

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

CASSIO PACHECO DA SILVA

Complexos de Inclusão de Antocianinas e
Análogos Sintéticos de Antocianinas

Versão original da Dissertação Defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

13/08/2015

CASSIO PACHECO DA SILVA

**Complexo de Inclusão de Antocianinas e
Análogos Sintéticos de Antocianinas**

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

Orientador: Prof. Dr. Frank Herbert Quina

São Paulo 2015

Ficha Catalográfica

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

S586c Silva, Cassio Pacheco da
Complexo de inclusão de antocianinas e análogos sintéticos
de antocianinas / Cassio Pacheco da Silva. -- São Paulo, 2015.
87p.

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

1. Fotoluminescência : Físico-química 2. Química supramolecular
I. T. II. Quina, Frank Herbert, orientador.

541.35 CDD

Dedicatória

Dedico esse trabalho ao meu Pai (in memoriam) e a minha Mãe com todo o meu amor, afeto, gratidão por tudo que fizeram por mim, pôr os seus apoios ao longo da minha vida. Obrigado pelos seus ensinamentos, os quais me tornaram essa pessoa de bom caráter. Desejo poder ter sido merecedor de todos os seus esforços principalmente o da minha formação.

AGRADECIMENTO(S)

A DEUS, dando-me a oportunidade de estudar, trabalhar e crescer frente as dificuldades e desafios enfrentados durante essa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Frank Herbert Quina, pela oportunidade de realizar essa importante etapa em seu grupo de pesquisa.

Ao meu grande amigo Walter Estella pela amizade, uma das pessoas mais incríveis que conheci ao longo da minha vida.

À Bárbara que me auxiliou durante os experimentos iniciais.

Ao Volnir que sempre me auxiliou todas às vezes que precisei dele e pelas discussões durante o cafezinho.

À minha amiga Jennifer.

Ao Prof. Dr^a. Cornélia Bohne pela disponibilização das cucurbit[7]urila.

Ao pessoal do laboratório Celize, Joaquim, Jair, Letícia, Marina.

Ao pessoal da minha república Lucas, Nicolás, César e Alexandre.

Aos meus amigos Isis, Léo, Renan, Eliana, Evandro, Paulo, Diego, Cássio, Karla, Raquel.

À Arlete uma irmã que sempre me apoiou em toda a minha vida.

À minha família por todo o apoio.

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro concedido (processo 132095/2013-0).

Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer. "

Amyr Klink

RESUMO

Silva, C.P. **Complexos de Inclusão de Antocianinas e Análogos Sintéticos de Antocianinas**. 2015, 88p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As antocianinas compreendem o maior conjunto de pigmentos naturais do Reino Vegetal. São caracterizadas pelas colorações vermelha, roxa e azul de uma variedade de flores, frutas e folhas. A sua estabilidade é influenciada por diversos fatores como o pH local do meio, temperatura, luz ou copigmentos.

A inclusão das antocianinas e análogos sintéticos, os sais de flavílio, dentro da cavidade da cucurbit[7]uril (CB[7]), sistema hóspede-hospedeiro, foi estudada a partir da espectroscopia de fluorescência. As antocianinas sintéticas utilizadas foram o cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio (HMF) e o cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio (MMF) e as antocianinas naturais foram a cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3,5-di-O-glicosídeo e antocianinas presentes no extrato do jabolão (*Syzygium cumini*).

Os complexos de inclusão das antocianinas e os análogos sintéticos dentro da cavidade do CB[7] apresentaram uma estequiometria de inclusão do tipo 1:2, uma molécula hóspede e duas moléculas hospedeiras. A estequiometria de inclusão e as constantes de incorporação foram determinadas a partir de isotermas da inclusão pelo método de regressão não-linear. Para os íons flavílios, a determinação da estequiometria também foi comprovada pelo Método da Variação Contínua (MVC) ou método Job.

A primeira constante de incorporação K_{11} obtida para as antocianinas e os íons flavílios foi da ordem de $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$. Essa elevada constante de incorporação é devida à interação eletrostática entre as carbonilas do CB[7] e a carga positiva do anel pírilio das antocianinas. Entretanto, a segunda constante de incorporação, K_{12} , apresenta um valor menor por causa da repulsão entre a primeira e a segunda molécula de CB[7].

A segunda constante de inclusão das antocianinas naturais apresentou um valor muito baixo em relação à segunda constante de incorporação do HMF e MMF. Essa diferença ocorreu pelo impedimento estérico provocado pelas unidades glicosídicas presentes nas antocianinas naturais.

A hidratação das antocianinas do jambolão é uma reação muito rápida, ocorrendo em pH acima de 3,0. Quando o CB[7] foi adicionado às antocianinas em pH 4,62, a hidratação foi um pouco menor, mas mesmo assim a hidratação ocorreu.

Após 24 horas, quando o equilíbrio das antocianinas do jambolão fosse deslocado na direção de formação das chalconas, o CB[7] foi adicionado ao meio, em elevadas concentrações. O equilíbrio de hidratação foi deslocado em direção ao cátion flavílio, indicando um aumento na estabilização desses compostos.

Palavras chaves: antocianinas, inclusão, hóspede-hospedeiro, cucurbiturilas, estabilidade

ABSTRACT

Silva, C.P. **Inclusion Complexes of Anthocyanins and Synthetic Anthocyanin Analogs**. 2015. 88p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The anthocyanins, the largest group of natural plant pigments, are responsible for the red, purple and blue colors of a variety of flowers, fruit and leaves. Their stability is influenced by several factors, including the local pH of the medium, temperature, light and copigments.

The inclusion of natural anthocyanins and their synthetic analogs, flavylium cations, in the cavity of cucurbit[7]uril, CB[7], to form host-guest complexes, was studied by fluorescence spectroscopy. The synthetic anthocyanin model compounds utilized were 7-hydroxy-4-methylflavylium (HMF) chloride and 7-methoxy-4-methylflavylium (MMF) chloride and the naturally-occurring anthocyanins were cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3,5-di-O-glucoside and the anthocyanins extracted from jambolão (*Syzygium cumini*) fruit.

The inclusion complexes of the anthocyanins and synthetic anthocyanin analogs with CB[7] presented a stoichiometry of 1:2, with one molecule of guest and two molecules of host. The stoichiometry of the inclusion and the incorporation equilibrium constants were determined from the binding isotherms by non-linear regression. For the synthetic flavylium ions, the stoichiometry was also verified using the method of continuous variations or Job plots.

The first binding constant, K_{11} , between the anthocyanins or flavylium ions and CB[7] was of the order of 10^5 - 10^6 M⁻¹. This large equilibrium constant for incorporation reflects the electrostatic interaction between the carbonyl groups of CB[7] and the positive charge of the pyrilium ring of the anthocyanins. The binding constant for the second CB[7], K_{12} , has a smaller value due to the repulsion between the first and second molecules of CB[7].

The second binding constant for the inclusion of the natural anthocyanins was much smaller than that of the synthetic anthocyanin analogs HMF and MMF. This difference was due to the steric hindrance afforded by the sugar residues present in the natural anthocyanins.

The hydration of the anthocyanins of jambolão is very rapid above pH 3. When CB[7] was added to a mixture of jambolão anthocyanins at pH 4.62, the extent of hydration was diminished, but partial hydration did still occur. After

equilibration at pH 4.62 for 24 hrs to form the chalcones, addition of high concentrations of CB[7] shifted the equilibrium back in the direction of the flavylum cation form of the anthocyanins, demonstrating the increase in the stabilization of this form upon host-guest complexation.

