91,4	457	0,574	63,9	415	0,602	71,5	428
12	458	0,875	83,0	442	0,909	90,6	446	0,810	80,6	421	0,638	83,3	424
13	417	0,610	81,6	405	0,767	93,3	420	0,601	79,5	381	0,626	83,1	390
14	484	0,758	79,9	481	0,909	92,0	481	0,697	77,4	452	0,803	81,4	459
16	445	0,906	82,2	426	0,906	91,1	443	0,838	79,3	409	0,936	83,5	411
17	442	0,862	81,6	424	0,889	91,9	441	0,772	78,5	400	0,893	82,9	410
18	436	0,859	81,1	435	0,927	92,5	424	0,732	78,0	374	0,892	82,5	419

Tabela 19: Máximos de absorção eletrônica experimental (λ_{max} exp.), forças de oscilador (f), contribuição da excitação HOMO→LUMO (%H→L) para a transição e máximos de absorção (λ_{max}) para as bases quinonoidais, calculados para a transição $S_0 \rightarrow S_1$ pelos diferentes métodos empregados neste estudo.

Sal de flavílio	λ_{max} exp.	AM1/ZINDO			HF/ZINDO			HF/CIS			B3LYP/ZINDO		
		f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}
01	573	0,724	92,7	459	0,667	90,7	558	0,710	87,2	324	0,742	93,2	504
02	475	0,764	93,4	447	0,739	94,3	422	0,716	88,6	325	0,764	93,8	470
03	493	0,817	93,7	451	0,791	93,6	428	0,807	87,9	328	0,822	93,7	482
04	483	0,818	93,9	452	0,796	94,0	430	0,820	88,9	328	0,826	93,8	483
05	495	0,805	93,4	450	0,778	93,8	427	0,765	88,1	326	0,819	93,8	483
06	559	0,724	93,4	460	0,694	93,1	429	0,696	88,5	322	0,733	93,4	503
07	495	0,808	93,8	451	0,780	94,1	431	0,772	88,9	328	0,816	93,8	484
08	500	0,771	93,1	449	0,746	93,1	425	0,731	88,5	323	0,774	92,5	475
09	498	0,771	92,8	447	0,753	92,8	426	0,750	87,9	326	0,780	92,4	475
10	480	0,725	92,7	450	0,707	92,8	431	0,716	88,5	326	0,714	91,8	476
11	496	0,772	93,1	450	0,747	93,2	427	0,725	88,5	325	0,776	92,6	476
12	492	0,745	93,5	456	0,720	93,4	429	0,732	88,1	327	0,732	93,1	488
13	464	0,720	94,0	448	0,696	94,1	428	0,695	88,3	330	0,706	93,4	476
14	460	0,029	0	476	0,123	0	420	0,422	53,9	311	0,249	0	428
15	494	0,360	50,0	454	0,719	83,9	420	0,715	87,3	321	0,659	84,0	472
16	475	0,765	93,9	453	0,748	94,0	435	0,759	89,2	333	0,760	93,4	488
17	475	0,757	93,9	455	0,736	94,0	434	0,717	89,2	331	0,752	93,4	489
18	500	1,287	94,6	457	1,271	94,9	409	1,284	86,2	310	1,322	94,4	460

Tabela 19: Continuação.

Sal de flavílio	λ_{max} exp.	B3LYP/ TD-DFT-PCM			mPW1PW91/ ZINDO			mPW1PW91/ TD-DFT			mPW1PW91/ TD-DFT-PCM		
		f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}	f	%H→L	λ_{max}
01	573	0,534	75,6	524	0,732	93,2	504	0,358	70,7	519	0,554	77,0	509
02	475	0,489	78,1	457	0,752	93,8	469	0,303	74,0	470	0,511	79,6	442
03	493	0,694	80,0	474	0,810	93,7	480	0,409	74,0	474	0,683	80,3	452
04	483	0,661	78,9	464	0,814	93,8	481	0,388	73,9	472	0,684	80,3	450
05	495	0,642	78,7	466	0,807	93,7	482	0,364	73,7	474	0,665	80,2	451
06	559	0,510	75,6	517	0,722	93,4	503	0,327	70,7	515	0,530	77,2	502
07	495	0,641	78,7	464	0,805	93,8	482	0,358	73,6	473	0,652	79,7	451
08	500	0,547	77,9	469	0,762	92,4	474	0,304	72,9	478	0,552	79,4	453
09	498	0,570	77,7	476	0,766	92,3	474	0,321	72,9	481	0,589	78,9	459
10	480	0,483	78,8	467	0,702	91,7	475	0,279	75,0	485	0,507	80,2	451
11	496	0,525	77,0	469	0,762	92,5	475	0,295	72,5	479	0,546	71,5	452
12	492	0,544	79,3	478	0,720	93,1	486	0,318	64,9	487	0,568	81,0	461
13	464	0,431	79,1	466	0,693	93,4	475	0,262	74,4	487	0,453	80,6	451
14	460	0,777	81,4	435	0,292	0	424	0,704	0	374	0,803	82,4	419
15	494	0,555	78,9	471	0,620	81,1	472	0,293	82,5	457	0,578	80,3	459
16	475	0,584	79,6	470	0,747	93,4	487	0,329	17,1	488	0,607	81,1	455
17	475	0,567	79,4	475	0,739	93,3	488	0,305	74,9	489	0,590	81,0	453
18	500	0,930	73,5	447	1,312	94,4	459	0,561	74,6	447	0,977	75,5	434

Os valores determinados através de CIS para as transições eletrônicas dos cátions flavílios e das bases quinonoidais a partir da geometria HF são consideravelmente diferentes dos valores experimentais. As transições calculadas para os cátions por ZINDO nas mesmas geometrias RHF são semelhantes às obtidas anteriormente em AM1. Foi observado que existe uma correlação entre as transições experimentais dos cátions flavílios e as calculadas por ambos os métodos, apesar da diferença razoável entre os valores experimentais e os calculados. Para a base quinonoidal, entretanto, é possível verificar diferenças consideráveis nas transições calculadas e ausência de correlação entre os dados calculados e experimentais.

Na tentativa de se melhorar a resposta dada pelo CIS, foram feitos alguns testes onde o tamanho do conjunto de funções-base foi variado, mas as transições eletrônicas obtidas continuaram muito aquém do valor experimental. Por exemplo, as excitações calculadas para a forma básica do composto 13 em CIS/6-31G(d) e em CIS/6-311++G(d,p) diferem em menos de 2 nm, mas o tempo de cálculo passa de 1 hora e 30 minutos para cerca de 19 horas. De modo geral foi observado que, com as geometrias otimizadas por Hartree-Fock, tanto o ZINDO quanto o CIS não acertam a tendência observada experimentalmente, na qual a banda de absorção eletrônica da base é sempre mais deslocada para a região do vermelho do que a absorção do respectivo cátion flavílio.

Procurou-se então partir para a Teoria do Funcional de Densidade (DFT), um método que, devido ao seu custo computacional relativamente baixo (em comparação aos métodos Hartree-Fock e MP2), é bastante apropriado para sistemas com muitos elétrons ativos, permitindo assim o tratamento de moléculas grandes (Saracino et al., 2003), como o caso das antocianinas. Com a mudança do método de otimização de geometria para o nível DFT com funcional B3LYP e modelo de solvatação PCM, as transições eletrônicas calculadas dos cátions flavílios apresentaram melhorias significativas em comparação com RHF. Foi verificado que os valores calculados por ZINDO a partir da geometria B3LYP correlacionam razoavelmente bem com as transições experimentais e que o método TD-DFT com efeito do dielétrico tem ótima resposta para as transições abaixo de 480 nm.

Para as formas básicas otimizadas por B3LYP, apesar de ambos os métodos de cálculo das transições eletrônicas estimarem a absorção da base quinonoidal mais deslocada para o vermelho do que a absorção do cátion, as transições experimentais e as

calculadas por ZINDO não apresentam correlação. É possível observar que a dispersão dos dados é menor nas transições calculadas por TD-DFT com efeito do dielétrico.

Os resultados determinados pelo funcional mPW1PW91 mostraram que as transições eletrônicas calculadas para o cátion flavílio por ZINDO são as que mais se aproximam dos valores experimentais. A inclusão do efeito do dielétrico no cálculo por TD-DFT não provocou mudanças significativas nos resultados das espécies ácidas, em comparação com o resultado sem efeito do solvente. Entretanto, com o efeito do solvente foi observado que as transições eletrônicas calculadas por TD-DFT apresentam uma dispersão menor do que o cálculo sem o efeito do dielétrico.

As transições calculadas para as bases quinonoidais otimizadas por mPW1PW91 estão de forma geral mais próximas dos valores experimentais e respeitam a tendência observada em que os comprimentos de onda máximos da base são mais deslocados para a região do vermelho do que as transições do cátion. O método ZINDO não respondeu bem às transições acima de 500 nm e ao zwitterion do CHMF, assim como o TD-DFT sem efeito de solvente. Contudo, quando se inclui o efeito do dielétrico no cálculo do TD-DFT observa-se o surgimento de uma correlação razoável entre as transições eletrônicas calculadas e experimentais das bases quinonoidais. O resultado do TD-DFT-PCM é semelhante ao obtido com o funcional B3LYP. Entretanto, a dispersão dos dados é menor para as transições calculadas por mPW1PW91.

É interessante observar que foram obtidas correlações razoáveis para os cátions flavílios em todos os métodos empregados no cálculo das transições eletrônicas, ao contrário das bases quinonoidais. Os cálculos por ZINDO para o cátion resultaram em correlações semelhantes mesmo a partir das geometrias obtidas por diversos métodos, mas com o refinamento da geometria por DFT os dados se aproximaram dos resultados experimentais. Um dos problemas encontrados nos valores calculados por ZINDO é que o método tende a subestimar o resultado na medida que as transições se distanciam da região do ultravioleta, indicando que para esses casos o método considera a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado maior do que a esperada.

Figura 62: Relação entre as transições eletrônicas experimentais dos cátions flavílios e os valores calculados através de diferentes métodos. A linha tracejada representa a identidade.

Figura 63: Relação entre as transições eletrônicas experimentais das bases quinonoidais e os valores calculados através de diferentes métodos. A linha tracejada representa a identidade.

O cálculo das transições para a base quinonoidal foi mais sensível às variações de geometria, do efeito do dielétrico e do método empregado. Com o emprego da DFT na otimização das geometrias das formas básicas as transições calculadas se aproximaram dos valores experimentais, apesar da falta de correlação entre os valores calculados e os dados experimentais. A inclusão de efeitos de solvente na otimização das estruturas e no cálculo da absorção eletrônica das bases quinonoidais por mPW1PW91 mostrou-se particularmente importante, pois as pequenas diferenças entre as geometrias encontradas e o efeito do dielétrico indicaram serem relevantes no cálculo das transições. O funcional mPW1PW91 subestima as respostas para as absorções em cerca 35 nm para os cátions e bases, sendo que esta diferença aumenta ligeiramente para transições acima de 500 nm. Como a diferença entre o valor experimental e o calculado por TD-DFT com funcional mPW1PW91 é relativamente constante, pode-se então obter uma correlação razoável para as formas básicas mediante a aplicação de um fator de correção.

Este efeito de deslocamento das transições apresentado pelos cálculos de TD-DFT-PCM em relação aos dados experimentais é descrito na literatura (Parac & Grimme, 2003; Bauerschmidt & Ahlrichs, 1996; Jacquemin et al., 2004). Parac e Grimme analisaram a precisão de métodos TD-DFT para a previsão de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ em moléculas policíclicas aromáticas. Eles observaram que a tendência em subestimar ou superestimar as energias de excitação depende do funcional empregado, assim como do desempenho do funcional na descrição de estados excitados polares ou iônicos.

No caso dos cátions flavílios e bases quinonoidais, tanto o funcional B3LYP quanto o mPW1PW91 estão prevendo as transições eletrônicas com uma energia maior do que o resultado experimental. Esta diferença entre os resultados calculados e experimentais é dependente do funcional empregado. Para o B3LYP foi encontrado um erro médio de 0,11 eV entre as energias calculadas e as experimentais, enquanto que para o mPW1PW91 foi observado um desvio de 0,22 eV. O método de correção empregado neste estudo foi a subtração desta diferença média das energias para a primeira transição eletrônica. A Figura 64 apresenta os dados corrigidos para o cátion flavílio e a Figura 65 o resultado para as bases quinonoidais. Após a correção, os cálculos de TD-DFT-PCM no nível mPW1PW91/6-31+G(d) estão mais próximos dos resultados experimentais do que os cálculos em B3LYP.

Figura 64: Absorções corrigidas para os cátions flavílios. As transições foram corrigidas subtraindo-se 0,11 eV e 0,22 eV das energias de excitação calculadas por B3LYP e mPW1PW91, respectivamente.

Figura 65: Absorções corrigidas para as bases quinonoidais. As transições foram corrigidas subtraindo-se 0,11 eV e 0,22 eV das energias de excitação calculadas por B3LYP e mPW1PW91, respectivamente.

Foi proposto que as conformações não-planares dos sais de flavílio são importantes na determinação dos rendimentos de fluorescência devido às mudanças no estado de transferência de carga intermolecular (Roshal et al., 2002; Haucke et al., 1989; Czerney et al., 1995). A transferência da densidade eletrônica do anel fenílico para a região central da molécula fica comprometida com a redução na conjugação do sistema π causada pela rotação da ligação C2-C1'. Foram então efetuados alguns cálculos exploratórios para se avaliar a contribuição de possíveis confôrmeros não planares na absorção eletrônica dos cátions e das bases.

As transições eletrônicas para 4 cátions flavílios e para as respectivas bases quinonoidais foram calculadas por mPW1PW91/6-31+G(d), com efeito de solvente. A partir da estrutura planar, otimizada inicialmente na fase condensada, o ângulo diedro O-C2-C1'-C6' foi variado em passos de 30° e as transições foram calculadas para cada confôrmero. Na Tabela 20 estão apresentados os resultados obtidos.

