BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20631
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo da dinâmica de equilíbrio ácido-base de
Antocianinas

Paulo Firmino Moreira Jr.
Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Frank Herbert Quina

São Paulo
07/07/2003

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005727

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Moreira Junior, Paulo Firmino

M838e Estudo da dinâmica de equilíbrio ácido-base de antocianinas
/ Paulo Firmino Moreira Junior. -- São Paulo, 2003.
130p.

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

1. Fotoquímica : Físico química : Orgânica 2. Flavonóide :
Produtos naturais I. T. II. Quina, Frank Herbert, orientador.

547.135 CDD

*“Estudo da dinâmica de equilíbrio ácido-
base de antocianinas”*

PAULO FIRMINO MOREIRA JUNIOR

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: Química Orgânica

Aprovado por:

Prof. Dr. FRANK HERBERT QUINA
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE CATALANI
IQ – USP

Profa. Dra. DENISE FREITAS SIQUEIRA PETRI
IQ – USP

Prof. Dr. MIGUEL GUILLERMO NEUMANN
IQSC – USP

Prof. Dr. MARCELO HENRIQUE GEHLEN
IQSC - USP

SÃO PAULO
10 DE SETEMBRO 2003.

A minha esposa Vilma

A minha filha Sophia

Agradecimentos

Ao Prof. Frank pela paciência e dedicação que dispensou durante todos esses anos de convivência harmoniosa.

Aos colegas do grupo: Adilson, André, Celize, Celso, Chang, Débora, Enio, Flávio, Isabel, Prof^{ra}. Laura, Maria Fernanda e Marilene, que sempre souberam manter o espírito de companheirismo e cooperação.

Aos alunos de Mestrado, Doutorado e Iniciação Científica do Instituto de Química.

Aos Professores, Maçanita e João Carlos de Portugal que forneceram amostras de antocianinas e muita colaboração para que esse trabalho fosse possível.

Aos Professores(as) do Instituto de Química, Omar, Riveros, Márcia, Denise, Regina, Helena Ferraz, Borin, Farah, Vicente, Jivaldo, Gianluca, Bechara, entre outros, que colaboraram de alguma forma com informações reagentes e conhecimentos.

A Carolina, Pós Doc, que passou por nosso grupo e que ajudou de sobremaneira para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química, de todos os departamentos que fazem o trabalho invisível, mas super importante que é fazer a máquina funcionar.

A comunidade Linux, que permitiu elaborar esse trabalho sem gastar um centavo do dinheiro público, sem travamentos, sem vírus, sem *OutLook*.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

Ao PADCT-FINEP e à FAPESP pelo auxílio financeiro à pesquisa do grupo.

Índice

Símbolos e abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
I. Introdução	1
I.1. Antocianinas nas maçãs	6
I.2. Antocianinas no vinho	6
I.3. Propriedades farmacológicas das antocianinas	7
I.4. Química das antocianinas	8
I.4.1. Sistema multi-equilíbrio	8
I.4.2. Cor sensível ao pH	10
I.4.3. Antocianinas e a co-pigmentação	11
I.4.4. Sensibilidade das antocianinas aos nucleófilos e metais	13
II. Objetivos	14
III. Parte experimental	15
III.1. Materiais	15
III.2. Medidas de fotólise por pulso de laser	16
III.2.1. Preparação das amostras para a obtenção das curvas de transientes em função do pH	16
III.2.1.1. Fotólise por pulso de Laser e transientes de absorção em diferentes pHs	16
III.2.2. Obtenção do tempo de vida (τ) a partir dos transientes	18
III.2.3. Obtenção do espectro de absorção do transiente	19

III.2.4. Espectros de Absorção e Especiação das Antocianinas em função do pH	20
IV. Resultados	24
IV.1.2.0. HMF em dodecilsulfato de sódio (SDS)	29
IV.1.2.1. Espectro de absorção do HMF com a variação do pH e especiação em soluções contendo SDS	29
IV.1.2.2. Fotólise por pulso de laser do HMF em SDS	32
IV.1.3. HMF em cloreto de hexadeciltrimetilamônio (CTACl)	33
IV.1.3.1. Salto de concentração de detergente (CTACl) em soluções de HMF	33
IV.1.3.2. Espectro de absorção do HMF com a variação do pH e especiação em soluções contendo CTACl	39
IV.1.3.3. Fotólise por pulso de laser de HMF em solução micelar de CTACl	41
IV.1.4. HMF em presença de Triton X-100	43
IV.1.4.1. Salto de concentração de detergente (Triton X-100) em soluções de HMF	43
IV.1.4.3. Efeito da variação do pH sobre a curva de transiente de absorção do HMF em Triton X-100	46
IV.1.5. HMF em presença de Brij 35	47
IV.1.5.1. Salto de concentração de detergente em soluções de HMF em Brij 35	47
IV.1.5.2. HMF e a recuperação após o salto de concentração de detergente Brij 35	58
IV.1.5.3. Salto de concentração com misturas de detergentes Brij 35 e CTACl em soluções de HMF	59
IV.2. Estudos com o 4',7-dihidroxiavílio (DHF) em meio aquoso	66
IV.2.1. Espectro de absorção do DHF com a variação do pH e especiação	66
IV.2.2. Fotólise por pulso de laser do DHF em meio aquoso	69
IV.2.2.1. Espectro de absorção do transiente para o DHF em meio aquoso	70
IV.3. Estudos com a Malvidina 3-glucosídeo (Oenina)	71
IV.3.1. Oenina em meio aquoso	71

IV.3.1.1. Variação temporal do espectro UV-Vis da Malvidina 3-glucosídeo (Oenina) em água	71
IV.3.1.2. Fotólise por pulso de laser da Oenina em meio aquoso	76
IV.3.2. Oenina em solução micelar de SDS	79
IV.3.2.1. Espectro UV-Vis ao longo do tempo da Oenina em presença de SDS	79
IV.3.2.2. Fotólise por pulso de laser da Oenina em solução contendo SDS	95
IV.4. Estudos da Pelargonina em meio aquoso	96
IV.4.1. Fotólise por pulso de laser da Pelargonina em meio aquoso	96
IV.5. Estudos da Cianina em meio aquoso	99
IV.5.1. Fotólise por pulso de laser da Cianina em meio aquoso	99
IV.6. Fotólise por pulso de laser da Malvina em meio aquoso	101
V. Discussão	103
V.1. Método	103
V.2. Comprovação do deslocamento do equilíbrio ácido-base do estado fundamental	105
V.3. Transientes de absorção em pHs diferentes	105
V.4. Aplicação do Método	107
V.5 Transferência de próton no estado fundamental em meio aquoso	111
V.6. A dinâmica do equilíbrio ácido-base no estado fundamental em solução aquosa	112
V.7. A dinâmica do equilíbrio ácido-base em SDS	114
V.8. Manipulação da reatividade do HMF	116
V.9. Cinética após saltos de concentração de detergente e pH	118
V.I. Conclusão	122
VII Referências Bibliografica	123

Índice de Figuras

Figura: I.1.	Cátion flavílio	2
Figura: I.2.	Equilíbrios químicos da antocianina natural oenina e, por extensão, da grande maioria das antocianinas naturais ou sintéticas.	9
Figura I.3.	A esquerda, hortênsia de coloração rosada plantada em solo ácido e a direita, hortênsia de coloração azul, plantada em solo alcalino.	10
Figura I.4.	Co-pigmento de antocianina proveniente da liliácea Africana de cor azul.	12
Figura III.1.	Fração molar das espécies envolvidas no equilíbrio ácido-base do HMF em meio aquoso em tampão fosfato 25 mM em função do pH	25
Figura IV.1.	Espectro de absorção do HMF em meio aquoso nos pHs 1,3; 3,0; 4,4; 4,9 e 6,9 após a adição de base	25
Figura IV.2.	Transientes de absorção do HMF em função do pH, com excitação por pulso de laser em 355 nm e comprimento de onda de monitoramento em 470 nm.	26
Figura IV.3.	Gráfico de $k_{obs} = (1 / \tau)$ em função da concentração de prótons $[H^+]$ para o HMF em meio aquoso.	28
Figura IV.4.	Curvas de decaimento do transiente de absorção para cada comprimento de onda do HMF em água a pH = 4,00.	28
Figura IV.5.	Espectro de absorção do transiente do HMF em meio aquoso em tempo zero, gerado pela excitação do pulso de laser em 355 nm, de 5 ns de duração.	29
Figura IV.6.	Espectros de absorção do HMF em presença de SDS 0,10 M nos pHs: 1,00; 2,65; 5,30; 6,30; 6,75; 7,05; 8,20 e 9,20.	30
Figura IV.7.	Espectro de absorção do HMF em pH 10,0 na ausência de detergente 10 segundos e 24 horas após a adição de SDS 0,10 M.	31
Figura IV.8.	Especiação do HMF em meio contendo SDS 0,10 M.	31
Figura IV.9.	Gráfico de k_{obs} em função da concentração de prótons na fase aquosa intermicelar $[H^+]_{aq}$ para o HMF em meio contendo SDS 0,10 M.	33
Figura IV.10.	Espectros de absorção UV-Vis ao longo do tempo de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) no pH = 7,27 termostatizado em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.	34
Figura IV.11.	Decaimentos das absorbâncias, desde o tempo zero, nos comprimentos de onda: 276, 316, 356 e 478 nm relativo aos espectros da Figura IV.10.	35
Figura IV.12.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 5,43.	35
Figura IV.13.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 5,80	36

Figura IV.14.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 6,47.	36
Figura IV.15.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 7,02.	37
Figura IV.16.:	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 7,27.	37
Figura IV.17.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 7,67.	38
Figura IV.18.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm (banda da base A) para soluções de HMF nos pHs: 5,43; 5,80; 6,47; 7,02; 7,27 e 7,67 em presença de CTACl 0,10 M.	38
Figura IV.19.	Gráfico de $\log(k_{obs})$ versus $[H^+]_{aq}$ conforme os dados da Tabela IV.3..	41
Figura IV.20.	Espectros de absorção do HMF em solução micelar de CTACl 0,10 M contendo tampão Bis-tris 10 mM, nos pHs: 1,40; 1,60; 1,80; 2,00; 2,50; 3,00 e 3,50 adquiridos após 5 horas de estabilização da solução.	41
Figura IV.21.	Especiação do HMF em meio contendo CTACl	42
Figura IV.22.	Gráfico de k_{obs} em função da concentração de prótons na fase aquosa intermicelar para o HMF em solução micelar de CTACl 0,10 M, em tampão Bis-tris 10 mM na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.	43
Figura IV.23.:	Espectros de absorção do HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em solução micelar de Triton X-100 (0,10 M) contendo tampão Bis-tris (10,0 mM) para manter pH = 7,67, obtidos ao longo de 6 horas (desde a adição do detergente), mantido a $25,0 \pm 0,1$ °C.	44
Figura IV.24.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm, de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Triton X-100 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10,0 mM) em pH = 7,67.	45
Figura IV.25.	Espectros de absorção do HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em solução micelar de Triton X-100 (0,10 M) contendo tampão Bis-tris (10 mM) nos pHs: 1,47; 2,03; 2,23; 2,71; 2,94; 3,21; 3,43 e 4,18. após 5 h de equilíbrio sob condições controlada de temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.	46
Figura IV.26.	Gráfico de k_{obs} para o HMF em função da concentração de prótons na fase intermicelar contendo 0,10 M de Triton X-100.	47
Figura IV.27.	Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 3,5 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Bis-tris (0,10 M) com pH = 8,52 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1$ °C.	49
Figura IV.28.	Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Bis-tris (0,10 M) com pH = 8,98 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1$ °C.	49
Figura IV.29.	Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Borato (0,10 M) com pH = 9,06 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1$ °C.	50
Figura IV.30.	Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a	50

	adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Borato (0,10 M) com pH = 9,18 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.	
Figura IV.31.	Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Borato (0,10 M) com pH = 9,34 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.	51
Figura IV.32.	Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Bis-tris (0,10 M) com pH = 9,38 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.	51
Figura IV.33.	Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Bis-tris (0,10 M) com pH = 9,79 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.	52
Figura IV.34.	Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,1 M) em solução tampão de Bis-tris (0,1 M) com pH = 10,13 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.	52
Figura IV.35.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 8,52.	53
Figura IV.36.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 8,98.	53
Figura IV.37.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Borato (10 mM) em pH = 9,06.	54
Figura IV.38.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Borato (10 mM) em pH = 9,18.	54
Figura IV.39.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Borato (10 mM) em pH = 9,34.	55
Figura IV.40.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 9,38.	55
Figura IV.41.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 9,79.	56
Figura IV.42.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 10,13.	56
Figura IV.43.	Decaimentos das absorbâncias em $\lambda = 476$ nm das soluções de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) nos diferentes pHs das curvas das Figuras IV.35. a IV.42..	57
Figura IV.44.	Gráfico de $\log(k_{\text{obs}})$ versus $[\text{H}^{+}]_{\text{aq}}$ para o HMF em solução micelar de Brij 35.	58
Figura IV.45.	Curvas de absorção UV-Vis após o salto de concentração de detergente nas condições de pH = 8,52 e após o salto de pH para pH = 1,0.	59
Figura IV.46.	Espectros de absorção UV-Vis ao longo do tempo de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo 0,10 M de Brij 35, em tampão Bis-tris 0,10 mM no pH = 7,43 ($\chi = 1$).	60

Figura IV.47.	Espectros de absorção UV-Vis ao longo do tempo de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo 0,05 M de Brij 35, e 0,05 M de CTACl, ($\chi = 0,50$) em tampão Bis-tris 0,10 mM no pH = 7,43.	61
Figura IV.48.	Espectros de absorção UV-Vis ao longo do tempo de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo 0,025 M de Brij 35 e 0,075 M de CTACl, ($\chi = 0,25$) em tampão Bis-tris 0,10 mM no pH = 7,43.	61
Figura IV.49.	Espectros de absorção UV-Vis ao longo do tempo de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo 0,10 M de CTACl, ($\chi = 0$), em tampão Bis-tris 0,10 mM no pH = 7,43.	62
Figura IV.50.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm das soluções ao longo do tempo para Brij 35 $\chi = 1$ adicionado em $t = 0$.	62
Figura IV.51.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm das soluções ao longo do tempo para Brij 35 $\chi = 0,5$ e CTACl, adicionado em $t = 0$.	63
Figura IV.52.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm das soluções ao longo do tempo para Brij 35 $\chi = 0,25$ e CTACl, adicionado em $t = 0$.	63
Figura IV.53.	Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm das soluções ao longo do tempo para Brij 35 $\chi = 0$ e CTACl, adicionado em $t = 0$.	64
Figura IV.54.	Decaimentos da absorbância em $\lambda = 478$ nm das soluções ao longo do tempo, reunidos para todas as frações molares de Brij 35 e CTACl, adicionado em $t = 0$	64
Figura IV.55.	Correspondência entre $\log(k_{obs})$ e χ_{CTACl} para as soluções de HMF com χ crescente em CTACl.	65
Figura IV.56.	Espectros UV-Vis de uma solução aquosa de DHF $2,0 \times 10^{-5}$ M, em tampão fosfato 10 mM, obtidos ao longo do tempo após o salto do pH, de 1,0 para 5,9.	66
Figura IV.57.	Variação da absorção em $\lambda = 495$ nm referente à Figura IV.56 .	66
Figura IV.58.	Espectros de DHF antes do salto de pH (1,0); após o salto ($t = 0$); e no equilíbrio ($t = eq$) a pH = 5,9.	68
Figura IV.59.	Especiação do DHF envolvendo as formas de cátion flavílio (AH^+), base (A) e chalcona trans (C_{trans}).	68
Figura IV.60.	Gráfico de k_{obs} em função da concentração de prótons $[H^+]$ para o DHF em meio aquoso.	70
Figura IV.61.	Espectro de absorção do transiente, em tempo zero, do DHF em meio aquoso, gerado pela excitação por pulso de laser em 355 nm, de 5 ns de duração.	71
Figura IV.62.	Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 1,0, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.	72
Figura IV.63.	Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 3,02, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.	73
Figura IV.64.	Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 4,17, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.	73
Figura IV.65.	Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 5,09, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.	74
Figura IV.66.	Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 5,44, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.	74