Keywords: anthocyanins, inclusion, host-guest, cucurbiturils, stability

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Pg	perlargonidina
Cy	cianidina
Pn	peonidina
Dp	delfinidina
Mv	malvidina
AH ⁺	cátion flavílio
A	base quinoidal
B	Hemiacetal
C _E	E-chalcona
C _Z	Z-chalcona
CD	ciclodextrina
CB[n]	cucurbiturilas
CB[7]	cucurbit[7]urila
HMF	cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio
MMF	cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio
MVC	método da variação contínua
SPE	extração em fase sólida
CCD	cromatografia em camada delgada
FD	fator de diluição
K ₁₁	constante de equilíbrio da primeira complexação pela CB[7]
[HMF@CB[7]] _{eq}	concentração do complexo HMF-CB[7] de estequiometria 1:1 no equilíbrio
[HMF] _{eq}	concentração do HMF no equilíbrio
[CB[7]] _{eq}	concentração do CB[7] no equilíbrio
[HMF] _o	concentração inicial do HMF
[CB[7]] _o	concentração inicial do CB[7]
I _f	intensidade de fluorescência
I _{fo}	intensidade de fluorescência na ausência de CB[7]

$I_{\text{HMF@CB[7]}}$	intensidade de fluorescência quando as moléculas de HMF estão complexadas com CB[7]
K_{12}	constante de equilíbrio da segunda complexação pela CB[7]
C_{HMF}	fração molar do HMF
K_h	constante de hidratação
K_i	constante de isomerização
K_{-h}	constante de desidratação
$\text{AH}^+\text{@CB[7]}$	antocianina complexada por uma molécula de CB[7]
$\text{AH}^+\text{@(CB[7])}_2$	antocianina complexada por duas moléculas de CB[7]
Cob^+	cobaltoceno
MMF@CB[7]	MMF complexada por uma molécula de CB[7]
$\text{MMF@}(CB[7])_2$	MMF complexada por duas moléculas de CB[7]
C_{MMF}	fração molar do MMF

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO	25
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1 Materiais.....	26
3.2 Equipamentos	26
3.3 Síntese de sais de flavílios.....	27
3.3.1 Cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio (HMF)	27
3.3.2 Cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio (MMF)	27
3.4 Isoterma de Ligação por Espectroscopia de Fluorescência – Determinação das Constantes de Incorporação e Estequiometria de Incorporação	28
3.5 Extração de antocianinas do jambolão	28
3.6 Purificação do extrato antociânico	29
3.7 Identificação de antocianinas presente no extrato do jambolão	29
3.8 Determinação do teor total de antocianinas.....	30
3.9 Inclusão de antocianinas presentes no jambolão em CB[7].....	30
3.10 Cinética de hidratação e desidratação de antocianinas presentes no jambolão por espectroscopia de absorção	30
3.11 Titulação UV-Vis do CB[7] com cobaltoceno– determinação da porcentagem de pureza.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÕES.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7. APÊNDICES.....	79

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura do cátion flavílio	18
Figura 2: Antocianina típica natural	18
Figura 3: Estrutura do glicoluril e a forma da CB, com os seus respectivos diâmetros em Å, das principais CBS. Todas as CBs apresentam a mesma altura, 9,1 Å.	23
Figura 4: Estrutura do HMF	27
Figura 5: Estrutura do MMF	27
Figura 6: Fruto do jabolão (<i>Syzygium cumini</i>)	29
Figura 7: Coloração apresentada pelas antocianinas em diferentes valores de pH (variação de 1,81 a 6,96): antocianina sintética, HMF, (A); antocianina natural, cianidina-3-glicosídeo (B).....	32
Figura 8: Espectro de absorção do HMF (A) e da cianidina-3-glicosídeo (B) em função do pH do meio.....	34
Figura 9: Espectro de fluorescência do MMF e HMF em diferentes concentrações de CB[7].....	36
Figura 10: <i>Espectros de fluorescência do HMF (0,2 µM) em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] (0 - 79,5 µM), em pH 3,0.....</i>	37
Figura 11: Intensidade máxima de fluorescência do HMF em função da razão molar do CB[7].....	38
Figura 12: Método do duplo recíproco para a estequiometria 1:1	40
Figura 13: Intensidade de fluorescência versus [CB[7]] para HMF complexado com CB[7]. A linha representa o ajuste de regressão não linear aos dados experimentais considerando a estequiometria 1:1, HMF@CB[7], usando a equação 6.	41
Figura 14: <i>Intensidade de fluorescência versus [CB[7]] para HMF complexado com CB[7]. A linha representa o ajuste de regressão não linear aos dados experimentais considerando a estequiometria 1:2, HMF@(CB[7])₂, usando a equação 7.....</i>	42
Figura 15: Job plot para a inclusão do HMF em CB[7], mostrando a estequiometria 1:2. A concentração total de HMF e CB[7] foi de 100 µM.....	43
Figura 16: Modelo de inclusão do HMF em CB[7].	44
Figura 17: Modelo de inclusão do HMF dentro da cavidade do CB[7].	45
Figura 18: Cianidina-3-glicosídeo.....	46
Figura 19: Espectro de fluorescência da cianidina-3-glicosídeo (4,12 µM) em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] (0 – 216,35 µM), em pH 1,96.	47
Figura 20: Método do duplo recíproco para a estequiometria 1:1 do complexo cianidina-3-glicosídeo@CB[7].	48
Figura 21: Ajuste de regressão não-linear para a inclusão da cianidina-3-glicosídeo em CB[7]. A linha azul considera a estequiometria 1:1 e a linha vermelha a estequiometria 1:2.....	49
Figura 22: Modelo de inclusão da cianidina-3-glicosídeo em CB[7]	50
Figura 23: Modelo de inclusão da cianidina-3-glicosídeo dentro da cavidade do CB[7], baseado no programa Avogadro.	51
Figura 24: Cianidina-3,5-di-O-glicosídeo	52
Figura 25: Espectro de fluorescência da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo (3,09 µM) em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] (0 – 363 µM), em pH 1,96.....	53
Figura 26: Método do duplo recíproco para a estequiometria 1:1 do complexo cianidina-3,5-di-O-glicosídeo@CB[7].	54

Figura 27: Ajuste de regressão não-linear para a inclusão da cianidina-3-glicosídeo em CB[7]. A linha azul considera a estequiometria 1:1 e a linha vermelha a estequiometria 1:2.....	55
Figura 28: Modelo de inclusão da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo em CB[7].	56
Figura 29: Modelo de inclusão da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo dentro da cavidade do CB[7].....	57
Figura 30: Estrutura das cinco principais antocianinas presentes no jambolão (Sharma et al., 2016).....	58
Figura 31: Espectro de absorção de antocianinas presentes no extrato do jambolão em pH 0,82.....	59
Figura 32: Cromatograma do extrato purificado do jambolão.....	60
Figura 33: Coloração apresentada pelas antocianinas presentes no extrato do jambolão em diferentes valores de pH (variação de 1,24 a 7,06)	61
Figura 34: Espectro de absorção do extrato do jambolão em diferentes pHs.....	62
Figura 35: Espectro de fluorescência do extrato do jambolão em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] (0 –362,83 μ M), em pH 1,96.	63
Figura 36: Ajuste de regressão não-linear. A linha azul considera a estequiometria 1:1 e a linha vermelha a estequiometria 1:2.....	64
Figura 37: Espectro de absorção em função do tempo das antocianinas do jambolão, mostrando a cinética de hidratação em pH 4,62.....	66
Figura 38: Espectros de absorção das antocianinas presente no jambolão em pH 4,62 obtidos imediatamente após a adição de CB[7].	67
Figura 39: Variação da absorbância das antocianinas do jambolão em diferentes concentrações de CB[7] em pH 4,62. Em (A) a absorbância foi monitorada imediatamente após a adição do extrato e em (B) as antocianinas permaneceram por 24 horas hidratando e depois a CB[7] foi adicionada, e os espectros foram registrados.	68
Figura 40: Espectro de absorção das antocianinas do jambolão em fase aquosa, pH 4,6, na presença de CB[7] 500 μ M.....	69
Figura 41: Espectro de absorção do cobaltoceno na presença de várias concentrações de CB[7]:	71
Figura 42: Espectro de fluorescência do MMF (0,2 μ M) em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] (0-32,24 μ M), em pH 3,0.....	79
Figura 43: Método do duplo recíproco para a complexação 1:1, MMF@CB[7]	79
Figura 44: Intensidade de fluorescência versus a [CB[7]] do MMF complexado com CB[7]. A linha representa o ajuste de regressão não linear aos dados experimentais considerando a estequiometria 1:1, MMF@CB[7], usando a equação 6	80
Figura 45: Intensidade de fluorescência versus a [CB[7]] do MMF complexado com CB[7]. A linha representa o ajuste de regressão não linear aos dados experimentais considerando a estequiometria 1:2, MMF@(CB[7]) ₂ , usando a equação 7.....	81
Figura 46: Espectros de fluorescência do MMF para o método da variação contínua: MMF-CB[7]	81
Figura 47: Job plot para a inclusão do MMF em CB[7], mostrando a estequiometria 1:2.	82
Figura 48: Espectros de fluorescência do HMF para o método da variação contínua: HMF-CB[7].....	82
Figura 49: Especificação da cianidina-3-glicosídeo com o seu respectivo pK _n	83
Figura 50: Determinação da absorvidade molar da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo.....	83