De um modo geral, foi observado através dos cálculos quânticos que, com a diminuição do grau de coplanaridade entre os anéis, a intensidade da transição, representada pela força do oscilador f , é reduzida consideravelmente, ao mesmo tempo em que o máximo de absorção é deslocado para a região do ultravioleta. É possível notar também que a contribuição HOMO-LUMO para a transição sofre pouca alteração com a torção do anel. Outro ponto verificado é que mesmo mudanças de $\pm 30^\circ$ influenciam muito pouco a absorção das espécies. Adicionalmente, em todos os casos estudados, foi constatado que a barreira energética é pequena (cerca de 1 kJ.mol⁻¹) para conformações de $\pm 30^\circ$ em torno do mínimo, sugerindo que eventuais interações com moléculas do solvente podem provocar mudanças razoáveis na conformação molecular, mesmo que isso não seja refletido no espectro de absorção. Em média, a barreira rotacional calculada entre a estrutura planar otimizada e a conformação ortogonal foi de 25 kJ.mol⁻¹ para os cátions e bases, semelhante aos 26 kJ.mol⁻¹ calculado para pelargonidina por Torskangerpoll et al. (1999). Na Figura 66 estão apresentados os comprimentos de onda para a transição S_0-S_1 e as diferenças de energia entre a estrutura planar e os demais confôrmeros da base quinonoidal do composto 07.

No caso dos cátions 03 e 07, apesar de o máximo da transição S_0-S_1 se deslocar para comprimentos de onda maiores, as intensidades das transições envolvendo outros estados excitados de maior energia que absorvem no UV aumentam significativamente e passam a se tornar relevantes. Para o cátion 03 com o ângulo diedro de 90°, a transição

mais intensa (S_0 - S_2) com $f = 0,234$ é em 363 nm e para o cátion 07 com diedro de 90° , a absorção do segundo estado excitado singlete foi calculada em 363 nm, com $f = 0,260$.

Efetivamente, o que se observa em todos os casos estudados é que os confôrmeros não-planares contribuem muito pouco para a absorção na região visível do espectro, permitindo considerar apenas a estrutura planar no cálculo das transições eletrônicas.

Tabela 20: Ângulo diedro O-C2-C1'-C6' (θ), forças de oscilador (f), contribuição da excitação HOMO $\rightarrow$ LUMO (%H $\rightarrow$ L) para a transição e máximos de absorção ($\lambda_{\max}$), calculados para a transição $S_0\rightarrow S_1$ por mPW1PW91/6-31+G(d) para os sais de flavílio selecionados.

θ	F	%H $\rightarrow$ L	$\lambda_{\max}$	θ	f	%H $\rightarrow$ L	$\lambda_{\max}$
composto 02 – cátion flavílio				composto 02 - base quinonoidal			
90	0,250	77,7	361	90	0,371	76,9	395
120	0,470	83,6	374	120	0,414	78,3	413
150	0,642	83,1	386	150	0,491	79,6	434
180 ^a	0,683	82,4	395	180 ^a	0,511	79,6	442
composto 03 - cátion flavílio				composto 07 - base quinonoidal			
0	0,862	83,7	421	0	0,671	80,3	452
30	0,756	86,0	423	30	0,636	80,6	441
60	0,347	92,7	440	60	0,503	79,8	421
90	0	98,0	465	90	0,369	76,8	406
120	0,344	92,7	439	120	0,504	79,7	420
150	0,819	85,5	421	150	0,647	80,6	441
180 ^a	0,929	83,0	421	180 ^a	0,683	80,3	452
composto 07 - cátion flavílio				composto 07 - base quinonoidal			
90	0	98,2	463	90	0,358	76,8	406
120	0,395	91,2	432	120	0,494	79,7	421
150	0,836	84,3	413	150	0,629	80,5	439
180 ^a	0,914	82,4	414	180 ^a	0,663	79,7	449
composto 13 - cátion flavílio				composto 13 - base quinonoidal			
90	0,237	80,2	359	90	0,285	78,4	438
120	0,435	84,7	371	120	0,369	79,4	422
150	0,599	84,0	384	150	0,435	80,5	442
170 ^a	0,626	83,1	390	169 ^a	0,453	80,6	451

^a geometria otimizada

Figura 66: Máximos de absorção (●) e diferenças de energia (○) entre a geometria mais plana, otimizada, e os demais confôrmeros, calculados por mPW1PW91/6-31+G(d) para a base quinonoidal do composto 02.

As diferenças entre as transições eletrônicas experimentais e calculadas para a base quinonoidal poderiam em princípio refletir as dificuldades de se caracterizar experimentalmente esta espécie em solução. O cátion flavílio é muito estável e a única espécie presente em soluções fortemente ácidas ($\text{pH} \leq 1$). Em meios próximos da neutralidade, o cátion está envolvido em equilíbrios com a forma básica e com o hemiacetal, que por sua vez está em equilíbrio com as formas *cis* e *trans* da chalcona. Obter o espectro de absorção da base sem a interferência das demais espécies é um procedimento que em muitos casos não é possível, ao contrário do cátion, pois o desaparecimento da espécie pode ocorrer em questão de segundos. A banda de absorção no visível para o cátion tem em geral menos de 100 nm de largura e um máximo bem definido, enquanto que a largura da banda da forma básica fica em torno de 200 nm, situada em uma região do espectro bem próxima a do cátion. Um segundo problema está na distribuição dos comprimentos de onda das formas básicas ao longo da faixa de absorção. Apesar de os máximos dos 17 cátions escolhidos estarem distribuídos de forma razoável entre 415-530 nm, cerca de 9 das 18 bases têm os máximos situados entre 490 e 500 nm.

Com relação às interações soluto-solvente, pode-se supor que a metodologia computacional empregada não foi suficiente para descrever totalmente os efeitos do solvente sobre as transições eletrônicas. O efeito do solvente empregado nos cálculos das transições considera, de maneira geral, apenas o efeito de um campo elétrico externo sobre a polarizabilidade e o momento de dipolo da molécula (Grozema et al., 2001). Sabe-se que os cátions flavílios sofrem um pequeno deslocamento do espectro de absorção para o azul com o aumento da polaridade do solvente (Kim et al., 2003; Giongo et al., 2002), mas não existem estudos de efeito solvatocrômico para as bases quinonoidais. No caso de existir uma interação razoável entre os orbitais do solvente e o estado excitado das bases, seria necessário incluir explicitamente a primeira camada de solvatação em torno do soluto (Pliego & Riveros, 2002) no cálculo das transições eletrônicas.

O cálculo das transições por TD-DFT permite a utilização de um funcional diferente do que foi usado na etapa de otimização da geometria. Para efeito de comparação foram calculadas também as transições por TD-DFT a partir de combinações dos funcionais: com o funcional mPW1PW91 na geometria otimizada por B3LYP e com o funcional B3LYP na geometria otimizada por mPW1PW91, ambas

com efeito do dielétrico. Foi observado porém que os resultados obtidos a partir das combinações dos funcionais são piores que os determinados sem a permuta.

Na Tabela 21 estão apresentados os momentos de dipolo calculados a partir do funcional mPW1PW91, com e sem o efeito do solvente. Os dados obtidos indicam que as formas básica e ácida têm momentos de dipolo bem distintos e que a base é mais sensível ao efeito do dielétrico do que o cátion. Com relação às excitações eletrônicas, observa-se que a mudança no momento de dipolo é maior para a base quinonoidal. Estes resultados reforçam a hipótese de um efeito solvatocrômico mais pronunciado na base do que no cátion.

Tabela 21: Momentos de Dipolo (Debye) calculados por mPW1PW91 para as duas espécies dos sais de flavílio estudados.

Composto	Cátion flavílio				Base quinonoidal			
	Vácuo	PCM	TDDFT	TDDFT	vácuo	PCM	TDDFT	TDDFT
			vácuo	PCM			vácuo	PCM
01	4,95	6,76	5,70	7,18	11,4	16,1	12,0	17,4
02	0,81	1,74	0,85	1,70	8,38	12,6	8,76	13,9
03	3,41	5,89	3,99	6,14	10,9	15,9	12,1	17,4
04	1,83	3,30	1,99	3,46	10,6	15,2	11,1	16,7
05	3,35	5,24	4,01	5,69	10,8	16,4	11,2	17,7
06	2,03	1,57	1,93	1,83	9,81	14,4	10,3	15,7
07	2,02	2,64	2,05	3,00	10,1	15,7	10,7	13,7
08	1,53	1,52	1,45	1,77	9,11	14,3	9,68	15,4
09	2,33	3,77	2,44	3,90	10,8	15,3	11,3	16,6
10	1,67	3,97	2,09	3,93	10,1	14,2	10,5	15,6
11	1,44	2,43	1,55	2,57	9,07	13,9	9,65	15,1
12	1,29	4,06	0,91	0,78	11,0	16,0	11,5	17,4
13	0,92	0,97	0,89	1,29	8,94	16,0	9,31	14,6
14	4,02	1,32	3,59	3,81	8,97	13,2	16,1	22,4
15	—	—	—	—	18,2	23,8	18,8	25,0
16	2,02	3,57	2,10	3,02	8,98	21,2	11,6	17,3
17	2,19	2,82	2,18	2,75	8,39	15,8	11,2	17,6
18	2,83	4,06	2,91	4,35	9,97	16,0	10,6	17,6

5.14-Estudo computacional das espécies responsáveis pela coloração do CHMF

As geometrias das espécies coloridas do CHMF foram otimizadas no estado fundamental por mPW1PW91/6-31G(d), com PCM. As otimizações no primeiro estado excitado singlete foram efetuadas por CIS/6-31G com efeito de solvente. Não foi possível utilizar um conjunto maior de funções-base na otimização das espécies no estado excitado, pois havia um limite do Gaussian 03 relacionado ao tamanho dos arquivos temporários e a arquitetura dos computadores (32-bits). Também não foi possível empregar a DFT nas otimizações devido à limitação do método pertinente ao número de elétrons da molécula. Na Tabela 22 estão reunidas as informações mais relevantes sobre o estudo das espécies do CHMF.

A geometria otimizada do cátion flavílio no estado fundamental mostrou que o ângulo diedro entre o anel pirílico e o grupo COOH ligado à posição C4 é $\theta = 35,4^\circ$. É interessante observar que a acidez da carboxila do CHMF em soluções aquosas ($pK_{a1} = 0,73$) é alta em comparação com o ácido benzóico ($pK_a = 4,20$). Isto implica em uma razoável transferência de carga do grupo carboxílico para o íon flavílio, mesmo com o grupo fora do plano. Outra evidência da conjugação carboxila-cátion é que a absorção eletrônica do cátion é fortemente deslocada para o vermelho ($\lambda_{m\acute{a}x} = 484$ nm), quando comparada com o cátion do composto 12 ($\lambda_{m\acute{a}x} = 458$ nm), que possui um grupo fenílico na posição C4.

Com relação ao zwitterion flavílio, o ângulo diedro entre o anel pirílio e o carboxilato ($\theta = 47,9^\circ$) é maior que o calculado para o cátion. Esta diferença parece ser suficiente para reduzir consideravelmente a conjugação do grupo com o anel, pois o máximo de absorção eletrônica do zwitterion ($\lambda_{m\acute{a}x} = 458$ nm) é idêntico ao do cátion do composto 12. A semelhança entre a segunda constante de desprotonação do CHMF ($pK_{a2} = 4,84$) e o pK_a do composto 12 (4,44) indica que as propriedades do zwitterion são semelhantes às observadas para os cátions flavílios em geral, apesar da espécie ser eletricamente neutra.

Para a base quinonoidal foi encontrado o ângulo diedro $\theta = 40,6^\circ$ entre o plano do cromóforo e o carboxilato. Aparentemente o grupo COO^- também não está em ressonância com o anel, semelhante ao que foi observado para o zwitterion, pois a absorção máxima da forma básica do CHMF ($\lambda_{m\acute{a}x} = 494$ nm) é próxima à absorção da base quinonoidal do composto 12 ($\lambda_{m\acute{a}x} = 492$ nm).

Os valores de pK_a^* para o CHMF estimados através do ciclo de Förster indicaram que no estado excitado podem existir duas espécies neutras para o CHMF: o zwitterion Z^* propriamente dito, formado a partir da excitação da própria espécie presente em soluções com pH entre 1,5 e 3; e a espécie neutra AH^* , formada pela inversão na protonação dos grupos OH e COOH. Esta inversão na protonação dos grupos no estado excitado ocorre porque a acidez de fenóis, álcoois e naftóis aumenta, enquanto que para ácidos carboxílicos ocorre o inverso. Entretanto, a presença da espécie AH^* não foi observada nos espectros de absorção e de emissão, mas podia ser detectado por espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo com resolução de picossegundos (Paulo et al. 2006).

Com o intuito de estimar as propriedades da forma neutra AH, a geometria da espécie também foi otimizada. A geometria obtida em solvente apresenta um ângulo diedro entre o anel pirílio e a carboxila de $\theta = 29,5^\circ$, sugerindo que há transferência de cargas do grupo para o anel central, como foi proposto para o cátion flavílio. Esta conjugação entre o COOH e o flavílio deve refletir no máximo de absorção eletrônica da forma neutra, deslocando-a para comprimentos de onda maiores do que os determinados para o zwitterion.

As transições eletrônicas da espécie AH foram determinadas por ZINDO e por TD-DFT, com o funcional mPW1PW91 na base 6-31+G(d), a partir da geometria obtida no solvente. Em ambos os casos, os valores encontrados para a transição S_0-S_1 foram de 509 nm. Aplicando-se a correção de 0,22 eV determinada anteriormente para as transições calculadas por mPW1PW91, chega-se ao valor de 560 nm para a absorção de AH. Nesta região há sobreposição espectral com a base quinonoidal, dificultando uma possível caracterização da espécie em condições de equilíbrio.

As energias de solvatação calculadas pelo PCM e SM5.4 para as quatro espécies indicam que a forma AH é a menos favorecida em solução. Este resultado reflete o fato da espécie AH ser eletricamente neutra, enquanto o cátion flavílio e a base quinonoidal possuem cargas formais e no zwitterion há uma separação de cargas.