Índice de Tabelas

Tabela I.1.	Tabela dos substituintes do cátion flavílio para algumas antocianidinas.	3
Tabela IV.1.	Tempos de decaimento dos transientes do HMF τ ($\pm 10\%$), gerados por fotólise por pulso de laser em diferentes pHs.	27
Tabela IV.2.	Tempos de vida dos decaimentos do HMF em solução micelar de SDS, 0,10 M, sob temperatura de $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.	32
Tabela IV.3.	Valores de k_{obs} em $\lambda = 478\text{ nm}$ em função do pH intermicelar para soluções de HMF ($2,0 \times 10^{-5}\text{ M}$) contendo CTACl (0,10 M, adicionado em $t = 0$) em tampão Bis-tris (10 mM), termostatizado em $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.	39
Tabela IV.4.	Tempos de vida para o decaimento dos transientes de absorção do HMF em solução de CTACl 0,10 M, em tampão Bis-tris 10 mM na temperatura de $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.	42
Tabela IV.5.	Tempo de vida do transiente do HMF em solução 0,10 M de Triton X-100, 24 mM de tampão Bis-tris, sob condições controladas de temperatura de $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.	47
Tabela IV.6.	Valores de k_{obs} em $\lambda = 476\text{ nm}$ em função do pH intermicelar para soluções de HMF ($2,0 \times 10^{-5}\text{ M}$) contendo Brij 35 (0,10 M, adicionado em $t = 0$) em tampão Bis-tris ou Borato (10 mM), termostatizado em $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.	57
Tabela IV.7.	Valores de k_{obs} das absorbâncias em $\lambda = 478\text{ nm}$ após a adição dos detergentes (CTACl e Brij 35) em $t = 0$, para as soluções contendo HMF ($2,0 \times 10^{-5}\text{ M}$).	65
Tabela IV.8.	Tempos de decaimento em meio aquoso τ ($\pm 10\%$) do transiente do HMF, gerado por fotólise por pulso de laser em diferentes pHs.	69
Tabela IV.9.	Valores dos tempos de vida do transiente (monitorado a 540 nm) da Oenina em meio aquoso, contendo tampão fosfato 24 mM na temperatura de $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para diferentes valores de pHs	77
Tabela IV.10.	Tempos de vida dos decaimentos da absorção de soluções de Oenina em SDS, nos pHs de 2,64 a 8,11.	93
Tabela IV.11.	Tempos de vida do transiente da oenina em meio contendo SDS 0,10 M em tampão fosfato (24 mM), na temperatura de $25 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$	96
Tabela IV.12.	Tempos de vida dos transientes da Pelargonina, gerados por fotólise por pulso de laser em 532 nm, com tampão fosfato 24 mM, a $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para diferentes valores de pHs	98
Tabela IV.13.	Valores dos tempos de vida do transiente da Cianina em meio aquoso, com tampão fosfato 25 mM, e temperatura $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para diferentes valores de pHs	99
Tabela IV.14.	Tempos de vida (τ) do transiente de absorção da Malvina em meio aquoso, em tampão fosfato 25 mM, na temperatura $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para diferentes valores de pHs	102
Tabela V.1.	Tabela com as constantes de protonação e desprotonação do estado fundamental obtidos por fotólise por pulso de laser para as antocianinas em meio aquoso e em meio micro-heterogêneo	109

Índice de Esquemas

Esquema III.1.	Representação esquemática do “Aparelho de fotólise por pulso de laser”.	18
Esquema V.1.	Representação esquemática do caminho que leva à formação da base A (no estado fundamental) em tempo menor que 1 ns, a partir da absorção da luz pulsada do laser pelo cátion flavílio no estado fundamental.	104
Esquema V.2.	Diagrama energético para o HMF em meio micro-heterogêneo de micelas aniônicas	110
Esquema V.2.	Sistema multi-equilíbrio comum às Antocianinas.	120
Esquema V.3.	Diagrama energético para o HMF em meio micro-heterogêneo de micelas catiônicas.	120
Esquema V.4.	Equilíbrio entre o cátion flavílio e o hemiacetal	121

Índice de equações

equação 1	19
equação 2	21
equação 3	106

Símbolos e abreviaturas

$[H^+]_{aq}$	concentração de próton na fase aquosa intermicelar
A	base quinoidal no estado fundamental
A^*	base quinoidal no estado singlete excitado
$(AH^+)^*$	cátion flavílio no estado singlete excitado
AH^+	cátion flavílio no estado fundamental
B	hemiacetal
χ	fração molar
$\chi_{Brij\ 35}$	fração molar de Brij 35 na solução
C_{cis}	Chalcona cis
χ_{CTACl}	fração molar de CTACl na solução
C_{trans}	chalcona trans
ϵ_{max}	absortividade molar no comprimento de onda de maior absorção
K_a	constante de equilíbrio ácido-base
k_d	constante de velocidade de desprotonação de AH^+ do estado fundamental
k_d^*	constante de velocidade de desprotonação de $(AH^+)^*$ no estado singlete excitado
K_h	constante de equilíbrio da hidratação
k_{-h}	constante de velocidade de desidratação de B
k_h	constante de velocidade de hidratação de AH^+
K_i	constante de equilíbrio da isomerização
k_i	constante de velocidade de isomerização da chalcona cis para chalcona trans
k_{-i}	constante de velocidade de isomerização da chalcona trans para chalcona cis
k_{obs}	constante de velocidade igual ao inverso do tempo de vida τ
k_p	constante de velocidade de protonação do estado fundamental, de A
k_p^*	constante de velocidade de protonação no estado singlete excitado, de A^*
k_{-t}	constante de velocidade de tautomerização da chalcona cis para o hemiacetal
K_t	constante de equilíbrio da tautomerização
k_t	constante de velocidade de taumerização do hemiacetal para a chalcona
λ	comprimento de onda em nm
τ	tempo de vida

Resumo

Ao ser excitado do estado fundamental para o estado singlete excitado, o pK_a do equilíbrio ácido-base das antocianinas apresenta um deslocamento de ca. 4 para ca. -1. Esta característica de super-fotoácido, aliado à técnica de fotólise por pulso de laser, permite a perturbação da posição do equilíbrio ácido-base no estado fundamental. O acompanhamento da cinética de reestabelecimento do equilíbrio inicial, existente antes do pulso do laser, permite a determinação das constantes de desprotonação k_d e protonação k_p no estado fundamental. Este método foi aplicado para a determinação das constantes de protonação e desprotonação das seguintes antocianinas sintéticas e naturais: 4-metil-7-hidroxiflavílio (HMF), 4',7-dihidroxiflavílio (DHF), malvidina-3-glucosídeo (Oenina), malvidina-3,5-diglucosídeo (Malvina), pelargonidina-3,5-diglucosídeo (Pelargonina) e cianidina-3,5-diglucosídeo (Cianina). Assim, as constantes de desprotonação do estado fundamental são: $k_d = 1,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (HMF), $3,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (DHF), $5,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Oenina), $3,8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Malvina), $1,3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Pelargonina) e $1,8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Cianina). As constantes de protonação do estado fundamental são: $k_p = 3,56 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (HMF), $3,06 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (DHF), $2,51 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Oenina), $2,9 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Malvina), $3,6 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Pelargonina) e $2,2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Cianina). Nosso método é a única técnica que permite a determinação direta destas constantes. Este método também permite a determinação de k_d e k_p em meios micro-heterogêneos. Através de medidas de k_d , foi possível provar que ocorre a estabilização do cátion flavílio de HMF em micelas aniônicas de SDS (dodecilsulfato de sódio). Em micelas não iônicas e catiônicas, por outro lado, ocorre a desestabilização do cátion flavílio, que se manifesta através do aparecimento de reatividade ausente em solução aquosa. Os resultados da aplicação deste método revelam ainda que o principal processo de dissipação da energia da luz, absorvida pelas antocianinas, é a transferência de próton no estado excitado e não a fluorescência.

Abstract

Upon excitation from the ground state to the first excited singlet state, the pK_a of the acid-base equilibrium of anthocyanins exhibits a large shift, from ca. 4 to ca. -1. This characteristic of super-photoacidity, coupled with the technique of laser flash photolysis, can be employed to perturb the position of the acid-base equilibrium in the ground state. Monitoring the kinetics of relaxation back to the initial equilibrium position that existed prior to the laser pulse permits determination of the rate constants for protonation (k_p) and deprotonation (k_d) in the ground state. This method was applied to the following natural and synthetic anthocyanins: 4-methyl-7-hydroxyflavylium (HMF); 4',7-dihydroxyflavylium (DHF); malvidine-3-glucoside (Oenin); malvidine-3,5-diglucoside (Malvin); Pelargonidine-3,5-diglucoside (Pelargonin); and cyanidine-3,5-diglucoside (Cyanin). Thus, the ground state deprotonation rate constants (k_d) for the acid form were found to be: $1.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (HMF); $3.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (DHF); $5.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Oenin); $3.8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Malvin); $1.3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Pelargonin); $1.8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Cyanin). The corresponding rate constants for protonation of the ground state of the base (k_p) were: $3.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (HMF); $3.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (DHF); $2.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Oenin); $2.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Malvin); $3.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Pelargonin); $2.2 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ (Cyanin). Our method is currently the only one that permits direct determination of these rate constants. This method also allows the determination of k_p and k_d in microheterogeneous media. Thus, employing measurements of k_d , it was possible to demonstrate that anionic SDS (sodium dodecyl sulfate) micelles stabilize the flavylium cation form of HMF. In cationic and non-ionic micelles, however, the flavylium cation is destabilized, which manifests itself via the appearance of reactivity that is absent in aqueous solution in the absence of these surfactants. Finally, the results of the application of this method show that the primary energy wasting process for radiant energy absorbed by anthocyanins is excited state proton transfer rather than fluorescence.

I. Introdução

Antocianinas, do grego *anthos*, flor, e *kyanos*, azul, são pigmentos, solúveis em água, responsáveis pelas cores vermelho, azul e púrpura das flores, caules, folhas, frutos e raízes de muitos vegetais. As antocianinas são derivados glicosilados do cátion flavílio (**Figura I.1.**) e são classificados como flavonóides. A forma aglicona de uma antocianina é chamada de antocianidina.

Há seis estruturas de antocianidinas mais comuns, sendo elas a Pelargonidina, Cianidina, Delfinidina, Peonidina, Petunidina e Malvidina (**Tabela I.1.**). As antocianidina 3-glucosídeo e antocianidina 3,5-diglucosídeo são as mais comumente encontradas na natureza (Goto & Kondo, 1991). De um modo geral, quase todas as flores cor-de-rosa, escarlate e laranja contêm antocianinas derivadas de pelargonidina, flores carmim e magenta, derivados da cianidina, e as flores purpuras e azuis contêm derivados da delfinidina (Cooper-Driver, 2001). Atualmente estima-se que mais de 250 tipos de antocianinas já foram isoladas de plantas. Essas antocianinas são todas O-glicosiladas com diferentes açúcares. Normalmente esses substituintes estão ligados ao grupo OH dos carbonos 3 e 5, porém, são menos frequentes no grupo OH do carbono 7 e raros

no grupo OH dos carbonos 3' e 5'. Os principais açúcares substituintes são a D-glucose, L-ramnose, D-galactose, D-xylose e arabinose. O açúcar ligado nessas posições pode também ser acilado pelos ácidos: p-coumárico, cafêico, ferrúlico, sináptico, acético, malônico, p-hidroxibenzóico, entre outros (Mazza & Brouillard, 1987).

As antocianinas são moléculas relativamente instáveis e suas cores são dependentes do pH do meio, da temperatura, luz e da presença de metais e de agentes oxidantes.

Por serem produtos naturais, as antocianinas apresentam grande potencial como corantes de alimentos (Bridle &

Figura I.1.

Timberlake, 1997), entretanto, devido a sua tendência de perder a cor durante a fase de processamento industrial, seu uso neste campo está limitado. Esses corantes naturais também são susceptíveis à Vitamina C e oxigênio. Neste caso, ocorre

perda de cor devido ao ataque da Vitamina C ao carbono 4 do cátion flavílio (**Figura I.1.**). Entretanto, na ausência de oxigênio, a cor é preservada por períodos aceitáveis (Garcia-Viguera & Bridle 1999).

Para aumentar a estabilidade da cor das antocianinas, pode-se recorrer à acilação com ácido cinâmico ou compostos similares.

Tabela I.1.: Tabela dos substituintes do cátion flavílio para algumas antocianidinas.

Antocianidina	3	5	6	7	3'	5'	cor
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	H	Laranja
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	H	Laranja-vermelho
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	H	Laranja-vermelho
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	Azul-vermelho
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	Azul-vermelho
Apigenidina	H	OH	H	OH	H	H	Laranja
Luteonidina	H	OH	H	OH	OH	H	Laranja
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	Vermelho
Aurantidinina	OH	OH	OH	OH	H	H	Laranja
6-hidroxi-cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	H	Vermelho
6-hidroxi-delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	H	Vermelho
Hirsutinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe	Azul-vermelho
5-metil-cianidina	OH	OMe	H	OH	OH	H	Laranja-vermelho
Pulchelinidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	Azul-vermelho
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	Azul-vermelho

As batatas vermelhas (*Solanum tuberosum* e *S. stenotomum*) foram avaliadas como fonte de corantes vermelhos naturais. A composição antocianínica desses tubérculos foi pesquisada em várias culturas. O conteúdo de antocianina monomérica está entre 2 e 40 mg / 100g de batata fresca. Curiosamente, todas as batatas vermelhas mostraram o mesmo tipo de pigmento, sendo a pelargonidina-3-rutinosídeo-5-

glucosídeo, acilada com ácido p-coumárico, a antocianina principal.

A concentração dos pigmentos em folhas, caules e frutos varia não só com a espécie e estado fisiológico da planta mas também com a estação do ano. Em virtude disso, a medida dos

níveis de pigmentação pode fornecer dados sobre as condições das plantas. Através de utilização das características fundamentais dos pigmentos mais comuns a todas as plantas, pode-se desenvolver um procedimento de análise do estado de uma determinada área ou um ecossistema.

As antocianinas concentram-se em maior quantidade nas folhas com baixa taxa de fotossíntese. Isto pode ser atribuído aos fatores climáticos (consequentemente, a medida da concentração de antocianinas em folhas pode ser útil para a avaliação do seu estado fisiológico (Sims & Gamon, 2002)). No hemisfério norte, por exemplo, devido à mudança de insolação e queda de temperatura no outono, as plantas reduzem sua produção de clorofila, pigmento que absorve luz na região do vermelho e do azul do espectro. Um outro pigmento encontrado nas folhas de muitas plantas é o caroteno, que absorve na região do azul e do verde e tem coloração amarela (a antocianina, que normalmente se encontra nos vacúolos das plantas, também absorve na região do verde ou do azul e verde).

Quando a concentração da clorofila cai, devido à proximidade do inverno, as folhas assumem a coloração amarela do caroteno. Em algumas plantas, quando a concentração de clorofila cai, há um acúmulo de açúcar, que reage produzindo antocianinas em abundância, resultando numa coloração vermelha ou púrpura, dependendo da acidez do meio.

Folha de carvalho no outono

Além da finalidade de atração de insetos polinizadores e de pássaros para a dispersão de frutos, a antocianina, presente em caules, flores e frutos, pode ter a função de proteção solar das plantas. Antocianinas têm normalmente duas bandas de absorção: uma na região do ultra-violeta compreendida entre 270 e 290 nm, e outra, na região do visível, entre 500 e 550 nm. A acilação das antocianinas com ácidos orgânicos aromáticos provoca o aparecimento de uma 3ª banda, compreendida entre 310 a 320 nm. A forte absorção da radiação UV pelas antocianinas, é uma das evidências em favor da hipótese de que antocianinas protegem os vegetais contra os efeitos danosos da radiação UV (Woodall & Stewart, 1998).