Figura 51: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em pH 0,82 e pH 4,62 para a quantificação pelo método do pH diferencial.....	84
Figura 52: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de 10 μ M CB[7]. Os espectros foram registrados imediatamente após o preparo da amostra.....	84
Figura 53: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de 100 μ M CB[7]. Os espectros foram registrados imediatamente após o preparo da amostra.....	85
Figura 54: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de 500 μ M CB[7]. Os espectros foram registrados imediatamente após o preparo da amostra.....	86
Figura 55: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62. Os espectros foram registrados após 24 horas de hidratação.	86
Figura 56: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de CB[7] 10 μ M. Os espectros foram registrados após 24 horas de hidratação.	87
Figura 57: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de CB[7] 100 μ M. Os espectros foram registrados após 24 horas de hidratação.	87
Figura 58: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de CB[7] 500 μ M. Os espectros foram registrados após 24 horas de hidratação.	88

1. INTRODUÇÃO

A coloração apresentada pelo Reino Vegetal é a mais diversa possível, com uma enorme variação de coloração assinalada por diversos tipos de pigmentos. Dentre esses pigmentos encontram-se as clorofilas, pigmento que converte o dióxido de carbono em glicose na fotossíntese através da luz solar. Na via da pentose-fosfato, a D-glicose é o material precursor para obter a D-eritrose-4-fosfato, composto primordial para a biossíntese do ácido xiquímico. Os aminoácidos, L-fenilalanina e a L-tirosina, são produtos do xiquimato, que em plantas dão origem às antocianinas e às betalainas (Gonçalves et.al., 2015)

Antocianinas são os pigmentos polifenólicos mais importantes e largamente distribuídos na natureza, responsáveis pela maior parte da diversidade de cor encontrada na mesma. (Brouillard et al., 2010; Hou et al., 2013; Drabent et al., 1999). Esses pigmentos, pertencentes à classe dos flavonóides, compreendem o maior conjunto de pigmentos solúveis em água do reino vegetal (Freitas et al., 2010). O termo antocianina (do Grego *antho*, flor, e *kyano*, azul) foi usado pela primeira vez por Marquat em 1835 para designar a coloração azul das flores encontrada no reino vegetal (Markakis, 1982). Sabe-se que as antocianinas não abrangem apenas a coloração azul, mas também uma ampla gama de coloração como vermelho, rosa e púrpura de diversas flores, frutas, vegetais e folhas em angiospermas (Castñeda-Ovando et al., 2009; Quina et al., 2009; Mateus & Freitas, 2009).

Quimicamente, esses flavonoides naturais ocorrem na forma glicosilada, ou seja, consistem de uma aglicona (antocianidina), açúcar(es) e em alguns casos grupo(s) acila(s) (Andersen & Jordheim, 2006). As antocianinas são derivados polihidroxi e polimetoxi glicosilados do sal 2-fenilbenzopirílio ou cátion flavílio (flavílio). A sua estrutura básica, Figura 1, inclui um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) contendo um oxigênio, que também é ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (B) (Castñeda-Ovando et al., 2009; Markakis, 1982).

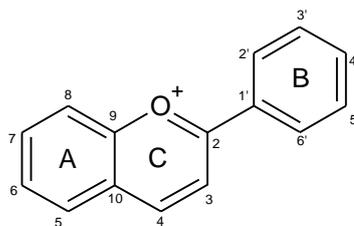


Figura 1: Estrutura do cátion flavílio

As antocianinas encontradas na natureza, ligadas a um açúcar (Figura 2), apresentam substituintes hidroxilas na posição 3 (sempre glicosilada, 3-O-monoglicosídeo) e na posição 5 (ocasionalmente glicosilada, 3,5-O-diglicosídeo). O anel B tem um ou mais substituinte hidroxila ou metoxila (Quina et al., 2009; Mateus & Freitas, 2009). As porções de açúcares ligadas às antocianinas podem variar, mas os principais açúcares ligados a esses compostos são comumente a glicose, ramnose, galactose ou arabinose. Com isso, a porção de açúcar pode ser uma unidade mono ou dissacarídica e, portanto, o que diferenciará uma antocianina da outra será a substituição metoxila e hidroxila, bem como os grupos glicosídicos presente na molécula (Mateus & Freitas, 2009).

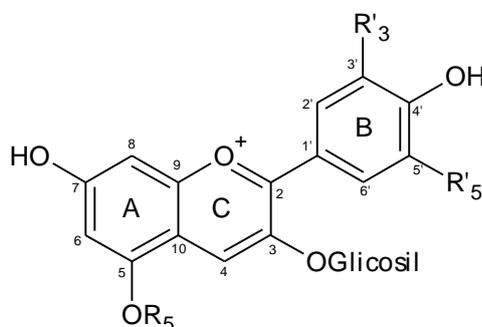


Figura 2: Antocianina típica natural

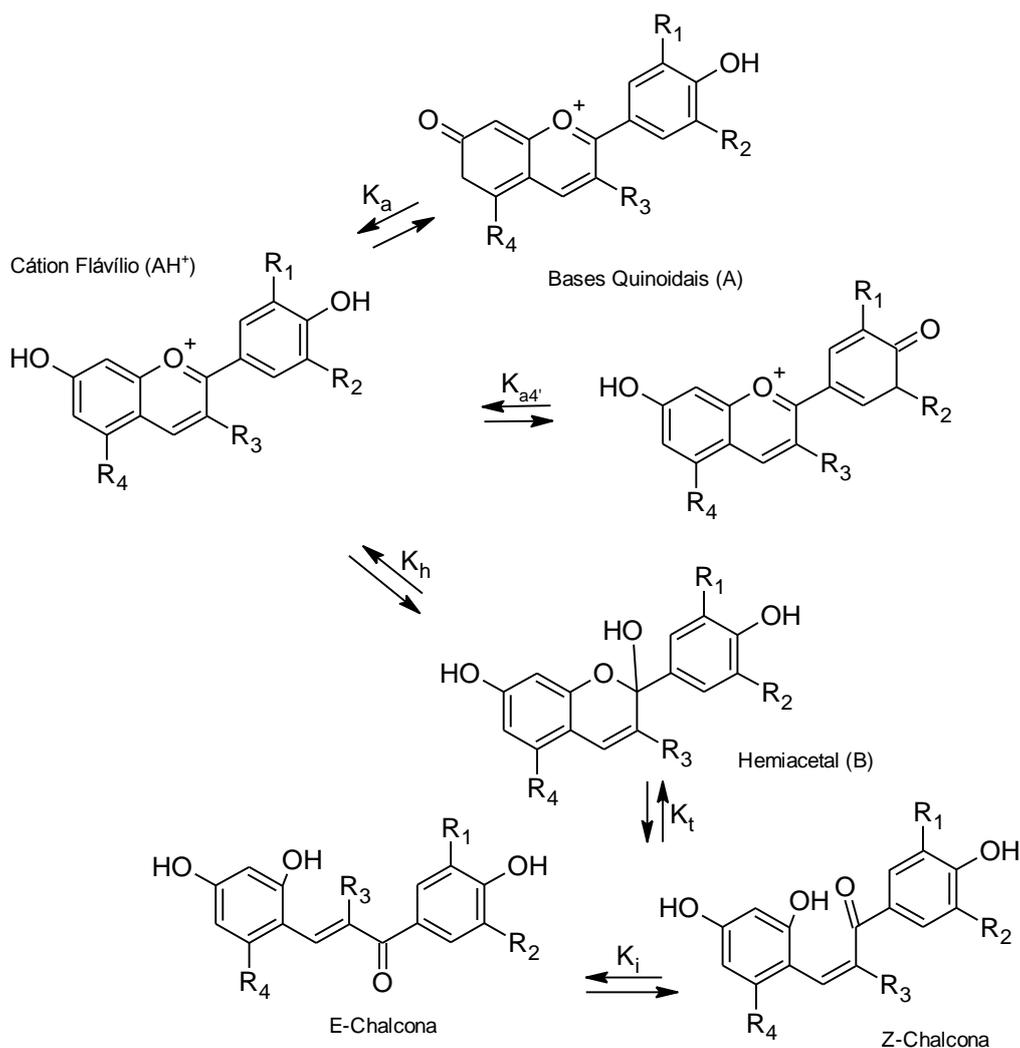
Na natureza, mais de 90% de todas as antocianinas são baseadas em apenas 6 antocianidinas: perlargonidina (Pg), cianidina (Cy), peonidina (Pn), delphinidina (Dp), petunidina (Pt) e malvidina (Mv) (Andersen & Jordheim, 2006). A distribuição dessas seis antocianidinas em frutas e vegetais são: cianidina 50%, delphinidina 12%, perlargonidina 12%, peonidina 12%, petunidina 7% e malvidina 7% (Castñeda-Ovando et al., 2009). Na tabela abaixo são mostrados os substituintes de cada antocianidina.