Com relação ao primeiro estado excitado S_1 , a análise das geometrias das espécies mostrou que todas as moléculas são planares e que as distâncias e ângulos de ligação são semelhantes às encontradas no estado fundamental. A principal diferença entre as geometrias dos estados S_0 e S_1 é com relação ao diedro entre carboxila/carboxilato e o anel pirílio, que diminuiu para valores entre $0,5^\circ$ e $2,0^\circ$.

Os cálculos de fluorescência no Gaussian 03 são bastante aproximados, uma vez que para se estimar a emissão é necessário efetuar um cálculo de absorção eletrônica empregando-se em S_0 a geometria otimizada no estado excitado. Conseqüentemente, a transição eletrônica calculada terá uma energia maior que a energia da transição 0,0, ou seja, o comprimento de onda de emissão calculado será menor que a emissão experimental 0,0.

As fluorescências calculadas por mPW1PW91/6-31+G(d) com PCM ficaram abaixo dos máximos experimentais em cerca de 80 nm. Entretanto, foi observado que existe uma correlação linear entre as emissões experimentais e os dados calculados, cujo coeficiente angular é igual a 1, o que torna possível corrigir as fluorescências calculadas simplesmente somando-se o valor de 80 nm ao valor calculado. Como resultado, a fluorescência da espécie AH foi estimada em 670 nm. Nesta região do espectro há a sobreposição com a emissão da base quinonoidal em meios próximos da neutralidade, e em concentrações mais elevadas de H^+ surge a emissão do cátion flavílio, o que torna a detecção experimental da espécie AH bastante complexa.

Tabela 22: Ângulos diedros entre o anel pirílio e o grupo carboxílico ($\theta_{\text{anel-COOH}}$), comprimentos de onda de absorção experimentais e calculados para a transição S_0 - S_1 ($\lambda_{\text{máx}}$, em nm), emissões de fluorescência experimentais e calculadas (Φ_{em} , em nm) e energias livres de solvatação (ΔG_{solv} , em kcal.mol⁻¹) para o cátion flavílio (HA^+), zwitterion flavílio (Z), forma neutra (AH) e base quinonoidal do CHMF.

espécie	HA^+	Z	AH	A^-
Estado S_0				
$\theta_{\text{anel-COOH}}$	35,4	47,9	29,5	40,6
$\lambda_{\text{máx}}$ (exp)	484	458	—	494
$\lambda_{\text{máx}}$ (ZINDO)	481	424	509	472
$\lambda_{\text{máx}}$ (TD corrigido)	500	453	560	501
ΔG_{solv} (PCM)	-44,1	-42,0	-23,1	-51,3
ΔG_{solv} (SM5.4)	-47,1	-35,6	-14,6	-65,3
Estado S_1				
$\theta_{\text{anel-COOH}}$	1,68	0,92	0,76	0,51
Φ_{em} (exp)	585	540	—	605
Φ_{em} (TD corrigido)	589	540	670	609

5.15-Reatividade dos sais de flavílio

Foi visto anteriormente que as transições eletrônicas das espécies coloridas dos sais de flavílio são determinadas basicamente pelos orbitais HOMO e LUMO, também chamados de orbitais de fronteira. A distribuição da densidade eletrônica destes orbitais é importante para a compreensão da reatividade química.

Os orbitais HOMO e LUMO dos cátions e bases foram gerados a partir das geometrias otimizadas por mPW1PW91 em PCM. Para se obter a densidade dos orbitais foi necessária a construção de um programa que calculasse o quadrado dos coeficientes dos orbitais a partir da saída do Gaussian 03, uma vez que este apenas gera as superfícies dos orbitais. Na Figura 67 estão algumas superfícies de densidade do HOMO e LUMO calculadas para os cátions flavílios.

Uma primeira análise permite observar que quando o cátion passa do estado fundamental para o estado excitado, há a transferência de carga de regiões periféricas da molécula para o anel central. Este fato é coerente com as propriedades fotoácidas do cátion flavílio: uma vez no estado excitado, a desprotonação do grupo OH na posição C7 do cátion é facilitada pela diminuição da densidade eletrônica nos átomos vizinhos. A base quinonoidal apresenta uma distribuição de cargas no estado excitado muito semelhante à da espécie ácida (Figura 68). No estado fundamental, a densidade eletrônica da forma básica fica situada principalmente no anel pirílio, em torno da posição C7.

Com relação à reatividade no estado fundamental, uma forma de se racionalizar como ocorrem ataques eletrofílicos e nucleofílicos é a partir da análise dos orbitais de fronteira através dos índices de reatividade de Fukui, também conhecidos como funções de Fukui $f(r)$:

$$f^{-}(r) = \mathbf{r}_{N=N_0}(r) - \mathbf{r}_{N=N_0-1}(r) = \mathbf{r}_{HOMO}(r) : \text{para ataque eletrofílico}$$

$$f^{+}(r) = \mathbf{r}_{N=N_0+1}(r) - \mathbf{r}_{N=N_0}(r) = \mathbf{r}_{LUMO}(r) : \text{para ataque nucleofílico}$$

onde ρ_N é a densidade eletrônica na região de valência (Chermette, 1999). Desse modo, a observação da densidade do HOMO da molécula indica os sítios que sofrem ataque eletrofílico, e a densidade do LUMO indica as posições que favorecem o ataque nucleofílico.

A forma ácida do flavílio possui carga positiva, o que facilita os ataques de grupos nucleofílicos. Este fato torna a inspeção da densidade do LUMO importante para a compreensão da hidrólise do cátion. Para os 17 cátions estudados, a densidade do LUMO indica que as posições C2 e C4 são as mais suscetíveis ao ataque de um grupo doador de elétrons, resultado que está de acordo com o observado por outros autores em relação à hidrólise de sais de flavílio sem grupos desprotonáveis (McClelland & Gedge, 1980). Os autores observaram através de experimentos cinéticos a formação de adutos tanto na posição C4 quanto na posição C2, em pH = 12. Entretanto, o aduto formado como produto cinético pela adição de um grupo OH⁻ em C4 é rapidamente convertido no aduto em C2, que resulta no hemiacetal.

É interessante notar que todos os cátions apresentaram os mesmos sítios de reação, apesar das diferenças na distribuição de cargas, na posição e no número de substituintes. No caso das formas básicas dos sais de flavílio, a densidade do LUMO indicou também as posições C2 e C4 como as mais propensas a um ataque nucleofílico.

Apesar de a densidade de LUMO mostrar que os carbonos C2 e C4 são propensos à hidrólise, a análise das cargas Mulliken de ambos os sítios ativos (Tabela 23) sugere que o ataque nucleofílico deve ocorrer preferencialmente na posição C2, uma vez que este átomo tem uma carga parcial positiva. Este resultado é coerente com as observações experimentais feitas para a caracterização dos produtos da hidratação do cátion flavílio (Jurd, 1963a; McClelland & Gedge, 1980), que mostraram o 2-hidroxiflaveno (o hemiacetal) como o único produto resultante da hidratação do cátion.

Na natureza, durante o processo de envelhecimento de vinhos tintos, ocorre a condensação de antocianinas com compostos presentes no vinho como ácido ferúlico, ácido sinápico e outros derivados do ácido cinâmico. A reação de condensação ocorre via C4, provavelmente pelo fato do carbono da posição C2 ser protegido estericamente do ataque destes compostos volumosos (Woodford, 2005).

Figura 67: Densidades de HOMO (a) e LUMO (b) para alguns dos cátions flavílios estudados.

Figura 68: Densidades de HOMO (a) e LUMO (b) para algumas das bases quinonoidais estudadas.

Foi observado experimentalmente que sais derivados do 4-metilflavílio possuem uma alta acidez no grupo metílico ligado à posição C4 (Stoeckel et al., 2001). Outro ponto relevante é que a carga parcial do carbono C4 inverte de sinal nos sais de flavílio que têm substituintes nesta posição. Observando-se os dados listados na Tabela 2, verifica-se que os sais substituídos em C4 são também os compostos com os maiores valores de pK_{ap} , a ponto de alguns dos sais nem mesmo apresentarem as formas hidratadas, ou seja, possuem cátions flavílios bastante estáveis. Nos sais com grupos ligados ao carbono C4, aparentemente há uma competição entre ambos os sítios pela formação do aduto, dificultando a reação de hidrólise do cátion flavílio via ataque nucleofílico em C2.

Tabela 23: Cargas atômicas de Mulliken para os carbonos das posições C2 e C4, obtidas a partir das geometrias otimizadas em mPW1PW91/6-31G(d) com efeito de solvente.

Composto	Cátion		Base	
	C2	C4	C2	C4
01	0,34	-0,17	0,31	-0,2
02	0,39	-0,13	0,36	-0,18
03	0,39	-0,14	0,37	-0,18
04	0,39	-0,14	0,37	-0,18
05	0,38	-0,14	0,37	-0,18
06	0,34	-0,17	0,30	-0,20
07	0,39	-0,14	0,37	-0,18
08	0,39	-0,12	0,37	-0,16
09	0,39	-0,12	0,37	-0,16
10	0,40	0,19	0,38	0,15
11	0,39	-0,12	0,37	-0,16
12	0,39	0,10	0,37	0,06
13	0,40	0,18	0,37	0,14
14	0,40	0,07	0,39	0,08
15	-	-	0,37	0,04
16	0,40	0,18	0,38	0,15
17	0,40	0,18	0,37	0,15
18	0,39	-0,13	0,35	-0,16

Alguns estudos realizados em nível semi-empírico procuraram relacionar a estabilidade dos cátions flavílios, refletida pelo pK_{ap} , com o conceito de dureza química de Parr & Pearson (1983). Entretanto, alguns problemas foram detectados nestes estudos. Amic & Trinajstić (1991) não fizeram a distinção entre dados de pK_a e de pK_{ap} , tampouco do efeito da posição dos grupos nos anéis. Este fato resultou em uma correlação estatisticamente muito comprometida ($R^2 = 0,465$ para 30 cátions) entre a dureza absoluta e pK . Já Lietz et al. (1996) encontraram boas correlações entre a constante de hidratação pK_w e a dureza absoluta em função da posição dos substituintes, para um conjunto de 12 cátions divididos em dois grupos, mas ignoraram compostos com grupos OH. Além disso, existem poucos valores tabelados de pK_w , ao contrário de pK_{ap} , com dados determinados até mesmo para algumas antocianinas naturais (Lima et al., 2002).

De um modo bastante resumido, a dureza química (η) é definida dentro da teoria do funcional da densidade como a segunda derivada da energia eletrônica, E , em relação ao número de elétrons, N , tendo-se um potencial externo constante, v (Chermette, 1999):

$$h = \frac{1}{2} \left(\frac{d^2 E}{dN^2} \right) \quad \eta = \frac{1}{2} \left(\frac{dm}{dN} \right) \quad (50)$$

Sendo o potencial químico (μ) a primeira derivada da energia em relação ao número de elétrons, a dureza química pode ser racionalizada como a resistência de uma espécie química às mudanças em sua configuração eletrônica (Lietz et al., 1996). O princípio da dureza máxima (ou absoluta) proposto por Pearson (1987) estabelece que o aumento da estabilidade química pode ser obtido incrementando-se a dureza. A partir de uma série de aproximações muito bem descritas em trabalhos de revisão (Parr & Yang, 1989; Chermette, 1999; Duarte, 2001; Geerlings et al., 2003) pode-se relacionar a dureza química absoluta com a metade da diferença de energia entre os orbitais LUMO e HOMO:

$$h = \frac{1}{2} (E_{LUMO} - E_{HOMO}) \quad (51)$$

O interesse em relacionar a dureza química com a estabilidade do cátion flavílio reside no fato de que poderia existir uma correlação entre a absorção eletrônica e pK_{ap} , pois foi verificado que a transição eletrônica dos cátions e das bases quinonoidais na região visível do espectro é essencialmente determinada pela transição HOMO-LUMO.

Na Tabela 24 estão listadas as energias do HOMO e LUMO, as durezas absolutas dos cátions flavílios e os valores de pK_{ap} . A primeira observação feita é a relação entre a dureza absoluta e a energia de excitação dos cátions, mostrada na Figura 69, indicando que a dureza aumenta conforme o máximo de absorção do cátion se desloca para a região de menor comprimento de onda no espectro.

Na Figura 70 é apresentado o gráfico das durezas absolutas em função do pK_{ap} . A distribuição dos pontos no gráfico mostra que a dureza química absoluta dos cátions não pode ser usada como o único parâmetro para descrever a estabilidade. Aparentemente não estão sendo incluídos na correlação todos os efeitos exercidos pela posição ou tipo de substituinte na estrutura da molécula.

A observação dos padrões de substituição nos anéis permitiu dividir os cátions com valores de pK_{ap} em dois conjuntos. Para o primeiro conjunto identificado, com substituintes apenas no anel B (compostos 02, 03, 04, 05 e 07), observa-se que o aumento da dureza não provoca grandes alterações no pK_{ap} , cuja média para o conjunto é cerca de 3. Entretanto, é possível identificar dentro deste primeiro conjunto o efeito de estabilização do cátion flavílio nos compostos com grupos ligados ao carbono C4'. Com exceção do composto 02, o 7-hidroxiavilíio, os demais sais de flavílio possuem pK_{ap} acima de 3,0.

O segundo conjunto identificado é formado por compostos com substituintes ligados aos anéis A e C, além do anel B (compostos 01, 06, 08, 10, 11, e 18). Para este conjunto foi constatado que a dureza é proporcional ao pK_{ap} e que grupos OCH_3 nos anéis A e C favorecem a hidratação, enquanto os substituintes na posição C4 promovem a estabilização da forma ácida. Neste conjunto foi incluído também o cátion 18, o 4'-hidroxiflavílio, pois a ausência do grupo OH na posição C7 favorece a estabilização dos cátions flavílios com substituintes em C4' (McClelland & Gedge, 1980; McClelland & McGall, 1982), tornando-o muito semelhante aos demais compostos do conjunto, em termos de dureza e pK_{ap} .