I.1. Antocianinas nas maçãs

A cor vermelha é uma característica importante para a comercialização de maçãs. Usualmente, quanto maior a intensidade da cor da fruta, maior será seu valor. Frequentemente, a colheita de determinada espécie de maçãs está baseada na quantidade de cor vermelha, a qual é condizente com a respectiva variedade. Embora o desenvolvimento da cor nos frutos antes da colheita geralmente aumenta com o tempo, o fruto começa a amadurecer e então não resiste bem o período de armazenagem. Alguns estudos (Barden & Bramlage, 1994) determinaram a temperatura ótima (que simula as condições de noites frias) para o desenvolvimento máximo de cor nas variedades vermelhas de maçãs. Diferentes variedades mostraram diferentes temperaturas para o desenvolvimento ótimo de cor vermelha. Esses resultados podem ser utilizados para combinar melhor o cultivo e as condições de crescimento, afim de que frutos de qualidade superior sejam obtidos.

I.2. Antocianinas em vinho

O processo de fabricação de vinho depende de inúmeras variáveis, uma das quais é a estabilização da cor. Um bom vinho tinto deve apresentar uma coloração intensa (Brouillard & Dangles, 1994). Durante o processo de maturação após a

fermentação, em que os vinhos permanecem em barris de carvalho, ocorre um intrincado processo de polimerização (Somers, 1971 e Es-Safi et al., 1999) dos pigmentos constituídos de antocianina diglucosídeo e de tanino, extraídos da casca das uvas e das sementes. Os pigmentos estão nas formas livres, polimerizadas ou condensadas, baseados no grau de polimerização e condensação. Os aldeídos a saber: acetaldeído, furfuraldeído, 5-hidroxi-metilfurfuraldeído, coniferaldeído, entre outros, provenientes da madeira dos tonéis de armazenamento, também participam desse processo de polimerização. Neste caso, quanto mais ramificado e mais hidrofílico for o aldeído mais estável será a cor do vinho e menor a precipitação dos pigmentos. O tanino, ligado à antocianina, estabiliza a forma catiônica porque desestabiliza a forma hidratada da antocianina, *i.e.*, acaba por atuar como um copigmento. É interessante notar que, em um bom vinho, além da ausência do gosto de uva, não se encontra antocianina livre, isso porque, durante o processo de polimerização, os açúcares ligados à antocianina, que conferem solubilidade em água, sofrem hidrólise.

1.3. Propriedades farmacológicas das antocianinas

Os benefícios à saúde das antocianinas lhe conferem uma vantagem singular em aplicações como corantes em alimentos. Extratos de frutas vermelhas, que são ricas em antocianinas, são usadas em medicina popular e possuem alguns efeitos

terapêuticos positivos como agente anti-inflamatório (Wang & Lin, 2000, Wang et al. 1999) e no tratamento de várias enfermidades, incluindo doenças de circulação (devido à fragilidade nos vasos sanguíneos) e na prevenção da arteriosclerose induzida por colesterol (Ramirez-Tortosa et al., 2001). Essas propriedades biológicas das antocianidinas têm sido relacionadas principalmente com suas propriedades anti-oxidantes, refletido na capacidade de extratos de plantas com grande concentração de antocianinas de reagir com radicais livres de oxigênio (Meyer et al., 1997, Espin et al., 2000, Dangles, Fargeix & Dufour, 2000 e Moyer, 2002). O mecanismo pelo qual as antocianinas agem como anti-oxidantes ainda não foi totalmente compreendido, embora haja indicações de que processos como a doação de próton, a quelação de metal e as ligações com proteínas estejam envolvidos.

I.4. Química das antocianinas

I.4.1. Sistema multi-equilíbrio

As antocianinas possuem um intrincado conjunto de equilíbrios múltiplos que dependem das condições do meio como pH, temperatura e força iônica, o cátion flavílio AH^+ pode estar em equilíbrio com a base quinoidal **A**. Se a antocianina não for resistente à hidratação, o cátion flavílio pode sofrer ataque

nucleofílico da água, para gerar a pseudobase ou o hemiacetal **B**. Tautomerismo de **B**, com abertura do anel gera chalcona cis, **C_{cis}**. Essa chalcona, por sua vez, pode sofrer isomerização à chalcona *trans*, **C_{trans}**. Desse modo, a proporção das espécies presentes no estado do equilíbrio é dependente do pH do meio e há pelo menos quatro constantes de equilíbrio: a constante ácido-base K_a , a constante de hidratação K_h , a constante de tautomerização K_t e a constante de isomerização K_i . A **Figura 1.2.**, mostra esses equilíbrios para a antocianina natural oenina (malvidina 3-glucosídeo).

Figura 1.2.: Equilíbrios químicos da antocianina natural oenina e, por extensão, da vasta maioria das antocianinas naturais e sintéticas.

1.4.2. Cor sensível ao pH

A cor das antocianinas é sensível ao pH e o cátion flavílio (**AH⁺**) e base quinoidal (**B**) são as únicas espécies coloridas. A sensibilidade ao pH do meio manifesta-se de modo muito interessante no caso da flor de *Hydrangea sp*, conhecida como hortênsia, na qual se encontra a antocianina delphinidina 3-glucosídeo. As condições de acidez do solo podem alterar o pH do vacúolo, onde as antocianinas estão presentes na flor. Assim, quando o pH do solo está mais ácido, a hortênsia é rosada, porém quando o pH do solo está menos ácido (**Figura I.3.**) a flor é azul. O pH vacuolar, medido por uma combinação de micro-espectrofotometria e micro-eletrodo seletivo de próton, indica que os pHs para as células azuis ($\lambda = 589 \text{ nm}$) e vermelhas ($\lambda = 537 \text{ nm}$) são 4,1 e 3,3 respectivamente (Yoshida et al., 2003).

Figura: I.3.: À esquerda, hortênsia de coloração rosada plantada em solo ácido e a direita, hortênsia de coloração azul, plantada em solo alcalino.

I.4.3. Antocianinas e a copigmentação

Nas condições fisiológicas das plantas o pH varia de ácido para neutro, numericamente, o pH do vacúolo está entre 2,8 e 6,2 (Jurd & Asen, 1966). As antocianinas naturais em solução aquosa normalmente estabilizam-se na forma não colorida. Nas plantas, uma das formas encontrada pela natureza de estabilizar a cor ou até mesmo intensificá-la é através de associações químicas ou físico-químicas, conhecidas como copigmentação. Nesse processo, a antocianina interage intra- ou inter-molecularmente com certas substâncias a saber: alcalóides, aminoácidos, nucleosídeos, flavonóides não antociânicos (como o tanino), e até mesmo uma outra molécula de antocianina (Goto & Kondo, 1991).

A *Agapanthus praecox* sp é uma flor liliácea africana em formato de trompete, que pode apresentar-se nas cores branca ou azul. A estrutura do composto responsável pela cor azul (Bloor & Falshaw, 2000) é um p-coumaroil éster de um diglucosídeo de delfinidina, ligado a um triglucosídeo de flavonol através de um diéster de ácido succínico, ([6'''-O-(delfinidina 3-O-(6''-O-p-coumaroil-glucosídeo)7-O-glucosil)][6'''-O-(campferrol 3-O-glucosídeo, 7-O-xylosídeo 4'-O-glucosil)]succinato), representado conforme **Figura I.4**. Esse composto, que é um copigmento duplo de antocianina, apresenta cor azul na região de pH 5 a 7, e que é pouco comum. Além deste exemplo de copigmentação dupla, existem outras associações complexas (Bloor, 1997, Figueiredo et al. 1996 e Stephen & Bloor, 2001) nas quais as antocianinas podem formar compostos organometálicos (Elhabiri et al., 1997, Cornard, Boudet & Merlin, 2001).

Figura I.4.: copigmento de antocianina proveniente da liliácea Africana de cor azul.

I.4.4. Sensibilidade das antocianinas aos nucleófilos e metais

Em uma antocianina, a presença da carga positiva, **Figura I.2.**, deixa o carbono da posição 2 da forma ácida deficiente de elétron e sujeito ao ataque nucleofílico. O rompimento da ligação carbono-oxigênio, dando origem às chalconas, ou quebra da conjugação eletrônica tem, como resultado, a perda de cor. As antocianinas naturais mais comuns (3-monoglucosídeo e 3,5-diglucosídeo) perdem a coloração rapidamente em meio aquoso levemente ácido devido à formação do hemiacetal e das chalconas. *In vivo*, esses pigmentos encontram-se na forma associada com íons metálicos, na qual outros ésteres glicosilados, derivados de ácido cinâmico, favonas, flavonóis, ácido benzóico e de taninos, ligados ou não à antocianina, participam na complexação do íon metálico. As interações hidrofóbicas desses complexos metálicos de antocianinas, bem como a fixação da antocianina na forma planar, são os fatores responsáveis pela estabilidade, variedade e intensificação da cor. Normalmente, a coloração azul das antocianinas normalmente ocorre em pH básico, e não em condições levemente ácida nas quais se encontram as antocianinas. Portanto, supõe-se que essa coloração azul esteja eminentemente associada à formação de complexos pigmento-copigmento-metal (Elhabiri, et al., 1997).

Íons metálicos como Fe^{3+} , Mg^{2+} ou Al^{3+} não rompem a conjugação das espécies coloridas das antocianinas e podem até intensificar a cor. A formação do complexo metálico da cianidina 3-glucosídeo com o íon Al^{3+} depende não somente do pH, mas

também do tipo de ácido orgânico que ocupará a esfera de coordenação do metal. Por exemplo, a presença de tampão citrato complexa preferencialmente o alumínio e impede a formação do complexo com a cianidina 3-glucosídeo (Jurd & Asen, 1966).

II. Objetivos

- (1) Empregar a técnica de fotólise por pulso de laser para deslocar a posição do equilíbrio ácido-base de antocianinas e utilizar esta perturbação transitória provocada pelo laser para determinar as constantes de desprotonação (k_d) e de protonação (k_p) do estado fundamental de antocininas sintéticas e naturais;
- (2) Utilizar este método para esclarecer a origem do efeito de micelas de detergentes aniônicos (SDS), catiônicos (CTACl) e não iônicos (Brij 35 e Triton X-100) na posição do equilíbrio ácido-base de antocianinas no estado fundamental;
- (3) Relacionar o efeito de micelas na dinâmica do equilíbrio ácido-base como na reação de hidratação.

III. Parte experimental

III.1. Materiais

Os cloretos das antocianina naturais: Pelargonina (pelargonidina-3,5-diglucosídeo), Cianina (cianidina-3,5-diglucosídeo), Oenina (malvidina-3-glucosídeo) e Malvina (malvidina-3,5-diglucosídeo), foram adquiridas da Extrasynthèse S.A. e usadas sem tratamento adicional. O HMF (4-metil-7-hidroxiflavílio) e DHF (4',7-dihidroxiflavílio) foram sintetizados e fornecidos pelo grupo de pesquisa do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, ITQB / UNL, Oeiras, Portugal.

A água usada na preparação das soluções foi bidestilada e deionizada pelo sistema Millipore Mili-Q. Os ácido fosfórico (Aldrich), e clorídrico (Merck PA) e o hidróxido de sódio (Merck PA), foram usados como recebidos. Os tampões Bis-tris (Aldrich), borato de sódio (Carlo Erba), foram usados como recebidos. Os detergentes, polioxietileno[23]-dodecil eter (Brij® 35) e polioxietileno[10]isooctil fenil éter (Triton X-100), provenientes da Sigma, foram usados sem tratamentos prévios. O cloreto de hexadeciltrimetilamônio, CTACl, foi recristalizado em acetona. O dodecilsulfato de sódio (SDS) ultra-puro, proveniente da Mallinckrodt Baker, Inc. foi usado como recebido.

III.2. Medidas de fotólise por pulso de laser

III.2.1. Preparação das amostras para a obtenção das curvas de transientes em função do pH

Adicionou-se o sal de flavílio de interesse diretamente em uma cubeta contendo a solução tampão normalmente utilizada (fosfato 25 mM). A quantidade do sal de flavílio, na maioria dos casos, esteve entre $2,0$ e $2,5 \times 10^{-5}$ M. Esta concentração do sal de flavílio era suficiente ajustar a absorção no λ de excitação entre $0,5$ e $0,2 \text{ cm}^{-1}$. No aparelho de Fotólise por Pulso de Laser a amostra foi acondicionada em um compartimento próprio que permitia a termostatização a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ através de circulação de água. A temperatura da sala onde se encontra o aparelho também foi mantida a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dentro da cubeta da amostra foi colocada uma barra magnética para deixar a amostra sob agitação durante os disparos do laser.

III.2.1.1. Fotólise por pulso de Laser e transientes de absorção em diferentes pHs

Os experimentos de fotólise por pulso de laser foram conduzidos em um aparelho da Edinburgh Analytical Instruments LP900, equipado com um laser de Nd:YAG Surelite I-10 da Continuum para a excitação e uma lâmpada de xenônio de 450

W para o monitoramento dos transientes de absorção. Utilizou-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm, com volume de 2,5 a 3,0 mL de solução aquosa do sal de flavílio de interesse, dissolvido em tampão fosfato 25 mM. A concentração do sal de flavílio presente foi ajustada de modo que houvesse uma absorbância de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^{-1}$ no comprimento de onda de excitação. Dependendo do caso, usou-se a terceira (355 nm) ou a segunda harmônica (532 nm) do laser Nd:YAG, para a excitação da amostra. A energia ou potência do laser foi ajustada alterando-se o valor do Q-Switch, de modo a diminuir os possíveis problemas causados pelo excesso de energia de excitação incidindo sobre a amostra (**Esquema III.1.**). Durante as medidas dos transientes de decaimento de absorção, as amostras foram constantemente agitadas e termostatizadas a $25,0 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A cada disparo do laser, um transiente é acumulado e obtido e somado aos subsequentes, para que se obtenha um sinal transiente com uma maior relação sinal / ruído. Na maioria dos experimentos, acumularam-se 10 a 15 disparos de laser. Ao final dos experimentos de fotólise por pulso de laser, registrou-se o espectro de absorção UV-Vis da solução, empregando-se um aparelho UV-Vis HP8452, para detectar possíveis indícios de decomposição. Nos casos suspeitos, a solução foi substituída por outra similar e as últimas medidas refeitas, diminuindo o intervalo de troca da solução.

Após a medida do transiente, o pH de cada amostra foi determinado usando um aparelho Acumet® model 50 da Fisher Scientific com eletrodo de vidro combinado, modelo 91-03, da Orion. As medidas foram feitas *in situ*, devido ao pequeno

diâmetro do eletrodo (5,9 mm). A leitura do pH foi feita após 10 minutos de estabilização. Para a obtenção do próximo transiente, adicionaram-se, com uma microseringa de 10 μL , cerca de 2 μL de solução estoque de hidróxido de sódio 1,0 M.

Esquema III.1.: Representação esquemática do "Aparelho de fotólise por pulso de laser", usado nas determinações dos transientes de absorção.

III.2.2. Obtenção do tempo de vida (τ) a partir dos transientes

Na determinação do tempo de vida do decaimento, utilizou-se um software fornecido pelo fabricante do aparelho. Como

primeiro passo para a obtenção do tempo de vida, fez-se a conversão do transiente, dado na escala de mV, para a escala de densidade óptica. Após a conversão, o tempo de vida do transiente foi obtido através das rotinas de ajuste exponenciais da Edinburgh.

$$f(t) = y_0 + A_1 e^{(t-t_0)/\tau} \quad \text{(equação 1)}$$

A avaliação da qualidade do ajuste foi feita através do parâmetro estatístico χ^2 . A deconvolução foi usada somente nos casos em que o tempo de vida era inferior a 30 ns. Neste procedimento, empregou-se o formato do pulso do laser obtido pelo monitoramento do espalhamento Raman da água em 406 nm, modo de fluorescência do LP-900, com excitação em 355 nm.

