UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

BARBARA HELD

Estudos da Copigmentação de Compostos
Análogos às Antocianinas

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

30/04/2015

BARBARA HELD

**Estudos da Copigmentação de Compostos
Análogos às Antocianinas**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências (Química)*

Orientador (a): Prof. Dr. Frank Herbert Quina

São Paulo

2015

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

Held, Barbara
H474e Estudos da copigmentação de compostos análogos às
antocianinas / Barbara Held. -- São Paulo, 2015.
228p.

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

1. Fotoluminescência 2. Equilíbrio ácido-base I. T. II. Quina,
Frank Herbert, orientador.

541.35 CDD

***Dedico esta tese aos meus pais, Bruno e Vanda, que
muito contribuíram para minha formação acadêmica, e
à minha querida irmã, Natália.
Dedico também ao meu amado esposo Felipe, cujo
suporte foi essencial para a finalização do trabalho.***

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço ao Prof. Dr. Frank Herbert Quina pela oportunidade, orientação, paciência, atenção e confiança ao longo do trabalho. Sem dúvida o ambiente amistoso do laboratório, assim como a liberdade no desenvolvimento da tese e os assuntos científicos periféricos à realização do projeto muito contribuíram para minha formação também como pessoa.

À Profa. Dra. Cornelia Bohne por me receber em seu laboratório com toda a cordialidade e boa vontade, e por todos os ensinamentos mesmo em um curto período de tempo.

Aos colegas de laboratório (embora poucos no período em que o trabalho foi desenvolvido), essenciais no tortuoso ambiente acadêmico – Sergio, Luis, Caroline, Volnir e Cassio.

Ao Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader e seu grupo de pesquisa, por facilitar a utilização do espectrofotômetro para as medidas de cinética.

Aos Professores que também contribuíram para minha formação, ao longo da Iniciação Científica – Mauro Bertotti e Neyde Y. Murakami Iha.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido (processo 2010/00383-9).

RESUMO

Held, B. **Estudos da Copigmentação de Compostos Análogos às Antocianinas**. 2015. 228p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foram propostos, no projeto, estudos da interação de compostos modelos de antocianinas (íons hidroxiflavílios e hidroximetoxiflavílios sintéticos) com íons metálicos e com copigmentos orgânicos, bem como uma busca de sinergia na complexação ternária destes modelos de antocianinas com íons inorgânicos e copigmentos orgânicos. A partir dos resultados obtidos, pretendeu-se modelar e entender as interações antocianina - íon metálico - copigmento envolvidas na estabilização da cor de antocianinas *in natura*.

Para realizar os estudos, quatro compostos modelos – os cloretos dos íons 7,8-diidroximetil-4-metilflavílio (DHMF), 8-hidroximetil-4-metil-7-metoxiflavílio (HMMF), 3',4'-diidroximetil-7-metoxiflavílio (B-DHMF) e 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF) – foram sintetizados. Todas as estruturas apresentam hidroxilas e/ou metoxilas vicinais (estruturas tipo catecol). Além de sua síntese e caracterização, foram estudadas as propriedades fotofísicas e as espécies presentes em solução quantificadas, de acordo com os multiequilíbrios aos quais estes compostos estão submetidos.

Nos estudos de complexação por um íon metálico, o Al^{3+} , foram determinadas estequiometrias de 1:1, 2:3 e 1:3 (relação flavílio: Al^{3+}), dependendo da metodologia adotada. As constantes de complexação foram estimadas na ordem de 10^4 a 10^5 M^{-x} , onde x depende da estequiometria determinada.

A segunda etapa envolveu a interação com copigmentos orgânicos, tais como os ácidos p-cumárico (PCA), ferúlico (FRA), sinápico (SNA), vanílico (VNA) e sirínico (SRA). Utilizando espectroscopia de absorção e de fluorescência, determinaram-se

estequiometrias de 1:1 para todos os pares pigmento-copigmento. As constantes dos equilíbrios também foram estimadas sem diferenças significativas entre os pares, embora a afinidade do flavílio pelos derivados de ácido cinâmico seja ligeiramente maior. Com relação à base quinonoidal, em pHs em torno de 5,0, foram observadas interações menores, tendo sido concluído que os ácidos fenólicos estabilizam melhor a forma catiônica. A estabilidade do cátion flavílio frente à hidratação na presença destes copigmentos foi avaliada e, em comparação com a estabilidade promovida pelos íons Al^{3+} ou pela cucurbit[7]urila, é pouco significativa.

Finalmente, a terceira etapa envolveu o estudo dos complexos ternários. Observaram-se diferenças na estabilização do cátion flavílio dependendo das concentrações dos dois tipos de copigmento – concentrações maiores de Al^{3+} foram requeridas para estabilizar o B-DHMF em comparação ao sistema supramolecular formado com DHMF. A partir destes estudos, foi concluído que a presença do copigmento orgânico, embora em pequena extensão, também é responsável pela manutenção da cor, quando envolvido no complexo ternário, evidenciando comportamento sinérgico.

Como parte integrante do projeto, um trabalho em colaboração com o grupo da Profa Cornelia Bohne, na *University of Victoria (UVic)*, no Canadá, foi desenvolvido, envolvendo a determinação das constantes de equilíbrio e de velocidade de uma reação do tipo “hóspede-hospedeiro”, entre um íon flavílio (B-TMF) e um composto orgânico cíclico (hospedeiro), a cucurbit[7]urila – CB[7]. A estequiometria da reação foi determinada como 1:2 (B-TMF:CB[7]) sendo que concentrações de CB[7] suficientes para formar o complexo 1:2 promovem uma estabilização da forma catiônica do flavílio nunca vista antes, em pHs em que a reação de hidratação ocorre.

Palavras-chave: antocianinas, íon flavílio, íons Al^{3+} , ácidos fenólicos, copigmentação e cucurbiturila.

ABSTRACT

Held, B. **Studies of the Copigmentation of Compounds Analogous to Anthocyanins**. 2015. 228p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The proposal of this project was to study the reactions of model compounds of anthocyanins (synthetic hydroxyl- and hydroxyl/methoxyflavylium ions), with metal ions, as well as organic copigments or both, in a ternary complex. With results obtained from these systems, it was intended to propose mechanisms and understand how this structure – flavylium ion-metal ion-organic copigment – enables maintenance of the color of anthocyanins *in natura*. This study would provide information to investigate and search for evidence of synergic effect in the stabilization of these model compounds.

Four model compounds were synthesized for the study – chloride salts of 7,8-dihydroxy-4-methylflavylium (DHMF), 8-hydroxy-4-methyl-7-methoxyflavylium (HMMF), 3',4'-dihydroxy-7-methoxyflavylium (B-DHMF) and 7,3',4'-trimethoxyflavylium (B-TMF). Each one of those compounds presents a catechol-like structure, with bounded hydroxyl and/or methoxy in vicinal positions. The main aims were to synthesize, characterize and study photophysical properties, with a view to determine the concentration of multiequilibria species according to the pH of the medium.

The first step was an investigation of metallic complexes produced with Al^{3+} ions. The stoichiometries were determined as 1:1, 2:3 and 1:3 (flavylium: Al^{3+}), depending on the methodology adopted. Complexation constants were estimated between 10^4 and 10^5 M^{-x} , where x represents stoichiometry.

A second step was the study of interaction of flavylium ions and organic copigments, such as the following phenolic acids: para-coumaric acid (PCA), ferulic acid (FRA), sinapic acid (SNA), vanilic acid (VNA) and sirynpic acid (SRA). Using absorption and

fluorescence spectroscopy, a stoichiometry of 1:1 for each of the pigment:copigment pairs was found. Equilibrium constants were determined, and there was no significant differences considering the structures of flavylum ions, although for cinnamic acid derivatives the constants found are slightly larger. The same reactions studied in pH of about 5.0, showed that affinities between the cationic forms and the phenolic acids are larger in comparison to the bases. The stability of the cation regarding the hydration reaction is much smaller in the presence of these organic acids than in the presence of Al^{3+} or cucurbit[7]uril.

At last, the third step involved both types of copigment – metal ions and organic acids – in a supramolecular assembly with flavylum ions. It was observed that different concentrations of the two types of copigments studied are required for B-DHMF and DHMF to stabilize the cationic form; much larger concentrations of Al^{3+} in the complex in which B-DHMF are involved. It was also concluded that the presence of organic copigments, less representatively, are necessary for the maintenance of the color, an evidence of synergic behaviour.

An additional study, which was not in the scope of the project, but did provide another source of flavylum stabilization, was the reaction inclusion of B-TMF with CB[7] – cucurbit[7]uril. This step was developed in collaboration with Prof. Cornelia Bohne, at the University of Victoria (UVic), Canada. It consisted of the determination of the equilibrium and kinetic constants of this host-guest system, in which the flavylum cation interacts as the guest for the macrocyclic host. It was proposed a sequential 1:2 (B-TMF:CB[7]) mechanism that provides an alternative to avoid the hydration reaction of B-TMF, where CB[7] must be present in concentrations large enough to form the 1:2 complex.

Keywords: anthocyanins, flavylum ion, Al^{3+} ions, phenolic acids, copigmentation and cucurbituril.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHMF	7,8-diidroxi-4-metilflavílio
HMMF	8-hidroxi-4-metil-7-metoxiflavílio
B-DHMF	3',4'-diidroxi-7-metoxiflavílio
B-TMF	7,3',4'-trimetoxiflavílio
PCA	ácido para-cumárico
FRA	ácido ferúlico
SNA	ácido sinápico
VNA	ácido vanílico
SRA	ácido siríngico
CB[6]	cucurbit[6]urila
CB[7]	cucurbit[7]urila
CB[8]	cucurbit[8]urila
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
$\varepsilon_{\text{máx}}$	absortividade molar no máximo de absorção observado
HA^+	cátion flavílio
A	base quinonoidal
A^-	base quinonoidal ionizada
BH	hemiacetal
C_{CIS}	chalcona cis
C_{TRANS}	chalcona trans
B	somatória de BH, C_{CIS} e C_{TRANS} , no equilíbrio aparente
K_{a1}	constante de equilíbrio da primeira reação de desprotonação

K_{a2}	constante de equilíbrio da segunda reação de desprotonação
K_h'	constante de equilíbrio aparente da reação de hidratação
K_h	constante de equilíbrio da reação de hidratação
K_t	constante de equilíbrio da reação de tautomerização
K_i	constante de equilíbrio da reação de isomerização
pK_a	logaritmo negativo da constante de equilíbrio da reação de desprotonação
pK_{a1}	logaritmo negativo da constante de equilíbrio da primeira reação de desprotonação
pK_{a2}	logaritmo negativo da constante de equilíbrio da segunda reação de desprotonação
pK_h'	logaritmo negativo da constante de equilíbrio aparente da reação de hidratação
f_{HA}	fração molar do cátion flavílio
f_Z	fração molar da base quinonoidal zwitteriônica
f_A	fração molar da base quinonoidal ionizada
f_B	fração molar de B
CM	complexo formado entre um flavílio e íons Al^{3+}
β	constante de complexação observada para a reação com íons Al^{3+}
K_{CM}	constante do equilíbrio de complexação com íons Al^{3+}
m	número de mols do flavílio na reação de complexação com íons Al^{3+}
n	número de mols de íons Al^{3+} na reação de complexação

$n_{Al^{3+}}$	número de mols de íons Al^{3+} iniciais (concentração analítica)
n_F	número de mols de flavílio iniciais (concentração analítica)
$\chi_{Al^{3+}}$	fração molar de íons Al^{3+} no ponto estequiométrico da reação de complexação
ε_{CM}	absortividade molar do complexo CM
Cop	copigmento orgânico
CP	complexo entre copigmento orgânico e cátion flavílio
CP _A	complexo entre copigmento orgânico e base quinonoidal
K_{CP}	constante de copigmentação envolvendo copigmentos orgânicos
z	número de mols de copigmento orgânico na copigmentação
ε_{HA}	absortividade molar do cátion flavílio
ε_{CP}	absortividade molar do complexo de copigmentação orgânica
r_ε	razão entre ε_{CP} e ε_{HA}
E_0	área integrada sob a banda de emissão, na ausência do supressor de fluorescência (copigmento orgânico)
E	área integrada sob a banda de emissão, na presença do supressor de fluorescência (copigmento orgânico)
K_Q	constante de supressão de fluorescência
[Q]	concentração do supressor de fluorescência
k_{obs}	constante de velocidade observada
G	hóspede nas reações de inclusão
H	hospedeiro nas reações de inclusão

GH	complexo hóspede-hospedeiro de estequiometria 1:1
GH_2	complexo hóspede-hospedeiro de estequiometria 1:2
K_1	constante de equilíbrio da primeira etapa da reação de inclusão do B-TMF com CB[7]
K_2	constante de equilíbrio da segunda etapa da reação de inclusão do B-TMF com CB[7]
$[G]_T$	concentração total do hóspede
$[G]_{eq}$	concentração do hóspede no equilíbrio
$[H]_T$	concentração total do hospedeiro
$[H]_{eq}$	concentração do hospedeiro no equilíbrio
$[G@H]_{eq}$	concentração do complexo hóspede-hospedeiro de estequiometria 1:1 no equilíbrio
$[G@H_2]_{eq}$	concentração do complexo hóspede-hospedeiro de estequiometria 1:2 no equilíbrio
ϕ_f	rendimento quântico de fluorescência do B-TMF
ϕ_1	rendimento quântico de fluorescência do complexo GH
ϕ_2	rendimento quântico de fluorescência do complexo GH_2
I_{obs}	intensidade de fluorescência observada nos experimentos de isoterma de ligação da reação de inclusão
I_0	intensidade de fluorescência do B-TMF na ausência de CB[7]
I_{GH}	intensidade de fluorescência do complexo GH
I_{GH_2}	intensidade de fluorescência do complexo GH_2
$[H]_0$	concentração analítica do hospedeiro, CB[7]

k^+ constante de velocidade da etapa de associação da reação de inclusão do B-TMF com CB[7]

k^- constante de velocidade da etapa de dissociação da reação de inclusão do B-TMF com CB[7]

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura do cátion flavílio.	27
Figura 2. Representação dos equilíbrios envolvendo antocianinas, nos estados fundamental e excitado.	29
Figura 3. Representação das estruturas do flavonóide (flavocomelina) e da antocianina (malonilawobanina) constituintes da comelinina.	34
Figura 4. Da esquerda para a direita: estrutura do glicoluril (monômero dos CB[n]s), estrutura tridimensional do CB[7], e suas dimensões – diâmetro interno e dos portais e altura.	38
Figura 5. Estruturas dos íons flavílios investigados no projeto.	41
Figura 6. Estruturas dos copigmentos orgânicos investigados no projeto.	441
Figura 7. Esquema representando um sistema de fluxo detido com entrada simples, para duas seringas, e detecção por fluorescência.	45
Figura 8. Metodologias descritas na literatura para a síntese de sais de flavílio.	47
Figura 9. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 1,4 a 5,1, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	62
Figura 10. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 5,0 a 8,5, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	63
Figura 11. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 8,5 a 11,0, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	63
Figura 12. Frações molares do cátion flavílio do DHMF em função do pH, com ajuste sigmoidal para o pK_{a1}	64

Figura 13. Frações molares da base quinonoidal ionizada do DHMF em função do pH, com ajuste sigmoidal para o pK_{a2}	65
Figura 14. Espectros de absorção do DHMF, em função do pH, registrados imediatamente (curva cheia) e após 4 horas do preparo das soluções (ponto-traço)..	66
Figura 15. Espectros de absorção do DHMF, em função do pH, após 4 horas (curva cheia) e após 8 horas do preparo das soluções (ponto-traço).....	66
Figura 16. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 8,4 a 11,0, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas por N_2	67
Figura 17. Gráfico de especiação dos equilíbrios de DHMF, em função do pH.	68
Figura 18. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 1,4 a 3,9, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	69
Figura 19. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 5,1 a 9,1, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	70
Figura 20. Frações molares da base quinonoidal do HMMF em função do pH, com ajuste sigmoidal.	771
Figura 21. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 0,5 a 5,4, registrados após 3 horas do preparo das soluções.	72
Figura 22. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 6,5 a 9,9, registrados após 3 horas do preparo das soluções.	72
Figura 23. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 4,5 a 8,5, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas por N_2	73

Figura 24. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 8,5 a 11,1, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas por N_2 .	74
Figura 25. Gráfico de especiação dos equilíbrios de HMMF, em função do pH.	74
Figura 26. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 0,9 a 7,5, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas com N_2 .	76
Figura 27. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 7,1 a 10,0, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas por N_2 .	76
Figura 28. Frações molares do cátion flavílio do B-DHMF em função do pH, com ajuste sigmoidal para o pK_{a1} .	77
Figura 29. Frações molares da base quinonoidal ionizada do B-DHMF, em função do pH, para a determinação do pK_{a2} .	78
Figura 30. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 0,9 a 4,5, registrados 3 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.	79
Figura 31. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 4,5 a 7,5, registrados 3 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.	79
Figura 32. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 7,1 a 10,0, registrados 3 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.	80
Figura 33. Frações molares de “B” (somatória das espécies resultantes da abertura do anel), após 3 horas de incubação, em função do pH, com ajuste sigmoidal para a determinação do pK_h' .	881

Figura 34. Gráfico de especiação dos equilíbrios ácido-base de B-DHMF, em função do pH.....	82
Figura 35. Gráfico de especiação do equilíbrio de hidratação aparente do B-DHMF, em função do pH.	82
Figura 36. Espectro de emissão do B-DHMF, em pH 1,0. Concentração analítica de pigmento = $3 \cdot 10^{-5}$ M.	83
Figura 37. Espectros de absorção do B-TMF, na faixa de pH de 1,0 a 6,0, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	84
Figura 38. Espectros de absorção do B-TMF, na faixa de pH de 1,0 a 6,0, registrados 2 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	85
Figura 39. Espectros de absorção do B-TMF, na faixa de pH de 1,0 a 6,0, registrados 24 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	885
Figura 40. Frações molares do cátion flavílio em função do pH, com ajuste sigmoidal para pK_n'	87
Figura 41. Gráfico de especiação do equilíbrio de hidratação aparente do B-TMF, em função do pH.	87
Figura 42. Espectro de fluorescência do B-TMF, em pH 1,1. Concentração analítica de pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	88
Figura 43. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 0,3 a 6,0, com razão pigmento:Al ³⁺ em 1:100. Concentração analítica de pigmento = $3,7 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹	89
Figura 44. Espectros de absorção do DHMF, em pH 4,1, com variação na razão pigmento:Al ³⁺ . Concentração analítica de pigmento = $3,8 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ . (R300 = 300Al ³⁺ :1pigmento).....	90

Figura 45. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de íons Al^{3+} , para DHMF, com coeficiente estequiométrico $n = 1$.	991
Figura 46. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 0,3 a 6,0, com razão pigmento: Al^{3+} em 1:100. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.	92
Figura 47. Espectros de absorção do B-DHMF, em pH 4,9, com variação na razão Al^{3+} :pigmento. Concentração analítica de pigmento = $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ($R_{300} = 300\text{Al}^{3+}:1\text{pigmento}$).	92
Figura 48. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de íons Al^{3+} , para B-DHMF, com coeficiente estequiométrico $n = 1$.	93
Figura 49. Espectros de absorção do DHMF, em pH 4,9, com concentrações do pigmento e de íons alumínio variáveis (faixa de concentração de 0 a 50 μM para ambos).	94
Figura 50. Gráfico de absorbância em 700 nm contra fração molar de íons alumínio para o complexo DHMF- Al^{3+} (<i>Job plot</i>).	95
Figura 51. Espectros de absorção do B-DHMF, em pH 5,3, com concentrações do pigmento e de íons alumínio variáveis (faixa de 5 a 50 μM para ambos, na figura correspondem a 0 a 20 μL de solução).	96
Figura 52. Gráfico de absorbância em 530 nm contra fração molar de íons alumínio (<i>Job plot</i>).	96
Figura 53. Espectros de absorção do B-DHMF complexado com íons alumínio, em pH 5,3, com concentração de íons alumínio fixa (5,1 mM) e do pigmento variável (faixa de 4,6 a 23 μM).	97
Figura 54. Gráfico de absorbância em 530 nm contra concentração do complexo B-DHMF – Al^{3+} (determinação da absortividade molar do complexo – em destaque na caixa de texto).	98

Figura 55. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 1,0, com concentrações crescentes de ácido ferúlico. Concentração analítica de pigmento = $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$	100
Figura 56. Espectros de absorção do B-TMF, pH 1,0, com concentrações crescentes de ácido ferúlico. Concentração analítica de pigmento = $2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$	100
Figura 57. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de ácido ferúlico adicionado ao B-DHMF, conforme equação (16).	102
Figura 58. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de ácido ferúlico adicionado ao B-TMF, conforme equação (16).	102
Figura 59. Espectros de fluorescência do B-DHMF, em pH 1,1, com concentrações crescentes de ácido sinápico.	104
Figura 60. Espectros de fluorescência do B-TMF, em pH 1,1, com concentrações crescentes de ácido sinápico.	104
Figura 61. Gráfico de Stern-Volmer, para B-DHMF e SNA, pH 1,1.	105
Figura 62. Gráfico de Stern-Volmer, para B-TMF e SNA, pH 1,1.	105
Figura 63. Espectros de absorção do DHMF, pH 5,1, com concentrações crescentes de ácido p-cumárico. Concentração analítica de pigmento = $3,64 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$	108
Figura 64. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de ácido p-cumárico adicionado a DHMF, conforme equação (16).	109
Figura 65. Espectros de absorção do DHMF, pH 5,4, com concentrações crescentes de ácido ferúlico. Concentração analítica de pigmento = $3,8 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$	110
Figura 66. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 6,1, com concentrações crescentes de ácido p-cumárico. Concentração analítica de pigmento = $3,05 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$	110
Figura 67. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,4, com concentrações crescentes de ácido ferúlico. Concentração analítica de pigmento = $6,46 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$	111

Figura 68. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de ácido ferúlico, para DHMF em pH 5,4, conforme equação (16).....	112
Figura 69. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de ácido p-cumárico, para B-DHMF em pH 6,1, conforme equação (16).	112
Figura 70. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de ácido ferúlico, para B-DHMF em pH 5,4, conforme equação (16).	113
Figura 71. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de FRA, pH 1,0, monitoramento em 470 nm.....	115
Figura 72. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de FRA, pH 2,4, monitoramento em 470 nm.....	115
Figura 73. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de FRA, pH 3,5, monitoramento em 470 nm.....	116
Figura 74. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de FRA, pH 4,5, monitoramento em 470 nm.....	116
Figura 75. Espectros de B-DHMF, variando o pH, 24 horas após a sua adição. Concentração analítica do pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5}$ M.	117
Figura 76. Espectros de B-DHMF em presença de FRA 3,0 mM, variando o pH, 24 horas após a adição do pigmento. Concentração do pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5}$ M.	1118
Figura 77. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de PCA, pH 5,3, monitoramento em 470 nm.....	119
Figura 78. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de FRA, pH 5,3, monitoramento em 470 nm.....	119
Figura 79. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl_3 nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = 25 μM	121

Figura 80. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de PCA nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = 25 µM.....	121
Figura 81. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl ₃ e PCA nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = 25 µM.	122
Figura 82. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl ₃ e PCA, separadamente e à mesma solução na razão de 1:100. Concentração do pigmento = 25 µM.	122
Figura 83. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl ₃ e PCA na razão de 1:10, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 µM.....	123
Figura 84. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl ₃ e PCA na razão de 1:100, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 µM.....	124
Figura 85. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl ₃ nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = 25 µM.	125
Figura 86. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl ₃ e PCA nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = 25 µM.	125
Figura 87. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl ₃ e PCA, separadamente e à mesma solução, na razão de 1:10. Concentração do pigmento = 25 µM.	126
Figura 88. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl ₃ e PCA, separadamente e à mesma solução na razão de 1:100. Concentração do pigmento = 25 µM.	126
Figura 89. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl ₃ na razão de 1:1, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 µM.....	127
Figura 90. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl ₃ na razão de 1:100, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 µM.....	128