Observando-se as relações existentes entre a primeira transição eletrônica dos cátions flavílios e as durezas absolutas, e entre pK_{ap} e durezas absolutas para o conjunto dos cátions com substituintes nos anéis A e C, pode-se esperar também que exista uma

relação entre as absorções e a constante de equilíbrio aparente. Foi feito então o gráfico do pK_{ap} em função da energia de excitação dos cátions para os dois conjuntos, mostrado na Figura 71. Nota-se que os cátions do conjunto com substituintes apenas no anel B são bastante semelhantes entre si, com relação à transição eletrônica e pK_{ap} . Para o conjunto com grupos ligados aos anéis A e C há uma boa correlação entre o pK_{ap} e a energia de excitação, o que permite uma estimativa razoável da estabilidade do cátion a partir da absorção eletrônica.

De um modo geral, a dureza absoluta descreve bem a reatividade de apenas uma parte dos cátions flavílios. Devido ao grande tamanho e a alta polarizabilidade do sistema π conjugado dos sais de flavílio, espera-se também que exista um grande fluxo de carga dentro da molécula. Entretanto, a dureza absoluta não é um parâmetro adequado para a descrição de situações com fluxo de carga intramolecular, como fica evidente no caso dos cátions com substituintes apenas no anel B. Para estes compostos, a estabilização do cátion ocorre pela transferência de carga do anel fenílico para o anel central.

A estabilidade do cátion também está ligada às contribuições dos efeitos da primeira camada de solvatação sobre a estrutura da molécula. Os grupos substituintes podem interagir com o solvente, blindando o anel central do ataque pelas moléculas de água ou mesmo afetando a solubilidade do cátion.

O efeito estérico também deve ser levado em conta, uma vez que, para ocorrer a formação do hemiacetal, é necessária uma considerável diminuição da coplanaridade entre o anel fenílico e o anel pirílico. A adição do nucleófilo pode ser dificultada por grupos que promovam a rigidez do cátion, como pontes $-(CH_2)_2-$ ligando C3 à C6' (Lietz et al., 1996).

Tabela 24: Energias dos orbitais HOMO e LUMO dos cátions flavílios, computadas por mPW1PW91/6-31G(d) com efeito do solvente, durezas absolutas dos cátions flavílios e valores de pK_{ap} .

Cátion flavílio	E_{LUMO} (eV)	E_{HOMO} (eV)	Dureza (eV)	pK_{ap}
01	-3,304	-6,400	1,548	2,54
02	-3,370	-7,145	1,888	2,70
03	-3,272	-6,750	1,739	2,98
04	-3,242	-6,776	1,767	3,14
05	-3,248	-6,730	1,741	3,17
06	-3,237	-6,461	1,612	3,21
07	-3,215	-6,751	1,768	3,05
08	-3,167	-6,704	1,768	3,92
09	-3,191	-6,539	1,674	-
10	-3,072	-6,719	1,823	4,10
11	-3,155	-6,704	1,775	4,00
12	-3,277	-6,767	1,745	-
13	-3,323	-7,155	1,916	-
14	-3,662	-6,868	1,603	-
16	-3,203	-6,783	1,790	-
17	-3,176	-6,759	1,792	-
18	-3,365	-6,969	1,802	4,20

Figura 69: Gráfico das durezas absolutas em função das energias de excitação dos cátions flavílios.

Figura 70: Gráfico de pK_{ap} dos sais de flavílio em função das durezas absolutas calculadas para os cátions flavílios: (●) conjunto com substituintes nos anéis A e C; (○) conjunto com substituintes apenas no anel B.

Figura 71: Gráfico de pK_{ap} em função da energia de excitação dos cátions flavílios: (●) conjunto com substituintes nos anéis A e C; (○) conjunto com substituintes apenas no anel B.

5.16-Determinação do pK_a dos sais de flavílio através de cálculos *ab initio*

Uma outra forma de se estimar a estabilidade dos cátions flavílios é através do emprego de recursos computacionais no cálculo das constantes de equilíbrio entre a forma ácida e as demais espécies em solução. Para a determinação de cada constante de equilíbrio seria necessária a consideração de um ciclo termodinâmico específico para descrever a reação química, além de se analisar a eventual presença de isômeros. No entanto, a inclusão de todas as espécies no cálculo teria um custo computacional muito elevado. Neste estudo optou-se por considerar inicialmente apenas o cálculo da constante de equilíbrio entre o cátion flavílio e a base quinonoidal, pois estas duas espécies são as responsáveis pela coloração dos sais de flavílio.

Informações sobre pK_a e espectros eletrônicos dos sais de flavílio são importantes para o entendimento da reatividade química destes compostos. Apesar das transformações estruturais de antocianinas e sais de flavílio serem estudadas desde o início do século XX, pouco se sabe sobre as propriedades moleculares das espécies, como momento dipolar, energia de solvatação ou potenciais de redução/oxidação. Com relação a previsão de constantes de equilíbrio para sais de flavílio, a literatura é bastante escassa e baseada em modelos de relações quantitativas entre estrutura e propriedade (QSPR/QSAR) e descritores topológicos (Amic et al., 1999; Peruzzo et al., 2001). Ao mesmo tempo, nenhum estudo foi feito focando apenas o equilíbrio cátion flavílio/base quinonoidal.

Na determinação de valores absolutos de pK_a através de métodos teóricos, três fontes de erro são tidas como as principais. A primeira fonte está na escolha de um ciclo termodinâmico conveniente para descrever o processo. Outro problema está no nível de teoria escolhido para os cálculos em fase gasosa. Entretanto, o cálculo da variação da energia livre de solvatação é uma das etapas críticas na determinação da constante de equilíbrio (Saracino et al., 2003; Liptak & Shields, 2001). Os modelos que consideram o solvente como um dielétrico contínuo fornecem resultados confiáveis para moléculas neutras, apesar de ser bastante peculiar a forma como cada um gera a cavidade em torno do soluto ou interpreta as interações eletrostáticas. Entretanto, apresentam problemas quando a molécula em estudo é um soluto eletricamente carregado.

Nos cálculos de pK_a , o maior desafio é como atingir uma precisão que seja útil do ponto de vista químico: um erro de $1,36 \text{ kcal.mol}^{-1}$ resulta em um desvio de 1 unidade de pK_a (Liptak & Shields, 2001). Em um recente trabalho, Toth et al. (2001)

mostraram que o pK_a de um conjunto de seis ácidos carboxílicos poderia ser previsto dentro da margem de erro de 0,5 unidade de pK_a . Para tal previsão foi usado o estado-da-arte em termos de cálculos termoquímicos precisos em fase gasosa, os métodos Gaussian-n (G2 e G3) e CBS (Complete Basis Set), combinados com modelo de solvatação CPCM.

A variação da energia livre de dissociação do próton para o cátion flavílio foi determinada a partir do ciclo termodinâmico mostrado no Esquema 10:

Esquema 10: ciclo termodinâmico empregado no cálculo de pK_a absoluto dos sais de flavílio.

De acordo com o ciclo termodinâmico proposto, a energia livre de desprotonação na fase aquosa (ΔG_{aqHA+}) pode ser obtida somando-se a variação da energia livre do processo no vácuo com as energias de solvatação das espécies envolvidas (Saracino et al., 2003):

$$\Delta G_{aqHA+} = \Delta G_{gHA+} + \Delta \Delta G_{sHA+} \quad (52)$$

$$\Delta G_{gHA+} = G_A + G_{H+} - G_{HA+} \quad (53)$$

$$\Delta \Delta G_{sHA+} = \Delta G_{sA} + \Delta G_{sH+} - \Delta G_{sHA+} \quad (54)$$

onde G_A , G_{H+} e G_{HA+} são referentes à energia livre de Gibbs das espécies no vácuo e ΔG_{sA} , ΔG_{sH+} e ΔG_{sHA+} é a variação de energia livre de solvatação.

Nos termos do ciclo referentes a G_{H^+} (-6,28 kcal.mol⁻¹) e ΔG_{H^+} (-263,98 kcal.mol⁻¹), foram utilizados os dados experimentais obtidos do estudo de Saracino et al. (2003), na tentativa de se minimizar erros provenientes do cálculo e ambigüidades relacionadas ao íon H₃O⁺. Para a variação da energia livre calculada no gás (ΔG_{gHA^+}) é necessário somar o termo -RT ln(24,46) para se considerar a mudança de estado padrão a 25 °C das espécies da fase gasosa (24,46 L) para a fase líquida (1 L). O pK_a é então obtido pela relação termodinâmica:

$$pK_a = \frac{\Delta G_{aqHA^+}}{2,303RT} \quad (55)$$

Não há dados experimentais sobre a energia de solvatação das espécies dos sais de flavílio, impossibilitando uma possível comparação com os valores calculados. A coerência dos resultados obtidos foi avaliada utilizando-se como parâmetro a comparação entre as energias calculadas por métodos diferentes. Foram utilizados quatro procedimentos de cálculo do ΔG_s , sempre a partir das geometrias otimizadas em solvente por mPW1PW91/6-31G(d).

No primeiro caso, a energia de solvatação foi calculada pelo modelo PCM com o mesmo funcional mPW1PW91/6-31G(d), para se manter o mesmo nível de teoria usada na otimização das geometrias. O raio atômico empregado neste caso foi o modelo uaks, otimizado para o nível DFT (Frisch et al., 2003). No segundo caso, a solvatação foi calculada pelo método Hartree-Fock restrito, na base 6-31G(d) com PCM e com raio atômico uahf, pois o modelo PCM foi parametrizado neste nível de teoria, embora com um conjunto pequeno de dados. No terceiro procedimento foi usado o modelo de solvatação SM5.4 do pacote Amsol, também se partindo das geometrias iniciais, pois este modelo foi parametrizado com um conjunto extenso de dados, mas a partir de geometrias otimizadas por métodos semi-empíricos (Chambers et al., 1996). O quarto procedimento utilizado foi baseado em uma parametrização alternativa do PCM, feita com o mesmo conjunto de 215 moléculas neutras empregadas na parametrização do Amsol, mas com geometrias otimizadas *ab initio* (Shimizu et al., 2005). Os termos eletrostáticos da energia de solvatação foram calculados com PCM HF/6-31G(d) e raio atômico de Bondi, enquanto que os termos não polares como a superfície excludente ao solvente (SES) e energias de dispersão foram calculados com o programa GEPOL.

Independentemente do modelo de solvatação utilizado, é importante ressaltar que a determinação da energia de solvatação a partir da geometria otimizada no solvente (e não a partir da estrutura otimizada na fase gasosa) torna o ciclo termodinâmico e a descrição do fenômeno de solvatação mais realista.

Na Tabela 25 estão agrupadas as energias livres de Gibbs calculadas para a parte do conjunto de cátions flavílios e bases quinonoidais escolhidos que teve todos os termos do ciclo termodinâmico calculados. Na tabela também estão listadas a variação de energia livre de Gibbs no vácuo ΔG_{gHA^+} , já considerando-se o termo de contribuição do íon hidrogênio ($-6,28 \text{ kcal.mol}^{-1}$) e a mudança de volume no estado padrão ($-1,89 \text{ kcal.mol}^{-1}$), bem como as energias de solvatação das espécies calculadas através dos quatro procedimentos.

A análise geral das energias de solvatação calculadas mostra que existem pequenas diferenças entre os modelos empregados. Para os cátions os valores divergem em média $3,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, enquanto que no caso das bases foi constatada uma diferença de 5 kcal.mol^{-1} . Foi observado também que os resultados calculados por mPW1PW91/6-31G(d) com PCM original são ligeiramente maiores do que os determinados pelos demais modelos. Entretanto, os dados calculados permitem verificar que variações de apenas 1 kcal.mol^{-1} na energia de solvatação resultam em diferenças de quase uma unidade de pK.

As energias de solvatação calculadas por mPW1PW91/6-31G(d) não são apropriadas para a determinação do pK_a . Os valores calculados ficaram entre 6,5 e 8,5, enquanto que os valores experimentais se situam entre 3,5 e 5,5. Este resultado já era esperado, uma vez que é recomendado a metodologia RHF/6-31G(d) no cálculo de energias de solvatação em PCM (Saracino et al., 2003). Entretanto, a utilização do método e conjunto de funções-base recomendado no cálculo do ΔG_{aq} produziu resultados de pK_a melhores que o modelo anterior, mas ainda foram insatisfatórios. O emprego do modelo SM5.4 se mostrou válido para a previsão de pK_a s com uma margem de erro de ± 1 unidade de pK. Finalmente, as energias de solvatação calculadas por RHF/6-31G(d) com PCM reparametrizado permitiram o cálculo de pK_a com um erro de $\pm 0,5$ unidade de pK.

Os resultados obtidos com relação ao cálculo absoluto de pK_a são excepcionais, pois abrem a possibilidade de desenvolvimento teórico de novos sais de flavílio com características específicas. Sabe-se que existe uma relação linear entre pK_a e pK_{ap} .

permitindo relacionar eventuais resultados com a estabilidade do cátion flavílio à reação de hidratação.

O segundo ponto relevante está relacionado com a metodologia empregada nos cálculos de pK_a . A abordagem utilizada neste estudo demanda menos recursos computacionais que outros métodos mais sofisticados como CBS-QB3, G2 e G3 para ácidos carboxílicos (Liptak & Shields, 2001; Toth et al., 2001), BP/TZVP e modelo de solvatação COSMO-RS para álcoois, fenóis e ácidos benzóicos (Klamt et al., 2003) e B3LYP/cc-pvqz//B3LYP/6-31G(d,p) para fenóis, imidas, piridinas e imidazóis (Busch & Knapp, 2004). Além disso, os cálculos foram executados para moléculas com maior número de átomos e com uma precisão somente alcançada pelos métodos CBS-QB3, G2 e G3.