III.2.3. Obtenção do espectro de absorção do transiente

O espectro de absorção do transiente foi obtido na faixa de pH em que o cátion flavílio é a única espécie presente. Isto garante a estabilidade durante as medidas e evita interferência do hemiacetal ou das chalconas. Normalmente, o pH escolhido está na metade da faixa de valores de pH utilizada na coleta dos dados cinéticos para a determinação de k_p e k_d , conforme o item III.2.1.1. Preparada a solução, os transientes foram adquiridos variando-se, para cada medida, o comprimento de onda da luz de monitoramento (*probe*), normalmente em intervalos de 5 nm,

sobre toda a faixa de comprimento de onda em que ocorre absorção da antocianina na forma de cátion flavílio e da base, exceção feita àqueles comprimentos de onda próximos do laser (355 ou 532 nm), que devido a alta intensidade pode danificar a fotomultiplicadora (PMT). Uma vez que os experimentos foram realizados em pH constante em uma mesma amostra, o tempo de vida dos transientes permanece relativamente constante. Os valores de A_1 da **equação 1**, que representam a variação da densidade óptica em tempo zero após o pulso do laser, foram graficados em função do comprimento de onda para se obter o espectro de diferença de absorção do transiente ou espectro de absorção do transiente em tempo zero.

III.2.4. Espectros de Absorção e Especificação das Antocianinas em função do pH

Na obtenção dos espectros de absorção das antocianinas, utilizou-se um espectrofotômetro de absorção UV-Vis (HP 8452-A *diode array*) capaz de ler na faixa de comprimento de onda de 190 a 850 nm com uma resolução de 2 nm. A termostatização da amostra ($25,0 \pm 0,1$ °C), contida em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico, foi feita pela circulação de água no compartimento de amostra, empregando-se um banho termostatizado da Lauda. A concentração do sal de flavílio utilizada foi de $2,0$ a $2,5 \times 10^{-5}$ M, e o meio foi tamponado com fosfato 24 mM. Os saltos de pH foram realizados adicionando-se pequenos volumes de hidróxido de sódio 0,10 M com uma

microsseringa. O pH foi determinado após cada adição de base, com um medidor de pH Acumet® e um eletrodo de vidro combinado Orion. O tempo de mistura considerado foi de 3 s e o tempo mínimo para a aquisição do primeiro espectro foi de 5 s. Como a velocidade de desaparecimento da absorção da forma básica da antocianina é relativamente lenta, logo após o salto de pH, considera-se que esta primeira medida a 5 s seja equivalente ao tempo zero. O espectro de absorção da solução equilibrada foi determinado deixando-se a amostra protegida da luz.

Para as determinações da cinética de reação das antocianinas, utilizou-se o mesmo aparelho HP habilitado na rotina própria para cinética.

Para HMF em água, obteve-se a curva da fração molar das espécies em função do pH, considerando-se que o cátion flavílio, **AH⁺**, é a única espécie que absorve em soluções ácidas (pH 1) e que o desaparecimento desta banda implica no aparecimento da banda da base, **A**, em comprimento de onda um pouco maior, a medida que o pH aumenta. Assim, todo cátion flavílio que desaparece se converte na base e a curva da fração molar *versus* pH pode ser facilmente obtida.

Calculou-se a fração molar de **A** e de **AH⁺** a partir dos valores máximos de absorbância do cátion flavílio em 420 nm e da base em 470 nm empregando-se as funções para a modelagem matemática do tipo:

$$f_A(x) = 10^x / (10^x + 10^{pK_a}) \quad \text{(equação 2)}$$

onde x é o pH e $f_A(x)$ a fração molar de **A** em cada pH. Em

contrapartida, $f_{AH^+}(x) = 1 - f_A(x)$ representa o desaparecimento do cátion flavílio (AH^+) neste sistema. Empregou-se o *software* Origin 5.0 da Microcal Software Inc., para ajustar um valor de pK_a que permitisse às curvas, calculada e experimental, coincidirem. Na **Figura III.1.** estão graficadas as curvas de fração molar do cátion flavílio e da base em função do pH, que fornece um valor de $pK_a = 4,4$.

Figura III.1.: Gráfico da fração molar das espécies envolvidas no equilíbrio ácido-base do HMF em meio aquoso de tampão fosfato 25 mM em função do pH.

Nas situações em que o cátion flavílio e a base quinoidal não eram as únicas espécies presentes, utilizaram-se outros artifícios para se obter a curva de especiação. No caso da Oenina em solução micelar 0,10 M de SDS, foram usados o espectro do cátion flavílio, **AH⁺**, medido no pH = 2,65 (ϵ_{max} (536) = 27.000 L mol⁻¹ cm⁻¹), o espectro da base, **A** (ϵ_{max} (546) = 15.400 L mol⁻¹ cm⁻¹), e ϵ_{max} (610) = 7.200 L mol⁻¹ cm⁻¹), obtidos pela decomposição global do espectro medido em t = 0 em soluções com pH final de: 5,11; 5,78; 6,17 e 6,60, nas quais somente **AH⁺** e **A** estavam presentes. Esses espectros foram empregados para obter as frações molares de **AH⁺** e **A** em tempos maiores e em soluções equilibradas. Deste modo, para cada pH, o espectro medido em tempo t = 0 (no qual somente **AH⁺** e **A** estavam presentes) foi normalizado e subtraído do espectro medido em tempos maiores. Com este procedimento, a contribuição do hemiacetal **B** e das chalconas **C**, que se formam ao longo do tempo pode ser mensurada. Em tempos maiores que 360 s, os produtos são **B** (ϵ_{max} (276) = 19.600 L mol⁻¹ cm⁻¹) e *cis*-chalcona, **C_{cis}** (ϵ_{max} (345) = 13.000 L mol⁻¹ cm⁻¹) Em água, os espectros UV-Vis obtidos por Houbiers et al., 1998 e Lima, J.C. tese de Dr 1996, foram usados para determinar a fração molar de **B**, **C_{cis}**, e **C_{trans}** no estado de equilíbrio.

IV. Resultados

IV.1. HMF em meio aquoso

IV.1.1. Espectro de absorção do HMF com a variação do pH e especiação em água

A **Figura IV.1.** mostra os espectros de absorção de soluções aquosas do HMF em função do pH. Observa-se que em meio ácido, o HMF apresenta uma banda de absorção em 420 nm atribuída a AH^+ e, em meio básico, uma banda de absorção em 470 nm, atribuída exclusivamente à base **A**.

A **Figura III.1.** apresenta um gráfico da especiação (fração molar de cada espécie) em função do pH.

IV.1.2. Fotólise por pulso de laser

Utilizou-se o sal 4-metil-7-hidroxi-flavílio (HMF) em meio aquoso na concentração de $2,0$ a $2,5 \times 10^{-5}$ M e, por meio da aparelhagem e do método descritos no item **III.2.1.**, obtiveram-se os transientes de absorção usando tampão fosfato 24 mM na temperatura de $25 \pm 0,1$ °C. Para cada curva de transiente, o pH foi medido conforme o procedimento também descrito no item **III.2.1.1.** As curvas do transiente de absorção (após a conversão do sinal de mV para densidade óptica) estão graficadas na **Figura IV.2.**

Figura IV.1.: Espectros de absorção do HMF em meio aquoso nos pHs 1,3; 3,0; 4,4; 4,9 e 6,9 após a adição da base.

Figura III.1.: Diagrama de especiação do HMF em meio aquoso envolvendo as espécies AH^+ e A , nos pHs: 1,3; 3,0; 4,4; 4,9 e 6,9. A curva de ajuste apresentou pK_a de 4,4.

Figura IV.2.: Transientes de absorção do HMF em função do pH, com excitação por pulso de laser em 355 nm e comprimento de onda de monitoramento em 470 nm.

Os valores dos tempos de vida (τ), determinados a partir do decaimento do transiente de absorção, em cada valor do pH, encontram-se na **Tabela IV.1.** Na **Figura IV.3.**, grafica-se os valores de $1/\tau$, que é equivalente ao k_{obs} , em função da concentração de prótons, $[H^+]$, em meio aquoso.

Tabela IV.1.: Tempos de decaimento dos transientes do HMF τ ($\pm 10\%$), gerados por fotólise por pulso de laser em diferentes pHs.

<i>pH</i>	<i>τ (ns)</i>
2,17	3,8
2,27	5,4
2,44	8,1
2,47	9,2
2,56	10,5
2,71	14,8
2,75	15,0
3,03	26,1
3,27	45,9
3,29	46,5
3,68	103
3,94	161
4,27	233
4,88	333

O espectro de absorção do transiente do HMF em meio aquoso foi obtido variando-se o comprimento de onda da luz de monitoramento. Seguiu-se o procedimento descrito no item III.2.3. para a obtenção dos transientes, utilizando uma solução de pH = 4,0. Os transientes para cada comprimento de onda estão graficados na **Figura IV.4.** A partir desses transientes, calculou-se o tempo de vida para cada uma das curvas e as constantes da **equação 1**. Na **Figura IV.5.** estão graficados os valores de A_1 , correspondentes a ΔOD em tempo zero (imediatamente ao final do pulso do laser) em função do comprimento de onda λ , resultando no espectro de absorção do transiente.

Figura IV.3.: Gráfico de $k_{obs} = (1 / \tau)$ em função da concentração de prótons $[H^+]$ para o HMF em meio aquoso.

Figura IV.4.: Curvas de decaimento do transiente de absorção para cada comprimento de onda do HMF em água a pH = 4,00.

Figura IV.5.: Espectro de absorção do transiente do HMF em meio aquoso em tempo zero, gerado pela excitação do pulso de laser em 355 nm, de 5 ns de duração.

IV.1.2. HMF em dodecilsulfato de sódio (SDS)

IV.1.2.1. Espectro de absorção do HMF com a variação do pH e especiação em soluções contendo SDS

A **Figura IV.6.**, apresenta as curvas de absorção de soluções de HMF, equilibradas durante 5 horas na ausência de luz. A **Figura IV.7.** mostra os espectros de absorção do HMF nas seguintes condições: antes da adição do detergente SDS em pH 10,0; 10 segundos após a adição; 24 horas após a adição de SDS 0,10 M.

Na **Figura IV.8.**, encontra-se o gráfico de especiação

calculada considerando que a banda em $\lambda = 427 \text{ nm}$ é devido à absorção do cátion flavílio AH^+ e a banda em $\lambda = 476 \text{ nm}$, devido à absorção da base **A**.

Figura IV.6.: Espectros de absorção do HMF em presença de SDS 0,10 M nos pHs: 1,00; 2,65; 5,30; 6,30; 6,75; 7,05; 8,20 e 9,20.

Figura IV.7.: Espectro de absorção do HMF em pH 10,0 na ausência de detergente 10 segundos e 24 horas após a adição de SDS 0,10 M.

Figura IV.8.: Especificação do HMF em meio contendo SDS 0,10 M.

IV.1.2.2. Fotólise por pulso de laser do HMF em SDS

De modo análogo ao item III.2.1.1., obtiveram-se os transientes de absorção do HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em soluções aquosas 0,10 M do detergente aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS) na concentração de 0,10 M contendo tampão fosfato 10 mM para manter o pH final desejado. Todos os decaimentos dos transientes obtidos são mono-exponenciais e os tempos de vida correspondentes estão registrados na Tabela IV.2.. A curva de $1/\tau$, equivalente ao k_{obs} , em função da concentração de prótons na fase aquosa intermicelar ($[\text{H}^+]_{\text{aq}}$), está apresentado na Figura IV.9.

Tabela IV.2.: Tempos de vida dos decaimentos do HMF em solução micelar de SDS, 0,10 M, em temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

<i>pH</i>	<i>τ (ns)</i>
4,37	131
4,42	156
4,53	181
4,60	198
4,70	249
4,82	392
5,30	1300
5,39	1580
5,49	1320
5,58	2030
6,00	3400

Figura IV.9.: Gráfico de k_{obs} em função da concentração de prótons na fase aquosa intermicelar $[H^+]_{aq}$ para o HMF em meio contendo SDS 0,10 M.

IV.1.3. HMF em cloreto de hexadeciltrimetilamônio (CTACl)

IV.1.3.1. Salto de concentração de detergente (CTACl) em soluções de HMF

A **Figura IV.10.**, apresenta um típico comportamento dos espectros UV-Vis de soluções de HMF ao longo do tempo, após a adição de CTACl 0,10 M. Na **Figura IV.11.**, estão graficados os decaimentos da absorbância nos comprimentos de onda $\lambda = 276$, 316 356 e 478 nm. Nas **Figuras: IV.12., IV.13., IV.14., IV.15., IV.16., IV.17.**, grafica-se o decaimento no comprimento de onda $\lambda = 478$ nm, nos pH: 5,43; 5,80; 6,47; 7,02; 7,27 e 7,67,

respectivamente. Na **Figura IV.18.** estão graficados todos os decaimentos apresentados nas **Figuras IV.12. à IV.17.**

Figura IV.10.: Espectros de absorção UV-Vis ao longo do tempo de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) no pH = 7,27 termostatizado em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Figura IV.11.: Decaimentos das absorvâncias, desde o tempo zero, nos comprimentos de onda: 276, 316, 356 e 478 nm relativo aos espectros da **Figura IV.10**.

Figura IV.12.: Decaimento da absorvância em $\lambda = 478 \text{ nm}$ de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) contendo CTACl ($0,10 \text{ M}$) em tampão Bis-tris (10 mM , adicionado em $t = 0$) em pH = 5,43.

Figura IV.13.:Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 5,80.

Figura IV.14.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 6,47.

Figura IV.15.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACI (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 7,02.

Figura IV.16.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACI (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 7,27.

Figura IV.17.: Decaimento da absorvância em $\lambda = 478$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM, adicionado em $t = 0$) em pH = 7,67.

Figura IV.18.: Decaimento da absorvância em $\lambda = 478$ nm (banda da base A) para soluções de HMF nos pHs: 5,43; 5,80; 6,47; 7,02; 7,27 e 7,67 em presença de CTACl 0,10 M.

Na **Tabela IV.3.**, encontram-se os resultados dos cálculos do tempo de vida (τ) na forma de $k_{obs} = (1 / \tau)$, para o decaimento da banda da base A, extraídos das figuras anteriores. Na **Figura IV.19.**, encontram-se graficados os valores de $\log(k_{obs})$ *versus* $[H^+]_{aq}$

Tabela IV.3.: Valores de k_{obs} ($\lambda = 478$) nm em função do pH intermicelar para soluções de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo CTACl (0,10 M, adicionado em $t = 0$) em tampão Bis-tris (10 mM), termostatizado em $25,0 \pm 0,1$ °C.

<i>pH</i>	<i>k_{obs} (s⁻¹)x10⁶</i>
5,43	919
5,80	1440
6,11	2270
6,47	3310
7,02	6060
7,27	8200
7,67	11100

IV.1.3.2. Espectro de absorção do HMF com a variação do pH e especiação em soluções contendo CTACl

Foi realizado um estudo da variação da absorbância de soluções de HMF em CTACl 0,10 M contendo tampão Bis-tris 10 mM. As curvas de absorção medidas após 5 horas de equilíbrio (no escuro) entre os pHs: 1,40 e 3,50 estão graficados na **Figura IV.20.**

Na **Figura IV.21** está apresentado um gráfico de especiação, calculado a partir das absortividades molares das espécies, conforme o item **III.2.4.**

Figura IV.19.: Gráfico de $\log(k_{obs})$ versus $[H^+]_{aq}$ conforme os dados da Tabela IV.3.

Figura IV.20.: Espectros de absorção do HMF em solução micelar de CTACl 0,10 M contendo tampão Bis-tris 10 mM, nos pHs: 1,40; 1,60; 1,80; 2,00; 2,50; 3,00 e 3,50 adquiridos após 5 horas de estabilização da solução.