Tabela 1: Estrutura das seis principais antocianidinas. Essas antocianidinas apresentam o substituinte OH nas posições 3 e 5.

Antocianidina	R' ₃	R' ₅
Perlagonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

A coloração apresentada pelas antocianinas é influenciada por diversos fatores como a substituição no anel B, na qual um aumento no padrão de hidroxilação provoca um deslocamento batocrômico, mudando a coloração da vermelha para violeta. A natureza do açúcar (arabinose, glicose), acilado ou não, e a sua posição no esqueleto da antocianidina são fatores estruturais que influenciam na tonalidade da cor das antocianinas. Logo, esses fatores estruturais variam de espécie para espécie (Mateus & Freitas, 2009). As cores exibidas por essa classe de compostos também são influenciadas pela temperatura, pH do meio, luz, co-pigmentos, presença de íons metálicos (Castñeda-Ovando et al., 2009; Mercadante & Bobbio, 2008).

Em meio aquoso, as antocianinas e também os seus análogos sintéticos, os sais de flavílios, apresentam uma elevada reatividade dependente do pH do meio, que provoca grandes mudanças na sua coloração e estrutura devido a uma série de reações reversíveis, mostrada no Esquema 1.



Esquema 1: Reações de equilíbrio de antocianinas em meio aquoso

As antocianinas apresentam uma maior estabilidade em soluções ácidas do que em soluções neutras e alcalinas. Em meio ácido, em valores de pH inferiores a 2, a espécie predominante é o cátion flavílio, AH^+ . A desprotonação desse cátion produz a base quinonoidal, A, por um equilíbrio ácido-base. Porém, quando o pH do meio é elevado, acima de 3, ocorre também uma reação de hidratação do cátion flavílio. A reação de hidratação ocorre porque as posições C2 e C4 do anel C são as que apresentam maior densidade de carga positiva, possibilitando um ataque nucleofílico pela molécula de água. Nessa etapa, há um equilíbrio de hidratação, dando origem ao hemiacetal, B. O hemiacetal formado entra em equilíbrio tautomérico com as chalconas (Freitas et al, 2011; Quina et al, 2011; Freitas, 2005; Brouillard, 1982).

A coloração das soluções, em diferentes pH, contendo antocianinas são bastante distintas. Em meio fortemente ácido as antocianinas apresentam uma coloração vermelha bastante intensa e, à medida que o pH é aumentado, essa coloração vai perdendo intensidade, mudando a coloração de vermelho para violeta, pois o cátion flavílio é desprotonado e ocorre a formação da base quinonoidal (produto cinético). Quando o equilíbrio termodinâmico é obtido a solução torna-se incolor (Freitas, 2005).

Como a estrutura química das antocianinas naturais é bastante complexa, pois há unidades glicosiladas na sua estrutura, compostos modelos desses pigmentos estão sendo bastante utilizados, no estudo da sua estabilidade. Esses compostos modelos sintéticos, análogos às antocianinas, conhecidos como sais de flavílios, apresentam o cromóforo básico das antocianinas (o íon 2-fenilbenzopirílio) e são susceptíveis aos mesmos fatores de estabilidade, ou seja, as transformações estruturais dos sais de flavílios sintéticos seguem o mesmo padrão das antocianinas naturais (Pina, 1998; Amic & Trinajstić, 1991).

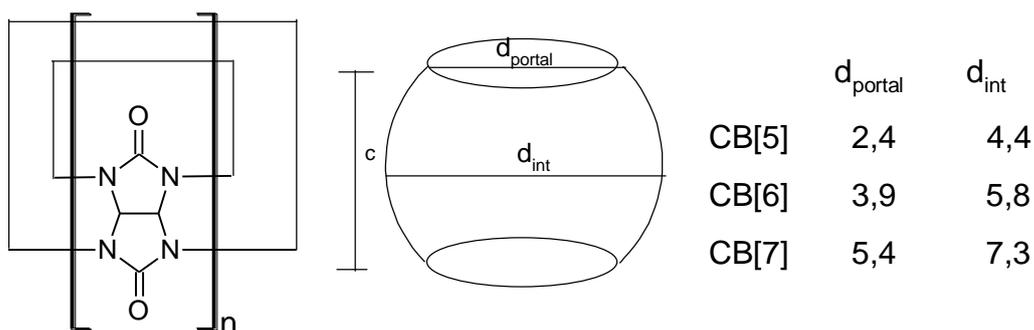
Diante dos fatores que afetam a estabilidade desses compostos (antocianinas naturais e sais de flavílio), o estudo dessa classe de pigmentos torna-se um grande desafio, sendo que a busca por um ambiente que aumente a sua estabilidade ainda é bastante limitada. Uma possível estratégia para aumentar a estabilidade das antocianinas e dos sais de flavílio poderia ser a inclusão e a encapsulação dessas moléculas em hospedeiros como ciclodextrinas ou cucurbiturilas

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos consistindo de unidades de D-(+)-glicopirranose (Park, 2006). As CDs mais comuns são α -, β - e γ -ciclodextrinas que tem seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente. Apresentam uma estrutura tipo um cone truncado com uma cavidade hidrofóbica oca de diâmetro e volume específico e superfície externa relativamente hidrofílica (Fernandes et al., 2013). De acordo com essas características, essas macromoléculas formam complexos de inclusão com uma variedade de espécies hidrofílicas ou anfifílicas, como muitos compostos orgânicos, frequentemente substâncias fenólicas, de tamanho apropriado admitindo-os para dentro da cavidade (Christoff et al., 2000; Fernandes et al., 2013; Park 2006). CDs têm sido bastante utilizadas como moléculas hospedeiras com o intuito de proteger (estabilizar, no caso das antocianinas e seus análogos) moléculas hóspedes da

degradação (Christoff et al., 2000). A formação de complexo do tipo hospedeiro-hóspede pode ser facilmente monitorada usando técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia UV-visível (UV-vis), espectroscopia de fluorescência, espectroscopia no infra-vermelho, abordagens eletroquímicas e medidas de solubilidade (Fernandes et al., 2013). Destas, a espectroscopia de fluorescência tem sido bastante usada para a caracterização do tipo de complexação entre a molécula hospedeira e a molécula hóspede dentro da cavidade das ciclodextrinas (Singh et al., 2004).