Figura 91. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de PCA na razão de 1:1, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μ M.....	128
Figura 92. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de PCA na razão de 1:100, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μ M.....	129
Figura 93. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de Al^{3+} e PCA na razão de 1:1, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μ M.....	129
Figura 94. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de Al^{3+} e PCA na razão de 1:10, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μ M.....	130
Figura 95. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de Al^{3+} e PCA na razão de 1:100, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μ M.....	130
Figura 96. Espectros de absorção de DHMF, em presença de FRA e íons Al^{3+} , em diferentes estequiometrias, pH = 4,8.....	132
Figura 97. Espectros de absorção do complexo ternário, com estequiometria de 3:1 (DHMF: Al^{3+}), com concentrações variáveis de FRA, pH = 4,8.	132
Figura 98. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de Al^{3+} , pH 5,3, monitoramento em 470 nm.	134
Figura 99. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de FRA, pH 5,3, monitoramento em 470 nm.....	134
Figura 100. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de FRA e Al^{3+} , pH 5,3, monitoramento em 470 nm.....	135
Figura 101. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 2:1:2 (B-DHMF: Al^{3+} :FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.....	137
Figura 102. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 3:1:3 (B-DHMF: Al^{3+} :FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.....	137

Figura 103. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 4:1:0 (B-DHMF:Al ³⁺ :FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.....	138
Figura 104. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 4:1:2 (B-DHMF:Al ³⁺ :FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.....	138
Figura 105. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 4:1:4 (B-DHMF:Al ³⁺ :FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.....	139
Figura 106. Espectros de fluorescência do B-TMF com subseqüentes adições de CB[7], pH 3,0. Concentração fixa de B-TMF = 0,2 µM e concentrações de CB[7] de 0,32 a 158 µM.....	140
Figura 107. Isoterma de ligação usando o modelo de estequiometria 1:1, solução analítica.	141
Figura 108. Isoterma de ligação usando o modelo de complexação sequencial 2:1, solução analítica.	142
Figura 109. Curvas obtidas no <i>stopped-flow</i> para cada concentração de CB[7] utilizada, de 0,892 µM (C – curva vermelha) a 5,35 µM (H – curva laranja). Concentração de B-TMF = 0,2 µM. As curvas A (preta) e B (azul) correspondem ao registro para água contra água e água contra B-TMF, respectivamente.	143
Figura 110. Ajuste da curva de k_{obs} contra concentração de CB[7], dois conjuntos de dados.....	144
Figura 111. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3.	145
Figura 112. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3, 30 minutos após o preparo das soluções (salto de pH).....	146
Figura 113. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3, 60 minutos após o preparo das soluções (salto de pH).....	146

Figura 114. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3, com 180 minutos de incubação do B-TMF, registrados imediatamente após a adição de CB[7].	147
Figura 115. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3, com 180 minutos de incubação do B-TMF, registrados 80 minutos após a adição de CB[7].	148
Figura 116. Curvas cinéticas do B-TMF com adição de CB[7], pH 4,3.	149
Figura 117. Espectros de absorção do B-TMF com adição de CB[7], pH 4,3, início do experimento.	1500
Figura 118. Espectros de absorção do B-TMF com adição de CB[7], pH 4,3, sete horas do início do experimento.	1500
Figura 119. Curvas cinéticas do B-TMF com adição de CB[7], pH 5,5.	1511
Figura 120. Espectros de absorção do B-TMF com adição de CB[7], pH 5,5, início do experimento.	1511
Figura 121. Espectros de absorção do B-TMF com adição de CB[7], pH 5,5, sete horas do início do experimento.	1522
Figura 122. Curvas cinéticas do B-TMF com adição de CB[7], pH 4,6, após 12 horas de incubação.	1533
Figura 123. Espectros de absorção da titulação de CB[7] com cobaltoceno.	1544
Figura 124. Absorbância do cobaltoceno em 261 nm contra concentração nominal de CB[7].	1544

Índice de Tabelas

Tabela 1. Relação das metaloantocianinas cujas estruturas foram elucidadas [25]..	335
Tabela 2. Parâmetros obtidos para os sais de flavílio, em solução aquosa, pH ~ 1,0.	661
Tabela 3. Dados obtidos a partir do método de Job – constantes do equilíbrio obtidas para cada ponto e a média entre elas.....	99
Tabela 4. Constantes de copigmentação médias (em M^{-1}) e razões r_{ϵ} determinadas por espectroscopia de absorção, obtidas a 25°C.	103
Tabela 5. Constantes de copigmentação médias (em M^{-1}) determinadas por espectroscopia de absorção e de fluorescência, para os flavílios fluorescentes, obtidas a 25°C.....	106
Tabela 6. Constantes de copigmentação para os pares DHMF-PCA e DHMF-FRA, em dois pHs distintos, obtidas a 25°C.....	114
Tabela 7. Constantes de velocidade observadas para B-DHMF na ausência e presença de PCA e FRA em pH 5,3, obtidas a 25°C.	120
Tabela 8. Constantes de velocidade observadas para B-DHMF na ausência e presença de FRA e Al^{3+} ou ambos, em pH 5,3, obtidas a 25°C.....	136
Tabela 9. Constantes de velocidade observadas para B-DHMF na presença de FRA e Al^{3+} em diferentes estequiometrias, em pH 5,3, obtidas a 25°C.	139
Tabela 10. Constantes de velocidade observadas obtidas pelo software <i>Pro Data Viewer</i> para cada concentração de CB[7], obtidas a 20°C.	144
Tabela 11. Constantes de complexação B-DHMF - Al^{3+} , comparando duas metodologias.	166

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. Copigmentação com ácidos orgânicos, polifenóis e outros flavonoides	30
1.2. Complexação com íons metálicos e Metaloantocianinas.....	32
1.3. Complexação do tipo “hóspede-hospedeiro” entre íons flavílios e macrocíclicos	37
2. OBJETIVOS.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Reagentes.....	42
3.2. Equipamentos	43
3.3. Procedimentos Experimentais – IQ-USP	46
3.4. Procedimentos Experimentais – UVic.....	544
4. RESULTADOS	60
4.1. Determinação dos parâmetros dos multiequilíbrios	60
4.2. Copigmentação com íons metálicos	88
4.3. Copigmentação com ácidos fenólicos.....	99
4.4. Complexos Ternários	120
4.5. Reação de inclusão do cloreto de 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF) com cucurbit[7]urila (CB[7])	140
5. DISCUSSÃO.....	156
5.1. Determinação dos parâmetros dos multiequilíbrios	156
5.2. Copigmentação com íons metálicos	1611
5.3. Copigmentação com ácidos fenólicos.....	167
5.4. Complexos Ternários	174
5.5. Reação de inclusão do cloreto de 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF) com cucurbit[7]urila (CB[7])	179
6. CONCLUSÕES.....	186
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
APÊNDICES	199

1. INTRODUÇÃO

As antocianinas (do grego *anthos*, flor, e *kyanos*, azul) pertencem à classe dos flavonoides (polifenóis) e compreendem o maior conjunto de pigmentos solúveis em água do reino vegetal. São responsáveis não somente pela cor azul, como pelas cores roxa, vermelha, laranja e amarela da maioria das flores e frutas [1-8]. Também podem estar presentes em folhas, raízes, bulbos, tubérculos, sementes, caules, cereais e legumes. O cromóforo básico das antocianinas é o íon 2-fenilbenzopirílio, mais conhecido como cátion flavílio, representado na Figura 1 [3,7-8].

Figura 1. Estrutura do cátion flavílio.

Na natureza, as antocianinas encontram-se glicosiladas, geralmente nas posições C3 e C5, sendo classificadas em mono, di ou triglicosiladas, de acordo com o número de glicosídeos (moléculas de carboidrato) ligados ao flavílio. O produto da hidrólise destas unidades de carboidrato resulta na aglicona correspondente, também conhecida como antocianidina, ou seja, a antocianina livre de segmentos glicosídeos. Tipicamente, as antocianinas apresentam substituintes -OH nas posições já citadas, glicosiladas ou não, e ainda um ou mais substituintes -OH e -OCH₃ no anel B.

As cores observadas nas antocianinas e nas antocianidinas dependem de diversos fatores, tal como o padrão de substituição (que advém da gama de combinações possíveis, considerando a posição e tipo de substituinte nos anéis ou ainda a possibilidade de glicosilação e o tipo de glicosídeo). Outros fatores incluem a presença de íons metálicos ou ácidos orgânicos naturais, o pH local do meio, a associação com outros flavonoides, a autoassociação e a natureza do microambiente em que a antocianina se encontra. A posição e o número de grupos $-OH$ ou $-OCH_3$ influencia a absorção eletrônica, distribuída por toda a região visível do espectro eletrônico, pois altera o número de átomos de oxigênio que podem delocalizar a carga pelo sistema π .

Tanto as antocianinas naturais, como muitos dos seus análogos sintéticos (sais de flavílio mais simples), possuem uma reatividade química bastante rica no estado fundamental em meio aquoso, envolvendo uma série de equilíbrios simultâneos dependentes do pH do meio [8-14]. Estes incluem (Figura 2) equilíbrios ácido-base da antocianina, para formar a base quinonoidal correspondente (com escala de tempo de nano- a microssegundos), de hidratação e abertura do anel flavílio (com escala de tempo de segundos a minutos) e de tautomerização e isomerização (com escala de tempo de minutos a horas) das chalconas resultantes da abertura do anel flavílio [15,16]. O cátion flavílio e a base quinonoidal são as únicas espécies que absorvem na região visível, sendo que o cátion sempre absorve em comprimentos de onda menores que a base. No estado excitado, as antocianinas se tornam ácidos bastante fortes, com valores de pK_a^* no estado excitado na faixa de -1 a 0 [15-20].

Figura 2. Representação dos equilíbrios envolvendo antocianinas, nos estados fundamental e excitado.

As antocianinas apresentam potencial de aplicação como corantes na indústria de alimentos, pelo fato de já fazerem parte de nossa dieta, além de serem atóxicos, bons antioxidantes e solúveis em água [3,8,18]. Todavia, o seu emprego é limitado em função da rápida perda de cor em $pH > 3$, devido à instabilidade química do cátion flavílio acima deste pH . Na natureza, porém, a cor das antocianinas freqüentemente persiste mesmo em valores de pH mais elevados. Esta persistência da cor *in natura* deve-se, em muitos casos, à complexação da forma colorida da antocianina por um íon metálico [21-28] ou por uma molécula orgânica incolor (o copigmento) [10,20,26,30-32], o que inibe

a reação de hidratação em meios ácidos. Este fenômeno, conhecido como “copigmentação”, também provoca, em alguns casos, profundas mudanças na cor da antocianina, como por exemplo de vermelho para azul [25-26].

Provavelmente, apenas as antocianinas que possuem em sua estrutura pelo menos dois grupos hidroxila em orto (tipo catecol) no anel B podem coordenar eficientemente com íons metálicos [25-29]. A natureza da interação entre o copigmento e a antocianina, que resulta na estabilização da cor da antocianina, mesmo em valores mais altos de pH, ainda não está completamente esclarecida.

1.1. Copigmentação com ácidos orgânicos, polifenóis e outros flavonoides

A copigmentação pode ser do tipo inter- ou intramolecular. Em algumas antocianinas naturais a copigmentação intramolecular estabiliza a cor em meio neutro; nestes casos, o copigmento consiste, por exemplo, de um grupo cinamato ou uma flavona ligado covalentemente a um dos segmentos glicosídicos da antocianina [26,33]. Ela ocorre por meio do alinhamento entre a porção acila do copigmento e o anel pirílio, dificultando o ataque nucleofílico da água. Pode envolver mais de um copigmento intercalado entre segmentos glicosídicos, interagindo com o cátion flavílio, formando uma estrutura tipo “sanduíche” [33,34].

A copigmentação intermolecular é estabelecida quando um copigmento orgânico incolor não faz parte da estrutura da antocianina, mas forma um complexo que também previne o processo de hidratação.

O mecanismo clássico de copigmentação [26] supõe que as antocianinas e os copigmentos empilham através de interações do tipo π (“pi-stacking”), com forças de van der Waals, efeito hidrofóbico, interações iônicas e a participação secundária de ponte de hidrogênio [33,35,36]. Por outro lado, recentemente foi demonstrado, por meio de trabalhos do grupo [20,31-32] e em um trabalho envolvendo cálculos computacionais descritos por *DFT* [36], que a complexação de antocianinas ou íons flavílios sintéticos (como o íon 7-metoxi-4-metilflavílio) com copigmentos também envolve um componente importante de transferência de carga (da molécula do copigmento para o cátion flavílio). Esta componente seria a responsável pelo aparecimento de uma nova banda de absorção nos espectros registrados para antocianina/flavílio na presença de um copigmento orgânico, correspondente ao estado excitado do complexo de transferência de carga [35,36].

A interação entre copigmento e antocianina/flavílio pode ocorrer com ambas as formas, o cátion e a base quinonoidal, considerando que ambos são aproximadamente planares e podem alinhar-se sobre o copigmento. Contudo, constantes de copigmentação pelo menos três ordens de magnitude menores foram reportadas para o par base-copigmento em relação ao par cátion-copigmento [36,37].

A estequiometria reportada para estes complexos é de 1:1 [34-36], e se observam alterações nas propriedades espectroscópicas, tais como deslocamento batocrômico (conforme citado acima, acompanhando a formação do complexo), e efeito hiper- ou hipocrômico. Tanto na copigmentação inter-quanto na intramolecular, parece haver uma forte dependência da afinidade entre copigmento e antocianina/flavílio com os substituintes encontrados em ambas as estruturas, sua posição e a presença ou ausência de segmentos glicosídicos [33,34].

Em alguns casos, a copigmentação envolve não somente a antocianina e o copigmento, mas sim uma sinergia entre uma ou mais antocianinas, um ou mais copigmentos e um ou dois íons metálicos [25,26,38], podendo resultar em um arranjo supramolecular que se automonta em solução [25,26].

1.2. Complexação com íons metálicos e Metaloantocianinas

A elucidação estrutural de algumas antocianinas presentes principalmente em flores azuis, tais como a *Commelina communis* (trapoeraba asiática) e a *Hydrangea macrophylla* (hortênsia), comprovaram a presença dos íons metálicos Mg^{2+} e Al^{3+} , respectivamente [39,40]. Entretanto, pelo fato de serem observadas variações na cor, por exemplo, da *Hydrangea*, de azul (em meio ácido) para vermelho (em meio levemente alcalino), a primeira hipótese, proposta por Willstätter e Everest, em 1913, para explicar esta observação baseava-se em mudanças de pH nos vacúolos das células epidérmicas [41].

Já era conhecido na época que, apesar de apresentarem cores diferentes, certas flores da mesma espécie ou de espécies distintas poderiam conter o mesmo pigmento – este seria o caso da cianina, que está presente tanto nas flores do milho azul, como nas pétalas da rosa vermelha [42].

Porém, sabendo que o vacúolo sempre apresenta pH perto da neutralidade, Shibata et al., em 1919, por meio de estudos envolvendo reações entre Mg^{2+} ou Ca^{2+} e flavonóis, as quais resultavam em compostos azul esverdeados, propuseram outra hipótese envolvendo a complexação dos pigmentos por cátions metálicos [43]. Ambas as teorias foram então refutadas pelos Robinson, os quais introduziram uma terceira hipótese, em 1931, em que a variação e intensificação da cor seria consequência da presença de moléculas orgânicas incolores, tais como tanina e flavonóis, as quais foram denominadas como “copigmentos” [44].

Apenas em 1991, Goto e Kondo ofereceram evidências experimentais que deram sustentação para pelo menos uma das três hipóteses históricas acima citadas – a hipótese de complexação, por meio da elucidação estrutural da comelinina, presente na *Commelina communis* [39]. Outras tentativas de determinação estrutural e síntese da comelinina já haviam sido reportadas antes por Hayashi, Abe e Mitsui (1957) [45] e Goto, Hoshino e Takase (1979) [22].

Trata-se de uma supramolécula constituída de três componentes: um tipo de antocianina (malonilawobanina), um tipo de flavonóide (flavocomelina) e um íon metálico (Mg^{2+}), dispostos na proporção de 6:6:2, respectivamente, Figura 3. Tanto a complexação, quanto a interação entre os anéis aromáticos da

antocianina e o flavonóide (em pares) seriam importantes para a manutenção da cor azul do pigmento.

Figura 3. Representação das estruturas do flavonóide (flavocomelina) e da antocianina (malonilwobanina) constituintes da comelinina.

Após outras estruturas semelhantes à da comelinina terem sido reportadas, foi possível fazer uma generalização do arranjo disponível em metaloantocianinas. As estruturas elucidadas referem-se aos pigmentos encontrados nas seguintes espécies: *Centaurea cyanus*, *Salvia patens*, *Salvia uliginosa* e *Nemophila menziesii*. Os pigmentos de todas estas espécies são constituídos por uma antocianina, um flavonóide e um ou mais íons metálicos na mesma proporção reportada para a *Commelina*, ou seja, 6:6:2, conforme a Tabela 1 [25].

Tabela 1. Relação das metaloantocianinas cujas estruturas foram elucidadas [25].

Flor	Pigmento	Antocianina	Flavona	Metal (is)
C. cyanus	Protocianina	Succinilcianina	Malonilflavona	Mg ²⁺ , Fe ³⁺
S. patens	Protodelfina	Malonilawobanina	Apigenina diglucosídeo	Mg ²⁺
S. uliginosa	Cianosalvianina	Acetilmalonilawobanina	Apigenina diglucosídeo	Mg ²⁺
N. menziesii	Nemofilina	Nemofilinina	Apigenina diglucosídeo/ Malonilapigenina diglucosídeo	Mg ²⁺ , Fe ³⁺

Experimentos envolvendo a substituição do(s) centro(s) metálico(s) foram bem sucedidos em alguns casos. A substituição por pelo menos um íon metálico distinto do íon original, para cada um dos cinco pigmentos reportados, produziu estruturas semelhantes, cujo espectro de absorção apresentou bandas centradas em comprimentos de onda bem próximos ou idênticos aos originais [46]. Estes experimentos forneceram evidência para sustentar a hipótese de que a complexação entre sítios da antocianina e alguns cátions metálicos, tais como Fe³⁺ e Co³⁺, envolve transferência de carga do ligante

para o metal [47], cujo máximo de absorção associado centra-se em 675 nm, produzindo a cor azul.

Outros aspectos da complexação de antocianinas com íons metálicos dizem respeito ao sítio de complexação, normalmente dois substituintes -OH vicinais no anel A ou no anel B, em que as distâncias da ligação carbono-oxigênio mostram-se distintas para cada substituinte -OH. No caso de complexação pelas hidroxilas nas posições C3' e C4', como ocorre para a comelinina, a distância C3' – O é maior, comparativamente à distância C4' – O. Isto ocorre devido à desprotonação do -OH em C4', a qual se encontra sob a forma de cetona [46].

Estudos envolvendo apenas complexação de antocianinas e/ou íons flavílios, sem a presença de copigmentos orgânicos, podem ser encontrados em [21-24,27,48-50]. Elhabiri et al. [49] realizaram experimentos de complexação de antocianinas di- e trihidroxiladas em posições vicinais com íons Al^{3+} e Ga^{3+} . Algumas das antocianinas utilizadas eram análogas (sais de flavílio, sem resíduos glicosídeos), e outras naturais, com ácidos hidroxibenzóicos ligados aos resíduos glicosídeos. Os resultados obtidos forneceram indícios para os autores elaborarem algumas conclusões importantes – os complexos formados possuem máximo de absorção em comprimentos de onda maiores em comparação ao cátion flavílio e, portanto, devem assumir uma estrutura semelhante à da base quinonoidal; as formas incolores das antocianinas também complexam, em menor extensão, com os cátions metálicos, e desempenham algum papel na complexação com as formas coloridas. Há evidências de que as antocianinas com resíduos glicosídeos promovem a estabilização das formas coloridas, por meio de

empilhamento intramolecular, facilitando a formação da base quinonoidal, e a complexação apenas com as formas coloridas [49].

1.3. Complexação do tipo “hóspede-hospedeiro” entre íons flavílios e macrocíclicos

A interação de flavílios com cadeias de carboidratos já foi avaliada em alguns estudos, considerando que os açúcares fazem parte da composição das células vegetais, da mesma forma que o fazem flavonoides, íons metálicos e outros compostos que podem atuar como copigmentos na estabilização de antocianinas. Além dos açúcares com cadeia linear, estruturas macrocíclicas, como as ciclodextrinas, podem interagir com íons flavílios, em um processo de encapsulamento [51,52]. Há estudos quanto às propriedades e utilização das ciclodextrinas, assim como de outro grupo de macrocíclicos, que atua em reações do tipo “hóspede-hospedeiro” – as cucurbiturilas.

As cucurbit[n]urilas são polímeros macrocíclicos de glicoluril, onde n representa o número de unidades repetitivas do monômero. A maior parte dos estudos relacionados a essa classe de compostos refere-se ao seu uso como hospedeiros de uma série de hóspedes eletricamente neutros ou catiônicos.

De maneira oposta às ciclodextrinas, sua estrutura possui formato de toro, com portais do mesmo diâmetro, Figura 4, e a complexação com hóspedes orgânicos não se baseia apenas em interações hidrofóbicas (como é o caso para as ciclodextrinas), mas também – e principalmente – eletrostáticas, devido à presença de grupos carbonila nos portais [53,54].

Figura 4. Da esquerda para a direita: estrutura do glicoluril (monômero dos CB[n]s), estrutura tridimensional do CB[7], e suas dimensões – diâmetro interno e dos portais e altura.

Constantes de complexação, comparando as duas classes de compostos, são usualmente maiores para as CB[n]s – constantes da ordem de 10^{15} já foram reportadas para CB[7] e adamantinas substituídas [55].

A cucurbit[6]urila (CB[6]) foi primeiramente sintetizada há mais de um século, sendo que sua estrutura foi caracterizada apenas nos anos 1980. O desenvolvimento da síntese e purificação de CB[n]s de diferentes tamanhos levou à disseminação de sua utilização como hospedeiro supramolecular em diversas aplicações, como, por exemplo, experimentos de *self-sorting*, catálise, materiais porosos, captura de proteínas, formação de hidrogéis supramoleculares, estabilização e entrega de drogas, dentre outros. Muito embora a síntese e complexação de CB[6] tenha sido amplamente estudada, no caso dos CB[n]s mais largos, como CB[7] e CB[8], hóspedes adequados ainda estão sendo investigados, visto que o diâmetro dos portais é maior nos dois casos [56].

Hóspedes catiônicos ligam-se preferencialmente às CB[n]s, uma vez que as interações eletrostáticas da carga positiva com os grupos carbonila tornam a complexação mais intensa, comparando o mesmo hóspede com e sem a carga positiva. Hóspedes aromáticos e/ou policondensados, tais como derivados de naftaleno, já foram estudados [56] – neste caso, a porção aromática encontra-se posicionada na cavidade hidrofóbica do hospedeiro, ao passo que a porção carregada positivamente interage com as carbonilas localizadas nos portais. Estes sistemas supramoleculares são caracterizados tanto por estudos cinéticos – a dinâmica da complexação de CB[n]s e hóspedes compreende intervalos de tempo bastante distintos, dependendo do sistema – quanto termodinâmicos, visto que sistemas supramoleculares são sempre reversíveis. Experimentos de competição, utilizando ressonância magnética nuclear, mostraram que a dissociação do hóspede corresponde à etapa determinante da reação de inclusão; as constantes de velocidade da etapa de associação dependem do tamanho e estrutura do hóspede.

A estrutura do íon flavílio – dois anéis aromáticos condensados ligados a um anel não condensado, com uma carga positiva no heteroátomo - é adequada para complexação com compostos deste tipo, e a ligação do tipo hóspede-hospedeiro pode exercer a mesma função que a complexação com íons metálicos e/ou ácidos fenólicos, ou seja, estabilizar o flavílio, mantendo a cor do pigmento.

2. OBJETIVOS

Sintetizar, caracterizar e estudar as propriedades fotofísicas de quatro compostos modelos, quantificando as espécies presentes em solução em função do pH. Para esta etapa, foram sugeridos quatro compostos modelos – os cloretos dos íons 7,8-diidroxi-4-metilflavílio (DHMF), 8-hidroxi-4-metil-7-metoxiflavílio (HMMF), 3',4'-diidroxi-7-metoxiflavílio (B-DHMF) e 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF), Figura 5.

Estudar a complexação entre DHMF e B-DHMF com o íon Al^{3+} , determinando a estequiometria e constantes de complexação.

Estudar a complexação com cinco copigmentos orgânicos, determinando estequiometria, constantes de complexação, espécies participantes da reação e estabilidade frente à reação de hidratação. Os seguintes compostos foram propostos para esta etapa: os ácidos p-cumárico (PCA), ferúlico (FRA), sinápico (SNA), vanílico (VNA) e siríngico (SRA), Figura 6.