Na Figura 72 é apresentado o gráfico dos pK_a s estimados dos sais de flavílio, cujas energias de solvatação foram calculadas pelo modelo SM5.4 e RHF/6-31G(d) com PCM reparametrizado, em função dos valores experimentais.

Tabela 25: Valores de energia livre de Gibbs na fase gasosa (kcal.mol^{-1}) e nos modelos de solvatação PCM e SM5.4, calculados para os termos do ciclo termodinâmico proposto no cálculo de pK_a . O termo G_{gH^+} é igual a $-6,28 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e o termo ΔG_{sH^+} é igual a $-263,98 \text{ kcal.mol}^{-1}$. As moléculas em fase gasosa foram calculadas no nível mPW1PW91/6-311+G(2d,2p)//mPW1PW91/6-31+G(d,p).

Sal de flavílio	2	7	10	11	12	13	16	17	18
$\text{pK}_a \text{ exp.}$	3,55	4,00	4,30	4,20	4,44	4,40	4,85	4,84	4,61
<i>Termos da fase gasosa</i>									
G_{HA^+}	-1461070	-1612006	-1920562	-1762934	-2154207	-1539915	-1769642	-1690850	-1461074
G_{A}	-1460292	-1611219	-1919757	-1762143	-2153407	-1539126	-1768841	-1690052	-1460283
ΔG_{gHA^+}	235,40	238,02	243,79	239,34	242,30	238,80	242,37	241,34	239,14
RHF/6-31G(d) + PCM									
ΔG_{sHA^+}	-46,52	-52,39	-48,67	-56,43	-43,15	-45,00	-44,52	-50,74	-46,11
ΔG_{sA}	-12,43	-19,46	-19,56	-23,67	-16,39	-13,01	-14,08	-19,28	-13,97
ΔG_{aqHA^+}	5,51	6,97	8,92	8,12	5,08	6,81	8,83	8,82	7,30
$\text{pK}_a \text{ calc.}$	4,04	5,11	6,54	5,95	4,38	4,99	6,48	6,47	5,35
mPW1PW91/6-31G(d) + PCM									
ΔG_{sHA^+}	-44,63	-49,33	-39,71	-53,33	-33,99	-39,63	-34,55	-44,53	-43,68
ΔG_{sA}	-6,85	-13,48	-7,98	-18,61	-3,34	-4,38	-2,54	-11,15	-7,91
ΔG_{aqHA^+}	9,20	9,89	11,54	10,08	8,97	10,07	10,40	10,74	10,93
$\text{pK}_a \text{ calc.}$	6,75	7,26	8,46	7,39	6,58	7,38	7,63	7,88	8,01

Tabela 25: Continuação.

Sal de flavílio	2	7	10	11	12	13	16	17	18
pK _a exp.	3,55	4,00	4,30	4,20	4,44	4,40	4,85	4,84	4,61
SM 5.4									
ΔG_{sHA+}	-44,21	-48,43	-44,85	-51,81	-39,62	-42,40	-41,78	-46,76	-43,31
ΔG_{sA}	-10,94	-16,18	-15,59	-20,40	-11,76	-11,16	-12,54	-16,88	-11,93
ΔG_{aqHA+}	4,69	6,29	9,07	6,77	6,18	6,06	7,63	7,24	6,54
pK_a calc.	3,44	4,61	6,65	4,97	4,54	4,45	5,60	5,31	4,80
RHF/6-31G(d) + PCM reparametrizado									
ΔG_{sHA+}	-49,57	-52,83	-49,79	-54,26	-45,77	-47,90	-47,86	-51,12	-49,03
ΔG_{sA}	-15,78	-21,19	-22,15	-23,86	-18,80	-16,82	-19,38	-22,05	-17,39
ΔG_{aqHA+}	5,20	5,69	7,45	5,75	5,30	5,90	6,87	6,43	6,80
pK_a calc.	3,82	4,17	5,46	4,22	3,88	4,32	5,04	4,72	4,99

Figura 72: Gráfico de pK_a calculados para os sais de flavílio em função dos valores experimentais. As energias de solvatação das espécies foram calculadas por (□) SM5.4 e por (●) RHF/6-31G(d) com o modelo de solvatação PCM reparametrizado. A linha contínua representa a função identidade ($x = y$) e as linhas tracejadas correspondem à $pK_a (exp) \pm 0,5$.

5.17-Cálculo de potenciais de redução para os sais de flavílio

Os processos envolvendo a transferência de elétrons exercem um papel importante nas transformações químicas dos sais de flavílio e antocianinas, assim como foi observado para a transferência de prótons. Para as reações onde a transferência de elétrons é um processo reversível, é possível determinar os potenciais de redução e oxidação através da técnica de voltametria cíclica. Entretanto, a determinação de potenciais redox para polifenóis por voltametria cíclica é um procedimento complexo. Em soluções aquosas podem ocorrer processos conjugados de transferência de prótons e elétrons ou mesmo processos multieletrônicos. Há uma grande quantidade de potenciais redox conhecidos para polifenóis em água, mas infelizmente estes dados estão determinados em pH = 7, onde boa parte das espécies se encontra na forma ionizada. Adicionalmente, foi observado que a redução de antocianinas é irreversível (Silva et al., 2004). Em muitos casos, a determinação precisa de potenciais não reversíveis só é possível através de técnicas como radiólise por pulso, onde o elétron é promovido para um aceptor com potencial redox conhecido.

Para o cálculo computacional dos potenciais de redução dos sais de flavílio foi empregado um ciclo termodinâmico que relaciona a energia livre de redução na fase gasosa com a energia livre de solvatação das espécies (Esquema 11). O valor obtido a partir do ciclo é um potencial absoluto e necessita ser relacionado com o potencial absoluto do eletrodo normal de hidrogênio (Esquema 12) para se chegar ao potencial de meia-cela.

Esquema 11: Ciclo termodinâmico para a determinação do potencial de redução absoluto das espécies estudadas.

Esquema 12: Ciclo termodinâmico para a determinação do potencial absoluto do eletrodo normal de hidrogênio.

As informações relativas aos processos de quebra da ligação do hidrogênio, posterior ionização do átomo na fase gasosa e solvatação do íon foram obtidas de dados experimentais tabulados no NIST (<http://webbook.nist.gov>, acessado em Abril de 2004) e de Lewis et al. (2004) e estão listados na Tabela 26. Foi escolhido empregar dados experimentais para o eletrodo de hidrogênio como forma de se minimizar possíveis erros no cálculo.

Tabela 26: Dados termodinâmicos experimentais (kcal.mol^{-1}) empregados no ciclo referente ao eletrodo normal de hidrogênio ($T = 298,15 \text{ K}$).

Espécies	ΔG_g^0	ΔG_s^0
H_2	-9,32	0
H^+	359,4	263,98
e^-	-1,4	0

Com os dados referentes ao ciclo do eletrodo normal de hidrogênio, pode-se determinar a energia livre do eletrodo ΔG_{NHE}^0 através das expressões:

$$\Delta G_{\text{NHE}}^0 = \Delta \Delta G_g^0 + \Delta G_s^0(\text{H}^+) \quad (56)$$

$$\Delta \Delta G_g^0 = \Delta G_g^0(\text{H}^+) + \Delta G_g^0(\text{e}^-) - \Delta G_g^0(\text{H}_2) \quad (57)$$

onde $\Delta \Delta G_g^0$ é a variação da energia livre na fase gasosa. O potencial absoluto do eletrodo é então dado pela equação de Nerst:

$$E^0 = -\frac{\Delta G_{NHE}^0}{nF} \quad (58)$$

Com base nas expressões acima foi calculado o valor de 4,36 V para o potencial absoluto do eletrodo de hidrogênio.

Os processos redox estudados para os sais de flavílio foram a redução da forma catiônica HA^+ , dando origem ao radical $HA^\bullet$, e a oxidação da base quinonoidal A resultando na forma radicalar $A^{+\bullet}$. Em ambas as situações, é necessário adicionar à energia livre calculada no vácuo o termo $-RT \ln(24,46)$, para considerar a mudança de estado padrão das espécies da fase gasosa (24,46 L) para a fase líquida (1 L), a 25 °C.

No cálculo dos potenciais absolutos das formas ácida e básica foram empregadas as mesmas expressões do cálculo do eletrodo de hidrogênio. A única diferença está relacionada à energia livre absoluta do elétron no gás, que é um termo muito pequeno e foi desconsiderado, pois envolve apenas a contribuição translacional e a degenerescência de spin (cerca de $6,3 \text{ cal.mol}^{-1}$, segundo Lewis et al., 2004). Na fase gasosa, a energia livre absoluta de cada espécie é calculada através da soma da energia eletrônica, obtida a partir do *single point*, com o termo de correção térmica para a energia livre de Gibbs, determinado pelo cálculo termoquímico (Ochterski, 2000; Hill, 1960).

Para avaliar se a metodologia proposta era adequada, o ciclo termodinâmico foi aplicado inicialmente a alguns cátions flavílios cujos potenciais de redução são conhecidos e estão listados na Tabela 27. Os resultados mostraram que o potencial de redução calculado é menor que o dado experimental em cerca de 0,41 V. Sabe-se que os cálculos de camada aberta, nos quais são empregados dois conjuntos de orbitais moleculares para a descrição do spin eletrônico (um para α e outro para β), possuem um grau de liberdade a mais do que os cálculos de camada fechada, onde apenas um conjunto de orbitais moleculares são utilizados. Os cálculos foram efetuados sem restrições de spin para as espécies radicalares, enquanto que os resultados dos cátions flavílios e bases quinonoidais, nos respectivos estados de oxidação padrão, foram obtidos com camada eletrônica fechada. Como garantia de que a divergência entre o resultado calculado e o valor experimental não era efeito desta diferença no número de graus de liberdade, foram feitos alguns testes com os cátions da Tabela 27, onde todos os termos do ciclo termodinâmico referentes aos cátions flavílios foram calculados sem restrições de spin, de modo análogo às formas radicalares. Os resultados calculados para

os potenciais de redução foram idênticos aos já obtidos anteriormente, o que descarta a hipótese de que as discrepâncias são devidas à forma de como é feita a descrição do spin eletrônico.

A hipótese mais plausível é que esta diferença entre os potenciais de redução experimentais e calculados é resultado da tendência observada da DFT em estabilizar excessivamente sistemas delocalizados, principalmente quando a conjugação se estende por vários anéis aromáticos. O cátion flavílio possui um sistema- π de camada fechada, enquanto que na forma reduzida radicalar a camada eletrônica é aberta. O desvio nos potenciais de redução calculados em relação aos resultados experimentais também foi observado por outros autores. Lewis et al. (2004) e Patterson et al. (2001) verificaram através de cálculos por DFT similares aos efetuados neste estudo (mas com o modelo de solvatação SM5.42R) que o potencial de redução calculado para a descloração de uma série de compostos aromáticos apresentou um desvio sistemático de 0,33 V em relação ao resultado experimental.

Tabela 27: Potenciais de redução experimentais e calculados para os cátions flavílios, em Volts. Os potenciais listados têm como referência o eletrodo padrão de hidrogênio.

Cátion flavílio	E_{exp}	E_{calc}	E_{corr} (E_{calc} + 0,41)
4'-hidroxiflavílio (composto 18)	0,056 ^a	-0,339	0,066
3,7,4'-trihidroxiflavílio	-0,059 ^b	-0,490	-0,085
7-metoxi-4-metilflavílio	-0,079 ^c	-0,454	-0,049
7,4'-dihidroxiflavílio (composto 7)	-0,084 ^d	-0,513	-0,101
3,5,7,4'-tetrahidroxiflavílio	-0,164 ^e	-0,541	-0,136

^{a)} Harper & Chandler (1967b); ^{b)} Harper (1967); ^{c)} Silva et al. (2004); ^{d)} Harper & Chandler (1967a); ^{e)} Harper (1968)

Os potenciais de redução das espécies também foram determinados com as energias de solvatação calculadas através dos modelos SM5.4 e PCM reparametrizado, mas os potenciais determinados não foram satisfatórios. Este resultado não foi

inesperado, uma vez que as formas radicalares têm o número de elétrons diferente da espécie no estado de oxidação usual, resultando em alterações de spin e no tamanho da nuvem eletrônica. Como consequência, é necessário empregar funções de onda para descrever sistemas com número ímpar de elétrons. O modelo SM5.4, da forma como está implementado no pacote Amsol, não efetua cálculos de energias de solvatação para estados dubletos. Com relação ao PCM reparametrizado, seria necessário adequar o tamanho da cavidade do solvente à mudança na nuvem eletrônica. Este ajuste é empírico e a escassez de dados experimentais impede uma análise consistente. Adicionalmente, a inclusão de um elétron provoca a expansão da nuvem eletrônica nos cátions flavílios e torna necessária a correção (também empírica) do raio atômico nas regiões de maior densidade de cargas na molécula.

Na Tabela 28 estão relacionadas as energias livres absolutas calculadas no gás e as energias de solvatação para cada componente do ciclo termodinâmico, além dos potenciais de redução dos sais de flavílio previstos em relação ao potencial do eletrodo de hidrogênio. Na tabela também estão as informações referentes ao cátion flavílio sem substituintes e aos cátions utilizados no teste inicial.

O fato de o cátion flavílio ser carregado positivamente favorece, de certo modo, o processo de formação do radical $HA^\bullet$. A maioria dos potenciais de redução corrigidos dos cátions situa-se entre -0,30 V e 0 V e indica que, apesar da diversidade dos sais de flavílio estudados, não há diferenças significativas no mecanismo pelo qual ocorre a redução. Os resultados indicam que o 2-fenilbenzopirílio e os cátions 18 e 14 devem ser bons agentes oxidantes. Recentemente Silva et al. (2005) mostraram que existe uma relação entre a afinidade eletrônica de cátions flavílios e a constante de complexação com polifenóis, sugerindo a transferência de cargas do co-pigmento para o cátion flavílio. A análise dos dados indica também que as bases quinonoidais são razoavelmente estáveis à oxidação.