Uma outra classe de macromoléculas que vem ganhando bastante destaque no estudo de complexação hospedeiro-hóspede são as cucurbit[n]urilas (CBn). Essas macromoléculas, assim como as ciclodextrinas, podem formar complexos de inclusão. Porém, as CBns apresentam uma maior e melhor afinidade do que as ciclodextrinas, especialmente para moléculas hóspede com carga positiva, como as antocianinas e seus análogos, que apresentam uma carga positiva no anel pirílio (Zhang, 2012).

As cucurbit[n]urilas são oligômeros cíclicos constituídos de um número variável de unidades de glicoluril ligados por grupos de metileno para formar uma estrutura cíclica altamente simétrica, lembrando o formato de uma abóbora ou de uma gaiola (Apurba & Nau, 2007; Chakraborty & Basu, 2011; Koner et al., 2011). Dependendo do número de unidades de glicoluril (n), alguns homólogos de cucurbit[n]urilas são conhecidos com diferentes dimensões do portal e da cavidade. Esses homólogos são: CB[5], CB[6], CB[7], CB[8] e CB[10], sendo 5, 6, 7, 8 e 10 unidades de glicoluril.



CB[n]: n = 5 - 10

Figura 3: Estrutura do glicoluril e a forma da CB, com os seus respectivos diâmetros em Å, das principais CBS. Todas as CBs apresentam a mesma altura, 9,1 Å.

A estrutura simétrica das cucurbiturilas possui dois portais idênticos com grupos carbonila altamente polarizados, conferindo à molécula um caráter básico de Lewis, e uma cavidade hidrofóbica (Chakraborty & Basu, 2011; Demets, 2007). Os portais de carbonila possibilitam um estabelecimento de uma interação íon-dipolo e ligação de hidrogênio, enquanto que o interior da cavidade permite uma interação hidrofóbica, promovendo a estabilidade do complexo hospedeiro-hóspede com uma ampla gama de moléculas hóspede (Chakraborty & Basu, 2011; Zhou et al., 2010).

A formação de complexo de inclusão com as cucurbiturilas é influenciada por alguns fatores. O primeiro fator, mencionado acima, é com relação à cavidade hidrofóbica desses macrocíclos, sendo que esses compostos procuram acomodar espécie com essa mesma característica. As dimensões dos portais das CBs determinam a seletividade por tamanho, capazes de formar complexos de inclusão com uma variedade de espécies química, como aminas, compostos aromáticos, corantes, fármacos e muitas outras. As interações íon-dipolo são responsáveis pela formação de complexo entre cátion e as carbonilas (Demets, 2007). O efeito eletrostático pode desempenhar um papel crucial na formação de complexos de inclusão. Uma vez que o potencial eletrostático nos portais e dentro da cavidade das cucurbiturilas é significativamente negativo, logo, elas exibem uma preferência mais pronunciada para interagir com espécies catiônicas do que com espécies neutra ou aniônica (Lee et al., 2003). O

confinamento de moléculas hospedeiras no macrociclo cucurbit[n]uril pode alterar as propriedades químicas e espectroscópicas dessas moléculas, bem como aumentar a fotoestabilidade ou facilitar a fotodimerização estereoseletiva (Li et al., 2010).

Com isso, o crescente interesse na família de cucurbit[n]urila como novos hospedeiros em química supramolecular pode ser atribuída a suas excelentes propriedades de reconhecimento molecular (Khedkar et al., 2012). Portanto, as antocianinas e os sais de flavílios, com a sua carga positiva no anel benzopirílio são excelentes candidatos para serem inclusos pelas cucurbiturilas.

2. OBJETIVO

Neste trabalho, estudou-se as reações de inclusão de compostos modelos de antocianinas (sais de flavílios), o cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio (HMF) e o cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio (MMF), e das antocianinas naturais, cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3,5-di-O-glicosídeo e antocianinas presentes no extrato do jambolão (*Syzygium cumini*) em cucurbi[7]turila (CB[7]), através da reação do tipo hóspede-hospedeiro. E, verificou-se também a eficiência da CB[7] na estabilização das antocianinas presentes no extrato do jambolão frente à reação de hidratação.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram: metanol (Vetec Química), benzoilacetona (Sigma-Aldrich), 3-metoxifenol (Aldrich), resorcinol (Sigma-Aldrich), cloreto de sódio (CAQ Ind. e Com. Ltda.), ácido sulfúrico (Merck), éter dietílico (Vetec Química) ácido acético (Merck), ácido fórmico (Grupo Química) (Aldrich), hidróxido de potássio (Merck), ácido clorídrico (Synth), ácido perclórico (Vetec Química), acetato de sódio (Merck), acetato de etila (Vetec Química), butanol (Aldrich), cloreto de cianidina-3-glicosídeo (Aldrich) e cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo (Aldrich), Cobaltoceno (Aldrich) As soluções aquosas foram preparadas com água purificada por sistema Milli-Q.

A cucurbit[7]uril (CB[7]) foi gentilmente fornecida pela Professor Dr^a Cornelia Bohne, do Departamento de Química da Universidade de Vitória, Canadá.

Os frutos do jabolão (*Syzygium cumini*) foram adquiridos em árvores da Cidade Universitária.

3.2 Equipamentos

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Diode Array 8452A da Hewlett Packard. As medidas cinéticas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 Bio da Varian acoplado a um banho termostático da Lauda Brinkmann. As medidas de fluorescência no estado estacionário foram feitas em um fluorímetro Hitachi Modelo F-4500, acoplado com um banho termostático da Lauda Brinkmann.

O pH das soluções aquosas foram determinados com um medidor de pH/ORP/temperatura DM-22 da Digimed.

Para uma melhor solubilização dos flavílios foi utilizado um banho ultrassônico Fisher Scientific.

3.3 Síntese de sais de flavílios

Os sais de flavílios utilizados foram sintetizados a partir da condensação de fenóis com β -dicetonas, baseado na metodologia descrita por Roque (2001).

3.3.1 Cloreto de 7-hidroxi-4-metilflavílio (HMF)

Foram pesados e transferidos para um balão de fundo redondo, contendo aproximadamente 12,0 mL de ácido acético glacial, 1 mmol de resorcinol e 1 mmol de benzoilcetona, respectivamente. Nessa solução foi borbulhado durante 2 horas ácido clorídrico gasoso produzido *in situ* (NaCl + ácido sulfúrico). Ao final dessa reação, adicionou-se éter etílico, precipitando um sólido amarelo. O sólido foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico, obtendo-se 95,45 mg, com rendimento reacional de 34,9%.

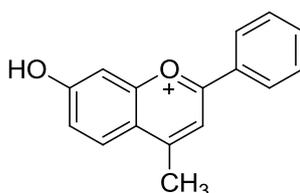


Figura 4: Estrutura do HMF

3.3.2 Cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio (MMF)

A síntese do MMF é similar à síntese do HMF. Adicionou-se 2 mmol de benzoilcetona, 2 mmol de 3-metoxifenol e 17,0 mL de ácido acético em um balão de fundo redondo. Nessa solução foi borbulhado ácido clorídrico gasoso por um período de 3 horas. O flavílio foi precipitado com éter etílico. Por fim, o produto foi filtrado, obtendo uma massa de 99,89 mg, 19,92 % de rendimento.

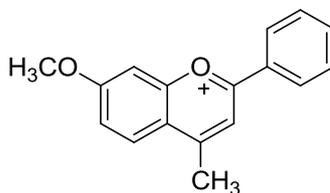


Figura 5: Estrutura do MMF

3.4 Isoterma de Ligação por Espectroscopia de Fluorescência – Determinação das Constantes de Incorporação e Estequiometria de Incorporação

Primeiramente, foram preparadas soluções contendo os íons flavílios com concentração de 0,2 μM em pH 3,0, a partir de soluções estoques. As soluções estoques foram preparadas em metanol acidificado com duas gotas de ácido perclórico.