Estudar a complexação ternária, a qual envolve um composto modelo de antocianina (DHMF e B-DHMF), íons Al^{3+} e um copigmento orgânico. Determinar possíveis estequiometrias, estabilidade e efeito sinérgico na formação do complexo e estabilização da cor.

Estudar a reação de inclusão entre B-TMF e cucurbit[7]urila (CB[7]), determinando parâmetros termodinâmicos e cinéticos, tais como estequiometria, constantes do equilíbrio e constantes de velocidade. Estudar a possível estabilização da forma catiônica frente à hidratação quando B-TMF encontra-se ligado ao hospedeiro, CB[7].

Íons Flavílios do Projeto

DHMF: $R_4 = \text{CH}_3$; $R_7 = R_8 = \text{OH}$; $R_3' = R_4' = \text{H}$

HMMF: $R_4 = \text{CH}_3$; $R_7 = \text{OCH}_3$; $R_8 = \text{OH}$; $R_3' = R_4' = \text{H}$

B-DHMF: $R_4 = R_8 = \text{H}$; $R_7 = \text{OCH}_3$; $R_3' = R_4' = \text{OH}$

B-TMF: $R_4 = R_8 = \text{H}$; $R_7 = R_3' = R_4' = \text{OCH}_3$

Figura 5. Estruturas dos íons flavílios investigados no projeto.

Ácidos cinâmicos:

PCA: $R_3 = R_5 = \text{H}$; $R_4 = \text{OH}$

FRA: $R_3 = \text{H}$; $R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{OCH}_3$

SNA: $R_3 = R_5 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OH}$

Ácidos benzóicos:

VNA: $R_3 = \text{H}$; $R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{OCH}_3$

SRA: $R_3 = R_5 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{OH}$

Figura 6. Estruturas dos copigmentos orgânicos investigados no projeto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados sem purificação prévia: metanol HPLC (Vetec Química), etanol absoluto p.a. (Merck), éter dietílico p.a. (Vetec Química), acetato de etila p.a. (Vetec Química), ácido acético glacial (Sigma-Aldrich), ácido perclórico p.a. (Vetec Química), hidróxido de sódio p.a. (Merck), acetato de sódio p.a. (Merck), ácido fosfórico p.a. (Cinética Química Ltda.), diidrogenofosfato de sódio monoidratado p.a. (Merck), monoidrogenofosfato de sódio heptaidratado p.a. (Sigma-Aldrich), carbonato de sódio p.a. (Merck), ácido sulfúrico p.a. (Merck), cloreto de sódio p.a. (CAQ Ind. e Com. Ltda.), benzoilacetona 98% (Sigma-Aldrich), 3-metoxicatecol 98% (Sigma-Aldrich), 2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído 98% (Sigma-Aldrich), 3',4'-dimetoxiacetofenona 98% (Sigma-Aldrich), sulfato de alumínio octadecaidratado p.a. (Merck), sulfato de magnésio p.a. (Merck), cloreto de alumínio anidro 98% (Fluka), ácido ferúlico 99% (Sigma-Aldrich), ácido para-cumárico 98% (Sigma-Aldrich), ácido sinápico 98% (Sigma-Aldrich), ácido siríngico $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich) e ácido vanílico 97% (Sigma-Aldrich).

O 2,3-diidroxifenol (pirogallol, Sigma-Aldrich) foi utilizado após purificação por sublimação. A 3',4'-diidroxiacetofenona foi sintetizada no laboratório por um dos integrantes do grupo a partir de 1,2-diidroxibenzeno (catecol) $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich), anidrido acético p.a. $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich) e cloreto de alumínio anidro 98% (Fluka), e utilizada após purificação por recristalização.

Para a calibração dos eletrodos do medidor de pH foi utilizado um conjunto de cápsulas de preparação de soluções-tampão (pHs 4,00, 7,00 e

10,0) da Aldrich. Todas as soluções aquosas foram preparadas em água deionizada por um Sistema Milli-Q da Millipore, com resistividade elétrica $\geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.

Os seguintes reagentes foram utilizados sem purificação prévia no laboratório da UVic: cloreto de sódio *ACS reagent grade* (ACP), ácido clorídrico *ACS reagent grade* (Anachemia), hexafluorofosfato de bis (ciclopentadienil)cobalto (III) 98% (Sigma-Aldrich) e metanol grau espectroscópico (EMD Omnisolv). Todas as soluções aquosas foram preparadas em água deionizada, *Barnstead NANOpure deionizing systems*, com resistividade elétrica $\geq 17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.

Todos os sais de flavílio foram preparados em laboratório. O composto utilizado no projeto de colaboração com a Profa. Bohne, cucurbit[7]urila, foi preparado e purificado por um dos integrantes do grupo, na UVic.

3.2. Equipamentos

No IQUSP, os espectros eletrônicos foram registrados em dois espectrofotômetros UV-Vis, o *Diode Array* 8452A da Hewlett Packard, e o Varian Cary 50 Bio. Este último também foi utilizado para os experimentos cinéticos com o B-DHMF. Neste caso, o software foi ajustado para leitura da absorbância a 470 nm, a intervalos fixos de tempo, empregando um sistema de suporte multicelas (com espaço para até 18 celas). Também foram registrados os espectros de absorção de 300 a 750 nm em função do tempo (modo *Scanning Kinetics*).

As medidas de fluorescência no IQ-USP foram efetuadas em um espectrômetro de fluorescência da Hitachi, Modelo F4500.

As determinações de pH foram efetuadas em dois medidores de pH/conductividade/temperatura— Fischer Scientific, modelo Accumet 50, com um semi-microeletrodo combinado de Ag/AgCl modelo 91-03, da Thermo Orion, e Digimed, modelo DM-22, com um semi-microeletrodo combinado de Ag/AgCl modelo GEPH06RBNC, da Gehaka.

Na UVic, os espectros eletrônicos foram registrados utilizando um espectrofotômetro Varian Cary 100. No caso de experimentos cinéticos, o software foi ajustado para leitura da absorbância a 470 nm, a cada intervalo de 0,5 minuto, para um período total de 420 minutos, empregando um sistema de suporte multicelulas (com espaço para até 6 celas).

Os espectros de fluorescência no UVic foram registrados em um espectrofluorímetro PTI QM-2 ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 - 700 \text{ nm}$, fenda dos monocromadores = 5 nm). Para o tratamento de dados da isoterma de ligação, os softwares *The Scientist 3* e *Origin Lab 8.6* foram utilizados para determinar a estequiometria e calcular as constantes de equilíbrio da reação hóspede-hospedeiro.

Para estudar a cinética de reações rápidas em solução, que ocorrem no intervalo aproximado de milissegundos a minutos [57], como é o caso da reação de inclusão do tipo hóspede-hospedeiro, utilizou-se a técnica de cinética de fluxo detido, ou *stopped-flow*.

Um sistema *stopped-flow* SX20 foi empregado ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, fenda do monocromador de excitação = 2,33 nm). A fluorescência foi detectada a 90° do feixe de excitação, utilizando um filtro de corte (para comprimentos de onda $\geq$

515 nm). Neste sistema, há duas entradas para as seringas contendo os reagentes, além de um sistema injetor, acionado pneumaticamente, que impulsiona os êmbolos das seringas e promove a adição dos reagentes para o interior do misturador, Figura 7.

A mistura de reagentes é conduzida à câmara do detector, acoplada a outra seringa posicionada no sentido oposto, que atua como frenadora. Quando os reagentes são injetados, eles preenchem essa seringa, deslocando o êmbolo e ativando o *trigger*, iniciando a detecção. O sistema injetor é controlado eletronicamente, e acionado após o preenchimento das seringas, cujas travas devem ser deixadas na posição adequada para que as soluções fluam no sentido correto.

Figura 7. Esquema representando um sistema de fluxo contínuo com entrada simples, para duas seringas, e detecção por fluorescência.

A voltagem da fotomultiplicadora foi mantida constante durante todo o experimento, variando de 650 a 723 V entre experimentos realizados em dias diferentes. A intensidade de fluorescência observada para cada amostra é proporcional ao potencial de detecção, ajustado a 4,0 V para a amostra com a maior intensidade de fluorescência – o complexo hóspede-hospedeiro em maior concentração.

Para cada experimento (hospedeiro em diferentes concentrações), 24 curvas cinéticas foram registradas pelo software, e a sua média foi utilizada no tratamento de dados. As curvas cinéticas foram ajustadas com funções monoexponenciais, utilizando o software Pro-Data Viewer, e a qualidade do ajuste foi julgada de acordo com a distribuição dos resíduos.

As determinações de pH foram efetuadas com um medidor de pH da Cole Parmer, modelo 05669-20.

3.3. Procedimentos Experimentais – IQ-USP

3.3.1. Síntese dos sais de flavílio

Os sais de flavílio foram sintetizados por meio das reações de condensação estudadas por Robinson e Robinson [58,59], envolvendo um fenol e uma betadicetona (método “A”), ou ainda um salicilaldeído e uma acetofenona (método “B”), Figura 8. A metodologia geral encontra-se descrita em [60].

Método "A" - condensação de fenóis e betadicetonas

Método "B" - condensação de 2-hidroxibenzaldeídos e acetofenonas

Figura 8. Metodologias descritas na literatura para a síntese de sais de flavílio.

Desta forma, dois dos quatro sais de flavílio (DHMF e HMMF – de acordo com a Figura 5) podem ser sintetizados pelo método “A”, enquanto os outros dois (B-DHMF e B-TMF) podem ser sintetizados pelo método “B”.

Para proceder à síntese do DHMF, fez-se necessário purificar o pirogallol por meio de sublimação a 110 °C, visto que seu armazenamento prolongado pode promover polimerização [61], visualizada pela coloração do composto – sólido branco cristalino quando puro, e sólido acinzentado opaco quando polimerizado.

A síntese dos flavílios foi realizada a partir da dissolução de ambos os reagentes em iguais proporções em ácido acético glacial, em um balão de reação de volume adequado. A reação foi realizada à temperatura ambiente ou com aquecimento brando (cerca de 60 °C) sob agitação constante, e o ácido clorídrico utilizado para catalisar a reação foi gerado *in situ*. Para isto, a um

funil de adição foram adicionados alguns mililitros de ácido sulfúrico, o qual gotejou sobre uma pequena quantidade de cloreto de sódio disposto em outro balão de reação. Para acoplar o gerador de ácido clorídrico gasoso ao balão de síntese, utilizou-se uma mangueira adaptada a uma pipeta de Pasteur.

O ácido clorídrico foi borbulhado no sistema reacional ao longo da síntese, e mudanças gradativas na coloração do sistema reacional foram observadas. Os sais de flavílio estudados são solúveis em ácido acético e possuem coloração vermelha arroxeada. Sendo assim, a formação do produto foi acompanhada pela mudança gradativa de coloração, de amarelo para laranja, até atingir coloração avermelhada intensa. Decorridas algumas horas após o início do borbulhamento, não foram observadas mudanças adicionais na coloração da solução resultante. Neste momento, o borbulhamento foi interrompido e foram adicionados volumes pequenos (de 15 a 40 mL) de éter dietílico para que ocorresse a precipitação do produto, o qual foi filtrado à pressão atmosférica e lavado com éter.

Os produtos da precipitação apresentaram aspecto cristalino e coloração arroxeada, com rendimentos entre 20 e 40%. Os compostos foram caracterizados por meio de análise elementar (de carbono e hidrogênio), e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (DPX 300 MHz), realizados pela Central Analítica do IQUSP. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos respectivos flavílios são apresentados no Apêndice 1.

3.3.1.1. Cloreto de 7,8-diidroxi-4-metilflavílio (DHMF)

Os reagentes utilizados na síntese do DHMF foram o 2,3-diidroxifenol (pirogalo) purificado e a benzoilacetona, em proporções equivalentes, acrescidos de ácido acético glacial suficiente para a dissolução completa.

A análise elementar apresentou o resultado [experimental (teórico)]: 66,54 (66,56)C%, 4,54 (4,54)H%, 12,47 (12,28)Cl%, $C_{16}H_{13}O_3Cl$. O 1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) apresentou: δ 3,30 (s, 3H, CH_3), 7,52 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H_6), 7,75 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, $H_{3'+5'}$), 7,84 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, $H_{4'}$), 7,99 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H_5), 8,46 (s, 1H, H_3), 8,51 (d, $J = 6,70$ Hz, 2H, $H_{2'+6'}$).

3.3.1.2. Cloreto de 8-hidroxi-4-metil-7-metoxiflavílio (HMMF)

Os reagentes utilizados na síntese do HMMF foram o 3-metoxicatcol e a benzoilacetona, em proporções equivalentes, acrescidos de ácido acético glacial suficiente para a dissolução completa.

A análise elementar apresentou o resultado [experimental (teórico)]: 60,22 (60,27)C%, 5,70 (5,65)H%, 10,35 (10,47)Cl%, $C_{17}H_{15}O_3Cl \times 2H_2O$. O 1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) apresentou: δ 3,82 (s, 3H, CH_3), 4,24 (s, 3H, OCH_3), 7,53 (d, $J = 12$ Hz, 1H, H_6), 7,78 (q, $J = 9,8$ Hz, 2H, $H_{3'+5'}$), 7,88 (t, $J = 9,8$ Hz, 1H, $H_{4'}$), 8,08 (d, $J = 12$ Hz, 1H, H_5), 8,47 (s, 1H, H_3), 8,55 (d, $J = 9,8$ Hz, 2H, $H_{2'+6'}$).

3.3.1.3. Cloreto de 3',4'-diidroxi-7-metoxiflavílio (B-DHMF)

Os reagentes utilizados na síntese do B-DHMF foram o 2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído e a 3'-4'-diidroxiacetofenona, em proporções equivalentes, acrescidos de ácido acético glacial suficiente para a dissolução completa.

A análise elementar apresentou o resultado [experimental (teórico)]: 57,32 (57,31)C%, 4,99 (4,93)H%, 9,20 (10,57)Cl%, $C_{16}H_{13}O_4Cl \times 1,7H_2O$. O 1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) apresentou: δ 4,16 (s, 3H, OCH_3), 7,18 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H_4), 7,49 (dd, $J = 5,5$ Hz, 1H, H_5'), 7,75 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H_6), 7,89 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H_5), 8,05 (dd, $J = 5,5$ Hz, 1H, H_6'), 8,13 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H_3), 8,32 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H_2'), 9,03 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H_8).

3.3.1.4. Cloreto de 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF)

Os reagentes utilizados na síntese do B-TMF foram o 2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído e a 3'-4'-dimetoxiacetofenona, em proporções equivalentes, acrescidos de ácido acético glacial suficiente para a dissolução completa.

A análise elementar apresentou o resultado [experimental (teórico)]: 57,72 (60,09)C%, 5,63 (5,60)H%, 9,88 (9,85)Cl%, $C_{18}H_{17}O_4Cl \times 1,5H_2O$. O 1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) apresentou: δ 4,05 (s, 6H, OCH_3), 4,18 (s, 3H, OCH_3), 7,33 (d, $J = 11$ Hz, 1H, H_5'), 7,54 (dd, $J = 10$ Hz, 1H, H_4), 7,94 (d, $J = 3$ Hz, 1H, H_6), 8,00 (d, $J = 3$ Hz, 1H, H_5), 8,20 (d, $J = 11$ Hz, 1H, H_6'), 8,29 (dd, $J = 10$ Hz, 1H, H_3), 8,52 (d, $J = 12$ Hz, 1H, H_2'), 9,16 (d, $J = 12$ Hz, 1H, H_8).

3.3.2. Determinação de parâmetros dos multiequilíbrios

Todas as soluções de sais de flavílio foram preparadas em metanol, com concentração da ordem de 10^{-3} mol.L $^{-1}$, acidificada com algumas gotas de ácido perclórico p.a, para evitar as reações de abertura do anel, com pH final em cerca de 0,5. A partir desta solução estoque, foram efetuadas diluições de 200 ou 300 vezes, em solução aquosa com pH definido, de modo que a concentração final na cubeta fosse da ordem de 10^{-5} mol.L $^{-1}$.

Os coeficientes de absortividade molar dos cátions flavílios foram determinados em meio fortemente ácido, onde o cátion é a única espécie em solução. Com esta finalidade, os espectros de absorção foram registrados para soluções de sal de flavílio em concentrações crescentes.

A segunda etapa da caracterização consistiu em determinar e, na medida do possível, quantificar as espécies presentes em solução em função do pH. Foram utilizadas soluções-tampão de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ (faixa de pH de 1,0 – 2,5), $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{OOCCH}_3$ (faixa de pH de 3,0 – 5,0), $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}/\text{HPO}_4^{2-}$ (faixa de pH de 5,5 - 8,5) e $\text{HCO}_3^{1-}/\text{CO}_3^{2-}$ (faixa de pH de 9,0 - 11,0), sendo que todos os tampões foram preparados mantendo a força iônica em 5,0 mM. Todas as amostras foram termostatizadas a $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Utilizaram-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Hellma) e, para a determinação do branco, foram adotadas as soluções-tampão correspondentes como referência.

Os espectros de absorção dos sais de flavílio em pHs crescentes foram registrados tanto imediatamente quanto após algum intervalo de tempo, necessário para que os multiequilíbrios fossem estabelecidos.

Nesta etapa, a estabilidade dos sais de flavílio foi avaliada em relação à oxidação. Desta forma, duas estratégias foram adotadas – na primeira, os espectros de absorção foram registrados algumas horas após o preparo das soluções, e na segunda estratégia, utilizou-se gás nitrogênio para purgar as amostras e obter os espectros dos sais de flavílio na ausência de gás oxigênio.

Foram realizados testes quanto à fluorescência dos sais de flavílio, ainda de modo a caracterizá-los e avaliar o comportamento das espécies em relação aos processos fotofísicos. Os espectros de emissão foram registrados para os compostos que apresentaram fluorescência detectável.

3.3.3. Copigmentação com íons metálicos

Para avaliar a ocorrência de complexação dos sais de flavílio com íons Al^{3+} , os espectros de absorção foram registrados, para cada pigmento, em presença do íon metálico, a partir de duas metodologias. Na primeira, utilizou-se uma concentração constante de Al^{3+} e pH crescente (faixa de pH de 1,0 a 5,5, aproximadamente). Na segunda, um pH constante e concentração de Al^{3+} crescente.

Outra metodologia também foi adotada; trata-se do método das variações contínuas, ou método de Job, o qual considera a variação na absorbância da banda atribuída ao complexo em relação à variação na fração molar de um dos componentes (ligante ou íon metálico) [62]. A partir de um *Job plot*, determina-se a fração molar em que a absorbância é máxima e, conseqüentemente, a relação entre as frações molares do ligante e do complexo – ou seja, a estequiometria da reação. Um segundo experimento foi realizado para que fosse possível calcular a constante do equilíbrio – a determinação da absorvidade molar do complexo, a partir do registro dos espectros de absorção de soluções contendo um excesso de um dos reagentes e o outro em quantidade limitante. Concentrações variaram entre 5 a 50 μM .

3.3.4. Copigmentação com ácidos fenólicos

A metodologia para estudar a copigmentação é similar à descrita no item anterior.

Devido à baixa solubilidade em água dos ácidos fenólicos utilizados, a concentração máxima obtida para estes compostos variou de 2 a 12 mmol/L. A

dissolução só foi possível com agitação em banho ultrassônico termostatizado a cerca de 60 °C.

Para que as constantes de copigmentação fossem estimadas, diluições a partir destas soluções saturadas dos ácidos fenólicos foram adicionadas a uma solução de flavílio em concentração constante ($\sim 10^{-5}$ M). Os espectros de absorção, assim como os de fluorescência para B-DHMF e B-TMF foram registrados em pH em torno de 1,0.

As constantes de copigmentação em pHs maiores (5,0 a 6,0) foram determinadas para os flavílios com substituintes -OH vicinais, B-DHMF e DHMF, os quais foram estudados com relação à formação de complexos ternários. Para isto, os mesmos procedimentos citados acima foram seguidos.

Considerando a formação das espécies resultantes da abertura do anel, a estabilidade do complexo B-DHMF-copigmento orgânico foi avaliada, monitorando a absorbância do complexo em função do tempo e em função da concentração do copigmento orgânico.

3.3.5. Complexos Ternários

Para avaliar a formação de complexos ternários, o possível efeito sinérgico e sua influência na estabilização da cor, duas estratégias foram adotadas. Na primeira, foram preparadas soluções de cloreto de alumínio e de copigmento orgânico em concentrações variando nas razões de 1:1, 1:10 e 1:100 em relação ao flavílio, cuja concentração foi mantida constante, em 25 μ M.

Estes experimentos foram realizados em pH em torno de 4,0, onde é possível observar a base quinonoidal, a qual pode formar complexos com íons

alumínio. Registraram-se os espectros de absorção, comparando as mudanças nos espectros quando o flavílio encontra-se na presença de apenas um dos copigmentos ou na presença de ambos. Além disso, a estabilidade do complexo ternário foi monitorada em função do tempo.

Na segunda estratégia, variações na estequiometria do complexo ternário foram investigadas, sendo que neste caso a situação foi invertida no que se refere ao reagente em excesso – o flavílio foi mantido em concentração maior em relação aos íons Al^{3+} , nas seguintes proporções: 2:1, 3:1 e 4:1 (flavílio: Al^{3+}).

Os experimentos foram conduzidos com os dois flavílios que formam complexos metálicos com íons alumínio, B-DHMF e DHMF. Os copigmentos orgânicos escolhidos para esta investigação foram o ácido p-cumárico (PCA) e o ácido ferúlico (FRA).

3.4. Procedimentos Experimentais – UVic

3.4.1. Preparo de soluções

Uma solução estoque de B-TMF 1,1 mM foi preparada em metanol acidificado (pH por volta de 0,5), para prevenir a ocorrência das reações de abertura do anel. A partir desta solução, o B-TMF foi diluído em solução aquosa de ácido clorídrico 1,0 mM, para todos os experimentos realizados em pH 3,0. Adotou-se a concentração de 0,2 μM para B-TMF, tanto nos experimentos da isoterma quanto nos experimentos de fluxo detido.

A solução estoque de CB[7] – 1,0 mM – também foi preparada em ácido clorídrico 1,0 mM, para que o pH da reação se mantivesse em torno de 3,0,

onde existe cerca de 50% do cátion flavílio. Nos experimentos de fluorescência, o CB[7] foi diluído na própria cela, utilizando-se microsseringas. Nos experimentos de fluxo detido, a partir da solução estoque foram preparadas soluções de CB[7] nas concentrações aproximadas de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 μM , antes da injeção das amostras. Após a injeção e respectiva mistura com a solução de B-TMF, considerando a diluição de 1:1, as concentrações correspondem à metade de cada valor estabelecido acima.

3.4.2. Isotermas de ligação por espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência de B-TMF foram registrados após adições crescentes da solução estoque de CB[7]. Utilizou-se um volume inicial de 2,8 mL de B-TMF na cela, e incrementos de volume variando entre 1 e 50 μL de CB[7] foram adicionados. A cela contendo B-TMF foi mantida a 20°C por pelo menos 10 minutos antes do início do experimento, e por cerca de um minuto entre cada adição de CB[7]. Utilizando baixas concentrações de B-TMF observa-se baixa intensidade na fluorescência registrada e, nestas condições, é possível observar a banda de espalhamento Raman da água exatamente na mesma região em que o B-TMF emite. Portanto, o espectro de fluorescência da solução de HCl 1,0 mM (o branco) foi registrado e subtraído dos demais espectros. As concentrações de CB[7] na cela variaram de 0,30 a 170 μM .

3.4.3. Cinética rápida por fluxo detido com detecção por espectroscopia de fluorescência

No método utilizado, os reagentes em ambas as seringas foram injetados em volumes iguais. As soluções de CB[7] foram injetadas via uma das seringas (“B”), em concentração pelo menos cinco vezes maior que a concentração de B-TMF (0,4 μ M), na seringa “A”, Figura 7.

Para a seringa “B”, a cada troca de solução, efetuou-se uma lavagem com solução de HCl 1,0 mM (branco) e, em seguida, com a própria solução de CB[7]. Foram realizadas oito injeções: branco contra branco (água deionizada nas duas seringas), branco contra B-TMF, e B-TMF contra cada uma das seis soluções de CB[7]. Antes de registrar as curvas cinéticas, as seringas foram movimentadas para extrair eventuais bolhas de ar presentes ao longo do sistema. Em seguida, com os compartimentos preenchidos com os respectivos reagentes, o sistema foi termostatizado a 20°C por pelo menos 10 minutos antes da injeção (para cada troca de solução). O sistema de injeção foi acionado por 24 vezes, e as curvas foram acumuladas no software e ajustadas com funções monoexponenciais.