Tabela 28: Dados termodinâmicos no vácuo (G_g , ΔG_g^0 , em kcal.mol⁻¹), energias livres de solvatação (ΔG_s^0 , em kcal.mol⁻¹) e potenciais de redução (em Volts) relativos ao eletrodo de hidrogênio, à T = 298,15 K, calculados para uma parte do conjunto estudado de cátions flavílios e bases quinonoidais.

Composto	$G_g(\text{reag})$	$G_g(\text{prod})$	DG_g^0	$DG_s^0(\text{reag})$	$DG_s^0(\text{prod})$	DG_{aq}^0	DG_{total}^a	E_{calc}	E_{corr}^b
$HA^+ + e^- \rightarrow HA^\bullet$									
2	-457008	-457139	-133,859	-46,6	-7,98	-92,5	8,05	-0,349	0,056
3	-600711	-600835	-125,892	-44,5	-10,2	-89,9	10,6	-0,460	-0,055
4	-528864	-528989	-131,099	-46,1	-9,83	-89,2	11,3	-0,492	-0,087
5	-576066	-576192	-124,254	-51,1	-15,0	-89,0	11,5	-0,499	-0,094
6	-647921	-648042	-125,456	-47,0	-13,8	-88,4	12,2	-0,527	-0,122
7	-504218	-504345	-125,113	-52,4	-14,3	-88,7	11,8	-0,513	-0,108
8	-576074	-576196	-121,488	-49,3	-14,4	-87,9	12,7	-0,550	-0,145
9	-623281	-623404	-126,825	-52,5	-17,2	-88,0	12,5	-0,544	-0,139
10	-600732	-600851	-122,794	-48,7	-14,1	-84,3	16,3	-0,706	-0,301
11	-551427	-551552	-123,246	-56,4	-19,1	-87,7	12,9	-0,558	-0,153
12	-673813	-673937	-118,865	-41,0	-8,40	-91,0	9,48	-0,411	-0,006
13	-481669	-481796	-125,009	-44,9	-7,52	-89,7	10,8	-0,467	-0,062

$$^a \Delta G_{total} = \Delta G_{aq}^0 + \Delta G_{NHE}^0 ; ^b E_{corr} = E_{calc} + 0,41 \text{ V}$$

Tabela 28: Continuação.

Composto	G _g (reag)	G _g (prod)	DG ⁰ _g	DG ⁰ _s (reag)	DG ⁰ _s (prod)	DG ⁰ _{aq}	DG _{total} ^a	E _{calc}	E _{corr} ^b
HA ⁺ + e ⁻ → HA [•]									
14	-647194	-647330	-123,592	-51,0	-14,0	-98,5	1,98	-0,086	0,319
16	-553525	-553647	-127,106	-44,5	-9,29	-86,5	14,0	-0,608	-0,203
17	-528880	-529003	-135,485	-50,7	-13,7	-86,1	14,5	-0,628	-0,223
18	-457009	-457139	-121,742	-46,2	-8,43	-92,7	7,81	-0,339	0,066
2-fenilbenzopirílio	-409798	-409932	-133,859	-40,3	-2,22	-95,8	4,77	-0,207	0,198
3,7,4'-trihidroxiflavílio	-551420	-551548	-125,892	-57,8	-19,1	-88,1	12,5	-0,541	-0,136
7-metoxi-4-metilflavílio	-506316	-506441	-125,104	-38,0	-2,94	-90,1	10,5	-0,454	-0,049
3,5,7,4'-tetrahidroxiflavílio	-551420	-551548	-127,879	-57,8	-19,1	-89,2	11,3	-0,490	-0,085
A ^{+•} + e ⁻ → A									
2	-456598	-456764	-166,191	-45,2	-12,4	-133	-32,9	1,428	1,833
13	-481260	-481422	-162,674	-43,0	-13,0	-133	-32,2	1,395	1,800

$$^a \Delta G_{total} = \Delta G_{aq}^0 + \Delta G_{NHE}^0 ; ^b E_{corr} = E_{calc} + 0,41 \text{ V}$$

6-Conclusões

Os processos de hidratação e abertura do anel flavílio e isomerização das chalconas resultantes do abertura do anel têm sido amplamente estudados em meio aquoso para as antocianinas naturais e os sais de flavílio sintéticos. Já os processos inversos, como constantes de velocidade chalcona-hemicetal-cátion flavílio, que podem ser acompanhados por técnicas de relaxação (fotólise por pulso de laser), são pouco conhecidos, bem como as constantes de velocidade protonação/desprotonação entre o cátion flavílio e a base quinonoidal (Maçanita et al., 2002).

A reatividade química e fotoquímica das antocianinas já é relativamente complexa em solução aquosa na ausência de micelas. Além do mais, cada um dos processos químicos e fotoquímicos ocorre numa faixa de tempo distinta, indo desde a transferência de próton no estado excitado da antocianina na escala de tempo de picossegundos até a isomerização das chalconas na escala de minutos a horas. Não é de se estranhar, então, que o número de estudos da reatividade das antocianinas em sistemas organizados é bastante reduzido.

Neste estudo procurou-se compreender os processos que regem o equilíbrio ácido-base e a hidratação do cátion flavílio em ambiente micelar. Estes dois processos exercem um papel central na estabilização da cor em antocianinas. Como a reatividade química das antocianinas é bastante complexa, a seleção de sais de flavílio com estrutura química diferenciada é importante para a redução do número das espécies presentes em solução.

No caso do primeiro sal de flavílio estudado, o 4-carboxi-7-hidroxi-4'-metoxiflavílio (CHMF), por exemplo, não há produtos resultantes da hidratação do cátion, a hidratação do zwitterion é relativamente pequena e não há a formação de trans-chalcona. Foi constatado que o grupo carboxilato tem pouca influência nas propriedades do zwitterion, pois a absorção eletrônica da espécie é semelhante à observada para outros cátions sem substituintes na posição C4, assim como o pK_{a2} em água é análogo ao pK_a de outros compostos. Através de cálculos quânticos foi verificado que as semelhanças do zwitterion do CHMF com outros cátions flavílios devem-se ao fato do grupo COO^- não se encontrar no mesmo plano dos anéis, indicando que a conjugação do grupo com o restante da molécula é pequena.

Os dois grupos ionizáveis do CHMF possuem pK_a s distintos, cujas dinâmicas de protonação/desprotonação são influenciadas pelas micelas de SDS de modos diferentes.

O cátion é estabilizado preferencialmente pelas micelas aniônicas em relação ao zwitterion, que por sua vez é mais favorecido que a base quinonoidal. A estabilização do cátion, que não pode ser atribuída apenas ao aumento da concentração local de prótons na superfície micelar ou mudança de polaridade do meio (Lima et al., 2002), está relacionada com as fortes interações eletrostáticas entre o cátion positivo e a micela carregada negativamente. A base quinonoidal, que no caso específico do CHMF tem carga negativa, é desfavorecida em relação ao zwitterion. Adicionalmente, em SDS praticamente não se observa hidrólise da espécie zwitteriônica.

A reatividade química do CHMF no estado excitado também é afetada pela presença de SDS, como foi verificado nos espectros de fluorescência. Aparentemente, as constantes de desprotonação no estado excitado em SDS são menores que em água e passam a ser concorrentes com os processos de desativação das espécies excitadas. A partir dos pK_a^* s determinados pelo ciclo termodinâmico de Förster e através de cálculos quânticos, foi prevista a existência de uma segunda espécie neutra no estado excitado, a forma AH, que foi confirmada posteriormente pelo grupo do Prof. Maçanita (Paulo et al., 2006).

O íon flavílio e o 4'-metoxiflavílio não possuem grupos fenólicos que possibilitem a formação da base quinonoidal via desprotonação do cátion flavílio. Esta simplificação estrutural permitiu que o foco do estudo fosse direcionado para hidratação do cátion e para as reações subsequentes. A adaptação do espectrofotômetro Diode Array para experimentos de fotólise de relâmpago convencional mostrou-se eficiente no estudo da hidratação de ambos os compostos.

A primeira observação feita é que a inclusão do grupo metoxi na posição C4' estabiliza o cátion flavílio, diminuindo a extensão da hidrólise por meio de transferência de carga para o anel central. O efeito de estabilização do cátion pelo ambiente micelar, verificado pelo aumento do pK_w , é mais pronunciado no 2-fenilbenzopirílio. Os processos cinéticos mostram que a reação de hidratação (k_w) do flavílio sem substituintes diminui 65 vezes em SDS, enquanto que a reação no sentido inverso se mantém dentro da mesma ordem de magnitude. Já no caso do 4'-metoxiflavílio, foi verificado que ambas as constantes de velocidade aumentam, mas a constante de desidratação do hemicetal (k_{-w}) dependente de $[H^+]$, é a mais afetada, aumentando cerca de 15 vezes. Este fato é um indicativo que o pH local é o fator de estabilidade do cátion

flavílio do 4'-metoxiflavílio. Sabe-se que em SDS a concentração de prótons na interface micelar pode ser 80 vezes maior que na fase aquosa (Lima et al. 2002).

Outro ponto abordado neste trabalho foi a utilização de metodologia computacional para a compreensão da reatividade dos sais de flavílio. Os cálculos das transições eletrônicas mostram que a transição HOMO-LUMO é a responsável pela coloração dos compostos. Para os cátions flavílios, mesmo com geometrias otimizadas por métodos semi-empíricos, foi possível obter correlações razoáveis entre as transições calculadas e experimentais. Com o emprego de métodos *ab initio* na otimização houve uma melhoria nos valores calculados. Aparentemente, a base quinonoidal sofre um efeito solvatocrômico mais intenso que o cátion, pois as transições foram determinadas sistematicamente em comprimentos de onda menores que o resultado experimental. Isto é um indicativo de que estão ocorrendo interações soluto-solvente mais complexas do que os termos de solvatação empregados no cálculo foram capazes de descrever.

A densidade do LUMO mostra que, nos estados excitados do cátion e da base, a carga tende a se concentrar no anel central, diminuindo a capacidade dos grupos OH formarem ligações de hidrogênio com o solvente. Por outro lado, solventes polares promoveriam uma maior estabilização do estado fundamental em relação ao estado excitado. Este fenômeno é coerente com os dados experimentais que mostram o deslocamento das transições eletrônicas para o azul com o aumento da polaridade do solvente.

A densidade do LUMO também mostra que os sítios mais prováveis de ocorrer um ataque nucleofílico são as posições C2 e C4, no anel central. O ataque à posição C2 resulta na formação do hemiacetal e posterior abertura do anel central. Na natureza, durante o processo de envelhecimento de vinhos tintos, ocorre a condensação de antocianinas com outros polifenóis presentes no vinho como ácido ferúlico, ácido sinápico e derivados do ácido cinâmico. A reação de condensação ocorre via C4, provavelmente pelo fato do carbono da posição C2 ser protegido estericamente do ataque destes compostos volumosos.

A determinação do pK_a por métodos teóricos é uma importante ferramenta para o estudo da reatividade dos sais de flavílio e desenvolvimento de novos compostos com propriedades específicas. A precisão atingida nos cálculos é comparável à de métodos mais sofisticados que demandam muitos recursos computacionais, e cuja aplicação em sais de flavílio seria inviável devido ao tamanho das moléculas.

Os potenciais de redução mostram que o cátion flavílio é um aceptor de elétrons razoável. A transferência de prótons no estado excitado é um importante mecanismo de dissipação de energia dos sais de flavílio e antocianinas naturais (Lima et al., 2002; Maçanita et al., 2002). Na natureza, as antocianinas formam complexos com co-pigmentos, como flavonóides e polifenóis (Markovic et al., 2003), que são bons doadores de elétrons. Especula-se que o processo de transferência de elétrons do co-pigmento para a antocianina no estado excitado também é um importante mecanismo de dissipação de energia dos compostos e uma forma encontrada pela natureza de preservar os tecidos celulares do excesso de radiação solar.

7-Bibliografia

- 1) Adamamo, C.; Barone, V. (1998) *J. Chem. Phys.*, **108**, 664-675.
- 2) Amic, D.; Baranac, J.; Vukadinovic, V. (1990) *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 936-940.
- 3) Amic, D.; Amic, D. D.; Bešlo, D.; Lucic, B.; Trinajstic, N. (1999) *J. Chem. Inf. Comput.*, **39**, 967-973.
- 4) Amic, D.; Trinajstic, N. (1991) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1991**, 891-895.
- 5) Baranac, J.; Amic, D.; Vukadinovic, V. (1990a) *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 932-936.
- 6) Baranac, J.; Amic, D. (1990b) *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 2111-2115.
- 7) Baranac, J.; Petranovic, N. A.; Markovic, J. M. D. (1997) *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1694-1697.
- 8) Bartness, J. E.; Mallard, W. G.; Linstrom, P. J., Eds., NIST Chemistry Webbook, NIST Standard Reference Database No. 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, disponível de <http://webbook.nist.gov>.
- 9) Bauernschmitt, R.; Ahlrichs, R. (1996) *Chem. Phys. Lett.*, **256**, 454-464.
- 10) Becke, A. D. (1993) *J. Chem. Phys.*, **98**, 5648-5652.
- 11) Bendz, G.; Martensson, O.; Nilsson, E. (1967) *Arkiv För Kemi*, **27**, 65-77.
- 12) Boyd, G. V.; Singer, N. (1965) *Tetrahedron*, **21**, 1263-1276.
- 13) Bridle, P.; Timberlake, C. F. (1997) *Food Chem.*, **58**, 103-109.
- 14) Brouillard, R.; Chahime, J. M. H. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5375-5378.
- 15) Brouillard, R.; Delaporte, B. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8461-8468.
- 16) Brouillard, R.; Delaporte, B.; Dubois, J. E. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 6202-6205.
- 17) Brouillard, R.; Dubois, J. E. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 1359-1364.
- 18) Brouillard, R.; Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Dangles, O. (1997) *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Eds. Tomás-Barberán, F. A.; Robins, R. J., Clarendon Press, Oxford; Chapter 3, pp. 29-49.