Uma solução estoque de CB[7] com concentração de 0,879 mM foi também obtida em pH 3,0, para manter o pH das misturas próximo de 3,0.

Adicionou-se 2,7 mL do flavílio, com concentração de 0,2 μM , em uma cubeta, na qual foram adicionadas alíquotas de CB[7], variando em volume de 1 μL a 50 μL . Os espectros de fluorescência foram obtidos a 25,0 $^{\circ}\text{C}$.

As estequiometrias da incorporação dos íons flavílios também foram determinadas pelo método da variação contínua (MVC ou Método de Job) utilizando a espectroscopia de fluorescência. As concentrações dos flavílios e do CB[7] foram de 100 μM e suas proporções relativas foram alteradas (Renny et al., 2013).

A inclusão das antocianinas naturais com CB[7] foi realizada em pH 1,96, a 25,0 $^{\circ}\text{C}$. A cianidina-3-glicosídeo apresenta um valor de pK_{aH} de $2,72 \pm 0,35$. As concentrações da cianidina-3-glicosídeo e da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo foram de 4,12 μM e 3,09 μM . A inclusão das antocianinas presentes no extrato do jambolão foi realizada adicionando 1 μL do extrato em 1,5 mL de solução aquosa de pH 1,96.

3.5 Extração de antocianinas do jambolão

O extrato contendo as antocianinas presentes nas frutas do jambolão foi obtido pelo tratamento das cascas das frutas, por 24 horas, com metanol acidificado com ácido clorídrico 0,01% na proporção de 1:3 m/v.



Figura 6: Fruto do jambolão (*Syzygium cumini*)

3.6 Purificação do extrato antociânico

As antocianinas presentes no extrato metanólico do jambolão foram purificadas por meio da técnica de extração em fase sólida (SPE) com cartucho C18 de 500 mg da Applied Separations, de acordo com a metodologia descrita por Longo e colaboradores (2006). A purificação do extrato bruto ocorreu em cinco etapas: (1) ativação da coluna C-18 com a percolação de 3,0 mL de metanol, seguido por 3,0 mL de uma solução aquosa de HCl 0,01%; (2) adição de 3,0 mL do extrato bruto ao cartucho C-18; (3) eluição de açúcares e ácidos orgânicos com 6,0 mL de HCl 0,01%; (4) eluição dos compostos fenólicos com 3,0 mL de acetato de etila; (5) eluição das antocianinas com 3,0 mL de metanol contendo HCl 0,01% (v/v).

3.7 Identificação de antocianinas presente no extrato do jambolão

A identificação preliminar das antocianinas presentes no extrato do jambolão foi realizada através das técnicas de espectrofotometria ultravioleta visível (UV-Vis), sendo que essa classe de composto apresenta, em meio ácido, uma absorção máxima entre 465 e 550 nm e uma absorção menos intensa por volta de 280 nm; para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se como fase móvel mistura de butanol, ácido acético e água (BAW) nas proporções de 4:1:5 v/v/v (Março 2008; Harbone 1966).

3.8 Determinação do teor total de antocianinas

O teor total de antocianinas presentes foi determinado pelo método do pH diferencial. Alíquotas de 10 µL do extrato purificado foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL contendo soluções de pH 0,82 e 4,62. Medidas espectrofotométricas foram realizadas e a quantificação foi expressa em g/L de cianidina-3,5-di-O-glicosídeo (Cui et. al., 2013; Denev et.al., 2010; Fuleki & Francis, 1968; Lee et. al., 2005).

$$C = \frac{A \times M \times FD}{\epsilon \times b}$$

sendo A:

$$A = (A_{517} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{517} - A_{700})_{pH\ 4,5}$$

onde A é a absorvância, M a massa molar da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo (611,52 g/mol), FD é o fator de diluição, ϵ é o coeficiente de absorvância molar da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo ($39476\ M^{-1}cm^{-1}$), e b o caminho ótico (1 cm).

3.9 Inclusão de antocianinas presentes no jambolão em CB[7]

1 mL do extrato antociânico foi adicionado em 1,5 mL da solução com pH 1,92 e alíquotas de solução aquosa de CB[7], variando em volume de 1 a 100 µL, foram adicionados. Os espectros de fluorescência foram registrados a 25,0 °C.

3.10 Cinética de hidratação e desidratação de antocianinas presentes no jambolão por espectroscopia de absorção

A estabilidade das antocianinas presentes no jambolão foi avaliada em pH 4,62. Quatro amostras foram analisadas: antocianinas livres (sem a presença de CB[7]), antocianinas na presença 10 µM de CB[7], antocianinas na presença de 100 µM de CB[7] e antocianinas na presença de 500 µM de CB[7]. Os espectros foram registrados imediatamente após a adição da CB[7], por um período de 90 minutos.

As antocianinas permaneceram em pH 4,42 por 24 horas para garantir que a hidratação ocorresse completamente. Após esse período, a CB[7] foi adicionado, sendo preparadas as mesmas quatro amostras descritas anteriormente, e os espectros foram registrados durante 75 minutos.

3.11 Titulação UV-Vis do CB[7] com cobaltoceno– determinação da porcentagem de pureza

Uma solução estoque de hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil)cobalto(III) (Cob^+) 1 mM foi preparado em metanol. Uma solução de 15 μM de Cob^+ foi preparada por diluição da solução estoque. Uma solução de CB[7] com concentração por volta de 1 mM foi preparada em 2 mM de cloreto de sódio.

3 mL da solução de Cob^+ 15 μM foram transferido para uma cubeta. A titulação foi realizada adicionando alíquotas de 9 μL da solução de CB[7] 1 mM e os espectros de absorção foram registrados após cada adição de CB[7]. A absorvância do Cob^+ em 261 nm é reduzida com a adição de CB[7]. A titulação foi finalizada quando houve uma saturação de CB[7], ponto onde não há nenhuma mudança no espectro de absorção do Cob^+ com a adição do CB[7]. Pelo menos três espectros mais foram registrados após a saturação.

A pureza foi determinada a partir da interseção das regressões lineares da absorção do cobaltoceno em função da concentração do CB[7].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estabilidade e a coloração das antocianinas e os seus análogos sintéticos, os sais de flavílios, em meio aquoso dependem do equilíbrio de quatro espécies devido a mudanças no pH, protonação ou reação de hidratação. As antocianinas existem principalmente na forma do cátion flavílio em pH menor que 3. Com o aumento no pH, duas reações podem acontecer, dependendo do padrão de substituição. Com o aumento do pH o cátion flavílio é convertido para a base quinonoidal através de uma reação de transferência de prótons e/ou pode sofrer um ataque nucleofílico da água na posição 2, formando o hemiacetal através de uma reação de hidratação, conforme mostrado no esquema 1 (p.20) . Esse por sua vez sofre reação de tautomerização com a abertura do anel C, formando as chalconas. A Figura 7 mostra a coloração das antocianinas sintéticas, HMF, e naturais, cianidina-3-glicosídeo, em função do pH do meio.