3.4.4. Estudos de estabilidade com monitoramento da absorbância

3.4.4.1. Preparo de soluções

A avaliação da estabilidade do B-TMF no que concerne à formação das espécies incolores consistiu de duas metodologias – registro dos espectros de fluorescência em presença de CB[7] em intervalos distintos, e monitoramento da absorção a 470 nm ao longo da reação de hidratação.

Para isto, foram preparadas soluções do hóspede e do hospedeiro em dois pHs distintos, pelo menos uma unidade de pH acima do pK_h' do B-TMF – pHs 4,3 e 5,5. Como o CB[7] complexa com cátions de uma forma geral, a utilização de solução-tampão não seria adequada para mensurar parâmetros da reação com o B-TMF. Sendo assim, utilizaram-se soluções diluídas de HCl nos pHs acima citados.

Foram realizados, para cada pH, três ensaios, variando as concentrações dos reagentes:

- (a) Cella contendo B-TMF 5,0 μ M, sem CB[7] – experimento controle;
- (b) Cella contendo B-TMF 5,0 μ M, com adição de CB[7] 10 μ M;
- (c) Cella contendo B-TMF 5,0 μ M, com adição de CB[7] 100 μ M.

3.4.4.2. Espectroscopia de Fluorescência

Considerando as três condições estabelecidas no item anterior, o B-TMF foi adicionado por último às celas e os espectros de fluorescência foram registrados imediatamente após a adição, assim como 30 e 60 minutos após a adição.

Além do monitoramento após a adição de B-TMF, uma segunda condição foi avaliada – a adição de CB[7] após o estabelecimento do equilíbrio de hidratação. Neste caso, o B-TMF foi adicionado às celas e pré incubado por um período de três horas. Após este período, o CB[7] foi adicionado nas concentrações de 10 e 100 μ M, e os espectros de fluorescência foram registrados imediatamente após a adição do hospedeiro e 80 minutos depois disso.

3.4.4.3. Cinética por Espectroscopia de Absorção

Os espectros de absorção dos sistemas descritos no item anterior também foram registrados. A partir dos resultados, concluiu-se que as amostras apresentaram absorção com sensibilidade suficiente para que experimentos cinéticos pudessem ser realizados. Neste caso, adotando as três condições citadas no item 2.4.4.1. – (a), (b) e (c) – monitorou-se a absorbância a 470 nm (máximo de absorção do flavílio na forma catiônica) durante 420 minutos, logo após a adição do B-TMF.

Além disso, o monitoramento também foi realizado para a situação em que as soluções de B-TMF em condições similares às estabelecidas acima são incubadas por 12 horas, antes da adição de CB[7]. O monitoramento iniciou-se a partir da adição do hospedeiro, em duas concentrações, 12 μM e 400 μM .

3.4.5. Titulação de CB[7] com hexafluorofato de bis(ciclopentadienil)cobalto (II) – cobaltoceno.

A síntese de cucurbiturilas requer etapa de purificação, pois não é possível obter apenas um dos curcubiturilos homólogos com a pureza requerida – é necessário separar as espécies obtidas. Durante a etapa de purificação, normalmente alguns íons e alguns equivalentes de água ficam retidos no CB[7], implicando em uma massa molecular diferente da massa calculada. Além disso, com o tempo é possível que mais água seja retida pelo CB[7] enquanto sólido, mesmo quando este é mantido em dessecador.

Portanto, com o tempo, soluções preparadas a partir de CB[7] oriundo da mesma síntese apresentam concentração decrescente, devendo ser tituladas com um padrão adequado – neste caso, o hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil)cobalto(II), o cobaltoceno [63].

As soluções estoque de CB[7] 1,0 mM a serem tituladas foram usadas sem diluição. Uma solução estoque de cobaltoceno foi preparada em solução aquosa de HCl 1,0 mM (mantendo o mesmo pH que a solução de CB[7]), com concentração de cerca de 15 μ M (a ser determinada acuradamente a partir da absorbância em 261 nm).

A partir do coeficiente de absortividade molar do cobaltoceno em água, em 261 nm – $\epsilon^{261} = (3,42 \pm 0,04) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – determinou-se a real concentração inicial de cobaltoceno em solução. Utilizando um volume inicial de cobaltoceno de 3,0 mL, adicionaram-se incrementos de 8 μ L de CB[7] 1,0 mM até obter um volume final de cerca de 3,10 mL, e registraram-se os espectros de absorção para cada ponto, acompanhando a intensidade em 261 nm. Esta titulação foi realizada para cada solução de CB[7] preparada.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação dos parâmetros dos multiequilíbrios

A Tabela 2 resume os valores encontrados para os parâmetros avaliados: coeficiente de absorvidade molar, máximo(s) de absorção e máximo de emissão dos sais de flavílio, $pK_a(s)$ e pK_h' .

Os espectros de emissão foram registrados para identificar os flavílios fluorescentes.

Tabela 2. Parâmetros obtidos para os sais de flavílio, em solução aquosa, pH ~ 1,0.

Flavílio	$\lambda^{\text{máx}}$ (absorção) / nm	$\lambda^{\text{máx}}$ (emissão) / nm	$\varepsilon^{\text{máx}} / \text{L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	pK_{a1}	pK_{a2}	$\text{pK}_{\text{h'}}$
DHMF	381	-	19100	4,9	10,1	-
	441		9320			
HMMF	384	-	18300	6,4	-	-
	444		7640			
B-DHMF	469	560 ($\lambda^{\text{ex}} = 469 \text{ nm}$)	33000	5,6	7,8	3,1
B-TMF	469	590 ($\lambda^{\text{ex}} = 469 \text{ nm}$)	29700	-	-	2,9

4.1.1. Cloreto de 7,8-diidroxi-4-metilflavílio (DHMF)

Os espectros de absorção de DHMF em função do pH estão dispostos nas Figuras 9, 10 e 11. Com o aumento do pH, observa-se o aparecimento da banda correspondente à espécie que está sendo formada, em detrimento da espécie cuja concentração diminui de acordo com o pH em questão. Observa-se que, em pHs baixos, o DHMF apresenta duas bandas de absorção, centradas em 381 e 441 nm. Na Figura 9, estas duas bandas diminuem, ao

passo que a banda centrada em 512 nm, correspondente à formação de uma nova espécie, aumenta em meio moderadamente ácido.

Nas Figuras 10 e 11, é possível observar a diminuição da banda em 512 nm e o aparecimento de banda centrada em 630 nm, indicando a formação de uma terceira espécie, em meios moderadamente ácidos a moderadamente alcalinos.

Com base na estrutura do DHMF, é possível atribuir os máximos correspondentes a cada espécie dos equilíbrios ácido-base: 381 e 441 nm para o cátion flavílio, amarelo, 510 nm para a base zwitteriônica, rósea, e 650 nm para a base ionizada, azul-arroxeadada.

Figura 9. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 1,4 a 5,1, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 10. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 5,0 a 8,5, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 11. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 8,5 a 11,0, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

A partir de medidas de absorbância, para um dado comprimento de onda, em função do pH, foi possível determinar os valores das constantes de dois equilíbrios. Para o pK_{a1} , referente ao equilíbrio (1), obteve-se o valor de $4,9 \pm 0,2$, com medidas em 438 nm. Para o pK_{a2} , referente ao equilíbrio (2), obteve-se o valor de $10,1 \pm 0,2$, com medidas em 514 nm. Os valores das constantes de equilíbrio correspondentes são, respectivamente, $1,3 \cdot 10^{-5}$ M e $7,9 \cdot 10^{-11}$ M.

Os gráficos resultantes destas duas determinações estão dispostos nas Figuras 12 e 13, as quais mostram as frações molares do cátion flavílio e da base quinonoidal ionizada, respectivamente, em função do pH, com ajuste sigmoidal.

Figura 12. Frações molares do cátion flavílio do DHMF em função do pH, com ajuste sigmoidal para o pK_{a1} .

Figura 13. Frações molares da base quinonoidal ionizada do DHMF em função do pH, com ajuste sigmoideal para o pK_{a2} .

Foram registrados espectros do DHMF ao longo do tempo, para o intervalo de pHs maiores, Figura 14 para 0 e 4 horas de incubação e Figura 15 para 4 e 8 horas. Em meios neutros a moderadamente alcalinos, a partir de pH de aproximadamente 6,5, observa-se diminuição da absorbância, para todas as bandas. Após 24 horas, os espectros permaneceram idênticos aos espectros registrados após 8 horas (não mostrado).

Figura 14. Espectros de absorção do DHMF, em função do pH, registrados imediatamente (curva cheia) e após 4 horas do preparo das soluções (ponto-traço).

Figura 15. Espectros de absorção do DHMF, em função do pH, após 4 horas (curva cheia) e após 8 horas do preparo das soluções (ponto-traço).

Com o objetivo de observar a influência do oxigênio na degradação do DHMF, os experimentos de especiação foram realizados utilizando nitrogênio para purgar as soluções. Observa-se, comparando os espectros sem (Figura 11) e com borbulhamento de N_2 (Figura 16), que os pontos isobésticos encontram-se mais definidos no segundo caso, fazendo com que os valores de absorbância determinados sejam mais reprodutíveis, fornecendo valores de pK_{a2} mais confiáveis.

Figura 16. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 8,4 a 11,0, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas por N_2 .

As medidas imediatas, sem borbulhamento de N_2 , fornecem valores de absorbância flutuantes em relação a um mesmo pH. Portanto, as constantes de equilíbrio e as frações molares foram determinadas a partir das medidas com

nitrogênio, Figuras 12 e 13 para os ajustes, e 17 para as frações molares experimentais comparadas com o ajuste teórico.

Figura 17. Gráfico de especiação dos equilíbrios de DHMF, em função do pH.

O DHMF não emite fluorescência detectável, portanto seu espectro de emissão não foi apresentado.

4.1.2. Cloreto de 8-hidroxi-4-metil-7-metoxiflavílio (HMMF)

Os espectros de absorção de HMMF em função do pH estão dispostos nas Figuras 18 e 19. Para este flavílio, com experimentos de salto de pH, também se observa o aparecimento da banda correspondente à espécie que está sendo formada, em detrimento da espécie cuja concentração diminui de acordo com o pH em questão. Neste caso, como o substituinte –OH aparece em apenas uma posição, C8, o aumento de pH ocasiona o aparecimento de apenas mais uma banda, correspondente à base quinonoidal.

A banda correspondente ao cátion flavílio, amarelo, com máximos em 384 e 444 nm, aparece em meio forte a moderadamente ácido, ao passo que a banda da base, laranja rosada, com máximo em 550 nm, começa a aparecer em meio moderadamente ácido a alcalino.

Figura 18. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 1,4 a 3,9, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 19. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 5,1 a 9,1, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

A partir de medidas de absorbância, em 446 nm, em função do pH, foi possível determinar pK_a igual a $6,4 \pm 0,2$, sendo a constante do equilíbrio correspondente igual a $4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. O gráfico resultante desta determinação encontra-se na Figura 20, a qual mostra a fração molar do cátion flavílio, em função do pH, ajustado a partir da equação de uma sigmoide.

Figura 20. Frações molares da base quinonoidal do HMMF em função do pH, com ajuste sigmoidal.

Em meios moderadamente ácidos a alcalinos, foram realizados estudos quanto aos equilíbrios de hidratação e tautomerização, da mesma forma que foi feito para o DHMF, para demonstrar a ausência das espécies incolores. Experimentos em que as soluções foram deixadas em equilíbrio por intervalos de tempo maiores para que se registrasse o espectro foram realizados, assim como experimentos com purgação por nitrogênio. Os resultados estão dispostos nas Figuras 21 a 24.

Figura 21. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 0,5 a 5,4, registrados após 3 horas do preparo das soluções.

Figura 22. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 6,5 a 9,9, registrados após 3 horas do preparo das soluções.

Observa-se a mesma tendência vista para o DHMF em pHs perto da neutralidade, onde pode ocorrer degradação da base quinonoidal, resultando em diminuição das bandas de absorção.

Os espectros dos experimentos de especiação utilizando nitrogênio para purgar as soluções (Figuras 23 e 24) em comparação com os espectros sem borbulhamento de N₂ (Figura 19) mostram que, assim como para DHMF, os pontos isobésticos encontram-se mais definidos no primeiro caso. Portanto, a constante de equilíbrio também foi determinada a partir das medidas com nitrogênio, Figura 20 para o ajuste e Figura 25 para as frações molares experimentais comparadas com o ajuste teórico.

Figura 23. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 4,5 a 8,5, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas por N₂.

Figura 24. Espectros de absorção do HMMF, na faixa de pH de 8,5 a 11,1, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas por N_2 .

Figura 25. Gráfico de especiação dos equilíbrios de HMMF, em função do pH.

4.1.3. Cloreto de 3',4'-diidroxí-7-metoxiflavílio (B-DHMF)

Conforme descrito nos itens anteriores, os experimentos com purgação por nitrogênio previnem a ocorrência de degradação via oxidação, no caso de espécies que, tal como B-DHMF, apresentam substituintes –OH vicinais. Portanto, com o intuito de determinar com mais acurácia as constantes dos equilíbrios ácido-base, o procedimento utilizado no registro dos espectros imediatamente após o preparo das amostras envolveu purgação com nitrogênio para eliminação do gás oxigênio dissolvido nas amostras.

Os espectros de absorção de B-DHMF em função do pH estão dispostos nas Figuras 26 e 27. Para este flavílio, com experimentos de salto de pH, também é possível identificar os máximos de absorção de cada espécie. Por se tratar de outra espécie diidroxilada, em C3' e C4', o aumento do pH ocasiona o aparecimento de duas bandas, correspondentes às duas bases quinonoidais. Na Figura 26, é possível observar a banda correspondente ao cátion flavílio, amarelo, com máximo em 469 nm, assim como a banda da base quinonoidal zwitteriônica, rósea, com máximo em 531 nm. Observa-se o aumento da banda correspondente à base quinonoidal, em meio moderadamente ácido a alcalino.

Na Figura 27, é possível distinguir também o aparecimento de um ombro, centrado em cerca de 670 nm, correspondente à base ionizada, roxa azulada.

Figura 26. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 0,9 a 7,5, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas com N_2 .

Figura 27. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 7,1 a 10,0, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Amostras purgadas por N_2 .

A partir de medidas de absorvância, em 469 e em 532 nm, em função do pH, foi possível determinar os valores das constantes dos equilíbrios da primeira e da segunda ionização, respectivamente, $2,5 \cdot 10^{-6}$ e $1,6 \cdot 10^{-8}$ M. Obteve-se, portanto, $5,6 \pm 0,2$ para o pK_{a1} e $7,8 \pm 0,2$ para o pK_{a2} . Os gráficos resultantes destas determinações, com ajuste sigmoidal, encontram-se nas Figuras 28 e 29.

Figura 28. Frações molares do cátion flavílio do B-DHMF em função do pH, com ajuste sigmoidal para o pK_{a1} .

Figura 29. Frações molares da base quinonoidal ionizada do B-DHMF, em função do pH, para a determinação do pK_{a2} .

Esta determinação de pK_a baseou-se em medidas de absorbância resultantes dos espectros registrados imediatamente após o preparo das soluções, ou seja, antes de o equilíbrio ser estabelecido. Para a determinação da constante do equilíbrio de hidratação aparente, K_h' , associada à transformação do flavílio na soma das espécies incolores, conforme discutido adiante, é necessário um período de incubação para que os equilíbrios possam ser estabelecidos.

Desta forma, o pK_h' , foi determinado a partir dos espectros de absorção registrados após o término de algumas horas, Figuras 30, 31 e 32.

Figura 30. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 0,9 a 4,5, registrados 3 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 31. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 4,5 a 7,5, registrados 3 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 32. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 7,1 a 10,0, registrados 3 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Observa-se, a partir dos gráficos acima, o aparecimento de uma banda centrada em 374 nm, referente à absorção de uma ou mais das espécies incolores dos multiequilíbrios. É possível determinar, a partir destas medidas, também por ajuste sigmoidal, o pK_h' construindo o gráfico de frações molares em função do pH, Figura 33. Obteve-se o valor de $3,1 \pm 0,2$ para o pK_h' , e $7,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ para a constante de hidratação aparente, K_h' .

Figura 33. Frações molares de “B” (somatória das espécies resultantes da abertura do anel), após 3 horas de incubação, em função do pH, com ajuste sigmoideal para a determinação do pK'_h .

A partir dos valores de pK dos processos estudados para o B-DHMF, pode-se construir o gráfico de especiação considerando apenas as transformações ácido-base, Figura 34, ou o equilíbrio de hidratação aparente, em que o cátion flavílio encontra-se em equilíbrio com as demais espécies que se formam após incubação, Figura 35. Os índices nas Figuras referem-se a: f_{HA} = fração molar do cátion flavílio; f_Z = fração molar da base quinonoidal zwitteriônica; f_A = fração molar da base quinonoidal ionizada; f_B = fração molar de B (somatória das espécies resultantes da abertura do anel).

Figura 34. Gráfico de especiação dos equilíbrios ácido-base de B-DHMF, em função do pH.

Figura 35. Gráfico de especiação do equilíbrio de hidratação aparente do B-DHMF, em função do pH.

O B-DHMF apresenta fluorescência pouco intensa, com máximo em 560 nm, em meio ácido, como pode ser visto na Figura 36.

Figura 36. Espectro de emissão do B-DHMF, em pH 1,0. Concentração analítica de pigmento = $3 \cdot 10^{-5}$ M.

4.1.4. Cloreto de 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF)

Para este flavílio, com experimentos de salto de pH, é possível identificar o máximo de absorção referente ao flavílio, Figura 37, cuja banda está centrada em 469 nm. Conforme o meio se torna menos ácido, observa-se a diminuição desta banda. Para observar a formação de uma das espécies em equilíbrio com o cátion flavílio, considerando que esta estrutura não apresenta substituintes –OH ionizáveis, é necessário registrar espectros após período de incubação para permitir que os equilíbrios mais lentos sejam estabelecidos.

Os espectros de absorção de B-TMF em função do pH para medidas efetuadas 2 horas e 24 horas após o preparo das soluções, respectivamente,

estão dispostos nas Figuras 38 e 39. Nestes espectros é possível observar o aparecimento da banda referente a uma ou mais espécies incolores, centrada em 377 nm.

Figura 37. Espectros de absorção do B-TMF, na faixa de pH de 1,0 a 6,0, registrados imediatamente após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 38. Espectros de absorção do B-TMF, na faixa de pH de 1,0 a 6,0, registrados 2 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 39. Espectros de absorção do B-TMF, na faixa de pH de 1,0 a 6,0, registrados 24 horas após o preparo das soluções. Concentração analítica de pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Na Figura 39, ainda podem ser observadas mudanças nos espectros em comparação com a Figura 38 – a banda referente ao flavílio diminui sutilmente, ao passo que a banda em 377 nm aumenta, o que indica que o equilíbrio de hidratação/tautomerização/isomerização não é totalmente estabelecido em apenas 2 horas. Deste modo, para calcular a constante de hidratação aparente, utilizaram-se os dados obtidos das medidas após 24 horas do preparo das soluções. Outra observação importante quanto aos espectros da Figura 39 refere-se à estabilidade do íon flavílio frente à degradação em meios neutros a moderadamente alcalinos.

A partir de medidas de absorbância, em 470 nm, em função do pH, determinaram-se os valores para o pK_h' e a constante do equilíbrio correspondente. Obteve-se $2,9 \pm 0,2$ para o pK_h' e $1,3 \cdot 10^{-3}$ M. O gráfico resultante desta determinação encontra-se na Figura 40. O gráfico de frações molares do cátion flavílio e frações molares da somatória das espécies resultantes das reações de abertura do anel, em função do pH, encontra-se na Figura 41.

Figura 40. Frações molares do cátion flavílio em função do pH, com ajuste sigmoidal para pK_h' .

Figura 41. Gráfico de especiação do equilíbrio de hidratação aparente do B-TMF, em função do pH.

O B-TMF apresenta fluorescência pouco intensa, com banda larga de emissão centrada em 590 nm, em pH 1,0, como pode ser visto na Figura 42.

Figura 42. Espectro de fluorescência do B-TMF, em pH 1,1. Concentração analítica de pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

4.2. Copigmentação com íons metálicos

4.2.1. Abordagem 1: concentrações crescentes de Al^{3+}

As Figuras 43 e 44 apresentam os espectros do DHMF, em função do pH, e em função da concentração de Al^{3+} , respectivamente. Observa-se, no primeiro caso, a formação de uma banda centrada em 544 nm, a partir de pH ~ 3,0. A partir da Figura 43, observa-se que a formação do complexo Al^{3+} - flavílio ocorre a partir de uma unidade abaixo do pK_{a1} , conforme previsto, neste caso 3,9. Acima de pH 3,0, observa-se a coloração arroxeada do complexo na cela de absorção, diferente da cor da base, rósea, que começaria a ser produzida

em pHs crescentes na ausência de íons alumínio. O deslocamento batocrômico de 510 para 544 nm corrobora com esta evidência.

Figura 43. Espectros de absorção do DHMF, na faixa de pH de 0,3 a 6,0, com razão pigmento: Al^{3+} em 1:100. Concentração analítica de pigmento = $3,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 44. Espectros de absorção do DHMF, em pH 4,1, com variação na razão pigmento: Al^{3+} . Concentração analítica de pigmento = $3,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. (R300 = 300 Al^{3+} :1pigmento)

A partir da Figura 44, observa-se a ocorrência de complexação mesmo quando o Al^{3+} encontra-se em baixas concentrações. Com o aumento na razão Al^{3+} :pigmento, há um aumento na banda de absorção associada ao complexo, em 544 nm.

Esta primeira abordagem baseia-se na relação entre os incrementos de absorbância na banda de absorção atribuída ao complexo e a concentração de íons Al^{3+} adicionada, de acordo com [32]. Neste caso, a inclinação da curva obtida a partir do gráfico da Figura 45 está diretamente relacionada com os coeficientes estequiométricos. O gráfico foi construído a partir de n (coeficiente estequiométrico referente ao DHMF) igual a 1.

Figura 45. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de íons Al³⁺, para DHMF, com coeficiente estequiométrico n = 1.

A inclinação da curva é numericamente igual a m (coeficiente estequiométrico referente aos íons Al³⁺), calculado como 0,31. Ou seja, a partir deste tratamento a relação estequiométrica foi determinada como 3DHMF:1Al³⁺.

Por meio desta metodologia, a qual fornece uma constante observada para o equilíbrio de complexação, obteve-se β igual a 3,3 e, por meio da relação com a constante do equilíbrio de ionização ($\beta = K_{CM}K_{a1}$), K_{CM} , a constante de complexação, é calculada como $2,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-3}$.

As Figuras 46 e 47 apresentam os espectros do B-DHMF, em função do pH, e em função da concentração de Al³⁺, respectivamente.

Figura 46. Espectros de absorção do B-DHMF, na faixa de pH de 0,3 a 6,0, com razão pigmento: Al^{3+} em 1:100. Concentração analítica de pigmento = $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 47. Espectros de absorção do B-DHMF, em pH 4,9, com variação na razão Al^{3+} :pigmento. Concentração analítica de pigmento = $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (R300 = 300 Al^{3+} :1pigmento).

A partir da Figura 46, observa-se que a formação do complexo Al^{3+} - flavílio também ocorre a partir de cerca de uma unidade abaixo do $\text{pK}_{a1} = 4,4$ neste caso – com a formação de uma banda centrada em 523 nm, muito similar à banda da base quinonoidal.

A partir de valores de pH mais próximos da neutralidade, observa-se a coloração arroxeada do complexo na cela de absorção. No caso do DHMF, observa-se um deslocamento batocrômico; para B-DHMF, o complexo absorve na mesma região que a base quinonoidal.

Na Figura 47, com o aumento na razão Al^{3+} :pigmento, há um aumento na banda de absorção associada ao complexo. Estes dados foram utilizados na determinação da constante de complexação e da estequiometria da reação, conforme descrito em [32], também usado para DHMF. A Figura 48 relaciona os incrementos de absorbância com o coeficiente estequiométrico $n=1$.

Figura 48. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de íons Al^{3+} , para B-DHMF, com coeficiente estequiométrico $n = 1$.

Assim como para DHMF, utilizando $n=1$, obteve-se $m=0,73$, indicando estequiometria de cerca de $3B\text{-DHMF}:2Al^{3+}$. Obteve-se β de 685 e, K_{CM} correspondente de $2,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-4}$.