Figura IV.21.: Especiação do HMF em meio contendo CTACl

IV.1.3.3. Fotólise por pulso de laser de HMF em solução micelar de CTACl

Estudou-se o comportamento do HMF em presença do detergente catiônico cloreto de hexadeciltrimetilamônio (CTACl). A concentração do detergente foi de 0,10 M, o comprimento de onda do laser, para a excitação da amostra, foi fixado em 355 nm e o monitoramento da absorbância em 490 nm. A concentração do HMF na solução final foi de $2,0 \times 10^{-5}$ M e o tampão Bis-tris 10 mM foi utilizado para manter o pH na fase aquosa intermicelar. Os tempos

de vida dos transientes estão registrados na **Tabela IV.4.** A curva de k_{obs} em função da concentração de prótons na fase aquosa intermicelar está representado na **Figura IV.22.**

Tabela IV.4.: Tempos de vida para o decaimento dos transientes de absorção do HMF em solução de CTACl 0,10 M, em tampão Bis-tris 10 mM na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

<i>pH</i>	<i>$\tau(ns)$</i>
1,40	30,2
1,60	44,6
1,80	63,4
2,00	115
2,25	154
3,00	622
3,50	1910

Figura IV.22.: Gráfico de k_{obs} em função da concentração de prótons na fase aquosa intermicelar para o HMF em solução micelar de CTACl 0,10 M, em tampão Bis-tris 10 mM na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

IV.1.4. HMF em presença de Triton X-100

IV.1.4.1. Salto de concentração de detergente (Triton X-100) em soluções de HMF

Na **Figura IV.23.** apresenta o comportamento típico dos espectros UV-Vis, obtidos ao longo de 6,0 horas, após a adição de Triton X-100 (0,10 M) a uma solução de HMF em tampão (pH = 7,67). Na figura seguinte (**Figura IV.24.**), graficou-se o decaimento da absorbância no comprimento de onda $\lambda = 478$ nm, que é a banda da forma básica (**A**).

Figura IV.23.: Espectros de absorção do HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em solução micelar de Triton X-100 (0,10 M) contendo tampão Bis-tris (10,0 mM) para manter pH = 7,67, obtidos ao longo de 6 horas (desde a adição do detergente), mantido a $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.24.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm, de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Triton X-100 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10,0 mM) em pH = 7,67.

IV.1.4.2. Espectro de absorção do HMF em função do pH e especiação em soluções contendo Triton X-100

Foi realizado um estudo da variação da absorbância de soluções de HMF em Triton X-100 (polioxietileno[10]isooctil fenil eter) 0,10 M, em tampão Bis-tris 10 mM. Os espectros de absorção, **Figura IV.25.**, foram registrados após 5 horas de equilíbrio das soluções.

Figura IV.25.: Espectros de absorção do HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em solução micelar de Triton X-100 (0,10 M) contendo tampão Bis-tris (10 mM) nos pHs: 1,47; 2,03; 2,23; 2,71; 2,94; 3,21; 3,43 e 4,18, após 5 h de equilíbrio sob condições controlada de temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

IV.1.4.3. Efeito da variação do pH sobre a curva de transiente de absorção do HMF em Triton X-100

O comportamento do HMF em presença de detergente não iônico foi estudado em soluções micelares (0,10 M) de Triton X-100. O comprimento de onda de excitação da amostra foi o harmônico 355 nm e a absorbância, foi monitorada em 510 nm. A concentração do HMF na solução final era de $2,0 \times 10^{-5}$ M e o tampão Bis-tris 24 mM. Os valores dos tempos de vida (τ) nos vários pHs estão registrados na **Tabela IV.5.** Na **Figura IV.26.** estão graficados os valores de $k_{\text{obs}} = (1 / \tau)$ *versus* $[\text{H}^+]_{\text{aq}}$, a concentração de prótons na fase aquosa intermicelar.

Tabela IV.5.: Tempo de vida do transiente do HMF em solução 0,10 M de Triton X-100, 24 mM de tampão Bis-tris, sob condições controladas de temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

<i>pH</i>	<i>τ (ns)</i>
2,03	12,2
2,23	19,3
2,71	49,1
2,94	73,7
3,21	116
3,43	158
4,18	301

Figura IV.26.: Gráfico de k_{obs} para o HMF em função da concentração de prótons na fase intermicelar contendo 0,10 M de Triton X-100.

IV.1.5. HMF em presença de Brij 35

IV.1.5.1. Salto de concentração de detergente em soluções de HMF em Brij 35

O comportamento do HMF em presença de solução micelar de detergente não iônico, também foi estudado em polioxietileno[23]dodecil eter (Brij 35 $\text{\AA}$). As **Figuras IV.27., IV.28., IV.29., IV.30., IV.31., IV.32., IV.33. e IV.34.**, apresentam os resultados do comportamento dos espectros UV-Vis após a adição de Brij 35 (0,10 M) a uma solução $2,0 \times 10^{-5}$ M de HMF tamponada

com Bis-tris ou Borato (10 mM) em diferente pHs. O transiente de absorção no comprimento de onda $\lambda = 476$ nm para os pHs: 8,52; 8,98; 9,06; 9,18; 9,34; 9,38; 9,79; 10,13, está apresentado nas **Figuras IV.35., IV.36., IV.37., IV.38., IV.39., IV.40., IV.41., IV.42.** respectivamente. Todas as curvas cinéticas foram reunidas na **Figura IV.43.**

Na **Tabela IV.6**, encontram-se os resultados de $k_{obs} = (1 / \tau)$, para o decaimento da banda da base **A**, extraídos das figuras anteriores. Na **Figura IV.44**, encontram-se representados os valores de $\log(k_{obs})$ *versus* $[H^+]_{aq}$.

Figura IV.27.: Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 3,5 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Bis-tris (0,10 M) com pH = 8,52 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Figura IV.28.: Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Bis-tris (0,10 M) com pH = 8,98 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Figura IV.29.: Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Borato (0,10 M) com pH = 9,06 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Figura IV.30.: Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Borato (0,10 M) com pH = 9,18 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Figura IV.31.: Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Borato (0,10 M) com pH = 9,34 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Figura IV.32.: Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Bis-tris (0,10 M) com pH = 9,38 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Figura IV.33.: Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,10 m) em solução tampão de Bis-tris (0,10 M) com pH = 9,79 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Figura IV.34.: Espectros de absorção UV-Vis de solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) medidos durante 2,0 h, após a adição de Brij 35 (0,1 M) em solução tampão de Bis-tris (0,1 M) com pH = 10,13 e termostatizada em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Figura IV.35.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 8,52.

Figura IV.36.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 8,98.

Figura IV.37.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Borato (10 mM) em pH = 9,06.

Figura IV.38.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Borato (10 mM) em pH = 9,18.

Figura IV.39.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Borato (10 mM) em pH = 9,34.

Figura IV.40.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 9,38.

Figura IV.41.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 9,79.

Figura IV.42.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 476$ nm de uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) em pH = 10,13.

Figura IV.43.: Decaimentos das absorvâncias em $\lambda = 476$ nm das soluções de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M) em tampão Bis-tris (10 mM) nos diferentes pHs das curvas das Figuras IV.35. a IV.42..

Tabela IV.6.: Valores de k_{obs} em $\lambda = 476$ nm em função do pH intermicelar para soluções de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo Brij 35 (0,10 M, adicionado em $t = 0$) em tampão Bis-tris ou Borato (10 mM), termostatizado em $25,0 \pm 0,1$ °C.

Tampão (10 mM)	pH	$k_{obs} (s^{-1}) \times 10^6$
Bis-tris	8,52	459
Bis-tris	8,98	974
Borato	9,06	775
Borato	9,18	1130
Borato	9,34	1210
Bis-tris	9,38	1700
Bis-tris	9,79	1960
Bis-tris	10,13	2920

Figura IV.44.: Gráfico de $\log(k_{obs})$ versus $[H^+]_{aq}$ para o HMF em solução micelar de Brij 35.

IV.1.5.2. HMF e a recuperação após o salto de concentração de detergente Brij 35

Após o completo equilíbrio da solução de HMF em Brij 35 (0,10 M) pH = 8,52 (**Figura IV.27.**), adicionou-se HCl (solução estoque 0,10 M) em quantidade suficiente para acidificar a solução a pH = 1,0. A **Figura IV.45.** mostra as variações dos espectros de absorção após as mudanças dos pHs.

Figura IV.45.: Curvas de absorção UV-Vis após o salto de concentração de detergente nas condições de pH = 8,52 e após o salto de pH para pH = 1,0.

IV.1.5.3. Salto de concentração com misturas dos detergentes Brij 35 e CTACl em soluções de HMF

Estudou-se o comportamento de soluções contendo concentrações fixas de HMF após salto de concentração de uma mistura dos detergentes CTACl e Brij 35. Variou-se a fração molar dos dois detergentes, mantendo a concentração total final de detergente em 0,10 M. Nas **Figuras IV.46., IV.47., IV.48. e IV.49.**, estão apresentados os resultados típicos do comportamento do espectro UV-Vis ao longo do tempo após a

adição de Brij 35 e CTACl a uma solução tampão Bis-tris 10 mM termostatzada a $25,0 \pm 0,1$ °C. As **Figuras IV.50., IV.51., IV.52. e IV.53.** apresentam o decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm das soluções ao longo do tempo, para diferentes frações molares de Brij 35 e CTACl, adicionado em $t = 0$. A **Figura IV.54.** contém todas as cinéticas de desaparecimento da absorbância de **A** em $\lambda = 478$ nm, ao longo do tempo, para todas as razões de Brij 35 e CTACl.

Figura IV.46.: Espectros de absorção UV-Vis, obtidos ao longo do tempo, para uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo 0,10 M de Brij 35 em tampão Bis-tris 0,10 mM no pH = 7,43 ($\chi = 1$).

Figura IV.47.: Espectros de absorção UV-Vis, obtidos ao longo do tempo, para uma solução de HMF (2,0 x 10⁻⁵ M) contendo 0,05 M de Brij 35, e 0,05 M de CTACl, (χ = 0,50) em tampão Bis-tris 0,10 mM no pH = 7,43.

Figura IV.48.: Espectros de absorção UV-Vis, obtidos ao longo do tempo, para uma solução de HMF (2,0 x 10⁻⁵ M) contendo 0,025 M de Brij 35 e 0,075 M de CTACl, (χ = 0,25) em tampão Bis-tris 0,10 mM no pH = 7,43.

Figura IV.49.: Espectros de absorção UV-Vis, obtidos ao longo do tempo, para uma solução de HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo 0,10 M de CTACl, ($\chi = 0$), em tampão Bis-tris 0,10 mM no pH = 7,43.

Figura IV.50.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 478$ nm das soluções ao longo do tempo para Brij 35 $\chi = 1$ adicionado em $t = 0$.

Figura IV.51.: Decaimento da absorvância em $\lambda = 478 \text{ nm}$ das soluções de HMF ao longo do tempo para Brij 35 $\chi = 0,5$ e CTACl, adicionado em $t = 0$.

Figura IV.52.: Decaimento da absorvância em $\lambda = 478 \text{ nm}$ das soluções de HMF ao longo do tempo para Brij 35 $\chi = 0,25$ e CTACl, adicionado em $t = 0$.

Figura IV.53.: Decaimento da absorvância em $\lambda = 478$ nm das soluções de HMF ao longo do tempo para Brij 35 $\chi = 0$ e CTACl, adicionado em $t = 0$.

Figura IV.54.: Decaimentos da absorvância em $\lambda = 478$ nm das soluções ao longo do tempo, reunidos para todas as frações molares de Brij 35 e CTACl, adicionado em $t = 0$

Na **Tabela IV.7.** estão reunidos os resultados de k_{obs} em $\lambda = 478$ nm após a adição dos detergentes Brij 35, CTACl e misturas de Brij 35 e CTACl em $t = 0$, em soluções contendo HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M). Na **Figura IV.56.** estão graficados os valores de $\log(k_{obs})$ versus χ_{CTACl} .

Tabela IV.7.: Valores de k_{obs} das absorvâncias em $\lambda = 478$ nm após a adição dos detergentes (CTACl e Brij 35) em $t = 0$, para as soluções contendo HMF ($2,0 \times 10^{-5}$ M).

<i>Fração molar χ</i> <i>CTACl</i>	<i>Decaimento $\tau(s)$</i>	<i>$k_{obs} (s^{-1}) \times 10^6$</i>
0	2010	498
0,50	401	2490
0,75	196	5100
1,00	107	9340

Figura IV.55.: Correspondência entre $\log(k_{obs})$ e χ_{CTACl} para as soluções de HMF com χ crescente em CTACl.

IV.2. Estudos com o 4',7-dihidroxi-flavílio (DHF) em meio aquoso

IV.2.1. Espectro de absorção do DHF com a variação do pH e especiação

Os espectros de absorção do DHF foram obtidos após saltos de pH, em que a solução inicial passou de $\text{pH} \approx 1$ para valores mais altos a depender do volume de base adicionado. O procedimento para a obtenção dos espectros, bem como a aparelhagem, estão descritos no procedimento IV.1.4. . Na **Figura IV.56.**, estão graficados os espectros de absorção UV-Vis obtidos ao longo do tempo, desde o tempo zero de adição da base até o equilíbrio da solução. Após o salto de pH, ocorre modificação lenta e gradual do perfil do espectro de absorção, a medida que ocorrem as reações de hidratação, tautomerização e isomerização. A **Figura IV.57.** apresenta os valores da absorbância no comprimento de onda de absorção máxima da forma básica **A**, ou seja, em $\lambda = 495 \text{ nm}$. A figura seguinte (**Figura IV.58.**), apresenta os espectros em três momentos distintos: 1) antes da adição da base; 2) imediatamente após a adição; 3) no estado de equilíbrio. A especiação do DHF em função do pH, foi obtida em vários experimentos e os dados obtidos mediante adição de base e após alcançado o equilíbrio, estão apresentados na **Figura IV.59.**

Figura IV.56.: Espectros UV-Vis de uma solução aquosa de DHF $2,0 \times 10^{-5}$ M, em tampão fosfato 10 mM, obtidos ao longo do tempo após o salto do pH, de 1,0 para 5,9.

Figura IV.57.: Variação da absorção em $\lambda = 495$ nm referente à Figura IV.56.

Figura IV.58.: Espectros de DHF antes do salto de pH (1,0); após o salto ($t = 0$); e no equilíbrio ($t = eq$) em pH = 5,9.

Figura IV.59.: Especificação do DHF envolvendo as formas de cátion flavílio (AH^+), base (A) e chalcona *trans* (C_{trans}).

IV.2.2. Fotólise por pulso de laser do DHF em meio aquoso

A partir de soluções de DHF de diferentes pHs com concentração próxima a $2,0 \times 10^{-5}$ M, tamponadas com tampão fosfato 24 mM, obtiveram-se as curvas de decaimento do transiente de absorção, usando 532 nm para a excitação da amostra e 510 nm para o monitoramento da absorbância. Na **Tabela IV.8.**, encontram-se os valores resultantes dos tempos de vida (τ), para um decaimento mono-exponencial e na **Figura IV.60.**, estão apresentados os valores de k_{obs} em função da concentração de prótons $[H^+]$ em meio aquoso.

Tabela IV.8.: Tempos de decaimento τ (± 10 %) em meio aquoso tamponado do transiente do DHF, em diferentes pHs.

<i>pH</i>	<i>τ (ns)</i>
2,48	9,5
2,53	11,4
2,60	11,8
2,69	15,3
2,76	18,4
2,82	18,7
2,97	29,6
3,20	46,4
3,40	58,7
3,42	65,4
3,64	101
3,77	136
4,12	217
5,33	283

Figura IV.60.: Gráfico de k_{obs} em função da concentração de prótons $[H^+]$ para o DHF em meio aquoso tamponado.