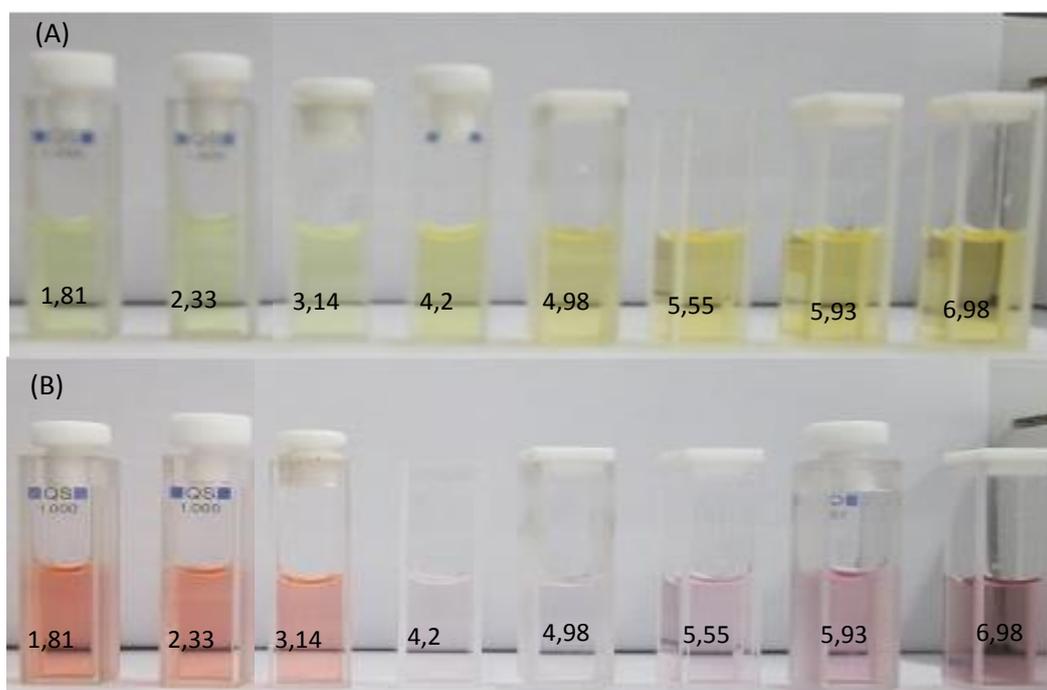


Figura 7: Coloração apresentada pelas antocianinas em diferentes valores de pH (variação de 1,81 a 6,96): antocianina sintética, HMF, (A); antocianina natural, cianidina-3-glicosídeo (B)

As antocianinas naturais, em meio ácido, apresentam uma coloração vermelha referente ao cátion flavílio, e com uma banda de absorção com máximo

por volta de 510 nm. Já a coloração das antocianinas sintéticas, os sais de flavílio, vai depende do padrão de substituição (Sweeny & Iacobucci, 1983). No caso do HMF em meio ácido o cátion flavílio apresenta uma coloração amarela com um máximo de absorção por volta de 415 nm. A Figura 8 mostra o perfil espectrofotométrico do HMF e da cianidina-3-glicosídeo. As antocianinas apresentam duas bandas de absorção e, dependendo do padrão de substituição, o máximo da banda mais intensa pode variar de 400 a 530 nm e a banda menos intensa centrada por volta de 260 a 280 nm. Uma maior hidroxilação do anel B causa um deslocamento da banda de absorção mais intensa para maiores comprimentos de onda, deslocamento batocrômico (Harbone, 1958).

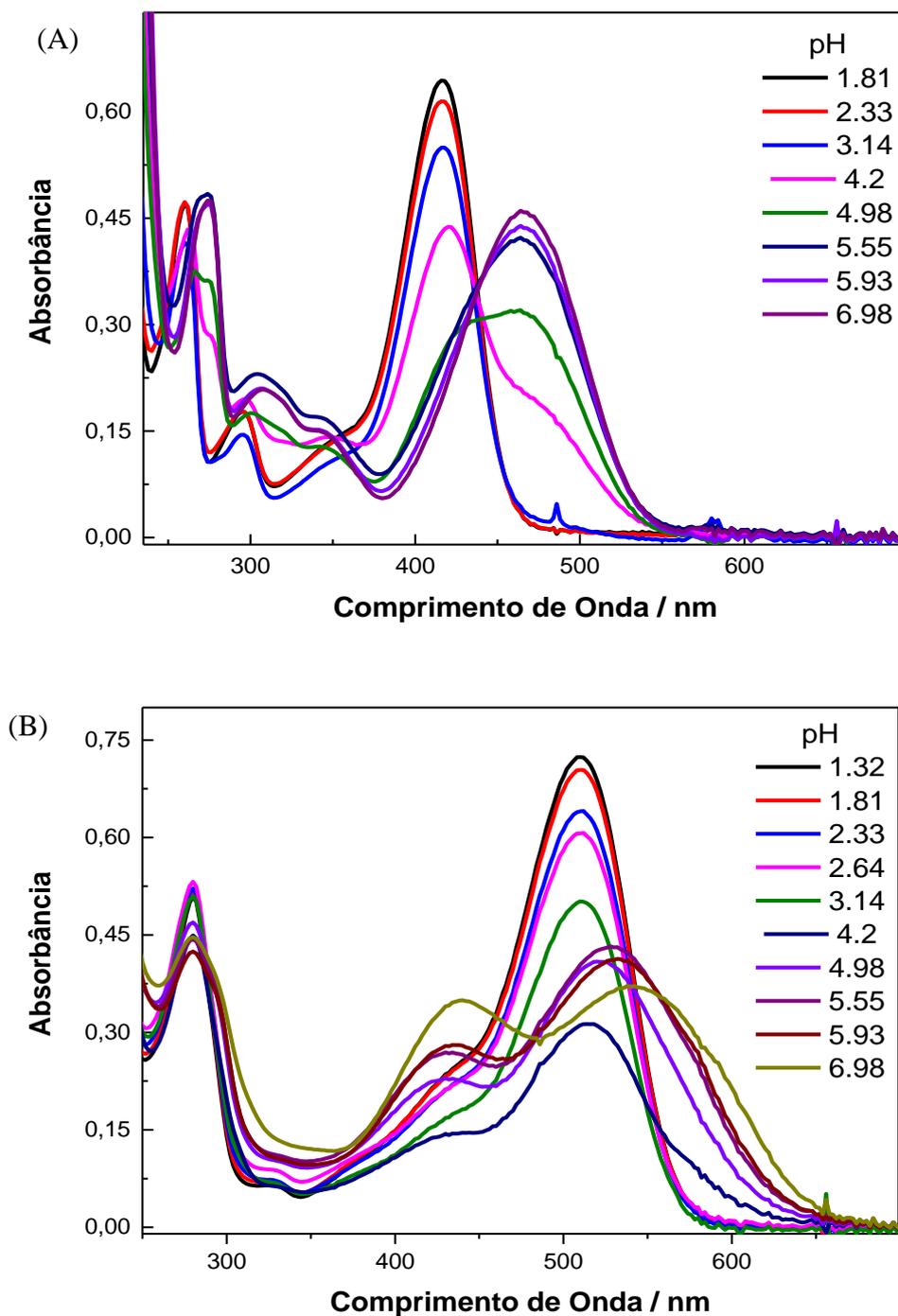


Figura 8: Espectro de absorção do HMF (A) e da cianidina-3-glicosídeo (B) em função do pH do meio

Como se pode notar, a cor das antocianinas tem uma forte dependência com o pH do meio, ou seja, o pH influencia consideravelmente a estabilização da cor desses compostos.

A inclusão de pigmentos em moléculas hospedeiras, como as cucubiturilas, pode aumentar significativamente a estabilidade de pigmentos contra diversos fatores. As cucurbiturilas apresentam uma rigidez em sua estrutura molecular capaz de acomodar diversos pigmentos. A molécula do CB[7] apresenta sítios de ligação hidrofílicos e hidrofóbicos que servem para a inclusão de moléculas, principalmente moléculas catiônicas, como as antocianinas, formando complexo do tipo hóspede-hospedeiro, típico das cucubiturilas.

Quando a CB[7] foi adicionado na cela contendo os flavílios, com concentração de $3,44 \times 10^{-5}$ M para o HMF e $1,7 \times 10^{-5}$ M para o MMF, houve um aumento da intensidade de fluorescência. Esse aumento observado na fluorescência do HMF e do MMF deve-se a inclusão desses compostos dentro da cavidade do CB[7], a qual produz um complexo fluorescente.