4.2.2. Abordagem 2: método das variações contínuas

Nesta segunda abordagem, o método de Job foi aplicado, onde não apenas a concentração do íon metálico é variada, como também a concentração do flavílio. Obteve-se estequiometria aproximada de $3DHMF:1Al^{3+}$, portanto, corroborando a primeira metodologia.

A Figura 49 apresenta os espectros de absorção em pH 4,9, de acordo com o método de Job.

Figura 49. Espectros de absorção do DHMF, em pH 4,9, com concentrações do pigmento e de íons alumínio variáveis (faixa de concentração de 0 a 50 μM para ambos).

Os primeiros espectros observados na Figura 49 apresentam o máximo de absorção atribuído à base quinonoidal do DHMF, centrado em cerca de 508 nm, e máximo de absorção em 580 nm, atribuído a um ou mais complexos com Al^{3+} .

A absorbância contra a fração molar de íons alumínio constitui um gráfico de Job, como o mostrado na Figura 50 para o complexo DHMF- Al^{3+} .

Figura 50. Gráfico de absorbância em 700 nm contra fração molar de íons alumínio para o complexo DHMF- Al^{3+} (*Job plot*).

A Figura 51 apresenta os espectros de absorção do B-DHMF em pH 5,3 para o método das variações contínuas. A absorbância em 530 nm contra a fração molar de íons alumínio, como o mostrado na Figura 52, constitui o gráfico de Job para o complexo B-DHMF – Al^{3+} .

Figura 51. Espectros de absorção do B-DHMF, em pH 5,3, com concentrações do pigmento e de íons alumínio variáveis (faixa de 5 a 50 μM para ambos, na figura correspondem a 0 a 20 μL de solução).

Figura 52. Gráfico de absorvância em 530 nm contra fração molar de íons alumínio (*Job plot*).

Conforme visto em destaque na Figura 52, obteve-se estequiometria de aproximadamente 1:1 (0,89) para o complexo B-DHMF:Al³⁺. Além do Job plot, a determinação da absortividade molar para o complexo metálico também foi necessária, como mostram as Figuras 53 e 54.

Figura 53. Espectros de absorção do B-DHMF complexado com íons alumínio, em pH 5,3, com concentração de íons alumínio fixa (5,1 mM) e do pigmento variável (faixa de 4,6 a 23 μM).

Figura 54. Gráfico de absorvância em 530 nm contra concentração do complexo B-DHMF – Al^{3+} (determinação da absorvância molar do complexo – em destaque na caixa de texto).

Desta forma, a partir dos espectros da Figura 51, foi possível determinar as concentrações de complexo no equilíbrio para cada ensaio (por meio da absorvância em 530 nm) e calcular as concentrações do metal e do ligante no equilíbrio. A partir de quatro medidas de absorvância foram calculadas as constantes de complexação e a sua média, $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, Tabela 3, a qual é condizente com resultados já reportados [32,60,64-66].

Tabela 3. Dados obtidos a partir do método de Job – constantes do equilíbrio obtidas para cada ponto e a média entre elas.

A^{530}	$[\text{Complexo}]_{\text{eq}} / \mu\text{M}$	$[\text{Al}^{3+}]_0 / \mu\text{M}$	$[\text{Al}^{3+}]_{\text{eq}} / \mu\text{M}$	$[\text{B-DHMF}]_0 / \mu\text{M}$	$[\text{B-DHMF}]_{\text{eq}} / \mu\text{M}$	$K_{\text{CM}} / 10^4 \text{ M}^{-1}$	$K_{\text{CM}} \text{ médio} / 10^4 \text{ M}^{-1}$
0,09935	2,735	45,13	42,40	4,595	1,860	3,469	3,593
0,18671	5,141	40,08	34,94	9,182	4,041	3,642	
0,24496	6,745	35,03	28,29	13,76	7,014	3,400	
0,30309	8,345	23,00	21,65	18,33	9,982	3,861	

4.3. Copigmentação com ácidos fenólicos

4.3.1. Copigmentação em pH 1,0 – espectroscopia de absorção

Para todos os íons flavílio estudados, a adição do copigmento provoca uma diminuição no máximo de absorção e o estabelecimento de um novo equilíbrio entre o copigmento (Cop) e o íon flavílio (AH^+) livres e o complexo formado (CP) – evidenciado pelo ponto isosbético observado nos espectros, Figuras 55 e 56 para os pares B-DHMF e ácido ferúlico (FRA), e B-TMF e FRA. Os demais gráficos encontram-se no Apêndice 2.

Figura 55. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 1,0, com concentrações crescentes de ácido ferúlico. Concentração analítica de pigmento = $3,5 \cdot 10^{-5}$ M-

1.

Figura 56. Espectros de absorção do B-TMF, pH 1,0, com concentrações crescentes de ácido ferúlico. Concentração analítica de pigmento = $2,4 \cdot 10^{-5}$ M-

1.

Assim como nos experimentos com Al^{3+} , além de registrar espectros para soluções com concentrações de copigmento crescentes, as absorptividades molares dos complexos flavílio-copigmento foram determinadas separadamente. Para isso, foram preparadas soluções em que a concentração de copigmento encontrou-se em grande excesso em relação à concentração de flavílio. Desta forma, considerou-se a concentração de íon flavílio, o reagente limitante, igual à concentração máxima do complexo no equilíbrio e a absorptividade molar pôde ser calculada.

Para o tratamento de dados, gráficos do logaritmo dos incrementos (negativos) de absorbância em função da concentração de copigmento adicionado foram construídos (Figuras 57 e 58). Das regressões lineares e, a partir da relação $r_\epsilon = \epsilon_{\text{CP}}/\epsilon_{\text{HA}}$ (razão entre as absorptividades molares do complexo e do flavílio livre), foi possível determinar as constantes de copigmentação, KCP, como resume a Tabela 4.

Figura 57. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de ácido ferúlico adicionado ao B-DHMF, conforme equação (16).

Figura 58. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de ácido ferúlico adicionado ao B-TMF, conforme equação (16).

Tabela 4. Constantes de copigmentação médias (em M^{-1}) e razões r_ϵ determinadas por espectroscopia de absorção, obtidas a 25°C.

Flavílio/ Copigmento	PCA		FRA		SNA		VNA		SRA	
	r_ϵ	K_{CP} (abs)	r_ϵ	K_{CP} (abs)	r_ϵ	K_{CP} (abs)	r_ϵ	K_{CP} (abs)	r_ϵ	K_{CP} (abs)
DHMF	0,81	23,0	0,76	59,3	0,69	157	0,88	10,5	0,84	40,8
HMMF	0,79	40,3	0,70	12,5	0,69	96	0,94	36,0	0,71	39,6
B-DHMF	0,88	34,9	0,72	23,3	0,68	119	0,96	16,8	0,80	48,2
B-TMF	0,83	122	0,78	55,2	0,70	504	1,0	4,6	0,84	101

4.3.2. Copigmentação em pH 1,0 – espectroscopia de fluorescência

As medidas de fluorescência mostram que o copigmento orgânico atua como um supressor de fluorescência. Desta forma, os espectros foram registrados para soluções contendo quantidades crescentes do copigmento supressor e a equação de Stern-Volmer, equação (17), foi utilizada para a determinação direta da constante de copigmentação [67].

As Figuras 59 e 60 apresentam os espectros de fluorescência para os pares B-DHMF e ácido sinápico (SNA), e B-TMF e SNA. Nas Figuras 61 e 62, gráficos da intensidade de fluorescência em função da concentração do copigmento são mostrados para os mesmos pares.

Figura 59. Espectros de fluorescência do B-DHMF, em pH 1,1, com concentrações crescentes de ácido sinápico.

Figura 60. Espectros de fluorescência do B-TMF, em pH 1,1, com concentrações crescentes de ácido sinápico.

Figura 61. Gráfico de Stern-Volmer, para B-DHMF e SNA, pH 1,1.

Figura 62. Gráfico de Stern-Volmer, para B-TMF e SNA, pH 1,1.

A Tabela 5 apresenta as constantes de copigmentação determinadas pela equação de Stern-Volmer, comparadas com as constantes determinadas por espectroscopia de absorção, apresentadas no tópico anterior.

Tabela 5. Constantes de copigmentação médias (em M^{-1}), determinadas por espectroscopia de absorção e de fluorescência, obtidas a 25°C.

Flavílio/ Copigmento	PCA		FRA		SNA		VNA		SRA	
	K_{CP} (abs)	K_{CP} (flu)	K_{CP} (abs)	K_{CP} (flu)	K_{CP} (abs)	K_{CP} (flu)	K_{CP} (abs)	K_{CP} (flu)	K_{CP} (abs)	K_{CP} (flu)
B-DHMF	34,9	30,1	27,8	48,9	264	260	16,8	10,0	48,2	43,8
B-TMF	122	119	55,2	250	504	518	4,6	64,0	101	140

Os espectros de fluorescência e os respectivos *plots* de Stern-Volmer dos demais flavílios são apresentados no Apêndice 3.

4.3.3. Copigmentação em meio moderadamente ácido

Conforme abordado ao longo dos tópicos anteriores, apenas os complexos ternários formados por flavílios com estrutura tipo catecol – DHMF e B-DHMF – podem ser observados, visto que os substituintes –OH vicinais são fundamentais na complexação com íons Al^{3+} .

Deste modo, a reação com ácidos fenólicos foi estudada em meio moderadamente ácido, em pHs em que a complexação com Al^{3+} foi observada, para determinar as constantes de copigmentação nestas condições.

Em pHs de 5,0 a 6, a adição do copigmento pode provocar tanto uma diminuição quanto um aumento no máximo de absorção, dependendo do flavílio considerado e o estabelecimento de um novo equilíbrio entre o copigmento livre, o flavílio e o complexo formado.

Em pH $\sim 1,0$, independente do flavílio considerado, a forma ácida é a espécie predominante. Porém, nesta etapa, utilizaram-se soluções tampão de pHs próximos do pK_{a1} , para manter as mesmas condições de estudo da complexação com Al^{3+} e da complexação ternária, em que a presença da base quinonoidal se torna importante.

Como pode ser observado na Figura 63, em pH 5,1 a adição do ácido p-cumárico à solução de DHMF promove a diminuição da absorbância atribuída à base quinonoidal – cujo máximo está centrado em cerca de 508 nm.

Figura 63. Espectros de absorção do DHMF, pH 5,1, com concentrações crescentes de ácido p-cumárico. Concentração analítica de pigmento = $3,64 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$.

Para calcular a razão r_{ϵ} , da mesma forma que na etapa anterior, foi realizado outro experimento para cada combinação base quinonoidal-copigmento.

A Figura 64 mostra a regressão linear para a determinação de K_{CP} utilizando o mesmo tratamento de dados adotado para os experimentos em pH 1,0.

Figura 64. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de ácido p-cumárico adicionado a DHMF, conforme equação (16).

Da mesma forma, as reações entre PCA e B-DHMF, assim como entre o segundo copigmento orgânico adotado nesta etapa, o ácido ferúlico, e ambos os flavílios foram estudadas em pH entre 5,0 e 6,0, como mostram as Figuras 65, 66 e 67.

Figura 65. Espectros de absorção do DHMF, pH 5,4, com concentrações crescentes de ácido ferúlico. Concentração analítica de pigmento = $3,8 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$.

Figura 66. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 6,1, com concentrações crescentes de ácido p-cumárico. Concentração analítica de pigmento = $3,05 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$.

Figura 67. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,4, com concentrações crescentes de ácido ferúlico. Concentração analítica de pigmento = $6,46 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$.

As Figuras 68, 69 e 70 mostram as regressões lineares para a determinação dos respectivos K_{CP} para os pares DHMF-FRA, B-DHMF-PCA e B-DHMF-FRA.

Figura 68. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de ácido ferúlico, para DHMF em pH 5,4, conforme equação (16).

Figura 69. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de ácido p-cumárico, para B-DHMF em pH 6,1, conforme equação (16).

Figura 70. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de ácido ferúlico, para B-DHMF em pH 5,4, conforme equação (16).

Os incrementos de absorção nos experimentos de copigmentação do B-DHMF em pH entre 5,0 e 6,0, ao contrário do que se observa para DHMF, são positivos. Entretanto, no complexo B-DHMF-PCA, apesar de o pH estar quase uma unidade acima do pK_{a1} , o flavílio parece estar sob a forma catiônica, visto que o máximo de absorção do complexo está centrado em 470 nm (máximo de absorção do cátion flavílio). No caso do FRA, observa-se diminuição no máximo de absorção do cátion, e aumento no máximo de absorção da base quinonoidal (centrado em 528 nm).

As constantes de copigmentação para os quatro pares flavílio-copigmento orgânico são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Constantes de copigmentação para os pares DHMF-PCA e DHMF-FRA, em dois pHs distintos, obtidas a 25°C.

Complexo	K_{CP} / M^{-1}	
	pH 1,0	pH entre 5,0 e 6,0
DHMF-PCA	23,0	2,83
DHMF-FRA	59,3	5,96
B-DHMF-PCA	34,9	21,6
B-DHMF-FRA	23,3	9,16

4.3.4. Copigmentação em meio moderadamente ácido – estabilidade do B-DHMF frente à reação de hidratação

Foram realizados alguns experimentos para testar a estabilidade do B-DHMF frente às reações de abertura do anel, na ausência e na presença de um copigmento orgânico – neste caso, o ácido ferúlico – em uma faixa de pHs, de 1,0 a 4,5, Figuras 71 a 74.

Figura 71. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de FRA, pH 1,0, monitoramento em 470 nm.

Figura 72. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de FRA, pH 2,4, monitoramento em 470 nm.

Figura 73. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de FRA, pH 3,5, monitoramento em 470 nm.

Figura 74. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de FRA, pH 4,5, monitoramento em 470 nm.

Os espectros do B-DHMF livre, Figura 75, e na presença de FRA 3,0 mM, Figura 76 foram registrados após 24 horas do início da reação de hidratação. Observa-se que, a partir de pH 3,5, as espécies incolores predominam sobre o cátion flavílio, mesmo em presença de FRA.

Figura 75. Espectros de B-DHMF, variando o pH, 24 horas após a sua adição. Concentração analítica do pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5}$ M.

Figura 76. Espectros de B-DHMF em presença de FRA 3,0 mM, variando o pH, 24 horas após a adição do pigmento. Concentração do pigmento = $1,8 \cdot 10^{-5}$ M.

Para avaliar as velocidades de hidratação em função da concentração do copigmento orgânico, curvas cinéticas do B-DHMF na presença de PCA, Figura 77, e FRA, Figura 78, foram construídas.

Figura 77. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de PCA, pH 5,3, monitoramento em 470 nm.

Figura 78. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de FRA, pH 5,3, monitoramento em 470 nm.

As curvas cinéticas foram ajustadas para equações exponenciais de primeira ordem e a Tabela 7 compara as constantes de velocidade observadas, k_{obs} , para cada concentração de copigmento orgânico, em pH 5,3.

Tabela 7. Constantes de velocidade observadas para B-DHMF na ausência e presença de PCA e FRA em pH 5,3, obtidas a 25°C.

Amostra		k_{obs} / s^{-1}	
Controle		0,11	
PCA 3 mM	FRA 3 mM	0,11	0,084
PCA 5 mM	FRA 5 mM	0,10	0,072
PCA 6 mM	FRA 6 mM	0,095	0,068
PCA 7 mM	FRA 7 mM	0,090	0,065

4.4. Complexos Ternários

4.4.1. Complexação com adição de copigmentos nas razões 1:1, 1:10 e 1:100 (flavílio:copigmento)

As Figuras 79 a 82 mostram os espectros de absorção de DHMF em função da adição de um ou dois copigmentos, com concentrações variáveis. A Figura 82 compara os espectros de DHMF em cada caso (adição de Al^{3+} , adição de PCA, e adição dos dois) apenas para a última razão (1:100), em que as mudanças são mais significativas.

Figura 79. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl_3 nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 80. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de PCA nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 81. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl_3 e PCA nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 82. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl_3 e PCA, separadamente e à mesma solução na razão de 1:100. Concentração do pigmento = 25 μM .

As Figuras 83 e 84 mostram os espectros dos complexos ternários nas últimas duas concentrações, registrados imediatamente e após alguns instantes do preparo das soluções.

Figura 83. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl_3 e PCA na razão de 1:10, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 84. Espectros de absorção do DHMF, pH 3,84, com adição de AlCl_3 e PCA na razão de 1:100, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = $25 \mu\text{M}$.

As mudanças observadas nos espectros do B-DHMF são bastante similares àsquelas observadas para DHMF. As Figuras 85 a 88 mostram os espectros registrados imediatamente para cada uma das situações. Os espectros com PCA foram omitidos, mas a tendência observada é a mesma que para DHMF, ou seja, sem modificação significativa no máximo de absorção.

Figura 85. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl_3 nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = $25 \mu\text{M}$.

Figura 86. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl_3 e PCA nas razões 1:1, 1:10 e 1:100. Concentração do pigmento = $25 \mu\text{M}$.

Figura 87. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl_3 e PCA, separadamente e à mesma solução, na razão de 1:10. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 88. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl_3 e PCA, separadamente e à mesma solução na razão de 1:100. Concentração do pigmento = 25 μM .

Os espectros também foram registrados com o tempo para o complexo ternário de B-DHMF, mostrados nas Figuras 89 a 95. Como B-DHMF é propenso às reações de hidratação, diferente do que ocorre com o DHMF, observa-se que, em baixas concentrações de copigmento (tanto orgânico quanto inorgânico), ocorre o aparecimento da banda em cerca de 380 nm, correspondente a uma das chalconas. Quanto ao complexo ternário, apenas nos espectros da razão de concentrações de 1:1 é possível observar a banda de chalcona – a partir da razão de 1:10 observa-se maior absorção na região do complexo metálico e maior estabilidade do complexo ternário.

Figura 89. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl₃ na razão de 1:1, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μM.

Figura 90. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de AlCl_3 na razão de 1:100, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 91. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de PCA na razão de 1:1, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 92. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de PCA na razão de 1:100, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 93. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de Al^{3+} e PCA na razão de 1:1, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 94. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de Al^{3+} e PCA na razão de 1:10, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μM .

Figura 95. Espectros de absorção do B-DHMF, pH 5,03, com adição de Al^{3+} e PCA na razão de 1:100, registrados com o tempo. Concentração do pigmento = 25 μM .

Os experimentos de B-DHMF com Al^{3+} e FRA mostraram mudanças idênticas nos espectros com a formação do complexo ternário, assim como em relação à estabilidade deste complexo em concentrações elevadas (razão 1:100).

Foram realizados testes em pH em torno de 1,0. Contudo, conforme evidenciado pelos experimentos da etapa anterior, não ocorre complexação com Al^{3+} em pHs menores do que uma unidade abaixo do pK_a do flavílio e, portanto, também não se observou a formação do complexo ternário, o que mostra sua dependência com o pH.

4.4.2. Complexação com adição de copigmentos nas razões 1:1, 2:1 e 3:1 (flavílio:copigmento)

Os experimentos envolvendo apenas íons flavílio e íons Al^{3+} forneceram resultados ambíguos em relação à estequiometria da complexação. Enquanto para a reação entre DHMF e Al^{3+} a estequiometria obtida foi de 3:1 utilizando duas metodologias, no caso do B-DHMF, foram obtidas estequiometrias de 3:2 e de 1:3, com possibilidade da existência de outras razões.

As Figuras 96 e 97 mostram os espectros de absorção de DHMF em presença de FRA e Al^{3+} em diferentes estequiometrias. No primeiro experimento, a razão entre DHMF e Al^{3+} chega até 5,4:1, e podem ser observados deslocamentos significativos no comprimento de onda do máximo de absorção.

Figura 96. Espectros de absorção de DHMF, em presença de FRA e íons Al^{3+} , em diferentes estequiometrias, pH = 4,8.

Figura 97. Espectros de absorção do complexo ternário, com estequiometria de 3:1 ($\text{DHMF}:\text{Al}^{3+}$), com concentrações variáveis de FRA, pH = 4,8.

Na Figura 97, a razão DHMF:Al³⁺ foi mantida constante, em 3:1, e a concentração de FRA foi variada – contudo, é mais difícil distinguir variações na absorbância quando o copigmento orgânico é variado. Por esse motivo, para B-DHMF, a variação na velocidade da descoloração em função da concentração dos copigmentos foi avaliada para detectar diferenças de estabilidade com relação à estequiometria do sistema.

4.4.3. Complexos Ternários – estabilidade

Com base nas mesmas condições adotadas no tópico 3.5.1, ou seja, utilizando B-DHMF 25 µM, e os copigmentos em razões de 1:1, 1:10 e 1:100, os estudos de estabilidade foram conduzidos da mesma forma que no tópico 3.4.4. As Figuras 98, 99 e 100 mostram as curvas cinéticas de B-DHMF em pH 5,3, em que as reações de abertura do anel ocorrem.

Figura 98. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de Al^{3+} , pH 5,3, monitoramento em 470 nm.

Figura 99. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de FRA, pH 5,3, monitoramento em 470 nm.

Figura 100. Curvas cinéticas de B-DHMF em presença de concentrações variáveis de FRA e Al^{3+} , pH 5,3, monitoramento em 470 nm.

Observa-se uma diminuição na velocidade da descoloração do B-DHMF com o aumento na concentração de copigmento – este efeito é notável para os sistemas contendo Al^{3+} em sua composição. Cada curva foi ajustada para uma equação exponencial de primeira ordem e, conforme mostra a Tabela 8, as constantes de velocidade observadas decrescem pouco na presença de FRA e consideravelmente na presença de Al^{3+} ou ambos.

Tabela 8. Constantes de velocidade observadas para B-DHMF na ausência e presença de FRA e Al^{3+} ou ambos, em pH 5,3, obtidas a 25°C.

Amostra	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
Controle	0,077
Al^{3+} 25 μM	0,051
Al^{3+} 250 μM	0,0050
Al^{3+} 2500 μM	0,0038
FRA 25 μM	0,078
FRA 250 μM	0,074
FRA 2500 μM	0,069
FRA 25 μM + Al^{3+} 25 μM	0,036
FRA 250 μM + Al^{3+} 250 μM	0,0062

Considerando a discussão a respeito das diferentes estequiometrias possíveis para a formação do sistema supramolecular, assim como os resultados citados acima quanto ao excesso de Al^{3+} promover maior estabilização, um segundo conjunto de experimentos foi realizado, em que as estequiometrias foram variadas para acompanhar a descoloração do B-DHMF, no mesmo pH.

As Figuras 101 a 105 mostram os espectros de absorção do complexo ternário em função do tempo, para as estequiometrias 2:1, 3:1 e 4:1 (DHMF: Al^{3+}).

As curvas em pH 5,3 foram ajustadas para uma equação exponencial de primeira ordem, e os resultados são apresentados na Tabela 9.

Figura 101. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 2:1:2 (B-DHMF:Al³⁺:FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.

Figura 102. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 3:1:3 (B-DHMF:Al³⁺:FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.

Figura 103. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 4:1:0 (B-DHMF:Al³⁺:FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.

Figura 104. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 4:1:2 (B-DHMF:Al³⁺:FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.

Figura 105. Espectros de absorção do complexo ternário, na estequiometria de 4:1:4 (B-DHMF:Al³⁺:FRA), pH 5,3, registrados de 2 em 2 minutos, por 600 minutos.

Tabela 9. Constantes de velocidade observadas para B-DHMF na presença de FRA e Al³⁺ em diferentes estequiometrias, em pH 5,3, obtidas a 25°C.

Razão B-DHMF:Al ³⁺ :FRA	k _{obs} / s ⁻¹
2:1:2	0,013
3:1:3	0,017
4:1:0	0,019
4:1:2	0,037
4:1:4	0,022

4.5. Reação de inclusão do cloreto de 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF) com cucurbit[7]urila (CB[7])

4.5.1. Reação de inclusão em pH 3,0

4.5.1.1. Isotermas de ligação por espectroscopia de fluorescência

Quando o CB[7] é adicionado ao B-TMF, ocorre um pequeno deslocamento para menores comprimentos de onda, conforme mostra a Figura 106, assim como um aumento no máximo de emissão, o qual cessa em concentrações maiores de CB[7]. Para as últimas adições de CB[7], observa-se uma diminuição da fluorescência, (por efeito de diluição) – a concentração de saturação já foi atingida.

Figura 106. Espectros de fluorescência do B-TMF com subsequentes adições de CB[7], pH 3,0. Concentração fixa de B-TMF = 0,2 μM e concentrações de CB[7] de 0,32 a 158 μM.

Para determinar a constante do equilíbrio da reação de inclusão, foram construídos gráficos de isoterma de ligação a partir da área integrada sob os espectros de emissão em função da concentração do hospedeiro, Figuras 107 e 108.