IV.2.2.1. Espectro de absorção do transiente para o DHF em meio aquoso

O espectro de absorção do transiente nos estudos de DHF (**Figura IV.61.**), foi obtido de modo análogo ao descrito para o HMF (item II.2.3.) com algumas diferenças como: o DHF foi preparado em tampão fosfato 20 mM e pH = 3,3. Em todos os comprimentos de onda verificados, o tempo de vida dos transientes de absorção permaneceu mono-exponencial com um valor próximo a 50 ns.

Figura IV.61.: Espectro de absorção do transiente, em tempo zero, do DHF em meio aquoso, gerado por pulso de laser de 5 ns de duração. Excitação em 355 nm.

IV.3. Estudos da antocianina natural Malvidina 3-glucosídeo (Oenina)

IV.3.1. Oenina em meio aquoso

IV.3.1.1. Variação temporal do espectro UV-Vis da Malvidina 3-glucosídeo (Oenina) em água

Preparou-se uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) em meio aquoso contendo tampão fosfato de 10 mM. O pH foi ajustado pela

pela adição de alíquotas de NaOH (2,00 M). Os espectros de absorção foram adquiridos conforme o procedimento descrito no item III.2.4. O pH foi conferido no final de cada experimento. As **Figuras IV.62., IV.63., IV.64., IV.65. e IV.66** mostram os espectros UV-Vis adquiridos ao longo do tempo, em cada pH.

Figura IV.62.: Variação temporal do espectro UV-Vis da oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 1,0, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.63.: Variação temporal do espectro UV-Vis da oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 3,02, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.64.: Variação temporal do espectro UV-Vis da oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 4,17, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.65.: Variação temporal do espectro UV-Vis da oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 5,09, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.66.: Variação temporal do espectro UV-Vis da oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 5,44, contendo tampão fosfato 10 mM; $25,0 \pm 0,1$ °C.

A **Figura IV.67.** apresenta os espectros UV-Vis de uma solução aquosa de oenina antes ($\text{pH} = 1$) e depois da adição da base ($\text{pH} = 5,90$) e após o equilíbrio da solução de antocianina.

Figura IV.67.: Espectros de absorção UV-Vis de oenina obtidos antes ($\text{pH} = 1$) e depois da adição da base ($\text{pH} = 5,90$) e no equilíbrio.

A partir dos espectros apresentados na **Figura IV.68.** foi possível construir um diagrama de especiação da oenina em meio aquoso: imediatamente após a adição da base (linha pontilhada) e no equilíbrio, situação na qual estão presentes as chalconas: **C_{trans}** e **C_{cis}** além da base **A** (linha cheia).

Figura IV.68.: Diagrama de especiação da oenina em meio aquoso de tampão fosfato como função do pH, imediatamente após a adição da base (linha pontilhada) e no equilíbrio (linha cheia).

IV.3.1.2. Fotólise por pulso de laser da Oenina em meio aquoso

Obtiveram-se as curvas utilizando a antocianina de origem natural oenina, em concentração de $2,0 - 2,5 \times 10^{-5}$ M. Utilizou-se

aparelhagem e o método descritos no item **III.2.1.**. Os valores de τ , na escala de ns, apresentados na **Tabela IV.9.**, foram calculados a partir da análise dos transientes de absorção (decaimentos mono-exponenciais em todos os casos) e, na **Figura IV.69.**, graficam-se os valores de k_{obs} , em função da concentração de próton $[H^+]$ em meio aquoso.

Tabela IV.9.: Valores dos tempos de vida do transiente (monitorado a 540 nm) da Oenina em meio aquoso fosfato (10 mM) na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C para diferentes valores de pHs

<i>pH</i>	τ (ns)
2,56	13,3
2,67	17,1
2,71	18,2
2,75	18,6
2,82	24,1
2,86	28,2
2,95	28,9
3,03	35,0
3,10	48,0
3,24	52,0
3,36	51,0
3,48	63,0
3,48	79,0

Figura IV.69.: Recíproco do tempo de vida (k_{obs}) em função da concentração de $[H^+]$ para a oenina em meio aquoso, contendo tampão fosfato 10 mM na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

O espectro de absorção do transiente da oenina, em tempo zero, foi obtido de acordo com o procedimento descrito no item **III.2.3.** e seu perfil pode ser acompanhado na **Figura IV.70.**

Figura IV.70.: Espectro de absorção do transiente da Oenina em meio aquoso (tempo zero), gerado por um pulso de laser de 5 ns a 355 nm.

IV.3.2. Oenina em solução micelar de SDS

IV.3.2.1. Espectro UV-Vis ao longo do tempo da Oenina na presença de SDS

Estudou-se o comportamento da oenina na presença de soluções micelares de SDS (0,10 M) contendo oenina (2×10^{-5} M), com a mudança do pH da solução. O comportamento dos espectros foi acompanhado ao longo do tempo, conforme descrito no item III.2.4. Os dados obtidos, estão apresentados nas **Figuras: IV.71., IV.72., IV.73., IV.74., IV.75., IV.76., IV.77., IV.78., IV.79. e IV.80.**

Figura IV.71.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 2,64, contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.72.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 3,02 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.73.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 3,76 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.74.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de Oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 5,11 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.75.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 5,78 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.76.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 6,17 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.77.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 6,60 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.78.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 7,05 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.79.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 7,55 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.80.: Variação temporal do espectro UV-Vis de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) em meio aquoso, pH = 8,11 contendo SDS 0,10 M e tampão fosfato 10 mM, na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

O conjunto de todos os espectros UV-Vis obtidos 10 s após a mistura da oenina com o meio micelar de SDS está apresentado na **Figura IV.81**. Na **Figura IV.82**, estão os espectros adquiridos após 600 s de mistura. A **Figura IV.83**., apresenta o conjunto de espectros adquiridos no estado de equilíbrio.

Figura IV.81. Espectros das soluções de oenina em SDS (retirados das **Figuras IV.71**. à **IV.80**.) 10 s após a adição de oenina.

Figura IV.82.: Espectros das soluções de oenina em SDS (retirados das Figuras IV.72. à IV.81.) 600 s após a adição de oenina.

Figura IV.83.: Espectros das soluções de oenina em SDS (retirados das Figuras IV.72. à IV.81.) no equilíbrio.

A curva de decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm, durante os primeiros dez minutos após a adição da oenina estão apresentados nas **Figuras IV.84. a IV.96.** Para efeito de comparação, todos esses decaimentos estão reunidos em uma única figura, **Figura IV.97.** A **Tabela IV.10.** apresenta todos os valores dos tempos de vida, bem como as constantes de velocidade de primeira ordem (k_{obs}), correspondentes aos decaimentos mostrados na figura anterior. É preciso salientar que esses valores foram calculados considerando-se os decaimentos mono-exponenciais ou bi-exponenciais.

Figura IV.84.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS ($0,10$ M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 2,64.

Figura IV.85.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 3,02.

Figura IV.86.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 3,76.

Figura III.87.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 5,11.

Figura IV.88.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 5,78.

Figura IV.89.: Decaimento da absorvância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 6,17.

Figura IV.90.: Decaimento da absorvância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 6,60.

Figura IV.91.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 7,05.

Figura IV.92.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 7,55.

Figura IV.93.: Decaimento da absorbância em $\lambda = 536$ nm de uma solução de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo SDS (0,10 M) em tampão fosfato (10 mM) em pH = 8,11.

Figura IV.94.: Decaimentos da absorção de Oenina em $\lambda = 536$ nm, das curvas das Figuras IV.84. à IV.93.

A especiação foi obtida utilizando-se os espectros de absorção das curvas acima e o procedimento usado foi descrito no item III.2.4., no qual foram dados os valores das absorvidades molares das espécies envolvidas no sistema em questão, **Figura IV.96**. A determinação das frações molares das chalconas foi feita com o auxílio do Prof. Dr. J. C. Lima da FCT, UNL, Portugal. As curvas da **Figura IV.97**. constituem um exemplo do resultado da subtração dos espectros do cátion flavílio e da base do espectro de absorção da solução de pH = 5,78 (**Figura IV.75**).

Figura IV.96.: Especiação da oenina em meio contendo SDS 0,10 M.

Figura IV.97.: As curvas de 2 a 6 correspondem aos tempos 2) 30; 3) 60; 4) 120; 5) 600; e 6) 10.800 s, subtraídas a contribuição espectral do cátion e da base.

IV.3.2.2. Fotólise por pulso de laser da Oenina em solução contendo SDS

Conforme o que foi descrito no item **III.2.2.**, determinaram-se os valores dos tempos de vida (τ), para cada valor de pH (**Tabela IV.11.**). Em todos os casos, empregou-se uma solução recém preparada de oenina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) contendo 0,10 M de SDS em tampão fosfato (10 mM) na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Tabela IV.11.: Tempos de vida do transiente da oenina em meio contendo SDS 0,10 M em tampão fosfato (24 mM), na temperatura de $25 \pm 0,1$ °C

<i>pH</i>	τ (ns)
4,36	131
4,43	135
4,83	369
5,00	476
5,48	1410
5,54	1400
6,38	4970

A **Figura IV.98.**, baseada nos dados da **Tabela IV.11.**, mostra a variação de k_{obs} em função da concentração de prótons $[H^+]_{aq}$ na fase aquosa intermicelar. A **Figura IV.99.** é o espectro de absorção do transiente em tempo zero, da oenina em solução de SDS 0,10 M.

Figura IV.98.: Recíproco do tempo de vida (k_{obs}) em função da concentração de $[H^+]_{aq}$ na fase aquosa intermicelar para a oenina em solução contendo SDS (0,10 M) e tampão fosfato 24 mM na temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

Figura IV.99.: Espectro de absorção do transiente em tempo zero, gerado por excitação pelo pulso de laser a 355 nm.

IV.4. Estudos da antocianina natural Pelargonina em meio aquoso

IV.4.1. Fotólise por pulso de laser da pelargonina

Através da fotólise por pulso de laser, obtiveram-se as curvas de decaimento do transiente de absorção de uma solução aquosa de pelargonina de concentração próxima a $2,0 \times 10^{-5}$ M. Os transientes foram obtidos conforme o item **III.2.1.1**. A **Tabela IV.12.**, mostra os valores dos tempos de vida (τ) encontrados

para um decaimento mono-exponencial. Os valores de k_{obs} em função da concentração de prótons $[H^+]$ em meio aquoso estão representados na **Figura IV.100**.

Tabela IV.12.: Tempos de vida dos transientes, gerados por fotólise por pulso de laser em 532 nm, da pelargonina com tampão fosfato 24 mM, a $25,0 \pm 0,1$ °C para diferentes valores de pHs

<i>pH</i>	τ (ns)
2,63	11,6
2,74	15,2
2,85	19,6
2,95	25,4
3,07	31,2
3,26	46,9
3,35	55,4

Figura IV.100.: Recíproco do tempo de vida (k_{obs}) em função da concentração de prótons $[H^+]$ para a pelargonina em meio aquoso de tampão fosfato 24 mM.

IV.5. Estudos da antocianina natural Cianina em meio aquoso

IV.5.1. Fotólise por pulso de laser da Cianina em meio aquoso

Empregando-se a fotólise por pulso de laser, soluções aquosas (fosfato 25 mM) de cianina ($2,0 \times 10^{-5}$ M) foram excitados com o segundo harmônico do laser (532 nm) e a absorção do transiente foi monitorada em 560 nm. A partir das curvas de absorção do transiente, os valores dos tempos de vida (τ), para todos os pHs investigados, foram calculados e estão apresentados na **Tabela IV.13**. Na **Figura IV.101**., estão representados os valores de k_{obs} em função de prótons $[H^+]$ em solução

Tabela IV.13.: Valores dos tempos de vida do transiente da cianina em meio aquoso, com tampão fosfato 25 mM, e temperatura $25,0 \pm 0,1$ °C para diferentes valores de pHs

pH	τ (ns)
2,74	23,0
2,94	34,3
2,95	39,3
3,07	52,4
3,26	71,3
3,40	86,0
3,47	74,1

Figura IV.101.: Recíproco do tempo de vida (k_{obs}) em função da concentração de $[H^+]$ para a cianina em meio aquoso.

O espectro de absorção do transiente da cianina em meio aquoso (**Figura IV.102.**) foi obtido de acordo com o procedimento descrito no item **III.2.3.** Usou-se uma solução de cianina de concentração próxima a $2,0 \times 10^{-5}$ M, preparada em tampão fosfato 25 mM de pH = 2,85. Para a cianina, utilizou-se a luz de excitação do laser em 532 nm.

Figura IV.102.: Espectro de absorção do transiente da cianina em meio aquoso em tempo zero, gerado pela excitação do pulso de laser em 532 nm.

IV.6. Fotólise por pulso de laser da antocianina natural Malvina em meio aquoso

Obtiveram-se as curvas da absorção do transiente utilizando-se uma solução de malvina com concentração próxima a $2,5 \times 10^{-5}$ M, em meio aquoso, com tampão fosfato de 25 mM. A excitação também foi feita em 532 nm e o monitoramento da absorbância, em 560 nm. Na **Tabela IV.14.**, encontram-se os valores dos tempos de vida (τ) dos decaimentos dos transientes de absorção para todos os pHs investigados. Na **Figura IV.103.**, registra-se os valores de k_{obs} em função da concentração de prótons $[H^+]$ em solução aquosa.

Tabela IV.14.: Tempos de vida (τ) do transiente de absorção da malvina em meio aquoso, em tampão fosfato 25 mM, na temperatura $25,0 \pm 0,1$ °C para diferentes valores de pHs

<i>pH</i>	τ (ns)
3,39	63,3
3,29	55,2
3,05	36,2
2,90	25,5
2,71	15,7
2,57	11,9
2,48	10,3

Figura IV.103.: Gráficos de k_{obs} em função da concentração de $[H^+]$ para a malvina em meio aquoso.

V. Discussão

V.1. Método

Estudos com antocianinas sintéticas (Lima et al., 1998 e Pina et al., 1996), envolvendo medidas de fluorescência resolvida no tempo, indicam que, no processo de protonação e desprotonação, os estados singletes excitados de HMF e DHF possuem caráter de compostos super-fotoácidos. O HMF, por exemplo, quando está no estado excitado, apresenta $pK_a^* = -0,8$, um valor muito mais baixo do que o HMF no estado fundamental, cujo pK_a é 4,4. Portanto, no estado excitado, o equilíbrio ácido-base é deslocado rapidamente no sentido da dissociação do próton, refletindo o caráter muito mais ácido deste estado.

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de fotólise por pulso de laser para a determinação da dinâmica do equilíbrio ácido-base (k_d e k_p) no estado fundamental de antocianinas. O equilíbrio ácido-base das antocianinas estudadas, nos estados fundamental e excitado, está representado no esquema abaixo, destacando que o tempo total no processo de dissociação do próton de $(AH^+)^*$ e decaimento da base A^* para o estado fundamental é menor do que 1 ns (Lima et al., 1998).

No **Esquema V.1.**, $(AH^+)^*$ e A^* representam o cátion flavílio e a base quinoidal no estado excitado, enquanto que AH^+ e A representam o estado fundamental dessas espécies. A desprotonação do HMF no estado excitado e o decaimento da base quinoidal para o estado fundamental são extremamente

rápidos, com tempos de vida de 6 ps e 130 ps, respectivamente (Lima et al., 1998). A largura do pulso do laser é igual a 5 ns, isto é, muito mais lento do que a desprotonação e o decaimento dos estados excitados para o estado fundamental da base. Neste caso, as quatro espécies mostradas no esquema podem ser

Esquema V.1.: Representação esquemática do caminho que leva à formação da base A (no estado fundamental) em tempo menor que 1 ns, a partir da absorção da luz pulsada do laser pelo cátion flavílio no estado fundamental.

reduzidas a apenas duas espécies: a forma ácida AH^+ e a forma básica A do HMF no estado fundamental. Portanto, em cada pulso de laser, há a geração de base no estado fundamental. Segundo o Princípio de Le Chatelier, o sistema tenderá, após o pulso do laser, a voltar ao estado de equilíbrio inicial.