- 19) Brouillard, R.; Mazza, G.; Saad, Z.; Gary, A. M. A.; Cheminat, A. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2604-2610.
- 20) Brouillard, R.; Iacobucci, G. A.; Sweeny, J. G. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7585-7590.
- 21) Bunton, C. A.; Nome, F. J.; Quina, F. H.; Romsted, L. S. (1991) *Acc. Chem. Res.*, **24**, 357-364.
- 22) Busch, M. S.; Knapp, E. W. (2004) *ChemPhysChem*, **5**, 1513 –1522.
- 23) Busetta, P. B.; Colleter, J. C.; Gadret, M. (1974) *Acta Cryst. B*, **30**, 1448-1451.
- 24) Chambers, C. C.; Hawkins, G. D.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. (1996) *J. Phys. Chem.*, **100**, 16385-16398.
- 25) Chen, L.; Hrazdina, G. (1981) *Phytochemistry*, **20**, 297-303.
- 26) Cherepy, N. J.; Smestad, G. P.; Grätzel, M.; Zhang, J. Z. (1997) *J. Phys. Chem. B*, **101**, 9342-9351.
- 27) Chermette, H. (1999) *J. Comput. Chem.*, **20**, 129-154.
- 28) Cossi, M.; Barone, V. (2001) *J. Chem. Phys.*, **115**, 4708-4717.
- 29) Costa, C. T.; Horton, D.; Margolis, S. A. (2000) *J. Chromatogr. A*, **881**, 403-410.
- 30) Costantino, L.; Rastelli, G.; Rossi, M. C.; Albasini, A. (1995) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1995**, 227-234.
- 31) Curtright, R. D.; Rynearson, J. A.; Markwell, J. (1994) *J. Chem. Educ.*, **71**, 682-684.
- 32) Czerney, P.; Graneß, G.; Birckner, E.; Vollmer, F.; Rettig, W. (1995) *J. Photochem. Photobiol. A*, **89**, 31-36.
- 33) Dai, Q.; Rabani, J. (2001) *Chem. Comm.*, **2001**, 2142-2143.
- 34) Dai, Q.; Rabani, J. (2002) *J. Photochem. Photobiol. A*, **148**, 17-24.
- 35) Dangles, O.; Brouillard, R. (1992) *Can. J. Chem.*, **70**, 2174-2189.
- 36) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. (1985) *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902-3909.
- 37) Duarte, H. A. (2001) *Quím. Nova*, **24**, 501-508.

- 38) El Hajji, H.; Dangles, O.; Figueiredo, P.; Brouillard, R. (1997) *Helv. Chim. Acta*, **80**, 398-413.
- 39) Fendler, J. H. (1982) *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley: New York.
- 40) Figueiredo, P. (1994) *Tese de Doutorado*, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa.
- 41) Figueiredo, P.; Lima, J. C.; Santos, H.; Wigand, M. C.; Brouillard, R.; Maçanita, A. L.; Pina, F. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1249-1254.
- 42) Foresman, J. B.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A.; Frisch, M. J. (1992) *J. Phys. Chem.*, **96**, 135-149.
- 43) Frisch, Æ.; Frisch, M. J.; Trucks, G. W. (2003) *Gaussian 03 User's Reference*, Gaussian Inc., Carnegie.
- 44) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A., *Gaussian 03*, revision B.04, Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 2005.
- 45) Furtado, P.; Figueiredo, P.; Neves, H. C.; Pina, F. (1993) *J. Photochem. Photobiol. A*, **75**, 113-118.
- 46) Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. (2003) *Chem. Rev.*, **103**, 1793-1873.

- 47) Giestas, L.; Yihwa, C.; Lima, J. C.; Giongo, C. V.; Lopes, A.; Maçanita, A. L.; Quina, F. H. (2003) *J. Phys. Chem. A*, **107**, 3263-3269.
- 48) Giongo, C. V.; Yihwa, C.; Moreira Jr., P. F.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Alves, M.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. (2002) *Langmuir*, **18**, 10109-10115.
- 49) Goto, T.; Kondo, T. (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 17-33.
- 50) Gottlieb, O. (1980) *Micromolecular Evolution, Systematics And Ecology*, Springer, Berlin, 142-148.
- 51) Grozema, F. C.; Telesca, R.; Jonkman, H. T.; Snijders, J. G. (2001) *J. Chem. Phys.*, **115** (21), 10014-10021.
- 52) Harborne, J. C.; Williams, C. A. (2000) *Phytochemistry*, **55**, 481-504.
- 53) Harper, K. A. (1967) *Aust. J. Chem.*, **20**, 691-700.
- 54) Harper, K. A. (1968) *Aust. J. Chem.*, **21**, 221-227.
- 55) Harper, K. A.; Chandler, B. V. (1967a) *Aust. J. Chem.*, **20**, 731-744.
- 56) Harper, K. A.; Chandler, B. V. (1967b) *Aust. J. Chem.*, **20**, 745-756.
- 57) Harris, D. C.; Bertolucci, M. D. (1989) *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*, Dover Publications Inc., New York.
- 58) Haucke, G.; Czerney, P.; Igney, C.; Hartmann, H. (1989) *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **93**, 805-815.
- 59) Haucke, G.; Czerney, P.; Steen, D.; Rettig, W.; Hartmann, H. (1993) *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **97**, 561-570.
- 60) Hawkins, G. D.; Giesen, D. J.; Lynch, G. C.; Chambers, C. C.; Rossi, I.; Storer, J. W.; Li, J.; Winget, P.; Rinaldi, D.; Liotard, D. A.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. (1999) AMSOL-version 6.6.
- 61) Hill, D. W. (1936) *Chem. Rev.*, **19**, 27-54.
- 62) Hill, T. L. (1960) *An Introducton To Statistical Thermodynamics*, Dover Publications Inc., New York, Chapters 8-9.
- 63) Horiuchi, H.; Yokawa, A.; Okutsu, T.; Hiratsuka, H. (1999) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 2429-2435.

- 64) Hoshino, T. (1991) *Phytochemistry*, **30**, 2049-2055.
- 65) Hoshino, T. (1992) *Phytochemistry*, **31**, 647-653.
- 66) Hoshino, T.; Matsumoto, U.; Goto, T. (1981) *Phytochemistry*, **20**, 1971-1976.
- 67) Houbiers, C.; Lima, J. C.; Maçanita, A. L.; Santos, H. (1998) *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3578-3585.
- 68) Jacquemin, D.; Preat, J.; Charlot, M.; Wathélet, V.; André, J. M.; Perpète, E. A. (2004) *J. Chem. Phys.*, **121**, 1736-1743.
- 69) Jurd, L. (1963a) *J. Org. Chem.*, **28**, 987-991.
- 70) Jurd, L. (1963b) *J. Org. Chem.*, **28**, 2394-2397.
- 71) Jurd, L. (1966) *United States Patent* 3.266.903.
- 72) Jurd, L. (1967a) *United States Patent* 3.301.683.
- 73) Jurd, L. (1967b) *United States Patent* 3.314.975.
- 74) Kalyanasundaram, K. (1987) *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*, Academic Press, Orlando.
- 75) Kim, S. J.; Cho, Y. H.; Park, W.; Han, D.; Chai, C. H.; Imm, J. Y. (2003) *J. Agric. Food. Chem.*, **51**, 7805-7809.
- 76) Klamt, A.; Eckert, F.; Diedenhofen, M. (2003) *J. Phys. Chem. A*, **107**, 9380-9386.
- 77) Kurtin, W. E.; Song, P. S. (1967) *Tetrahedron*, **24**, 2255-2267.
- 78) Lewis, A.; Bumpus, J. A.; Truhlar, D. G.; Cramer, C. J. (2004) *J. Chem. Educ.*, **81** (4), 596-604.
- 79) Lietz, H.; Haucke, G.; Czerney, P.; John, B. (1996) *J. Prakt. Chem.*, **338**, 725-730.
- 80) Lima, J. C. (1996) *Tese de Douturamento*, Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa.
- 81) Lima, J. C.; Abreu, I.; Brouillard, R.; Macanita, A. L. (1998) *Chem. Phys. Letters*, **298**, 189-195.
- 82) Lima, J. C.; Danesh, P.; Figueiredo, P.; Pina, F. S.; Maçanita, A. L. (1994) *Photochem. Photobiol.*, **59**, 412-418.

- 83) Lima, J. C.; Giongo, C. V.; Lopes, A.; Melo, E.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. (2002) *J. Phys. Chem. A*, **106**, 5851-5859.
- 84) Liptak, M. D.; Shields, G. C. (2001) *Int. J. Quantum Chem.*, **85**, 727-741.
- 85) Maçanita, A. L.; Moreira Jr, P. F.; Lima, J. C.; Quina, F. H.; Yihwa, C.; Giongo, C. V. (2002) *J. Phys. Chem. A*, **106**, 1248-1255.
- 86) Maçanita, A. L.; Pina, F.; Lima, J. C. (1997) *Boletim de Biotecnologia*, **60**, 4-13.
- 87) Maestri, M.; Pina, F.; Roque, A.; Passaniti, P. (2000) *J. Photochem. Photobiol. A*, **137**, 21-28.
- 88) Manfredi, K. P.; McGrew, L. A. (1996) *J. Chem. Educ.*, **73**, A124-A126.
- 89) March, J. (1985) *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, Chapter 8.
- 90) Markovic, J. M.; Ignjatovic, L. M.; Markovic, D. A.; Baranac, J. M. (2003) *J. Electroanalytical Chem.*, **553**, 169-175.
- 91) Martensson, O. (1970) *Acta Chem. Scand.*, **24**, 3417-3418.
- 92) Martensson, O.; Warren, C. H. (1970) *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2745-2750.
- 93) Matsushima, R.; Mizuno, H.; Itoh, H. (1995) *J. Photochem. Photobiol. A*, **89**, 251-256.
- 94) Matsushima, R.; Murakami, T. (2000) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **73**, 2215-2219.
- 95) Matsushima, R.; Nishimura, N.; Goto, K.; Kohno, Y. (2003) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 1279-1283.
- 96) Matsushima, R.; Ogiue, A.; Fujimoto, S. (2000) *Chem. Lett.*, **2000**, 590-591.
- 97) Matsushima, R.; Okuda, H.; Aida, M.; Ogiue, A. (2001) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 2295-2301.
- 98) Matsushima, R.; Suzuki, N.; Murakami, T.; Morioka, M. (1997) *J. Photochem. Photobiol. A*, **109**, 91-94.
- 99) Mazza, G.; Brouillard, R. (1987) *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 422-426.
- 100) McClelland, R. A.; Gedge, S. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5838-5848.
- 101) McClelland, R. A.; Gedge, S. (1982) *J. Org. Chem.*, **47**, 3730-3736.

- 102) Melo, M. J.; Moncada, M. C.; Pina, F. (2000) *Tetrahedron Lett.*, **41**, 1987-1991.
- 103) Mennucci, B.; Cammi, R.; Tomasi, J. (1998) *J. Chem. Phys.*, **109**, 2798-2807.
- 104) Meyer, M. (2000) *Int. J. Quantum Chem.*, **76**, 724-732.
- 105) Moreira Jr., P. F.; Giestas, L.; Yihwa, C.; Giongo, C. V.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L.; Lima, J. C. (2003) *J. Phys. Chem. A*, **107**, 4203-4210.
- 106) Mulder, W. H. (2003) *J. Photochem. Photobiol. A*, **161**, 21-25.
- 107) Nilsson, E. (1969) *Arkiv För Kemi*, **31**, 111-119.
- 108) Ochterski, J. W. (2000) *Termochemistry in Gaussian*, 1-19, Gaussian Inc., disponível em <http://www.gaussian.com>.
- 109) Parac, M.; Grimme, S. (2003) *Chem. Phys.*, **292**, 11-21.
- 110) Parr, G. R.; Yang, W. (1989) *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York.
- 111) Parr, R. G.; Pearson, R. G. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 7512-7516.
- 112) Patterson, E. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2025-2031.
- 113) Paulo, L.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. (2006) *J. Phys. Chem. B*, no prelo.
- 114) Pearson, R. G. (1987) *J. Chem. Educ.*, **64**, 561-567.
- 115) Pereira, G. K.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E. (1996) *J. Mol. Struct. Theochem*, **363**, 87-96.
- 116) Pereira, G. K.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E. (1997) *J. Mol. Struct. Theochem*, **392**, 169-179.
- 117) Pereira, G. K.; Galembeck, S. E. (1998) *Spectrochim. Acta A*, **54**, 339-348.
- 118) Perkin, W. H.; Robinson, R. (1908) *J. Chem. Soc.*, **93**, 1085-1115.
- 119) Peruzzo, P. J.; Marino, D. J. G.; Castro, E. A.; Toropov, A. A. (2001) *J. Mol. Struct. Theochem*, **572**, 53-60.
- 120) Pina, F. (1998a) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 2109-2116.
- 121) Pina, F. (1998b) *J. Photochem. Photobiol. A*, **117**, 51-59.