Figura 107. Isotherma de ligação usando o modelo de estequiometria 1:1, solução analítica.

Figura 108. Isotherma de ligação usando o modelo de complexação sequencial 2:1, solução analítica.

Os dados não foram bem ajustados para a complexação de estequiometria 1:1, sendo que neste caso os resíduos calculados pelo software não apresentam distribuição aleatória.

Por outro lado, o modelo de complexação sequencial 2:1 mostrou-se adequado ao ajuste dos dados, retornando resíduos aleatórios e R^2 maior que 0,99. Os valores médios obtidos por meio de duplicatas calculados pelo *The Scientist* foram $(8,2 \pm 0,8) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para K_1 e $(2,9 \pm 1,3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para K_2 .

Quanto aos resultados obtidos por meio de solução analítica, o melhor ajuste obtido também é o que considera estequiometria sequencial 2:1. As constantes obtidas foram calculadas a partir dos parâmetros a_1 e b_1 (em destaque na caixa de texto da Figura 108), $K_1 = (5,8 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $K_2 = (1,1 \pm 0,5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

4.5.1.2. Cinética rápida por fluxo detido com detecção por espectroscopia

A cinética da reação entre CB[7] e B-TMF pôde ser acompanhada por fluxo detido, na escala de tempo de 0,25 s, Figura 109. Um gráfico com os valores de k_{obs} obtidos pelo software *Pro-Data Viewer* (Tabela 10) em função da concentração de CB[7] pode ser construído, equação 34, Figura 110.

Figura 109. Curvas obtidas no *stopped-flow* para cada concentração de CB[7] utilizada, de 0,892 μM (C – curva vermelha) a 5,35 μM (H – curva laranja).

Concentração de B-TMF = 0,2 μM . As curvas A (preta) e B (azul) correspondem ao registro para água contra água e água contra B-TMF, respectivamente.

Tabela 10. Constantes de velocidade observadas obtidas pelo software *Pro Data Viewer* para cada concentração de CB[7], obtidas a 20°C.

[CB[7]] / μM	k_{obs} / s^{-1}
0,892	122 ± 3
1,78	195 ± 3
2,67	281 ± 6
3,57	357 ± 8
4,46	459 ± 9
5,35	544 ± 16

Figura 110. Ajuste da curva de k_{obs} contra concentração de CB[7], dois conjuntos de dados.

Os valores médios obtidos a partir de duplicatas para as duas constantes, de associação, k^+ , e de dissociação, k^- foram, respectivamente, $(9,0 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $56 \pm 5 \text{ s}^{-1}$.

4.5.2. Estudos de estabilidade com respeito à reação de hidratação

4.5.2.1. Espectroscopia de fluorescência

Conforme estabelecido nos procedimentos experimentais, dois tipos de ensaio foram realizados para avaliar a estabilidade de B-TMF complexado com CB[7], por meio de espectroscopia de fluorescência.

As Figuras 111, 112 e 113 mostram o primeiro caso, um experimento do tipo salto de pH, em que o B-TMF em pH em torno de 0,5 é adicionado à solução de HCl em pHs mais elevados, sem passar por período de incubação. Os espectros foram registrados imediatamente e após 30 e 60 minutos, respectivamente.

Figura 111. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3.

Figura 112. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3, 30 minutos após o preparo das soluções (salto de pH).

Figura 113. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3, 60 minutos após o preparo das soluções (salto de pH).

As Figuras 114 e 115 mostram o segundo caso, em que o B-TMF passou por três horas de incubação em pH 4,3, e a partir da adição de CB[7], registraram-se os espectros imediatamente e após 80 minutos.

Figura 114. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3, com 180 minutos de incubação do B-TMF, registrados imediatamente após a adição de CB[7].

Figura 115. Espectros de fluorescência do B-TMF em função da adição de CB[7], pH 4,3, com 180 minutos de incubação do B-TMF, registrados 80 minutos após a adição de CB[7].

Com o propósito de avaliar o impacto da complexação com CB[7] na velocidade da reação de hidratação do B-TMF, o próximo tópico discute as mudanças na absorbância com e sem a adição do hospedeiro.

4.5.2.2. Cinética por espectroscopia de absorção

A absorbância a 470 nm, atribuída à forma catiônica do B-TMF, foi monitorada com o tempo, para amostras em pHs em que a reação de hidratação passa a ocorrer – pH 4,3 e 5,5. Conforme mostram as Figuras 116 e 119, a adição de CB[7] 100 μM estabiliza B-TMF, visto que a absorbância mantém-se constante, ao passo que CB[7] 10 μM diminui a velocidade de

formação das espécies incolores, mas em menor extensão. Estes resultados são condizentes com os dados obtidos no tópico anterior.

As Figuras 117, 118, 120 e 121 mostram os espectros de absorção registrados antes do início e após o término dos experimentos cinéticos, tanto para pH 4,3 quanto para pH 5,5.

Figura 116. Curvas cinéticas do B-TMF com adição de CB[7], pH 4,3.

Figura 117. Espectros de absorção do B-TMF com adição de CB[7], pH 4,3, início do experimento.

Figura 118. Espectros de absorção do B-TMF com adição de CB[7], pH 4,3, sete horas do início do experimento.

Figura 119. Curvas cinéticas do B-TMF com adição de CB[7], pH 5,5.

Figura 120. Espectros de absorção do B-TMF com adição de CB[7], pH 5,5, início do experimento.

Figura 121. Espectros de absorção do B-TMF com adição de CB[7], pH 5,5, sete horas do início do experimento.

No segundo experimento de monitoramento da absorbância para avaliação da estabilidade do B-TMF frente à adição de CB[7], foram obtidas as curvas da Figura 122.

Figura 122. Curvas cinéticas do B-TMF com adição de CB[7], pH 4,6, após 12 horas de incubação.

4.5.3. Titulação de CB[7] com hexafluorofato de *bis(ciclopentadienil)cobalto(II)*

Todas as soluções estoque de CB[7] preparadas ao longo do trabalho foram tituladas com cobaltoceno, o qual forma um complexo de inclusão estável, tal como reportado em [63]. O cobaltoceno apresenta banda de absorção em 261 nm, a qual decresce com a adição de CB[7], Figura 123, e cujo monitoramento permite determinar a concentração real de CB[7], Figura 124.

Figura 123. Espectros de absorção da titulação de CB[7] com cobaltoceno.

Figura 124. Absorbância do cobaltoceno em 261 nm contra concentração nominal de CB[7].

A intersecção entre as regressões lineares dos dois intervalos de pontos observados na Figura 126, em função da concentração nominal de CB[7], fornece o ponto de equivalência. Como os volumes utilizados são conhecidos, é possível calcular a razão entre os números de mol real e nominal de CB[7] e, com isso, determinar a concentração real da solução estoque de CB[7]. Estes valores variaram entre 83 e 85% da concentração nominal.

5. DISCUSSÃO

5.1. Determinação dos parâmetros dos multiequilíbrios

O registro dos espectros de absorção em função do pH forneceu informações quanto ao aparecimento de outras espécies em equilíbrio para cada sal de flavílio.

Tanto espectros registrados imediatamente ao preparo das soluções quanto aqueles registrados após certo período de incubação, necessário ao estabelecimento dos equilíbrios das reações mais lentas, foram utilizados para calcular parâmetros dos multiequilíbrios (Tabela 2).

5.1.1. Cloreto de 7,8-diidroxí-4-metilflavílio (DHMF)

Os equilíbrios químicos do DHMF podem ser descritos segundo as equações (1) e (2),

sendo:

HA^+ = cátion flavílio

A = base quinonoidal zwitteriônica

A^- = base quinonoidal ionizada.

O DHMF, por possuir o substituinte $-\text{CH}_3$ na posição C4 não é suscetível à reação de hidratação e posterior tautomerização com abertura do anel C [66].

Por esse motivo, os equilíbrios descritos para o DHMF refletem apenas as transformações ácido-base.

No caso dos experimentos de monitoramento da absorbância ao longo do tempo, observa-se diminuição nas bandas atribuídas às duas bases quinonoidais em até oito horas. Caso ocorresse a hidratação do DHMF, a previsão para o perfil dos gráficos seria não somente a diminuição das bandas referentes às espécies coloridas (flavílio e base quinonoidal), mas também o aparecimento de bandas referentes às espécies incolores (hemicetal e chalconas). Os equilíbrios de hidratação e tautomerização se estabeleceriam em um período de tempo igual ou maior que o tempo requerido para a degradação, mas não se observam evidências do aparecimento destas espécies.

A ocorrência de oxidação do DHMF é a causa mais provável para explicar esta degradação em poucas horas. Estruturas como as dos flavílios DHMF, HMMF e B-DHMF são similares a ortohidroquinonas, as quais podem produzir quinonas em presença de oxigênio [60,65]. As bases quinonoidais parecem ser as mais suscetíveis à oxidação, conforme observado nas Figuras 10 e 11.

Como mostram as Figuras 14 e 15, a diminuição na absorbância ocorre ao longo de toda a faixa registrada, implicando em diminuição da concentração de todas as espécies que estiverem presentes em solução. Por esse motivo, as demais espécies que poderiam resultar dos multiequilíbrios, o hemicetal e as chalconas, não foram considerados nas expressões utilizadas para determinação dos pK_{a1} e pK_{a2} .

Os espectros da Figura 16, com borbulhamento de nitrogênio, foram utilizados nestes cálculos, para assegurar que não houve diminuição das concentrações das espécies ionizadas por meio da oxidação.

Para determinar as frações molares do cátion flavílio e da base quinonoidal, parte-se da premissa de que, em pHs baixos ($\sim 1,0$), existe apenas o cátion livre em solução. Portanto, nas medidas de absorvância neste primeiro pH, considera-se fração molar igual a 1,0 para esta espécie. A partir das absorvâncias registradas nos pHs crescentes, as frações molares do cátion são calculadas proporcionalmente em relação à primeira medida. O mesmo ocorre para determinar as frações molares da base quinonoidal ionizada, partindo do maior pH em direção a pHs decrescentes – em pHs elevados, considera-se somente a presença da base e, portanto, uma fração molar igual a 1,0.

Os valores encontrados para as constantes de ionização para o primeiro e o segundo equilíbrio, $1,3 \cdot 10^{-5}$ M e $7,9 \cdot 10^{-11}$ M, respectivamente, são similares a valores encontrados na literatura [60], sendo que a constante do segundo equilíbrio é cerca de 6 ordens de magnitude menor, conforme previsto para estruturas do tipo catecol, em que a segunda desprotonação é menos suscetível, visto que resulta em uma base conjugada com maior separação de cargas [68].

5.1.2. Cloreto de 8-hidroxi-4-metil-7-metoxiflavílio (HMMF)

O HMMF participa de apenas um equilíbrio químico, que também pode ser descrito segundo a equação (1). Assim como o DHMF, o HMMF não apresenta as espécies incolores em quantidades apreciáveis.

A base quinonoidal, aparente em meios neutros a moderadamente alcalinos, também está sujeita à oxidação, como pode ser observado na Figura 19. Para calcular o pK_a adequadamente, também foram utilizados espectros das soluções purgadas com N_2 .

5.1.3. Cloreto de 3',4'-diidroxí-7-metoxiflavílio (B-DHMF)

O B-DHMF, ao contrário dos demais íons flavílio estudados, apresenta os equilíbrios referentes às transformações ácido-base, equações (1) e (2), assim como às reações de hidratação, tautomerização e isomerização, descritos pelas equações (3), (4) e (5), respectivamente. A equação (6) representa a reação de hidratação aparente, ou seja, a transformação do flavílio na soma das espécies incolores,

sendo:

BH = hemicetal

C_{CIS} = chalcona cis

C_{TRANS} = chalcona trans

Para a determinação dos pK_{a1} e pK_{a2} , da mesma forma que foi feito para DHMF e HMMF, as soluções foram purgadas com nitrogênio gasoso antes do registro dos espectros, para prevenir a oxidação.

A partir das Figuras 30, 31 e 32 observa-se o aparecimento de uma banda centrada em 375 nm, atribuída à uma das espécies incolores oriunda das reações de abertura do anel flavílio. Conforme descrito em [66], a chalcona trans absorve em comprimentos de onda entre 330 e 380 nm e o pK (representando o equilíbrio entre flavílio e chalcona trans) apresenta valores entre 2,0 e 3,0.

Considerando que a formação da chalcona trans é mais rápida do que em outros flavílios, para determinação de um pK_h aparente, o pK_h' , a concentração da espécie final resultante da incubação das soluções nos experimentos de salto de pH é obtida a partir da mesma premissa utilizada na determinação de pK_a . As frações molares referentes à somatória de todas as espécies que

tenham se formado no período de incubação neste caso, correspondem à praticamente apenas a chalcona trans.

5.1.4. Cloreto de 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF)

O B-TMF, da mesma forma que o B-DHMF, apresenta equilíbrios de hidratação, tautomerização e isomerização, mas não apresenta equilíbrio ácido-base, devido à ausência de substituintes -OH em sua estrutura. Portanto, as equações de (3) a (5) descrevem as transformações observadas, e a equação (6) define a transformação pertinente estudada no caso deste flavílio, ou seja, o equilíbrio de hidratação aparente.

O B-TMF, não é suscetível à degradação via oxidação, uma vez que em sua estrutura não há substituintes -OH, apenas -OCH₃.

5.2. Copigmentação com íons metálicos

Estudos quanto à complexação dos íons flavílio de interesse com íons Al³⁺ foram realizados em meio ácido a moderadamente ácido, em virtude da ocorrência de precipitação de Al(OH)₃ em pHs próximos da neutralidade.

Contudo, como a complexação com Al^{3+} ocorre mais eficientemente quando o flavílio encontra-se desprotonado [43,44,69], não seria possível observar a formação de complexo em pH em torno de 1,0 – 2,0, faixa em que o cátion predomina. Portanto, optou-se por utilizar pHs crescentes, de ~1,0 até pelo menos o $\text{pK}_{\text{a}1}$, ou uma unidade a menos, onde há cerca de 10% da espécie desprotonada, e a complexação poderia ser visualizada.

5.2.1. Abordagem 1: concentrações crescentes de Al^{3+}

Utilizando metodologia bastante similar à descrita em [32], para escrever uma expressão que relacione os dados experimentais e as grandezas a serem determinadas, foram considerados dois equilíbrios – ácido-base, equação (1), válido para os dois flavílios, e o equilíbrio de complexação, equação (7), entre a base quinonoidal zwitteriônica e íons alumínio. A somatória dos equilíbrios resulta na equação que representa a reação observada experimentalmente, equação (8), com a constante de equilíbrio experimental, o K_{obs} ,

sendo:

CM = complexo flavílio – Al^{3+}

K_{CM} = constante de equilíbrio de complexação

β = constante observada de equilíbrio de complexação

β pode ser deduzido por:

$$\beta = \frac{[CM] \times [H^+]}{[HA^+] \times [Al^{3+}]^n} = \frac{K_{CM} \times [A] \times [Al^{3+}]^n \times [H^+]}{[HA^+] \times [Al^{3+}]^n} = K_{CM} K_{a1} \quad (9)$$

A estequiometria da reação de complexação foi obtida por meio da seguinte equação [32],

$$\log \frac{A_x}{(A_0 - A_x)^n} = m \log([Al^{3+}]) + \log \beta \quad (10)$$

sendo:

m = coeficiente estequiométrico de Al^{3+}

n = coeficiente estequiométrico de HA^+

A_x = Absorbância na presença de íons Al^{3+}

A_0 = Absorbância máxima na presença de íons Al^{3+}

Utilizando as equações acima com $n=1$, obteve-se estequiometria de 3:1 (DHMF: Al^{3+}). Neste caso, calculou-se constante β igual a 3,3 e K_{CM} igual a $2,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-3}$.

Quanto ao B-DHMF, de acordo com o gráfico da Figura 48, utilizando $n=1$, obteve-se coeficiente angular (m) igual a 0,73, ou seja, estequiometria de 3:2 (B-DHMF: Al^{3+}). As constantes de complexação, β e K_{CM} , foram calculadas como 685 e $2,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

As constantes de complexação obtidas tanto para antocianinas quanto para seus análogos normalmente encontram-se na faixa de 10^4 a 10^5 M^{-1} [48,64], ou seja, obteve-se uma constante cerca de 100 a 1000 vezes maior do que o esperado com esta metodologia para o B-DHMF.

5.2.2. Abordagem 2: método das variações contínuas

O método das variações contínuas, ou método de Job, é baseado na utilização de reagentes limitantes na determinação da estequiometria de reações. São preparadas soluções dos reagentes em concentrações variáveis, em que a quantidade total dos reagentes (com base na soma das frações molares parciais) não varia ou varia bem pouco [62].

A partir deste método, a fração molar de um dos reagentes, no caso o Al^{3+} , é calculada conforme a equação (11); a fração molar em que a absorbância é máxima corresponde ao ponto estequiométrico, o qual possui uma dependência com o reagente que limita a quantidade de produto formado,

$$\chi_{\text{Al}^{3+}} = \frac{n_{\text{Al}^{3+}}}{n_{\text{Al}^{3+}} + n_{\text{F}}} \quad (11)$$

sendo:

$\chi_{\text{Al}^{3+}}$ = fração molar de íons Al^{3+}

$n_{\text{Al}^{3+}}$ = número de mols de Al^{3+} iniciais (calculados a partir da concentração analítica)

n_{F} = número de mols de flavílio iniciais (calculados a partir da concentração analítica)

Como mostra a equação (12), de forma simplificada, n corresponde ao número de mols de íons alumínio para cada flavílio na reação de complexação. A partir do gráfico da Figura 50, a intersecção entre as regressões lineares dos dois intervalos de pontos corresponde à fração molar de Al^{3+} no ponto estequiométrico. Utilizando a equação (13) calcula-se n , o coeficiente estequiométrico (0,37, destacado na caixa de texto da Figura 50), obtendo razão de 3:1 (DHMF: Al^{3+}).

$$n = \frac{x_{\text{Al}^{3+}}}{1 - x_{\text{Al}^{3+}}} \quad (13)$$

A determinação da absorvidade molar do complexo também é baseada na utilização de reagentes limitantes e em excesso (Figuras 53 e 54 para B-DHMF). Utilizando concentração fixa de íons Al^{3+} em excesso (5 mM) e concentração do flavílio variável, como reagente limitante (pelo menos 200 vezes menor que de Al^{3+}), todo o flavílio adicionado produz o complexo e, portanto, as concentrações de complexo adotadas nos cálculos correspondem às concentrações do reagente limitante.

Contudo, o método de Job foi utilizado apenas para verificar a estequiometria da reação entre DHMF e Al^{3+} - a partir de resultados obtidos para o complexo ternário, mostrou-se necessário confirmar a estequiometria da reação novamente.

Observa-se bastante flutuação da absorbância nos comprimentos de onda maiores ou iguais ao máximo de absorção do complexo (a partir de, aproximadamente, 540 nm), o que dificulta calcular a constante de equilíbrio

com precisão. Uma possível explicação para a flutuação na absorbância do complexo é que o mecanismo de complexação envolve mais de uma estequiometria e, portanto, mais de um complexo, com máximos de absorção muito próximos e pouco distinguíveis um do outro.

Utilizando as mesmas equações descritas para o complexo DHMF-Al³⁺, a partir do *Job plot*, Figura 52, foi calculado $n(\text{Al}^{3+})$ aproximadamente igual a um (0,89, destacado na caixa de texto).

A determinação da absortividade molar do complexo (Figuras 53 e 54) permitiu calcular a constante de complexação a partir dos espectros registrados na Figura 51, Tabela 3.

As constantes calculadas usando ambas as metodologias são comparadas na Tabela 11. A constante obtida a partir do método de Job para o complexo B-DHMF-Al³⁺ possui ordem de grandeza na faixa de 10⁴, conforme o esperado.

Tabela 11. Constantes de complexação B-DHMF - Al³⁺, comparando duas metodologias.

Método	K _{CP}
Variação apenas de Al ³⁺	2,7 x 10 ⁸
Variações contínuas	3,6 x 10⁴

Apesar de o método das variações contínuas não considerar o pK_{a1} , como o método reportado anteriormente, ou seja, não considerar diretamente as espécies presentes em solução, é bastante utilizado na determinação de parâmetros de reações de complexação, com resultados razoáveis. Mesmo sem supor qual a espécie que participa efetivamente da complexação, o método é confiável na determinação da estequiometria, uma vez que não utiliza nenhuma aproximação, lida apenas com conceitos de reagente limitante e em excesso.

O método descrito no tópico anterior não considera a absorvidade molar do complexo nos cálculos. Contudo, este aspecto não é necessariamente responsável pelas discrepâncias encontradas entre os dois casos. A relação entre as absorvidades dos flavílios e dos complexos (sejam eles com copigmento orgânico ou inorgânico), em pH 1,0, é quase sempre calculada como aproximadamente 1,0, e nos pHs em que a complexação com Al^{3+} foi estudada, observam-se razões bastante similares, o que não comprometeria o resultado final.

Entretanto, no método das variações contínuas não é observada a saturação do equilíbrio, tal qual ocorre quando se utilizam concentrações crescentes e mais elevadas de íons Al^{3+} .

5.3. Copigmentação com ácidos fenólicos

5.3.1. Copigmentação em pH 1,0 – espectroscopia de absorção

Como em pH $\sim 1,0$, independente do flavílio considerado, a forma ácida é a espécie predominante, para a determinação da constante do equilíbrio de copigmentação, a seguinte equação química pode ser escrita:

Sendo z o número de moléculas de copigmento que se associam a cada molécula de flavílio.

Foi demonstrado em [34,70] que a determinação da constante envolve apenas medidas do incremento de absorbância $[(A-A_0)/A_0]$ e medidas adicionais para determinação da absortividade molar do complexo. Para isto, as equações (15) e (16) foram deduzidas [34],

$$\frac{(A-A_0)}{A_0} = K_{CP} r_{\varepsilon} [Cop]^z \quad (15)$$

$$\ln \left[\frac{(A-A_0)}{A_0} \right] = \ln(K_{CP} r_{\varepsilon}) + z \ln[Cop] \quad (16)$$

sendo:

A = absorbância na presença de copigmento

A₀ = absorbância na ausência de copigmento

K_{CP} = constante de copigmentação

$r_{\varepsilon} = \varepsilon_{CP}/\varepsilon_{HA^+}$ = razão entre as absortividades molares do complexo e do íon flavílio livre

Um dos objetivos do projeto seria analisar se a estrutura do flavílio está diretamente relacionada com a afinidade com os copigmentos. Contudo, apenas para B-TMF, com exceção do complexo com FRA (Tabela 4), as constantes determinadas apresentam sempre o maior valor da série, se destacando como o flavílio que forma os complexos mais estáveis. Com relação aos demais pares flavílio-copigmento, as constantes obtidas, Tabela 4,

mostram que não há uma tendência evidente em relação aos flavílios, o que dificulta elaborar uma análise a partir destes resultados.

Entretanto, analisando de forma diferente – a partir da estrutura dos copigmentos – é possível observar uma tendência.

Três dos cinco copigmentos – PCA, FRA e SNA – são ácidos cinâmicos substituídos, ao passo que os dois restantes – SRA e VNA – são ácidos benzoicos substituídos. Os maiores valores para as constantes de equilíbrio foram obtidos para os derivados de ácido cinâmico, sendo que as constantes parecem mostrar um aumento conforme um substituinte é adicionado ao anel aromático do copigmento, ou seja, constantes crescentes foram obtidas partindo de PCA e FRA para SNA.

Esta tendência encontra-se de acordo com o citado na literatura [20, 31], em que os autores discutem uma correlação entre o potencial de ionização do copigmento e a constante de equilíbrio da complexação. O potencial de ionização reflete a tendência do composto em ceder elétrons, ou seja, neste caso, a tendência do copigmento em transferir elétrons para o cátion flavílio, uma espécie deficiente em elétrons.

Conforme calculado em [20, 31], os derivados de ácido benzoico possuem potencial de ionização maior que derivados de ácido cinâmico que, por sua vez, possuem potencial maior que flavonas substituídas. Quanto maior o potencial de ionização, menor a constante de equilíbrio obtida. Da mesma forma, SNA apresenta potencial de ionização menor que PCA, visto que contém mais substituintes doadores de elétrons ligados ao anel aromático e,

portanto, normalmente produz os complexos de transferência de carga com maiores constantes de equilíbrio.