V.2. Comprovação do deslocamento do equilíbrio ácido-base do estado fundamental

A ocorrência do deslocamento do equilíbrio ácido-base do estado fundamental pode ser constatada através do espectro diferencial de absorção do transiente em tempo zero (no momento do pulso do laser) das antocianinas sintéticas ou naturais. O HMF, por exemplo, apresenta bandas de absorção distintas para o cátion flavílio ($\lambda = 416 \text{ nm}$) e para a base quinoidal ($\lambda = 464 \text{ nm}$). Com o aumento do pH, observa-se a formação da base quinoidal e o desaparecimento do cátion flavílio (**Figura IV.1.**). Devido ao deslocamento momentâneo do equilíbrio, no tempo zero, provocado pela absorção da luz do laser, há o desaparecimento do cátion flavílio e a formação de base. Na **Figura IV.4.**, observa-se que, na região de absorção da base quinoidal ($\lambda = 464 \text{ nm}$), a absorbância diferencial do transiente é positiva e, na região onde o cátion flavílio absorve ($\lambda = 416 \text{ nm}$), é negativa.

V.3. Transientes de absorção em pHs diferentes

O pulso do laser desloca o equilíbrio ácido-base do estado fundamental das antocianinas. Com o controle da concentração de prótons na solução por meio de soluções tampões, obtêm-se diversos transientes de absorção com diferentes tempo de decaimento (**Figura IV.2.**). O inverso do tempo de vida das

espécies ($1 / \tau$) fornece o valor de k_{obs} . O gráfico de k_{obs} em função de $[H^+]$ resulta em uma reta, de acordo com a **equação 3** (Maçanita et al., 2002). A intersecção com o eixo y e a inclinação desta reta, fornecem os respectivos valores das constantes de desprotonação e protonação (k_d e k_p) do estado fundamental.

$$k_{obs} = k_d + k_p \times [H^+] \text{ (equação 3)}$$

O valor de k_p é obtido com precisão aceitável, porém a determinação de k_d esbarra numa limitação prática. Para se obter um valor muito preciso de k_d , seria necessário fazer medidas numa faixa de pH em que $k_p \times [H^+] \ll k_d$, o que não é factível neste sistema devido ao valor de pK_a ($pK_a = 4,4$). Não obstante esta limitação, é possível obter o valor de k_d com maior precisão a partir dos valores de k_p e pK_a pela relação:

$$K_a = 10^{(-pK_a)} = k_d / k_p$$

Os valores de K_a para as antocianinas podem ser obtidos da literatura ou por diagramas de especiação feitos a partir de espectrometria de absorção de soluções em diferentes pHs e, em alguns casos, usando as técnicas de fluxo detido ou de 1H -NMR.

V.4. Aplicação do Método

Para a aplicação do método, foram escolhidas duas antocianinas sintéticas: o HMF e o DHF. O HMF não sofre hidratação facilmente (**Esquema V.2.**). Portanto, os equilíbrios que levam à formação do hemiacetal e das chalconas estão ausentes. O DHF sofre hidratação e apresenta um sistema multi-equilíbrio de complexidade maior que o HMF, porém menor do que as antocianinas naturais. No equilíbrio, em $\text{pH} > 3,5$, o DHF apresenta uma pequena fração da espécie na forma de base (**A**) e uma fração maior da espécie na forma de chalcona *trans*, **C_{trans}** (**Figura IV.59.**); não estão presentes, portanto, quantidades significativas das espécies hemiacetal (**B**) ou chalcona *cis* (**C_{cis}**).

Os valores dos decaimentos dos transientes de absorção do HMF estão mostrados na **Tabela V.1.** e **Figura IV.3.** Os valores dos coeficientes angulares e lineares da **Figura IV.3.** Fornecem, segundo a **equação 3**, os valores de k_p , $3,56 \pm 0,09 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_d = 1,1 \pm 2,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Embora este valor de k_d apresente um erro muito grande, a utilização do valor de $K_a = 3,98 \times 10^{-5}$ (**Figura III.1.**) permite estimar um valor mais preciso para k_d , isto é, $1,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$.

O DHF, ao sofrer salto de pH, passa obrigatoriamente por um período de transição para o novo estado de equilíbrio. Esse período de transição pode ser constatado na **Figura IV.58.**, na qual o espectro de absorção do DHF mostra três fases distintas: **A**) o espectro de absorção da solução em $\text{pH} = 1$ (somente o

cátion flavílio está presente neste pH); **B**) o espectro de absorção 10 s após o salto de pH (de 1,0 para 5,9); **C**) o espectro de absorção ao atingir o novo estado de equilíbrio em pH 5,9 (3 horas). A conversão da base em chalcona é lenta, com $k_{\text{obs}} = 3,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ em pH = 5,9 (**Figura IV.57.**) e a absorção da base ($\lambda = 495 \text{ nm}$) decai ao longo do tempo. Entretanto, o equilíbrio ácido-base do DHF (AH^+ / A , $k_{\text{obs}} = 3,5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ em pH = 5,3) estabelece-se muito mais rapidamente, numa fração de um segundo.

A perturbação do equilíbrio ácido-base do estado fundamental do DHF pelo pulso do laser pode ser constatada através do espectro do transiente de absorção em tempo zero (**Figura IV.61.**), que apresenta um ΔOD positivo na região de absorção da base e negativo na região de absorção do cátion flavílio. As espécies que não pertencem ao equilíbrio estudado poderiam, em princípio, interferir nas medidas de fotólise por pulso de laser. Porém, a semelhança entre os tempos de vida dos transientes, numa solução preparada recentemente e na mesma solução após atingir o novo equilíbrio, indica que a chalcona *trans* C_{trans} e as demais espécies presentes no equilíbrio não interferem no tempo de vida das espécies AH^+ ou A .

Tabela V.1.: Tabela com as constantes de protonação e desprotonação do estado fundamental obtidos por fotólise por pulso de laser para as antocianinas em meio aquoso e em meio micro-heterogêneo.

<i>Antocianina</i>	<i>Meio</i>	<i>Coef. linear</i>	<i>Coef. angular</i>	<i>figura</i>	pK_a	$k_d(s^{-1}) \times 10^6$	$k_p(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}) \times 10^{10}$	pK_a^*	$k_d^*(s^{-1})$	$k_p^*(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$
HMF	aquoso	$0,01 \pm 0,02$	$0,0356 \pm 0,0009$	Figura IV.3.	4,45	1,4	3,56	-0,81 ⁽¹⁾	$15 \times 10^{10(1)}$	$2,3 \times 10^{10(1)}$
“	SDS 0,10M	$5,7 \pm 12 \times 10^4$	$1,79 \pm 0,05$	Figura IV.9.	6,70	0,036	18,2		$1,5 \times 10^{11(2)}$	$2,3 \times 10^{10(2)}$
“	CTACl 0,10M	$1,14 \pm 0,56 \times 10^6$	$8,2 \pm 0,3 \times 10^8$	Figura IV.22.	2,82	1,1	0,082			
“	Triton X- 100 0,10M	$3,38 \pm 0,32 \times 10^6$	$8,38 \pm 0,08 \times 10^9$	Figura IV.26.	3,51	3,4	0,84		2×10^{10}	$0,1 \times 10^{10}$
DHF	Aquoso	$0,0031 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,007$	Figura IV.60.	4,00	3,1	3,06	-0,62 ⁽¹⁾	8×10^{10}	$0,1 \times 10^{10}$
Oenina	Aquoso	$5,2 \pm 1,4 \times 10^6$	$2,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$	Figura IV.69.	3,70	5,3	2,5		$4,7 \times 10^{4(3)}$	$1,8 \times 10^{4(3)}$
“	SDS 0,10M	$9,7 \pm 8,2 \times 10^4$	$1,99 \pm 0,05 \times 10^{11}$	Figura IV.98.	6,00	0,18	18			
Pelargonina	Aquoso	$1,3 \pm 0,9 \times 10^6$	$3,55 \pm 0,06 \times 10^6$	Figura IV.100.	4,44	1,3	3,6			
Cianina	Aquoso	$1,4 \pm 1,5 \times 10^6$	$2,3 \pm 0,1 \times 10^7$	Figura IV.101.	4,09	1,8	2,2			
Malvina	Aquoso	$3,2 \pm 1,4 \times 10^6$	$2,97 \pm 0,08 \times 10^{10}$	Figura IV.103.	3,88	3,8	2,9			

(1)-Lima, J.C., et al., 2002; (2)-Giestas L., et al. (2003); (3)-Brouillard et al., 1977

Esquema V.2.: Sistema multi-equilíbrio comum às Antocianinas.

No estado excitado, o cátion flavílio do DHF, assim como aquele do HMF, apresenta característica de super-fotoácido. Os tempos de vida das espécies são suficientemente curtos (desprotonação de $(AH^+)^*$ em 12 ps, decaimento da base A^* em 270 ps) para que a posição do equilíbrio ácido-base do estado fundamental seja

deslocado durante o pulso de laser de 5 ns.

As constantes de acidez do DHF obtidas em meio aquoso foram: $k_d = 3,1 \pm 1,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $k_p = 3,06 \pm 0,06 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**Figura IV.60.**). Com o valor de pK_a igual a 4,0 (**Figura IV.59.**), obtém-se um valor de k_d de $3,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$.

O método de fotólise por pulso de laser para a determinação das constantes de acidez no estado fundamental apresenta os seguintes aspectos gerais:

- O tampão não age como doador de prótons, assim como a água;
- A constante de acidez (K_a) relaciona-se com a razão das constantes $K_a = 10^{(-pK_a)} = k_d / k_p$;
- A reatividade do cátion flavílio, através da hidratação, diminui a sensibilidade mas não altera a dinâmica da reação ácido-base;
- As outras espécies envolvidas nos equilíbrios de hidratação, isomerização e tautomerização, como o hemiacetal ou as chalconas, não geram a base sob a ação do pulso do laser.

V.5. Transferência de próton no estado fundamental em meio aquoso

Com o emprego da fotólise por pulso de laser foram obtidos os valores das constantes k_d e k_p , no estado fundamental de

duas antocianinas sintéticas e quatro antocianinas naturais em meio aquoso. Essas constantes também foram determinadas em meio micro-heterogêneo para uma antocianina sintética e outra natural (HMF e Oenina), cujos valores estão reunidos na **Tabela V.1**.

V.6. A dinâmica do equilíbrio ácido-base no estado fundamental em solução aquosa

Os valores de k_p , em meio aquoso, situam-se num intervalo relativamente reduzido entre $2,2$ a $3,6 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esse fato sugere que os valores de k_p estão limitados pela difusão do H^+ em meio aquoso e, portanto, muito pouco sensíveis à estrutura da antocianina. Por outro lado, os valores de k_d , em meio aquoso, estão relacionados com a natureza química da antocianina e a magnitude do k_d , determinando o valor de pK_a do estado fundamental.

Utilizando estes dados, junto com dados para o estado excitado das antocianinas e para os estados excitado e fundamental de outros foto-ácidos fenólicos, o Prof. J. C. Lima do Deptº de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, demonstrou que (Moreira et al., 2003) o valor de $\ln(k_d)$ (no estado singlete excitado ou estado fundamental), correlaciona-se com o caráter iônico da ligação O-H ($E_{\text{iônica}}$) conforme a **Figura V.1**. Esta correlação demonstra que a existência de um patamar que corresponde ao limite

máximo de velocidade na transferência intermolecular de um próton para a água. Esse fato sugere que na transferência envolve a água de solvatação da antocianina, que se reorienta a fim de receber o próton.

Figura V.1.: Correlação da constante de desprotonação ($\ln k_d$) do estado excitado e fundamental de antocianinas (o) e de uma série de fenóis e naftóis (●) conhecidos como bons foto-ácidos, com o caráter iônico da ligação O-H ($E_{(ion)}$). *Apud* Moreira et al., 2003.

A Oenina apresenta multi-equilíbrios complexos (**Figura IV.68.**) dependentes do pH, nos quais estão presentes várias espécies. A fluorescência do cátion flavílio $(AH^+)^*$ da oenina é muito fraca e quase inexistente em A^* (rendimento quântico f_f menor do que 4×10^{-3} Tese Dr. do Prof. Lima, J.C.). A adição de metanol as soluções aquosas da oenina resulta na redução do valor de k_d^* e a espécie $(AH^+)^*$ pode ser detectado, apresentando um tempo de vida de 20 ps. Mesmo assim, a baixa intensidade

de fluorescência da Oenina deixava dúvidas quanto à desprotonação do estado excitado em meio aquoso. Porém, o espectro do transiente de absorção da oenina em tempo zero é prova direta da formação de **A** e, portanto, uma prova indireta da formação de **A*** (**Figura IV.70.**).

Analisando os valores de k_d das antocianinas (**Tabela V.1**), nota-se que, em antocianinas naturais, os valores de k_d obedecem a seguinte ordem crescente: Pelargonina < Cianina < Malvina. Essas três antocianinas apresentam grupos substituintes distintos somente nas posições R_1 e R_3 .

V.7. A dinâmica do equilíbrio ácido-base em SDS

Como mencionado anteriormente, o HMF é uma antocianina sintética que, em condições normais de pH, não sofre hidratação; conseqüentemente, as etapas de hidratação, tautomerização e isomerização estão ausentes. Em pH = 11, cerca de 40% de **A** são convertidos em hemiacetal (**B**) e chalcona cis (**C_{cis}**), com aproximadamente 20 % de decomposição (Pina et al. 2001). Em pH = 10 (**Figura IV.7.**), dentro de um período de 24 horas, há apenas uma pequena redução da intensidade da banda de absorção do cátion flavílio.

Em um sistema micro-heteregêneo de micelas de SDS 0,10 M, há um aumento do valor de pK_a do HMF (que passa de 4,4 em meio aquoso para 6,7 em micelas) e uma grande estabilidade da cor. Utilizando o método de fotólise por pulso de laser, os valores obtidos das constantes k_d e k_p foram: $k_d = 0,036 \pm 0,106 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (**Figura IV.9.**) e $k_p = 18,2 \pm 0,5 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. O resultado de k_d contém uma margem de erro muito grande do ponto de vista estatístico. Porém, utilizando-se um $K_a = 2,0 \times 10^{-7}$, obtém-se $k_d = 0,036 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ou o mesmo valor. A presença das micelas de SDS diminui o valor de k_d do HMF em 40 vezes e aumenta o valor de k_p em 5 vezes, quando esses valores são comparados com aqueles obtidos em meio aquoso.

Em soluções de SDS 0,10 M, os valores das constantes de desprotonação e protonação do estado fundamental da oenina foram: $k_d = 0,2 \pm 0,13 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ e $k_p = 17,9 \pm 0,9 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. O valor mais preciso de k_d , obtido a partir do pK_a de 6,0 (**Figura IV.97.**) também é $k_d = 0,2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Comparando o meio aquoso com o meio micelar, a constante de desprotonação da oenina sofreu uma redução de 25 vezes enquanto que o aumento da constante de protonação foi de 7 vezes. A oenina apresenta várias espécies em equilíbrio, comum à grande maioria das antocianinas naturais. As diferenças dos diagramas de especiação em meio aquoso (**Figura IV.68.**) e em meio micelar (**Figura IV.97.**), estão enumeradas abaixo:

a) há um deslocamento do pK_a para região de maior pH, ou seja,

- há um $\Delta pK_a = 2,3$ unidades em relação ao meio aquoso;
- b) a base quinoidal (**A**), ausente em meio aquoso, apresenta-se estável em meio micelar de SDS em $pH > pK_a$;
- c) a chalcona **C_{cis}** está presente em maior proporção que a chalcona **C_{trans}** em meio micelar;
- d) o hemiacetal (que em meio aquoso é o produto principal em $pH > pK_a$) deixa de sê-lo em meio micelar, sendo a chalcona **C_{cis}** a forma principal.

De um modo geral, a presença de micelas de SDS resulta numa estabilização do cátion flavílio **AH⁺**, redução da constante de desprotonação (**k_d**) e desestabilização do hemiacetal (**B**).