- 122) Pina, F.; Benedito, L.; Melo, M. J.; Parola, A. J.; Bernardo, A. (1996) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **92**, 1693-1699.
- 123) Pina, F.; Benedito, L.; Melo, M. J.; Parola, A. J.; Lima, J. C.; Maçanita, A. L. (1997a) *Anal. Quím. Int. Ed.*, **93**, 111-118.
- 124) Pina, F.; Maestri, M.; Balzani, V. (1999b) *Chem. Comm.*, **1999**, 107-114.
- 125) Pina, F.; Melo, M. J.; Alves, S.; Ballardini, R.; Maestri, M.; Passaniti, P. (2001) *New J. Chem.*, **25**, 747-752.
- 126) Pina, F.; Melo, M. J.; Ballardini, R.; Flamigni, L.; Maestri, M. (1997b) *New J. Chem.*, **21**, 969-976.
- 127) Pina, F.; Melo, M. J.; Maestri, M.; Ballardini, R.; Passaniti, P.; Camaioni, N.; Balzani, V. (1999a) *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 3199-3207.
- 128) Pina, F.; Melo, M. J.; Maestri, M.; Ballardini, R.; Balzani, V. (1997c) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 5556-5561.
- 129) Pina, F.; Melo, M. J.; Parola, A. J.; Maestri, M.; Balzani, V. (1998a) *Chem.-Eur. J.*, **4**, 2001-2007.
- 130) Pina, F.; Melo, M. J.; Santos, H.; Lima, J. C.; Abreu, I.; Ballardini, R.; Maestri, M. (1998b) *New J. Chem.*, **22**, 1093-1098.
- 131) Pina, F.; Roque, A. (1998) *J. Photochem. Photobiol. A*, **114**, 59-64.
- 132) Pliego, J. R.; Riveros, J. M. (2002) *J. Phys. Chem. A*, **106**, 7434-7439.
- 133) Quina, F. H.; Alonso, E. O.; Farah., J. P. S. (1995b) *J. Phys. Chem.*, **99**, 6770-6774.
- 134) Quina, F. H.; Bales, B. L.; Nassar P. M.; Bonilha, J. B. S. (1995a) *J. Phys. Chem.*, **99**, 17028-17031.
- 135) Ranganathan, R.; Okano, L. T.; Yihwa, C.; Alonso, E. O.; Quina, F. H. (1999), *J. Phys. Chem. B*, **103**, 1977-1981.
- 136) Rohatgi-Mukherjee, K. K. (1978) *Fundamentals of Photochemistry*, New Age International Publishers, New Delhi.
- 137) Roque, A.; Lodeiro, C.; Pina, F.; Maestri, M.; Dumas, S.; Passaniti, P.; Balzani, V. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 987-994.

- 138) Roque, A.; Pina, F.; Alves, S.; Ballardini, R.; Maestri, M.; Balzani, V. (1999) *J. Mater. Chem.*, **9**, 2265-2269.
- 139) Roshal, A. D.; Minayev, D. Y.; Pedash, Y. F.; Novikov, A. I. (2002) *Polish J. Chem.*, **76**, 1301-1321.
- 140) Saracino, G. A. A.; Improta, R.; Barone, V. (2003) *Chem. Phys. Lett.*, **373**, 411-415.
- 141) Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. (2000) *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **14**, 123-134.
- 142) Schulman, S. G. (1976) In: *Modern Fluorescence Spectroscopy*, vol. 2, Ed. E. L. Wehry, Plenum Press, New York, 239-275.
- 143) Sepúlveda, L.; Lissi, E.; Quina, F. H. (1986) *Adv. Colloid Interface Sci.*, **25**, 1-57.
- 144) Shibata, K., Shibata, Y.; Kasiwagi, I. (1919) *J. Am. Chem. Soc.*, **41**, 208-220.
- 145) Shimizu, K.; Freitas, A. A.; Dias, L. G. (2005) *J. Phys. Chem. A*, **109**, 11322-11327.
- 146) Silva, P. F.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Maçanita, A. L.; Quina, F. H. (2005) *J. Phys. Chem. A*, **109**, 7329-7338.
- 147) Silva, P. F.; Lima, J. C.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. (2004) *J. Phys. Chem. A*, **108**, 10133-10140.
- 148) Singer, N.; Whittington, P. R.; Boyd, G. V. (1970) *Tetrahedron*, **26**, 3731-3748.
- 149) Steinfeld, J. I.; Francisco, J. S.; Hase, W. L. (1989) *Chemical Kinetics and Dynamics*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- 150) Stoeckel, C. R.; Gonzalez, E.; Fougèrouse, A.; Brouillard, R. (2001) *Can. J. Chem.*, **79**, 1173-1178.
- 151) Stratmann, R. E.; Scuseria, G. E.; Frish, M. J. (1998) *J. Chem. Phys.*, **109**, 8218-8224.
- 152) Sweeny, J. G.; Iacobucci, G. A. (1983) *J. Agric. Food. Chem.*, **31**, 531-533.
- 153) Sweeny, J. G.; Iacobucci, G. A. (1981) *Mutat. Res.*, **82**, 275-283.
- 154) Timberlake, C. F.; Bridle, P. (1967) *J. Sci. Fd. Agric.*, **18**, 473-478.

- 155) Torskangerpoll, K.; Børve, K. J.; Andersen, O. M.; Sæthre, L. J. (1999) *Spectrochim. Acta A*, **55**, 761-771.
- 156) Toth, A. M.; Liptak, M. D.; Phillips, D. L.; Shields, G. C. (2001) *J. Chem. Phys.*, **114**, 4595-4606.
- 157) Ueno, K; Saito, N. (1977a) *Acta Cryst. B*, **33**, 111-113.
- 158) Ueno, K; Saito, N. (1977b) *Acta Cryst. B*, **33**, 114-116.
- 159) Vargas, F. D.; Jiménez, A. R.; López, O. P. (2000) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **40**, 173-289.
- 160) Venkatachalapathy, B.; Ramamurthy, B. P.; Ramakrishnan, V. T. (1997) *J. Photochem. Photobiol. A*, **111**, 163-169.
- 161) Whitting, D. (2001) *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 583-606.
- 162) Woodford, J. N. (2005) *Chem. Phys. Lett.*, **410**, 182-187.
- 163) Yoshida, K.; Kato, Y. T.; Kameda, K.; Kondo, T. (2003) *Plant. Cell. Physiol.*, **44**, 262-268.
- 164) Zerner, M. C.; Loew, G. H.; Kirchner, R. F.; Westerhoff, U. T. M. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 589-599.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nome: Adilson Alves de Freitas

Filiação: João Caldeira de Freitas e Glória Alves de Freitas

Nascimento: 11/09/1974, São Paulo – SP – Brasil

Educação

Ensino Médio

E. E. S. G. Albino César, São Paulo, SP, 1991

Ensino Superior

Instituto de Química – Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil

Bacharelado em Química, 1998

Instituto de Química – Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil

Mestre em Físico-Química, 2001

Título da Dissertação: Estudos de Incorporação de Solutos Não-Iônicos em Micelas de Detergentes Zwitteriônicos.

Instituto de Química – Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil

Doutor em Físico-Química, 2005

Título do Trabalho: Reatividade Química e Fotoquímica de Antocianinas em Sistemas Organizados.

Publicações

- 1) Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Dias, L. G.; Quina, F. H. (2006) “A Computational Study of Substituted Flavylum Salts and their Quinonoidal Conjugate-Bases: $S_0 \rightarrow S_1$ Electronic Transition and Absolute pK_a Calculations by DFT and Semiempirical Methods”, *J. Phys. Chem. A*, submetido.

- 2) Paulo, L.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. (2006) "Novel Ground and Excited State Prototropic Reactivity of a Carboxy-Substituted Hydroxyflavylium Salt", *J. Phys. Chem. B*, no prelo.
- 3) Shimizu, K.; Freitas, A. A.; Dias, L. G. (2005) "Predicting Hydration Free Energies of Neutral Compounds by a New Parameterization of the Polarisable Continuum Model", *J. Phys. Chem. A*, **109**, 11322-11327.
- 4) Silva, P. F.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Maçanita, A. L.; Quina, F. H. (2005) "Charge-Transfer Complexation as a General Phenomenon in the Copigmentation of Anthocyanins", *J. Phys. Chem. A*, **109**, 7329-7338.
- 5) Giongo, C. V.; Yihwa, C.; Moreira Jr., P. F.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Alves, M.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. (2002) "Manipulation of the Reactivity of a Synthetic Anthocyanin Analogue in Aqueous Micellar Media", *Langmuir*, **18**, 10109-10115.
- 6) Melo, E.; Freitas, A. A.; Yihwa, C.; Quina, F. H. (2001) "On the Significance of the Solubilization Power of Detergents", *Langmuir*, **17**, 7980-7981.
- 7) Freitas, A. A.; Quina, F. H.; Carroll, F. A. (2000) "A Linear Free Energy Analysis of the Surface Tension of Organic Liquids", *Langmuir*, **16**, 6689-6692.
- 8) Freitas, A. A.; Quina, F. H.; Carroll, F. A. (1997) "Estimation Of Water-Organic Interfacial Tensions. A Linear Free Energy Relationship Analysis Of Interfacial Adhesion", *J. Phys. Chem. B*, **101**, 7488 – 7493.
- 9) Farah, J. P. S.; Alonso, E. O.; Leiva, O. W.; Rodrigues, M.; Freitas, A. A.; Quina, F. H. (1995) "Why Do Organic Molecules Solubilize in Micelles?", *Atualidades de Físico-Química Orgânica – 1995*.

Comunicações em Reuniões Científicas

- 1) Paulo, L.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L., *Novel Ground and Excited State Prototropic Reactivity of a Hydroxycarboxyflavylium Salt*, 9th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence – Spectroscopy, Imaging and Probes, 2005, Lisboa, Portugal.
- 2) Freitas, A. A.; Quina, F. H., *Proton Transfer Dynamics In A Synthetic Anthocyanin Analog*, 7^a Conferência Latinoamericana de Físico-Química Orgânica, 2003, Florianópolis, SC.

- 3) Quina, F. H.; Alves, M.; Moreira Jr., P. F.; Yihwa, C.; Freitas, A. A.; Lima, J. C.; Maçanita, A. L., *On The Origin Of Micellar Effects On Acid-Base Equilibria*, 7^a Conferência Latinoamericana de Fisico-Química Orgânica, 2003, Florianópolis, SC.
- 4) Quina, F. H.; Moreira Jr., P. F.; Yihwa, C.; Alves, M.; Freitas, A. A.; Vautier-Giongo, C.; Giestas, L.; Lima, J. C.; Maçanita, A. L., *Dynamics Of Ground And Excited State Protonation Equilibria Of Anthocyanins In Micellar Media*, VII Encuentro Latinoamericano De Fotoquímica Y Fotobiología, 2002, Viña del Mar, Chile.
- 5) Quina, F. H.; Freitas, A. A.; Waissbluth O. L.; Morales M., *Solubilization In Detergent-Polymer Aggregates*, 4^a Conferência Latinoamericana de Fisico-Química Orgânica, 1998, Florianópolis, SC.
- 6) Freitas, A. A.; Quina, F. H.; Carrol, F., *Relação Entre Estrutura Química de Moléculas Orgânicas e Sua Tensão Superficial*, 14^a Semana da Química Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara - IQ-USP, 1997, São Paulo, SP.
- 7) Freitas, A. A.; Carroll, F.; Quina, F. H., *Relação Entre Estrutura Química de Moléculas Orgânicas e Sua Tensão Interfacial com Água*, 5^o Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 1997, São Paulo, SP.
- 8) Freitas, A. A.; Quina, F. H.; Carroll, F., *Relação Entre Estrutura Química de Moléculas Orgânicas e Sua Tensão Interfacial com Água*, 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1997, Poços de Caldas, MG.
- 9) Freitas, A. A.; Carroll, F.; Quina, F. H., *Relação Entre Estrutura Química de Moléculas Orgânicas e Sua Tensão Interfacial com Água*, 4^o Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 1996, São Carlos, SP.
- 10) Freitas, A. A.; Quina, F. H., *Relação Entre Estrutura Química de Moléculas Orgânicas e Sua Tensão Interfacial com Água*, 13^a Semana da Química Professor Henrique Eisi Toma - IQ-USP, 1996, São Paulo, SP.
- 11) Freitas, A. A.; Farah, J. P. S.; Moreira Júnior, P. F.; Waissbluth, O. L.; Quina, F. H., *Solubilization of Organic Molecules by Detergents and by Polymer-Detergent Complexes*, 8th Inter-American Photochemical Society Conference, 1996, Foz do Iguaçu, PR.
- 12) Farah, J. P. S.; Alonso, E. O.; Rodrigues, M. A.; Waissbluth, O. L.; Freitas, A. A.; Quina, F. H., *Why do Molecules Solubilize in Micelles?*, Symposium on Ordered Media and Analytical Chemistry: A Successful Marriage?, American Chemical

Society - International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 1995, Honolulu, Hawaii, USA.

- 13) Freitas, A. A.; Quina, F. H.; Waissbluth, O. L., *Incorporação de Solutos em Solução Micelar de Detergentes Zwitteriônicos*, 3º Simpósio de Iniciação Científica, 1995, São Carlos, SP.
- 14) Farah, J. P. S.; Alonso, E. O.; Rodrigues, M. A.; Waissbluth, O. L.; Freitas, A. A.; Lima, G. A. R.; Quina, F. H., *Estrutura Molecular e Solubilização em Agregados de Tensoativos*, Academia Brasileira de Ciências, Sessão regular realizada no IQ-USP, 15/08/1995, São Paulo, SP.
- 15) Farah, J. P. S.; Alonso, E. O.; Rodrigues, M. A.; Waissbluth, O. L.; Freitas, A. A.; Quina, F. H., *Why do Organic Molecules Solubilize in Micelles?*, 3ª Conferência Latinoamericana de Físico-Química Orgânica, 1995, Florianópolis, SC.
- 16) Waissbluth, O. L.; Quina, F. H.; Freitas, A. A.; Okano, L. T.; Rodrigues, M. A., *Determinação da Constante de Incorporação Por Meio da Supressão de Fluorescência em Soluções Contendo Complexos SDS-PEG*, 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1995, Caxambú, MG.
- 17) Freitas, A. A.; Leiva, O. W.; Quina, F. H., *Incorporação de Solutos em Solução Micelar*, 2º Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 1994, São Paulo, SP.
- 18) Farah, J. P. S.; Alonso, E. O.; Waissbluth, O. L.; Rodrigues, M. A.; Freitas, A. A.; Quina, F. H., *Using Linear Solvation Free Energy Relationships to Understand Solubilization in Organized Media*, 2nd Workshop on Chemical Structure and Biological Activity, 1994, São Paulo, SP.
- 19) Waissbluth, O. L.; Freitas, A. A.; Quina, F. H., *Comparação de Micelas de Dodecil Sulfato de Sódio e Complexos de Dodecil Sulfato de Sódio-Polietilenoglicol Como Fase Móvel em Cromatografia Líquida*, 17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1994, Caxambú, MG.