5.3.2. Copigmentação em pH 1,0 – espectroscopia de fluorescência

A equação (17) mostra a relação entre a supressão de fluorescência provocada pela adição do copigmento e a constante de copigmentação, numericamente igual à constante de supressão,

$$\frac{E_0}{E} = 1 + K_Q[Q] = 1 + K_{CP}[Cop] \quad (17)$$

sendo:

E_0 = área integrada sob a banda de emissão, na ausência de supressor (copigmento)

E = área integrada sob a banda de emissão, na presença de supressor (copigmento)

$K_Q = K_{CP}$ = constante de supressão de fluorescência = constante de copigmentação

$[Q] = [Cop]$ = concentração de supressor = concentração de copigmento

O tratamento de dados utilizando a equação de Stern-Volmer comparado com a espectroscopia de absorção não envolve a determinação de um parâmetro a mais, como a absorvidade molar do complexo. Além disso, a reprodutibilidade dos resultados é maior, visto que a técnica é mais sensível e, com a adição do copigmento, há mudanças mais significativas na intensidade do sinal, em comparação com os espectros de absorção. Embora alguns pares

flavílio-copigmento apresentem diferenças entre os resultados obtidos por meio das duas metodologias, a maior parte dos resultados apresenta coerência entre si.

5.3.3. Copigmentação em meio moderadamente ácido

Como o valor do pH utilizado está pelo menos uma unidade acima do valor do pK_{a1} , antes da adição do copigmento orgânico, a base quinonoidal livre é a espécie predominante, com fração molar maior ou igual a 0,5. Para a determinação da constante do equilíbrio de copigmentação, também foram utilizadas as equações definidas para a reação observada em pH 1,0, em que a espécie atuante era o cátion flavílio.

Portanto, de acordo com a equação (18), a base quinonoidal resultante da primeira desprotonação interagiria com o copigmento orgânico, formando um complexo CP_A ,

sendo z o número de moléculas de copigmento que se associam a cada molécula de base quinonoidal.

Da mesma forma que no tópico 5.3.1, o tratamento de dados baseou-se nos estudos publicados por [34,70] como mostram as equações (15) e (16),

$$\frac{(A-A_0)}{A_0} = K_{CP} r_\varepsilon [Cop]^z \quad (15)$$

$$\ln \left[\frac{(A-A_0)}{A_0} \right] = \ln(K_{CP} r_\varepsilon) + z \ln[Cop] \quad (16)$$

sendo:

A = absorbância na presença de copigmento

A_0 = absorbância na ausência de copigmento

K_{CP} = constante de copigmentação

$r_\epsilon = \epsilon_{CP}/\epsilon_A$ = razão entre as absorptividades molares do complexo e da base quinonoidal livre

Utilizando a equação (16), e comparando as constantes de equilíbrio em pH 1,0 e em pH entre 5,0 e 6,0, observam-se valores de duas a dez vezes menores para os experimentos em meio ácido, Tabela 6.

Como o complexo estudado nesta etapa envolve a base quinonoidal, em cuja estrutura há maior delocalização de cargas, seria esperado que a afinidade entre os pares base quinonoidal-copigmento orgânico fosse menor, o que se reflete nas constantes de copigmentação menores comparativamente aos pares cátion flavílio-copigmento orgânico.

Contudo, pelo fato de o copigmento orgânico apresentar maior afinidade com a forma catiônica, o tratamento de dados pode ter sido adequado, por considerar apenas uma espécie participando do equilíbrio, mas não envolveria o cátion, e sim a base quinonoidal. Neste sentido, a adição de quantidades crescentes do copigmento deslocaria o equilíbrio ácido-base no sentido do cátion, para promover a formação do complexo HA-Cop.

Esta hipótese é sustentada pelos dados experimentais, em que há diminuição da banda atribuída à base quinonoidal zwitteriônica no caso do DHMF e aumento da banda atribuída ao cátion no caso do par B-DHMF-PCA. A

exceção seria o par B-DHMF-FRA, em que há um acréscimo na absorção da base.

Esta última evidência ressalta a discussão do tópico 5.4, em que se observa a importância do copigmento orgânico na formação do complexo ternário. A presença do copigmento orgânico em meios moderadamente ácidos promove sinergia na estabilização do B-DHMF frente às reações de abertura do anel. As forças responsáveis pela interação entre o cátion flavílio e ácidos fenólicos em meios ácidos provavelmente não são da mesma natureza que aquelas responsáveis pela interação com a base quinonoidal. Como a base não é tão deficiente em elétrons quanto o cátion, a contribuição por transferência de carga é provavelmente menor do que alguma interação do tipo hidrofóbica, por exemplo, com empilhamento π .

Como o complexo B-DHMF-PCA continua apresentando a maior constante de copigmentação e, em pH 6,1, parece estabilizar a forma catiônica, é possível afirmar que PCA atua como melhor copigmento para o B-DHMF comparativamente ao FRA.

5.3.4. Copigmentação em meio moderadamente ácido – estabilidade do B-DHMF frente à reação de hidratação

Observa-se que, a partir de pH 2,4, considerando o pK_h' igual a 3,1, a absorbância em 470 nm começa a diminuir com o tempo, devido à formação das espécies incolores. Contudo, nesta concentração de prótons, a extensão da hidratação ainda é baixa e, portanto, FRA consegue estabilizar o B-DHMF. A partir de pH 3,5, observa-se diminuição cada vez maior da absorbância com o

tempo e, em presença de FRA, diminuição da velocidade de descoloração do B-DHMF – esse efeito é mais pronunciado para a maior concentração utilizada, 7,0 mM.

Entretanto, a diferença entre as curvas na presença e na ausência do copigmento não é muito significativa – basta comparar a influência do FRA com o CB[7], o qual, em elevadas concentrações, impede que a reação de hidratação ocorra. Como os copigmentos orgânicos são pouco solúveis em água, não é possível preparar soluções muito concentradas para avaliar o efeito na estabilização do cátion flavílio.

Na Figura 76, observa-se que, a partir de pH 3,5, as espécies incolores predominam sobre o cátion flavílio, mesmo em presença de FRA.

A partir das curvas cinéticas de hidratação do B-DHMF em presença de concentrações crescentes de copigmento, em pH 5,3 (Figuras 77 e 78), observa-se a diminuição da k_{obs} com o aumento da concentração de copigmento – de forma mais pronunciada para o FRA, Tabela 7. Como pode ser visto no próximo tópico, os copigmentos orgânicos não promovem a estabilização do flavílio de forma tão eficiente quanto os íons Al^{3+} fazem.

5.4. Complexos Ternários

5.4.1. Complexação com adição de copigmentos nas razões 1:1, 1:10 e 1:100 (flavílio:copigmento)

A partir dos espectros das Figuras 79 a 82, pode-se observar que a adição de PCA, mesmo em pH 3,94, ainda ocasiona pequenas diminuições no máximo de absorção do flavílio, tanto na menor quanto em maiores

concentrações. Como os ácidos fenólicos absorvem intensamente na região do UV próximo, até cerca de 390 nm (onde o cátion flavílio do DHMF absorve) quando muito concentrados, as mudanças são sempre acompanhadas na banda em 440 nm.

Os experimentos com adição de apenas Al^{3+} mostram que, em baixas concentrações não há modificações significativas do espectro do DHMF. Entretanto, na razão de 1:100, a adição de Al^{3+} promove o surgimento da banda atribuída ao complexo, em cerca de 528 nm. No tópico de complexação com Al^{3+} , a determinação dos parâmetros da reação consistiu, na primeira metodologia, na utilização de concentrações relativamente elevadas de Al^{3+} , que promoviam a formação do complexo logo que as soluções fossem misturadas. Como a cinética deve ser dependente da concentração do íon metálico, observa-se que apenas para a última concentração a banda aparece prontamente, assim como a coloração da solução muda rapidamente de amarelo para rosa arroxeado.

Conforme se adicionam tanto Al^{3+} quanto copigmento orgânico ao DHMF, observa-se que a influência de íons Al^{3+} é maior, visto que as mudanças na banda centrada em 440 nm são similares às observadas na Figura 79 (adição de Al^{3+} somente), e a banda atribuída ao complexo só surge para a maior concentração de copigmentos.

Como foi previsto quanto à cinética da complexação, a Figura 83 mostra as mudanças com o tempo na banda do complexo metálico, sugerindo que, para concentrações menores de Al^{3+} , a reação se processa em escala de tempo maior relativamente às concentrações elevadas, como a utilizada no

último caso, Figura 84. Para a razão 1:100, a reação se completa quase imediatamente à adição do flavílio à solução e, como mostra o último espectro, mesmo após 15 dias de armazenamento da solução, praticamente não ocorrem variações, indicando que o complexo ternário mantém-se estável por longos períodos.

Quanto ao B-DHMF, resultados similares foram observados com relação à maior influência de íons Al^{3+} na formação do complexo ternário. A adição de PCA altera apenas o máximo de absorção correspondente ao cátion flavílio, diminuindo-o.

A adição de Al^{3+} promove a estabilização do B-DHMF com relação às reações de abertura do anel, conforme mostram as Figuras 89 a 95. Embora a adição somente de PCA não seja suficiente para que a base quinonoidal seja a espécie predominante em pH 5, quando se comparam as Figuras 90 a 95, em que Al^{3+} foi adicionado na razão 1:100 (B-DHMF: Al^{3+}), verifica-se que o copigmento orgânico é necessário para que esta estabilização seja mais efetiva. Esta observação evidencia a existência de sinergia entre copigmento orgânico e íon metálico.

5.4.2. Complexação com adição de copigmentos nas razões 1:1, 2:1 e 3:1 (flavílio:copigmento)

Como ambos os flavílios apresentam os substituintes -OH vicinais, mas em anéis diferentes, a expectativa com relação à formação dos complexos ternários seria de que a estequiometria tivesse um papel relevante para promover sinergia na estrutura supramolecular, visto que a geometria nestes sistemas influencia bastante a sua estabilidade.

Visualmente, as soluções apresentam colorações levemente distintas – da maior para a menor concentração de Al^{3+} (com relação a DHMF), a cor do complexo muda de azul arroxeado até azul esverdeado. Do ponto de vista da mimetização do complexo encontrado *in natura*, estes foram os resultados em que se obteve a maior semelhança entre o *in natura* e o *in vitro* – só foi possível observar o complexo azul a partir destas razões entre flavílio e copigmentos. Em excesso de Al^{3+} , os complexos obtidos assemelharam-se aos complexos binários flavílio-íon metálico, de coloração arroxeada.

Além de se encontrar em excesso em relação aos íons Al^{3+} , nesta etapa, o DHMF foi utilizado em concentrações mais elevadas em relação aos demais experimentos do projeto, com absorbâncias superiores a 1,0. Este fator também deve ser levado em conta, visto que outro fenômeno conhecido como responsável pela estabilização da cor é a auto-associação, em que as interações entre duas ou mais moléculas de flavílio (ou antocianina) também podem promover sinergia na formação de complexos ternários ou binários.

5.4.3. Complexos Ternários – estabilidade

Concentrações de Al^{3+} acima de 250 μM promovem uma diminuição de pelo menos dez vezes na velocidade da descoloração do B-DHMF, mostrando mais uma vez que a presença do íon metálico é essencial na estabilização do cátion flavílio. Quando se comparam as k_{obs} dos sistemas contendo Al^{3+} a 25 μM , observa-se que a presença do copigmento orgânico torna a estabilização mais eficaz – a presença de apenas íons Al^{3+} reduz a k_{obs} em cerca de 30%, ao

passo que a adição de FRA leva à redução a cerca de 50%, corroborando com o tópico 5.4.1.

Nos experimentos em que o flavílio é adicionado em excesso em relação aos íons Al^{3+} , nota-se que, diferente do que ocorre com o DHMF, as variadas razões estequiométricas avaliadas não promovem as mudanças sutis na coloração do complexo ternário envolvendo o B-DHMF – em todos os casos, observam-se soluções de coloração arroxeada.

Como pode ser comparado pela Tabela 9, a diminuição na concentração relativa de íons Al^{3+} promove o aumento na k_{obs} da reação, exceto por uma concentração, na estequiometria de 4:1:2. Estes resultados confirmam os dados discutidos acima, em que concentrações maiores de Al^{3+} aumentam a estabilidade do B-DHMF.

Na razão 4:1:2, o complexo ternário apresenta a menor tendência em estabilizar o B-DHMF, como pode ser atestado também pela Figura 104 – o máximo de absorção em 470 nm do cátion flavílio é pouco deslocado no sentido de formação da espécie estável, o complexo, em comparação com os espectros observados para as demais condições.

No tópico 4.2, foram calculadas estequiometrias de 3:2 e 1:1 para o complexo B-DHMF- Al^{3+} , portanto, era esperado que concentrações relativas de Al^{3+} maiores promovessem a estabilização do B-DHMF no complexo ternário. Ou seja, diferente do que ocorre com o DHMF, inclusive com relação às cores obtidas para os complexos ternários, para que ocorra sinergia, no caso do B-DHMF, os íons Al^{3+} devem estar presentes aproximadamente nas mesmas concentrações do flavílio.

Embora seja difícil relacionar as constantes de velocidade observadas com ambas as concentrações dos copigmentos, a partir destes ensaios de estabilidade, foi possível investigar as relações entre concentração, estequiometria, formação dos complexos ternários e espécies responsáveis pela cor.

5.5. Reação de inclusão do cloreto de 7,3',4'-trimetoxiflavílio (B-TMF) com cucurbit[7]urila (CB[7])

5.5.1. Reação de inclusão em pH 3,0

5.5.1.1. Isotermas de ligação por espectroscopia de fluorescência

Dois modelos diferentes, no que concerne à estequiometria, foram utilizados para fazer o ajuste em ambos os softwares – *The Scientist* e *Origin Lab*. O primeiro modelo considera uma estequiometria de 1:1, Figura 107, e o segundo considera complexação sequencial, de 2:1 (hospedeiro-hóspede), Figura 108, equações 19 e 20.

Para o tratamento dos dados, as equações (21) a (29) mostram as definições utilizadas para montar o *script* no software, e as equações (30) a (31) [71] para ajustar uma equação não linear no *Origin Lab*.

Definições utilizadas para o modelo de estequiometria 1:1:

$$K = \frac{[G@H]_{eq}}{[G]_{eq} [H]_{eq}} \quad (21)$$

$$I = \phi_f [G]_{eq} + \phi_1 [G@H]_{eq} \quad (22)$$

Balanços de massa:

$$[G]_T = [G]_{eq} + [G@H]_{eq} \quad (23)$$

$$[H]_T = [H]_{eq} + [G@H]_{eq} \quad (24)$$

Definições utilizadas para o modelo de complexação sequencial 2:1:

$$K_1 = \frac{[G@H]_{eq}}{[G]_{eq} [H]_{eq}} \quad (25)$$

$$K_2 = \frac{[G@H_2]_{eq}}{[G@H]_{eq} [H]_{eq}} \quad (26)$$

$$I = \phi_f [G]_{eq} + \phi_1 [G@H]_{eq} + \phi_2 [G@H_2]_{eq} \quad (27)$$

Balanços de massa:

$$[G]_T = [G]_{eq} + [G@H]_{eq} + [G@H_2]_{eq} \quad (28)$$

$$[H]_T = [H]_{eq} + 2[G@H]_{eq} + 2[G@H_2]_{eq} \quad (29)$$

Onde $[G@H]$ representa a concentração do complexo 1:1, e $[G@H_2]$ representa a concentração do complexo 2:1. O símbolo ϕ representa o rendimento quântico de fluorescência das espécies – onde f representa o hóspede livre, 1 representa o complexo 1:1, e 2 representa o complexo 2:1.

$$I_{obs} = \frac{I_0 + I_{GH} K_1 [H]_0}{1 + K_1 [H]_0} \quad (30)$$

$$I_{obs} = \frac{I_0 + I_{GH} K_1 [H]_0 + I_{GH_2} K_1 K_2 [H]_0^2}{1 + K_1 [H]_0 + K_1 K_2 [H]_0^2} \quad (31)$$

Onde os índices se referem a cada uma das espécies em equilíbrio, sendo G o B-TMF, H o CB[7], GH o primeiro complexo e GH_2 o segundo complexo, e o índice 0 se refere à concentração analítica. O símbolo I representa a intensidade de fluorescência – I_0 representa a intensidade de fluorescência do hóspede na ausência do hospedeiro.

O modelo de complexação sequencial 2:1 mostrou-se adequado ao ajuste dos dados, retornando resíduos aleatórios e R^2 maior que 0,99. O software *The Scientist* utiliza métodos numéricos para calcular as constantes dos equilíbrios e os rendimentos quânticos de fluorescência. Como são muitas variáveis não conhecidas e pouca informação inicial fornecida ao software, em alguns casos as flutuações no ajuste são quase da mesma ordem de grandeza que os parâmetros determinados. Contudo, mesmo tendo obtido erros elevados associados às constantes de equilíbrio, estas ainda corroboram os dados cinéticos.

A posição da carga positiva do cátion flavílio no anel bicondensado do B-TMF permite que este tipo de hóspede forme complexos com duas moléculas

do hospedeiro – a porção benzopirílio estaria posicionada no interior da cavidade do primeiro hospedeiro, ao passo que o benzeno ligado ao benzopirílio estaria na cavidade de um segundo hospedeiro. Desta forma, o oxônio poderia interagir com os grupos carbonílicos localizados em ambas as moléculas de hospedeiro, tornando o arranjo estável.

5.5.1.2. Cinética rápida por fluxo detido com detecção por espectroscopia

Quando as concentrações de CB[7] são pelo menos cinco vezes maiores que as de B-TMF, a cinética passa a ser de pseudo-primeira ordem e o gráfico da Figura 110 apresenta os valores de k_{obs} em função da concentração de CB[7], equação 32.

$$k_{obs} = k_1^+ [CB[7]] + k_1^- \quad (32)$$

As concentrações de CB[7] utilizadas nestes experimentos cinéticos, comparando com aquelas utilizadas para a isoterma de ligação, não elevadas o suficiente para que se forme o segundo complexo (2:1) em quantidade significativa. As constantes de velocidade foram atribuídas à primeira etapa (1:1), como etapa determinante da reação.

A constante de equilíbrio calculada para a primeira etapa da reação, a partir das constantes de velocidade, é igual a $(1,6 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Este valor é aproximadamente o dobro do obtido a partir da isoterma de ligação. Contudo, considerando a quantidade de parâmetros flutuantes no *The Scientist*, conforme discutido no tópico anterior, o valor obtido a partir dos experimentos cinéticos é mais preciso, pois agrega menos incerteza no cálculo, e mais

confiável, visto que na metodologia usada não há interferência da segunda etapa da reação.

Para avaliar a sensibilidade do *The Scientist* à variação nos parâmetros, e como as constantes de equilíbrio são afetadas, o valor de K_1 foi fixado em $1,0 \times 10^6$. Esta ação reduziu o número de parâmetros flutuantes para três, e consequentemente diminuiu os erros associados ao valor de K_2 , consequentemente (ajustes não mostrados). Os resíduos não mudaram apreciavelmente, comparando os resultados antes e depois de fixar o valor de K_1 , mostrando que ambos valores de K_1 são aceitáveis e que, portanto, os resultados provenientes das duas metodologias são condizentes.

5.5.2. Estudos de estabilidade com respeito à reação de hidratação

5.5.2.1. Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência do B-TMF varia com o tempo, decrescendo como consequência da formação das espécies provenientes da reação de hidratação. A adição de CB[7] na razão de 1:2, produzindo praticamente apenas o primeiro complexo (1:1), não estabiliza de forma eficaz o B-TMF, como pode ser visto nas Figuras 114 e 115. Entretanto, a adição de CB[7] 100 μM (suficiente para produzir o complexo 2:1) provoca diminuições mais graduais na intensidade de fluorescência, comparado com as soluções sem CB[7] e com CB[7] 10 μM .

A adição de CB[7] ao B-TMF incubado, Figura 114, provoca um aumento na fluorescência, evidência da formação seletiva do complexo com a forma catiônica do flavílio. Após 80 minutos, observam-se dois comportamentos

distintos, dependendo da concentração de CB[7]. Com a menor concentração de CB[7] em solução, observa-se o decréscimo da banda de emissão, ao passo que com CB[7] 100 μ M, ocorre um aumento de fluorescência, indicando que o complexo 2:1 desloca o equilíbrio de hidratação do B-TMF no sentido de estabilizar a forma catiônica.

A formação do complexo hóspede-hospedeiro estabiliza o B-TMF com relação às reações de abertura do anel benzopirílio, inibindo-as. Portanto, quando CB[7] é adicionado em quantidade suficiente para formar o complexo 2:1, o impedimento estérico de B-TMF em relação ao ataque nucleofílico da água é mais eficiente, como sugerem os resultados acima.

5.5.2.2. Cinética por espectroscopia de absorção

A partir das Figuras 117, 118, 120 e 121, pode-se observar que, no início da reação, assim como na espectroscopia de fluorescência, CB[7] em maior concentração estabiliza melhor B-TMF. Ao término do experimento, observa-se que a única amostra em que a banda da forma catiônica mantém-se com a mesma absorbância é aquela à qual se adicionou CB[7] 100 μ M. Com relação à amostra contendo CB[7] 10 μ M, observam-se duas bandas, uma referente à forma catiônica, centrada em 470 nm, e outra em 380 nm, referente à uma forma incolor.

Como pode ser visto, a adição de CB[7] 400 μ M estabiliza B-TMF, deslocando o equilíbrio de hidratação no sentido do cátion flavílio, cujo máximo de absorção em 470 nm aumenta com o tempo. No caso do CB[7] a 10 μ M, a

absorbância mantém-se praticamente constante ao longo do tempo, similar à curva obtida quando B-TMF livre é monitorado. Estes resultados são condizentes com os dados obtidos sem o período de incubação, em que se observou que CB[7] em concentrações elevadas, em que o complexo 2:1 é a espécie predominante, promove a estabilização do B-TMF com eficiência muito maior comparado à CB[7] em baixas concentrações.

6. CONCLUSÕES

Os compostos modelos de antocianinas estudados no projeto foram avaliados quanto aos multiequilíbrios dependentes do pH, tendo sido determinadas suas constantes dos equilíbrios ácido-base e de hidratação aparente.

A síntese pelo método “A” produz flavílios com substituintes $-\text{CH}_3$ na posição 4, os quais evitam ou diminuem a probabilidade de ocorrência do ataque nucleofílico da água em meios moderadamente ácidos ($\text{pH} > 3,0$). Sendo assim, apenas os flavílios sintetizados pelo método “B”, cuja posição 4 é ocupada por substituintes $-\text{H}$, produzem as espécies resultantes das reações de abertura do anel C em quantidade detectável.

A determinação dos pK_a s e pK_h' , com a subsequente especiação, foi essencial para definir quais espécies encontram-se em equilíbrio dependendo do pH adotado para as investigações subsequentes.

Os estudos de complexação com íons metálicos, Al^{3+} , iniciou a investigação quanto à formação de complexos ternários envolvendo os flavílios com substituintes $-\text{OH}$ vicinais. Trata-se da formação de compostos de coordenação entre ácido e base de Pearson “duros”, em que a primeira desprotonação não somente favorece a complexação do ponto de vista da afinidade entre ligante e metal, mas também quanto à geometria para que estequiometrias diferentes sejam estabelecidas. Conforme reportado em [46], as distâncias da ligação carbono-oxigênio mostram-se distintas para cada substituinte $-\text{OH}$ – a distância C – O é menor quando o $-\text{OH}$ encontra-se desprotonado, comparativamente à distância C – O na posição protonada. No

caso em que Al^{3+} liga-se a mais de um flavílio, estas distâncias tornam-se relevantes, como ocorre para o complexo com DHMF.

As constantes obtidas para os dois complexos estudados foram determinadas por metodologias distintas. Para DHMF, adotando as equações definidas em [32], calculou-se constante da ordem de 10^5 M e estequiometria de 3:1 (DHMF: Al^{3+}), corroborada pelo método das variações contínuas. Para B-DHMF, o primeiro método retornou constante com ordem de grandeza quatro vezes maior do que as reportadas para complexos similares, sendo o método das variações contínuas mais adequado para a determinação da constante.

Observa-se que as constantes de complexação são cerca de 100 a 1000 vezes maiores em comparação com aquelas determinadas para o complexo flavílio-copigmento orgânico em pH 1,0, e 10000 vezes maiores em relação à constante obtida em pH em torno de 5,0.

Os estudos de complexação com copigmentos orgânicos retornaram resultados importantes para a continuidade do projeto. Além das constantes calculadas revelarem menor afinidade do flavílio pelos ácidos fenólicos, em comparação com íons Al^{3+} , uma possível correlação entre a estrutura dos copigmentos e as constantes obtidas foi proposta.