V.8. Manipulação da reatividade do HMF

O HMF foi estudado em presença dos detergentes não iônico Triton X-100 e catiônico CTACl. A determinação das constantes de desprotonação do estado fundamental foi realizada usando a fotólise por pulso de laser e os valores encontrados foram: em solução de Triton X-100 0,1 M, $k_d = 3,4 \pm 0,3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (**Figura IV.26.**); em solução de CTACl 0,1 M, $k_d = 1,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (**Figura IV.22.**). As constantes de protonação encontradas foram: $k_p = 0,84 \pm 0,07 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Triton X-100, 0,1 M); e $k_p = 0,082 \pm 0,005 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CTACl, 0,1 M).

A eficiência de incorporação do HMF em micelas também pode ser verificadas através do valor de **K_s** (Vautier-Giongo et al.,

2002), a constante de incorporação da forma ácida do HMF no meio micelar. Os valores de K_s , medidos a 30 °C por Adilson A. Freitas em nosso laboratório usando a técnica de cromatografia líquida, são: 1200 M⁻¹ para o SDS; 100 M⁻¹ para o Brij 35; 36 M⁻¹ para o Triton-X e 3,2 M⁻¹ para o CTAB. Supondo que o valor de K_s do HMF em CTACl seja igual àquele em CTAB, a maioria do HMF encontra-se no meio aquoso. Portanto, a constante de desprotonação não sofreu alteração significativa. Entretanto, a constante de protonação diminuiu 43 vezes, sugerindo que a forma básica migre para a micela de CTACl antes de ser protonada.

Em micela de Triton X-100, a forma ácida do HMF está incorporada predominantemente na micela, acarretando um aumento modesto (por um fator de 2-3) em k_a (e uma diminuição modesta em k_p (por um fator de 4).

O resultado da incorporação de HMF em micelas de SDS é a estabilização do cátion flavílio em relação à base quinoidal e ao hemiacetal, conforme está mostrado no **Esquema V.3.**, tornando o cátion flavílio, ainda mais estável em relação ao meio aquoso. A estabilização da cor pode ser o resultado do pH local menor em torno da micela aniônica, mas este não é o único fator a ser considerado. Em micelas catiônicas e não iônicas, o cátion flavílio do HMF deixa de ser estável e passa a sofrer hidratação. Na micela catiônica, a constante de desprotonação quase não sofre variação, porém, a constante de protonação sofre uma redução de 43 vezes ao passar do meio aquoso para o meio contendo CTACl. Esse comportamento é consequência da desestabilização do cátion flavílio, em relação à base quinoidal e

ao hemiacetal (**Esquema V.4.**). Além da desestabilização do cátion flavílio, as micelas catiônicas induzem a estabilização da base e da chalconas através do aumento das constantes de hidratação e tautomerização.

A oenina apresenta um comportamento semelhante ao HMF em sistema micelar aniônico, com a diferença de que a oenina em meio aquoso está em equilíbrio com outras espécies. A redução de k_d ao passar do meio aquoso para a micela de SDS, foi de 26 vezes (para o HMF a redução foi de 40 vezes). Comparando a constante de hidratação, k_h , também houve redução, chegando a 18 vezes (k_h (água) = $0,085 \text{ s}^{-1}$ (Brouillard & Delaporte, 1977) contra k_h (SDS) = $0,0046 \text{ s}^{-1}$). A presença de micelas de SDS estabiliza o cátion flavílio, afetando de modo favorável as duas constantes de velocidade chaves para a estabilidade da cor, k_d e k_h .

V.9. Cinética após saltos de concentração de detergente e pH

Além das constantes k_p e k_d das antocianinas (**Tabela V.1.**), fizeram-se estudos da reatividade de hidratação e tautomerismo do HMF e da oenina após um salto de pH ou salto de concentração de detergente. Estudou-se, de forma preliminar, a reatividade do HMF na presença de CTACl através de saltos de pH (**Figura IV.18.**).

Nas figuras **Figuras IV.19.** e **IV.44.**, a grandeza de k_{obs} representa a rapidez do desaparecimento de **A** após um salto,

em pH fixo, da concentração de detergentes Brij 35 e CTACl, respectivamente. Na **Figura V.2.**, todos os resultados das duas figuras citadas anteriormente estão reunidos para ilustrar o fato de que as inclinações das duas retas são idênticas: $0,48 \pm 0,01$ (M^{-1}) em CTACl e $0,48 \pm 0,04$ (M^{-1}) em Brij 35. As duas retas estão separadas por aproximadamente 3,5 unidades de pH. A diferença entre os pK_a s (considerando que pK_a Brij 35 é próximo ao do Triton X-100) está ao redor de uma unidade de pH. Portanto, as mudanças provocadas pelas micelas de Brij 35 e CTACl na cinética de reação de HMF não estão relacionadas apenas com a diferença na concentração local de prótons nas duas micelas.

Figura V.2.: Variação de $\log(k_{obs})$ com o pH_{aq} para o HMF em CTACl e Brij 35 conforme Figuras IV.44. e IV.19.

HMF em SDS

Esquema V.3.: Diagrama energético para o HMF em meio micro-heterogêneo de micelas aniônicas

HMF em CTACl

Esquema V.4.: Diagrama energético para o HMF em meio micro-heterogêneo de micelas catiônicas.

Nos dois casos (CTACl e Brij 35), o pH no qual o desaparecimento de **HMF** é maior (k_{obs} é maior) está numa região do diagrama de especiação em que a fração molar de

cátion flavílio é pequena e em $\text{pH} > \text{pK}_a$. Este fato é uma indicação de que, após a hidratação do cátion flavílio, a saída do próton do complexo intermediário (**Esquema V.5.**) deve ser favorecido em pH mais alto.

Na **Figura IV.55.**, estão apresentados os valores de $\log(k_{\text{obs}})$ para HMF nas diferentes misturas de detergentes Brij 35 e CTACl. A cinética de desaparecimento de HMF em misturas dos detergentes, Brij 35 e CTACl varia linearmente com a proporção dos dois detergentes.

Esquema V.5.: Equilíbrio entre o cátion flavílio e o hemiacetal

VI. Conclusão

Há muito supõe-se que as antocianinas atuem também como proteção contra a radiação solar, mas, devido ao baixo rendimento quântico de fluorescência das antocianinas naturais, não foi possível comprovar essa função. Nas antocianinas naturais pelargonina, malvina, cianina e oenina, o cátion flavílio exibe pouca fluorescência. No entanto, o pulso do laser é capaz de gerar a base no estado fundamental, que pode ser evidenciado pelos espectros dos transiente de absorção em tempo zero. Desse modo, o principal processo de dissipação de energia de excitação absorvida pelas antocianinas naturais é através da transferência de próton do cátion flavílio no estado excitado para a água. Portanto, os processos não radiativos (transferência de próton), e não os radiativos (fluorescência), são a principal rota de dissipação de energia da luz.

Vários estudos de antocianinas em meio micelar sugeriram estabilização ou desestabilização da forma AH^+ em micelas (Roque et al., 1999 e Pina et al., 2001). Neste trabalho, medimos diretamente as constantes de velocidade associadas com o equilíbrio ácido-base pela técnica de fotólise por pulso de laser. Com base nestes valores, podemos afirmar com segurança que, os efeitos de micelas na estabilidade do cátion flavílio não está relacionado somente à mudança de pH local ou à constante dielétrica do meio, mas, também a um efeito intrínseco da micela que depende da carga da mesma. De especial interesse para eventuais aplicações de antocianinas como corantes naturais é a demonstração inequívoca de que um meio micelar aniônico

(SDS) propicia um elevado grau de estabilização da forma catiônica colorida, **AH⁺**, de antocianinas.

VII. Referencias bibliográficas

-Barden, C.L., Bramlage, W.J., *Separating the effects of low temperature ripening and light on loss of scald susceptibility in apples before harvest*, Journal of the American Society for Horticultural Science, **119**, 54-58 (1994)

-Bloor S.J., *Blue flower colour derived from flavonol-anthocyanin co-pigmentation in Ceanothus papillosus*, Phytochemistry, **45**, 1399-1405 (1997)

-Bloor S.J., Falshaw R., *Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue Agapanthus flowers*, Phytochemistry, **53** , 575-579 (2000)

-Brouillard, R. e Dangles, O., *Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging*, Food Chem. **51**, 365-371 (1994)

-Brouillard, R., Iacobucci G.A., Sweeny J.G., *Chemistry of Anthocyanin Pigments .9. UV Visible Spectrophotometric Determination of the Acidity Constants of Apigeninidin and 3*

related 3-deoxyflavylium salts, Journal of the American Chemical Society, **104**, 7585-7590 (1982)

-Brouillard, R., Dubois, J.E., *Mechanism of Structural Transformations of Anthocyanins in acidic media*, Journal of the American Chemical Society, **99**, 1359-1364 (1977)

-Bridle, P., Timberlake, C.F., *Anthocianins as natural food colours-selected aspects*, Food Chemistry, **58**, 103-109 (1997)

-Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., Williamson, M. P., *Polyphenol / Peptide Binding and Precipitation*, J. Agric. Food Chem., **50**, 1593-1601 (2002)

-Cooper-Driver G. A., *Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins*, Phytochemistry, **56**, 229-236 (2001)

-Cornard, J.P., Boudet, A.C., Merlin, J.C., *Complexes of Al(III) with 3'-4-dihydroxy-flavone: characterization, theoretical and spectroscopic study*, Spectrochimica Acta Part A, **57**, 591 602 (2001)

-Dangles O., Fargeix, G.e Dufour, C., *Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3',4',7-trihydroxyflavylium ion*, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 2, (8), 1653 -1663 (2000)

-Elhabiri, M., Figueiredo, P., Toki, K., Saito, N., e Brouillard, R.,

Anthocyanin-aluminium and -gallium complexes in aqueous solution, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, (2), 355 - 362 (1997)

-Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., *Competition between (+)-Catechin and (-)-Epicatechin in Acetaldehyde-Induced Polymerization of Flavanols*, J. Agric. Food Chem., **47**, 2088-2095 (1999)

-Es-Safi, N.-E., Le Guerneve, C., Cheynier, V., Moutounet, M., *New Phenolic Compounds Formed by Evolution of (+)-Catechin and Glyoxylic Acid in Hydroalcoholic Solution and Their Implication in Color Changes of Grape-Derived Foods*, J. Agric. Food Chem., **48**, 4233-4240 (2000)

-Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J., Garcia-Viguera, C., *Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New Source of Antiradical Activity for Foodstuff*, J. Agric. Food Chem., **48**, 1588-1592 (2000)

-Figueiredo, P., Lima, J.C., Santos, H., Wigand, M.C., Brouillard, R., Macanita, A.L., Pina, F., *Photochromism of the synthetic 4',7-dihydroxyflavylium chloride*, Journal of the American Chemical Society, **116**, 1249-1254 (1994)

-Figueiredo, P., Elhabari, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., Brouillard, R., *New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular co-pigmentation as a means for colour loss*, Phytochemistry, **41**, 301-308 (1996)

-Garcia-Viguera C, Bridle P, *Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylium salts with ascorbic acid*, Food Chemistry, **64**, 21-26 (1999)

-Goto, T. e Kondo, T., *Structure and molecular stacking of anthocyanins flower color variation*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **30**, 17-33 (1991)

-Houbiers, C., Lima, J. C., Macanita, A. L., Santos, H., *Color Stabilization of Malvidin 3-Glucoside: Self-Aggregation of the Flavylum Cation and Copigmentation with the Z-Chalcone Form*, J. Phys. Chem. B, **102**, 3578-3585 (1998)

-Jurd, L., Asen, S., *The formation of metal and "Co-pigment" complexes of cyanidin 3-glucoside*, Phytochemistry, **5**, 1263-1271 (1966)

-Lima J.C., Abreu, I., Brouillard, R., Macanita, A.L., *Kinetics of ultra-fast excited state proton transfer from 7-hydroxy-4-methylflavylium chloride to water*, Chemical Physics Letters, **298** (1-3), 189-195 (1998)

-Lima, J.C., Vautier-Giongo, C., Lopes, A., Melo, E., Quina, F.H., Macanita, A.L., *Color stabilization of anthocyanins: Effect of SDS micelles on the acid-base and hydration kinetics of malvidin 3-glucoside (Oenin)*, Journal of Physical Chemistry A, **106**, 5851-5859 (2002)

-Lima J.C., Tese de Doutorado, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, (1996)

-Macanita A.L., Moreira, P.F., Lima, J.C., Quina, F.H., Yihwa, C., Vautier-Giongo, C., *Proton transfer in anthocyanins and related flavylum salts. Determination of ground-state rate constants with nanosecond laser flash photolysis*, Journal of Physical Chemistry A, **106**, 1248-1255 (2002)

- Mazza, G., Brouillard, R., *Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products*, Food Chem., **25**, 207-225 (1987)

-Meyer, A. S., Yi, O.-S., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., Frankel, E. N., *Inhibition of Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Relation to Composition of Phenolic Antioxidants in Grapes (*Vitis vinifera*)*, J. Agric. Food Chem., **45**, 1638-1643 (1997)

-Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., Wrolstad, R. E., *Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes*, J. Agric. Food Chem., **50**, 519-525 (2002)

-Moreira, P. F., Jr., Giestas, L., Yihwa, C., Vautier-Giongo, C., Quina, F. H., Macanita, A. L., Lima, J. C., *Ground- and Excited-State Proton Transfer in Anthocyanins: From Weak Acids to*

Superphotoacids, J. Phys. Chem. A., **107**, 21-28 (2003)

-Pina, F., Melo, M.J., Santos, H., Lima, J.C., Abreu, I., Ballardini, R. e Maestri, M., *Excited state proton transfer in synthetic flavylum salts : 4-methyl-7-hydroxyflavylium and 4',7-dihydroxyflavylium Example of a four-level molecular device to invert the population of the excited state*, New J. Chem., 1093-1098 (1998)

-Pina, F., Melo, M.J., Alves, S., Ballardini, R., Maestri, M., Passaniti, P., *Micelle effect on ground and excited state proton transfer reactions involving the 4-methyl-7-hydroxyflavylium cation*, New Journal of Chemistry, **25**, 747-752 (2001)

-Ramirez-Tortosa, C., Andersen, Ø.M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R., Duthie, G.G., *Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats*, Free Radic. Biol. Med., **31**, 1033-1037 (2001)

-Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Moutounet, M., *Interactions of Grape Seed Tannins with Salivary Proteins*, J. Agric. Food Chem., **47**, 42-47 (1999)

-Sims DA, Gamon JA, *Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages*
Remote Sensing of Environment, **81**, 337-354 (2002)

-Somers, T.C., *The polymeric nature of wine pigments*, *Phytochemistry*, **10**, 2175-2186 (1971)

-Stephen, J., Bloor, S.J., *Deep blue anthocyanins from blue Dianella berries*, *Phytochemistry*, **58**, 923 - 927 (2001)

Vautier-Giongo, C., Yihwa, C., Moreira, P. F., Jr., Lima, J. C., Freitas, A. A., Alves, M., Quina, F. H., Macanita, A. L., *Manipulation of the Reactivity of a Synthetic Anthocyanin Analogue in Aqueous Micellar Media*, *Langmuir*, **18**, 10109-10115 (2002)

-Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Chang, Y.-C., Booren, A. M., Gray, J. I., DeWitt, D. L., *Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin, from Tart Cherries*, *J. Nat. Prod.*, **62**, 802-802 (1999)

-Wang, S. Y., Lin, H.-S., *Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage*, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 140-143 (2000)

-Woodall, G., Stewart, G., *Short communication. Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of Syzygium*, *J. Exp. Bot.*, **49**, 1447 -1450 (1998)

-Yoshida K, Toyama-Kato Y, Kameda K, Kondo T, *Sepal color*

variation of Hydrangea macrophylla and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode, Plant and Cell Physiology, 44, 262-268 (2003)