Considerando que o complexo flavílio – ácido fenólico seja formado no estado fundamental, com contribuição significativa de transferência de carga, a tendência do copigmento em doar elétrons para a forma catiônica do flavílio – descrita pelos valores de potencial de ionização – estaria diretamente relacionada aos valores obtidos para as constantes de copigmentação. Dividindo os ácidos fenólicos em dois grupos – ácidos cinâmicos e ácidos

benzoicos substituídos – observam-se constantes de equilíbrio significativamente maiores para os derivados de ácido cinâmico que, conforme a literatura indica, são bons doadores de elétrons.

A comprovação de que estes complexos são formados no estado fundamental foi demonstrada a partir do tratamento de dados considerando a supressão estática de fluorescência (equação de Stern-Volmer). O ajuste linear da intensidade relativa de fluorescência em função de concentrações crescentes de copigmento orgânico mostrou-se adequado para calcular constantes de supressão, numericamente iguais às constantes de copigmentação para os flavílios que apresentaram fluorescência detectável – B-DHMF e B-TMF.

Neste caso, com algumas exceções, os valores das constantes foram condizentes com aqueles obtidos pela espectroscopia de absorção, sendo que o tratamento por Stern-Volmer é mais adequado, visto que o método é mais sensível. O registro de absorbância em função da concentração de copigmento retorna pequenas variações na banda de absorção do flavílio, o que torna difícil calcular as constantes com precisão.

As estequiometrias da reação de copigmentação para todos os pares flavílio-copigmento foram determinadas como aproximadamente 1:1, estando de acordo com resultados reportados na literatura.

Em pH em torno de 5,0, observa-se que as constantes de copigmentação, calculadas pela mesma metodologia adotada para pH 1,0, são comparativamente menores (de 40 a 100%), demonstrando menor afinidade da base quinonoidal pelos ácidos fenólicos. Considerando que a base quinonoidal

não é tão deficiente em elétrons quanto o cátion e para quem, portanto, o componente de transferência de carga não deve ser tão relevante, as interações fracas devem ser as responsáveis pela formação do complexo. Desta forma, forças de dispersão, de van der Waals e efeito hidrofóbico seriam responsáveis pela interação entre as duas espécies, tornando o complexo menos estável. Ainda assim, o mais provável é que a base quinonoidal ainda seja a espécie a interagir com o copigmento orgânico na formação do complexo ternário – íons Al^{3+} formam o complexo com a base e conforme evidenciado pelo tópico 4.4., o copigmento orgânico desempenha um papel, embora menos significativo, na estabilização do cátion flavílio.

A formação de um complexo ternário com características dos dois copigmentos, mas principalmente do complexo flavílio-íon metálico, foi observada, sendo que em concentrações elevadas (razão 1:100 – flavílio:copigmento) a estabilidade do complexo ternário parece ser maior, tanto para os complexos formados por DHMF quanto para B-DHMF.

Um sistema de coloração azulada foi obtido quando DHMF encontra-se em excesso em relação aos íons Al^{3+} , sendo utilizadas estequiometrias mais comumente encontradas para compostos de coordenação – configurando uma geometria com mais de um ligante ao redor de um centro metálico. Esta condição foi adotada com base na estequiometria determinada para DHMF e Al^{3+} por ambas as metodologias abordadas.

Embora o B-DHMF esteja estruturalmente mais próximo das antocianinas encontradas na natureza, foram necessárias concentrações maiores de íons

Al^{3+} para formar o complexo ternário, e sua coloração, independente da estequiometria, é sempre arroxeada.

Com relação à capacidade de estabilizar o B-DHMF quanto ao processo de descoloração, os experimentos de monitoramento da cor mostraram que os íons Al^{3+} são muito mais eficazes em diminuir a constante de velocidade observada para a reação, comparando ambos os copigmentos adicionados separadamente – as interações responsáveis pela complexação metálica são muito mais intensas que as interações observadas no complexo de transferência de carga. Quando ambos, íon metálico e copigmento orgânico, são adicionados à solução, observa-se redução significativa da velocidade de descoloração – maior comparada à adição de apenas Al^{3+} . Esta seria uma das evidências de que pode haver efeito sinérgico entre copigmento inorgânico e orgânico.

Os resultados obtidos a partir do estudo do sistema hóspede-hospedeiro revelaram uma importante conclusão quanto aos estudos de copigmentação de flavílios – é possível encontrar compostos estruturalmente distintos dos propostos inicialmente neste projeto, mas que ainda assim atuam como copigmentos, como é o caso do CB[7].

Os hóspedes de CB[7] reportados na literatura apresentam comumente estequiometria de 1:1, pois compostos mais volumosos, como o B-TMF, foram pouco estudados como hóspedes. Portanto, o estudo de complexação do B-TMF com CB[7] possibilitou não somente conhecer uma outra forma de estabilizar flavílios, como também a investigação de um sistema de complexação sequencial 2:1.

Em comparação com a reação de inclusão de CB[7] com o cátion R-(+)-2-naftil-1-etilamônio [56], as constantes de equilíbrio obtidas são de uma a duas ordens de grandeza menores. A constante de dissociação, k^+ , determinada a partir de medidas de fluxo detido, é bastante similar à reportada para este outro sistema hóspede-hospedeiro.

Alguns estudos [72] apontam que a etapa determinante para a constante de velocidade global é a associação, em que moléculas de água no interior do hospedeiro são liberadas para o *bulk*, aumentando a entropia do solvente. Portanto, os valores calculados para as constantes de associação diferem pouco em virtude de maior ou menor afinidade, e são mais relevantes quando se considera o ajuste do hóspede no interior do hospedeiro. Ou seja, quanto melhor o “encaixe” quando o hóspede é inserido na cavidade da cucurbiturila, menor o número de moléculas de água retidas e maior a entropia e, conseqüentemente, as constantes de associação e do equilíbrio para o sistema são maiores.

O mecanismo de inclusão sequencial 2:1 (hospedeiro:hóspede) mostrou-se essencial na estabilização da forma catiônica do B-TMF em meio moderadamente ácido. Por se tratar de um hóspede com duas porções hidrofóbicas e carga positiva localizada aproximadamente no centro de sua estrutura, cada uma das porções pode ser acomodada nas cavidades de duas moléculas de hóspede, tornando a posição 2 no flavílio menos acessível e, portanto, menos suscetível ao ataque nucleofílico.

Embora tenham sido reportados sistemas em que a cucurbiturila desloca um equilíbrio em que uma das espécies seja a predominante, esta

estabilização de um cátion flavílio, promovida pelo CB[7], é inédita na literatura. Trata-se da inibição praticamente total da hidratação, em comparação com complexos com outros copigmentos, incluindo o arranjo supramolecular obtido com os complexos ternários.

Desta forma, os objetivos do trabalho foram cumpridos a contento, considerando o estudo de mais de uma possibilidade de manutenção da cor, promovida pela estabilização por meio de diferentes interações, dependendo do copigmento em questão. Obteve-se maior eficiência na estabilização quando o sistema utilizado promoveu um melhor impedimento estérico com relação a espécies nucleofílicas, propensas a reagir com uma estrutura deficiente em elétrons e, por isto, muito reativa, que é também a responsável pela produção da cor em diversos sistemas biológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Harborne, J. B.; Williams, C. A. *Phytochem.* **2000**, 55, 481.
- [2]. Ramirez-Tortosa, C.; Andersen, Ø. M.; Gardner, P. T.; Morrice, P. C.; Wood, S. G.; Duthie, S. J.; Collins, A. R.; Duthie, G.G.; *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, 31, 1033.
- [3]. Brouillard, R. In *Anthocyanins as Food Colors*, P. Markakis, Ed.; Academic Press: New York, **1982**; cap. 9.
- [4]. Santos, H.; Turner, D. L.; Lima, J. C.; Figueiredo, P.; Pina, F.; Maçanita, A.; *Phytochemistry* **1993**, 33, 1227.
- [5]. Wheldale, M. *The Anthocyanin Pigments of Plants*. Cambridge University Press: Cambridge, UK, **1916**.
- [6]. Gould, K. S.; Lee, D. W.. *Anthocyanins in Leaves (Adv. Bot. Res., 37)*. Academic Press: New York, **2002**.
- [7]. (a) Williams, C. A.; Grayer, R. J. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 539-573; (b) Veitch, N. C.; Grayer, R. J. *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, 25, 555.
- [8]. Andersen, D. M.; Jordheim, M. In *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications* (O. M. Andersen, K. R. Markham, eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, **2006**; p. 471.
- [9]. Houbiers, C.; Lima, J. C.; Santos, M. H.; Maçanita, A. L. *J. Phys. Chem.* **1998**, 102, 3578.
- [10]. Castaneda-Ovando, A.; Pacheco-Hernandez, M. D.; Paez-Hernandez, M. E.; Rodriguez, J. A.; Galan-Vidal, C. A. *Food Chem.* **2009**, 113, 859.
- [11]. Lima, J. C.; Vautier-Giongo, C.; Melo, E.; Lopes, A., Quina, F. H.; Maçanita, A. L. *J. Phys. Chem. A.*, **2002**, 106, 5851.

- [12]. Vautier-Giongo, C.; Yihwa, C.; Moreira Junior, P. F.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Alves, M.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. *Langmuir*, **2002**, *18*, 10109.
- [13]. Rodrigues, R.; Vautier-Giongo, C.; Silva, P. F.; Fernandes, A. C.; Cruz, R.; Maçanita, A. L.; Quina, F. H., *Langmuir*, **2006**, *22*, 933.
- [14]. Freitas, A. A.; Paulo, L.; Maçanita, A.; Quina, F. H. *Langmuir*, **2006**, *22*, 7986.
- [15]. Quina, F. H.; Freitas, A. A.; Maçanita, A.; Silva, P. F.; J. C. Lima, *The Spectrum*, **2006**, *19*, 18. Disponível em:
<http://www.bgsu.edu/departments/photochem/research/winter2006spectrum.pdf>
- [16]. Quina, F. H.; Moreira Jr., P. F.; Vautier-Giongo, C.; Rettori, D.; Rodrigues, R.; Freitas, A. A.; Silva, P. F.; Maçanita, A. *Pure Appl. Chem.*, **2009**, *81*, 1687.
- [17]. Maçanita, A. L., Moreira, P., Lima, J. C., Quina, F., Yihwa, C., Vautier-Giongo, C. *J. Phys. Chem. A.*, **2002**, *106*, 1248.
- [18]. Giestas, L.; Yihwa, C.; Lima, J. C.; Vautier-Giongo, C.; Lopes, A.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. *J. Phys. Chem. A.*, **2003**, *107*, 3263.
- [19]. Moreira Jr., P. F.; Giestas, L.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L.; Lima, J. C. *J. Phys. Chem. A.*, **2003**, *107*, 4203.
- [20]. Ferreira da Silva, P.; Lima, J. C.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. *J. Phys. Chem. A.*, **2004**, *108*, 10133.
- [21]. Yoshida, K.; Kitahara, S. D.; Ito, D.; Kondo, T. *Phytochem.*, **2006**, *67*, 992.
- [22]. Takeda, K. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 2006, **82**, 142.
- [23]. Yoshida, K.; Toyama-Kato, Y.; Kameda, K.; Kondo, T. *Plant Cell Physiol.*, **2003**, *44*, 262.
- [24]. Mori, M.; Kondo, T.; Yoshida, K. *Phytochem.*, **2008**, *69*, 3151.
- [25]. Yoshida, K.; Mori, M.; Kondo, T. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, *26*, 884.

- [26]. Haslam, E. *Practical Polyphenolics. From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, Cambridge University Press: Cambridge, UK, **1998**; cap. 6, p. 262.
- [27]. Cherepy, N. J.; Smestad, G. P.; Grätzel, M.; Zhang, J. Z. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 9342.
- [28]. Lima, A. A.; Sussuchi, E. M.; Giovani, W. F. *Croat. Chem. Acta*, **2007**, *80*, 29.
- [29]. Boulton, R. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 67.
- [30]. Ferreira da Silva, P.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. *J. Phys. Chem. A*, **2005**, *109*, 7329.
- [31]. Rodrigues, R.; Silva, P. F.; Shimizu, K.; Freitas, A. A.; Kovalenko, S.; Ernsting, N.; Quina, F. H.; Maçanita, A. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 1397.
- [32]. Marcovic, J. M. D.; Veselinovic, D. S.; Baranac, J. M.; Brdaric, T. P. *Spectrosc. Lett.*, **2008**, *41*, 104.
- [33]. Cavalcanti, R. N.; Santos, D. T.; Meireles, M. A. A. *Food Res. Int.*, **2011**, *44*, 499.
- [34]. Brouillard, R.; Mazza, G.; Saad, Z.; Albrecht-Gary, A. M.; Cheminant, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 2064.
- [35]. Kunsági-Maté, S.; May, B.; Tschiersch, C.; Fetzner, D.; Horváth, I.; Kollár, L.; Nikfardjam, M. P. *Food Res. Int.*, **2011**, *44*, 23.
- [36]. Di Meo, F.; Garcia, J. C. S.; Dangles, O.; Trouillas, P. *JCTC*, **2012**, *8*, 2034.
- [37]. Dangles, O.; Brouillard, R. *Can. J. Chem.*, **1992**, *70*, 2174.
- [38]. Kunsági-Maté, S.; Ortmann, E.; Kollár, L.; Szabó, K.; Nikfardjam, M. P. *J. Mol. Struct.*, **2008**, *891*, 471.

- [39]. Goto, T.; Kondo, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 17.
- [40]. Chenery, E. M. *J. Roy. Hort. Soc.*, **1937**, 62, 604.
- [41]. Willstätter, R.; Everest, A. E. *Jus. L. Ann. Chem.*, **1913**, 401, 189.
- [42]. Willstätter, R.; Nolan, T. J. *Jus. L. Ann. Chem.*, **1915**, 408, 1.
- [43]. Shibata, K.; Shibata, Y.; Kasiwagi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **1919**, 41, 208.
- [44]. Robinson, G. M.; Robinson, R. *Biochem J.*, **1931**, 25, 1687.
- [45]. Hayashi, K.; Abe, Y.; Mitsui, S. *Proc. Japan Acad.*, **1958**, 34, 373.
- [46]. Kondo, T.; Yoshida, K.; Nakagawa, A.; Kawai, T.; Tamura, H.; Goto, T. *Nature*, **1992**, 358, 515.
- [47]. Kondo, T.; Ueda, M.; Isobe, M.; Goto, T. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 8307.
- [48]. Moncada, M. C.; Moura, S.; Melo, M. J.; Roque, A.; Lodeiro. C.; Pina, F. *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, 356, 51.
- [49]. Elhabiri, M.; Figueiredo, P.; Toki, K.; Saito, N.; Brouillard, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2*, **1997**, 355.
- [50]. Asen, S.; Norris, K. H.; Stewart, R. N. *Phytochem*, **1969**, 8, 653.
- [51]. Lewis, C.E.; Walker, J.R.L; Lancaster, J.E. *Food Chemistry*, **1995**, 54, 315.
- [52]. Burin, V.M.; Rossa, P.N.; Ferreira-Lima, N.E.; Hillmann, M.C.R.; Boirdignon-Luiz, M.T. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2011**, 46, 186.
- [53]. Jeon, W.S.; Moon, K.; Park, S.H.; Chun, H.; Ko, Y.H.; Lee, J.Y.; Lee, E.S.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Rekharsky, M.V.; Sindelar, V.; Sobransingh, D.; Inoue, Y.; Kaifer, A.E.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 125, 12984.
- [54]. Liu, S.; Ruspic, C.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Zavalij, P.Y.; Isaac, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 15959.

- [55]. Moghaddam, S.; Yang, C.; Rekharsky, M.; Ko, Y.H.; Kim, K.; Inoue, Y.; Gilson, M.K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 3570.
- [56]. Tang, H.; Fuentealba, D.; Ko, Y.H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Bohne, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 20623.
- [57]. Bernasconi, C. F. *Relaxation Kinetics*, NY, USA, Academic Press, **1976**, cáps. 1, 2 e 14.
- [58]. Robinson, R.; Pratt, D. D. *J. Chem. Soc.*, **1922**, 1577.
- [59]. Robinson, R.; Robertson, A. J. *J. Chem. Soc.*, **1926**, 1713.
- [60]. Roque, A. L. D. M., Tese de Doutoramento, FCT, Universidade Nova de Lisboa, **2001**; 277 páginas.
- [61]. Jorge, F. C.; Brito, P.; Pepino, L.; Portugal, A.; Gil, H.; Pereira da Costa, R. *Silva Lusitana*, **2001**, *9*, 225.
- [62]. Henry, N. P.; Kenneth, S.-C.; Huang, J. *J. Chem. Educ.*, **1995**, *72*, 62.
- [63]. Yi. S.; Kaifer, A.E. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 10275.
- [64]. Mora-Soumille., N.; Al Bittar, S.; Rosa, M.; Dangles, O. *Dyes and Pigments*, **2013**, *96*, 7.
- [65]. Roginsky, V., Barsukova, T. *J. Chem. Soc. Perkins Trans.2*, **2000**, *7*, 1575.
- [66]. Pina, F., Melo, M. J., Alves, S., Ballardini, R., Maestri, M., Passantini, P.; *New J. Chem.*, **2001**, *25*, 747.
- [67]. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, N.Y., USA, **2006**, 3rd ed.; cáp. 7, pp. 261.
- [68]. Perrin, D. D., Dempsey, B.; Serjeant, E. P. *pKa prediction for organic acids and bases*, Chapman and Hall NY, USA, **1981**.
- [69]. Dangles, O.; Elhabiri, M.; Brouillard, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1994**, 2587.

- [70]. Markovic, J. M. D.; Petranovic, N. A.; Baranac, J. M. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 5530.
- [71]. Singh, M. K.; Pal, H.; Koti, A. S. R.; Sapre, V. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, *108*, 1465.
- [72]. Biedermann, F.; Uzunova, V. D.; Scherman, O.; Nau, W. M.; De Simone, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 15318.
- [73] Kim, J.; Jung, I.-S.; Kim, S.-Y.; Lee, E.; Kang, J.-K.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 540.
- [74] Henry, N. P.; Kenneth, S.-C.; Huang, J. *J. Chem. Educ.*, **1995**, *72*, 62.
- [75]. Dangles, O.; Saito, N.; Brouillard, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3125.
- [76]. Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Saito, N.; Brouillard, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 4788.
- [77]. Mazza, G.; Brouillard, R. *J. Agric. Food Chem*, **1987**, *35*, 422.
- [78]. Dangles, O.; Brouillard, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1992**, 247.
- [79]. Brouillard, R. *Phytochem*, **1983**, *22*, 1311.
- [80]. Mazza, G.; Brouillard, R. *Phytochem.*, **1990**, *29*, 1097.
- [81]. Brouillard, R.; Wigand, M.-C.; Cheminar, A. *Phytochem*, **1990**, *29*, 3457.
- [82]. Dangles, O.; Saito, N.; Brouillard, R. *Phytochem*, **1993**, *34*, 119.
- [83]. Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Toki, K.; Saito, N.; Dangles, O.; Brouillard, R. *Phytochem*, **1996**, *41*, 301.
- [84]. Davies, A. J.; Mazza, G. *J. Agric. Food. Chem*, **1993**, *41*, 716.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio registrado para os sais de flavílio do projeto.

Figura A1.1. Espectros de H^1 -RMN do DHMF, em CD_3OD .

Figura A1.2. Espectros de H^1 -RMN do HMMF, em CD_3OD .

Figura A1.3. Espectros de H^1 -RMN do B-DHMF, em CD_3OD .

Figura A1.4. Espectros de H^1 -RMN do B-TMF, em CD_3OD .

APÊNDICE 2

Espectros de absorção dos flavílios do projeto com adições crescentes de um copigmento orgânico. Ajustes lineares para cálculo da K_{CP} , com base na equação (16).

Figura A2.1. Espectros de absorção de DHMF, pH 1,1, em presença de concentrações crescentes de ácido p-cumárico.

Figura A2.2. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de PCA adicionado ao DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.3. Espectros de absorção de DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido ferúlico.

Figura A2.4. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de FRA adicionado ao DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.5. Espectros de absorção de DHMF, pH 1,1, em presença de concentrações crescentes de ácido sinápico.

Figura A2.6. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de SNA adicionado ao DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.7. Espectros de absorção de DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido vanílico.

Figura A2.8. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de VNA adicionado ao DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.9. Espectros de absorção de DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido siríngico.

Figura A2.10. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de SRA adicionado ao DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.11. Espectros de absorção de HMMF, pH 1,1, em presença de concentrações crescentes de ácido p-cumárico.

Figura A2.12. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de PCA adicionado ao HMMF, conforme equação (16).

Figura A2.13. Espectros de absorção de HMMF, pH 0,7, em presença de concentrações crescentes de ácido ferúlico.

Figura A2.14. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de FRA adicionado ao HMMF, conforme equação (16).

Figura A2.15. Espectros de absorção de HMMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido sinápico.

Figura A2.16. Gráfico de incrementos de absorbância em função da concentração de SNA adicionado ao HMMF, conforme equação (16).

Figura A2.17. Espectros de absorção de HMMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido vanílico.

Figura A2.18. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de VNA adicionado ao HMMF, conforme equação (16).

Figura A2.19. Espectros de absorção de HMMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido sirínico.

Figura A2.20. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de SRA adicionado ao HMMF, conforme equação (16).

Figura A2.21. Espectros de absorção de B-DHMF, pH 1,1, em presença de concentrações crescentes de ácido p-cumárico.

Figura A2.22. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de PCA adicionado ao B-DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.23. Espectros de absorção de B-DHMF, pH 1,1, em presença de concentrações crescentes de ácido sinápico.

Figura A2.24. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de SNA adicionado ao B-DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.25. Espectros de absorção de B-DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido vanílico.

Figura A2.26. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de VNA adicionado ao B-DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.27. Espectros de absorção de B-DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido sirínico.

Figura A2.28. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de SRA adicionado ao B-DHMF, conforme equação (16).

Figura A2.29. Espectros de absorção de B-TMF, pH 1,1, em presença de concentrações crescentes de ácido p-cumárico.

Figura A2.30. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de PCA adicionado ao B-TMF, conforme equação (16).

Figura A2.31. Espectros de absorção de B-TMF, pH 1,1, em presença de concentrações crescentes de ácido sinápico.

Figura A2.32. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de SNA adicionado ao B-TMF, conforme equação (16).

Figura A2.33. Espectros de absorção de B-TMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido vanílico.

Figura A2.34. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de VNA adicionado ao B-TMF, conforme equação (16).

Figura A2.35. Espectros de absorção de B-TMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido sirínico.

Figura A2.36. Gráfico de incrementos de absorvância em função da concentração de SRA adicionado ao B-TMF, conforme equação (16).

APÊNDICE 3

Espectros de fluorescência dos flavílios do projeto com adições crescentes de um copigmento orgânico. Ajustes lineares para cálculo da K_{CP} , com base na equação de Stern-Volmer.

Figura A3.1. Espectros de fluorescência de B-DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido p-cumárico.

Figura A3.2. Gráfico de Stern-Volmer, para B-DHMF e PCA, pH 1,0.

Figura A3.3. Espectros de fluorescência de B-DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido ferúlico.

Figura A3.4. Gráfico de Stern-Volmer, para B-DHMF e FRA, pH 1,0.

Figura A3.5. Espectros de fluorescência de B-DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido vanílico.

Figura A3.6. Gráfico de Stern-Volmer, para B-DHMF e VNA, pH 1,0.

Figura A3.7. Espectros de fluorescência de B-DHMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido siríngico.

Figura A3.8. Gráfico de Stern-Volmer, para B-DHMF e SRA, pH 1,0.

Figura A3.9. Espectros de fluorescência de B-TMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido p-cumárico.

Figura A3.10. Gráfico de Stern-Volmer, para B-TMF e PCA, pH 1,0.

Figura A3.11. Espectros de fluorescência de B-TMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido ferúlico.

Figura A3.12. Gráfico de Stern-Volmer, para B-TMF e FRA, pH 1,0.

Figura A3.13. Espectros de fluorescência de B-TMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido vanílico.

Figura A3.14. Gráfico de Stern-Volmer, para B-TMF e VNA, pH 1,0.

Figura A3.15. Espectros de fluorescência de B-TMF, pH 1,0, em presença de concentrações crescentes de ácido siríngico.

Figura A3.16. Gráfico de Stern-Volmer, para B-TMF e SRA, pH 1,0.