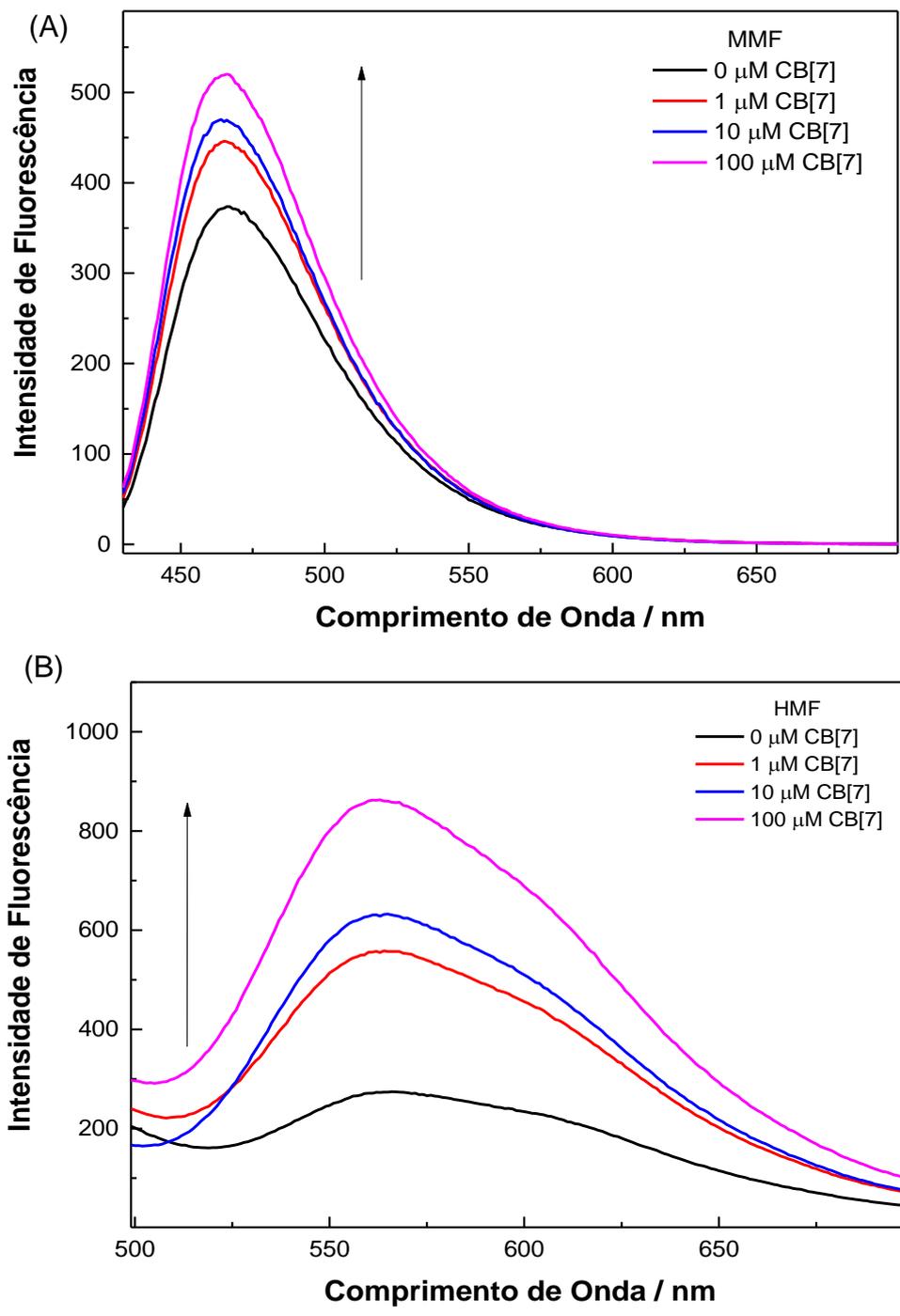


Figura 9: Espectro de fluorescência do MMF e HMF em diferentes concentrações de CB[7]

4.1 Isoterma de Inclusão dos Íons Flavílios, HMF e MMF, por Espectroscopia de Fluorescência

Como já foi demonstrado anteriormente, quando CB[7] é adicionado aos sais de flávílios um aumento significativo na intensidade de fluorescência é verificado devido a uma possível inclusão dos pigmentos dentro da cavidade do macrociclo, sendo que as cucurbiturilas apresentam uma rigidez molecular causando um aumento na intensidade de fluorescência dos flavílios. Os espectros de fluorescência do HMF com subseqüentes adições de CB[7] é mostrado na figura a seguir.

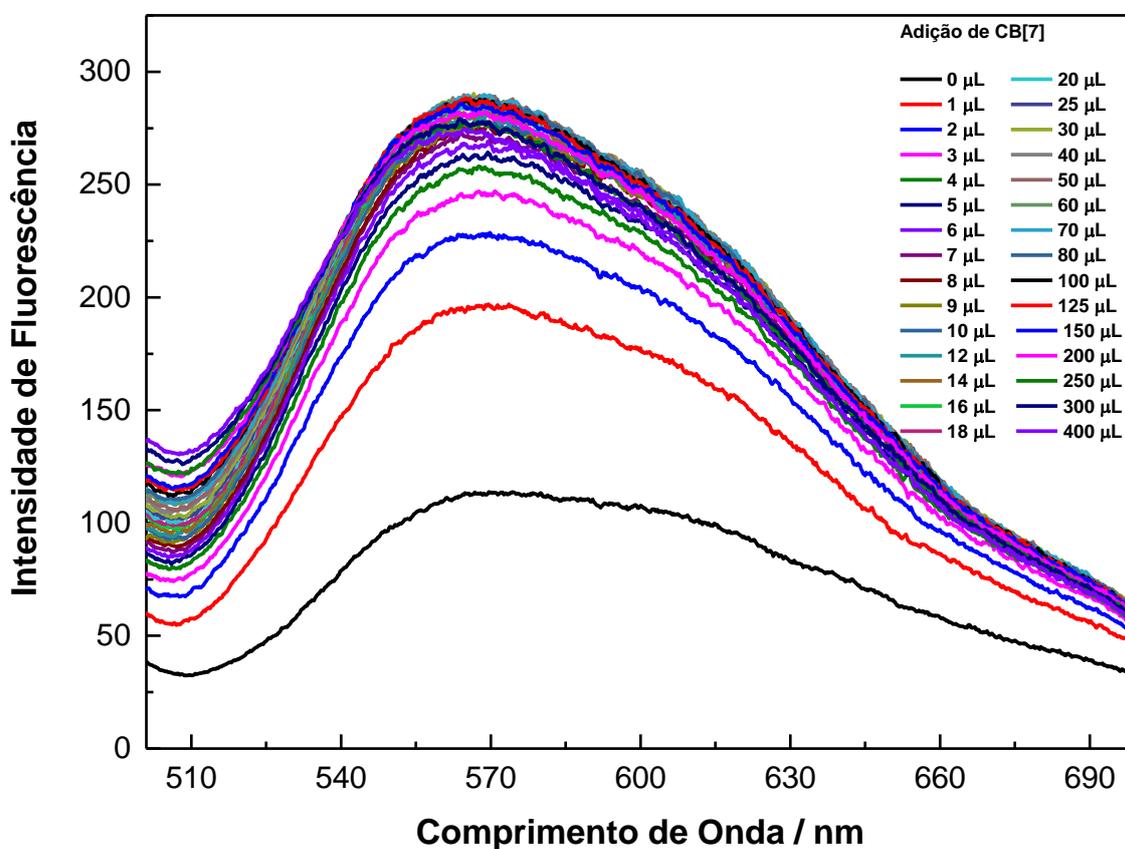


Figura 10: Espectros de fluorescência do HMF ($0,2 \mu\text{M}$) em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] ($0 - 79,5 \mu\text{M}$), em pH 3,0.

De acordo com os espectros de fluorescência, pode-se notar que a intensidade da emissão do HMF aumenta inicialmente com o aumento da concentração de CB[7]. Essa intensidade aumenta até uma certa concentração de CB[7], $15,57 \mu\text{M}$; acima dessa concentração, nota-se que a intensidade de

fluorescência começa a estabilizar e depois reduzir, indicando que há uma saturação de CB[7]. Logo, 15,57 μM de CB[7] é o valor limite de saturação, indicando a incorporação da molécula do HMF dentro da cavidade do CB[7]. Esse efeito da saturação pode ser melhor visualizado no gráfico da intensidade versus a concentração de CB[7].

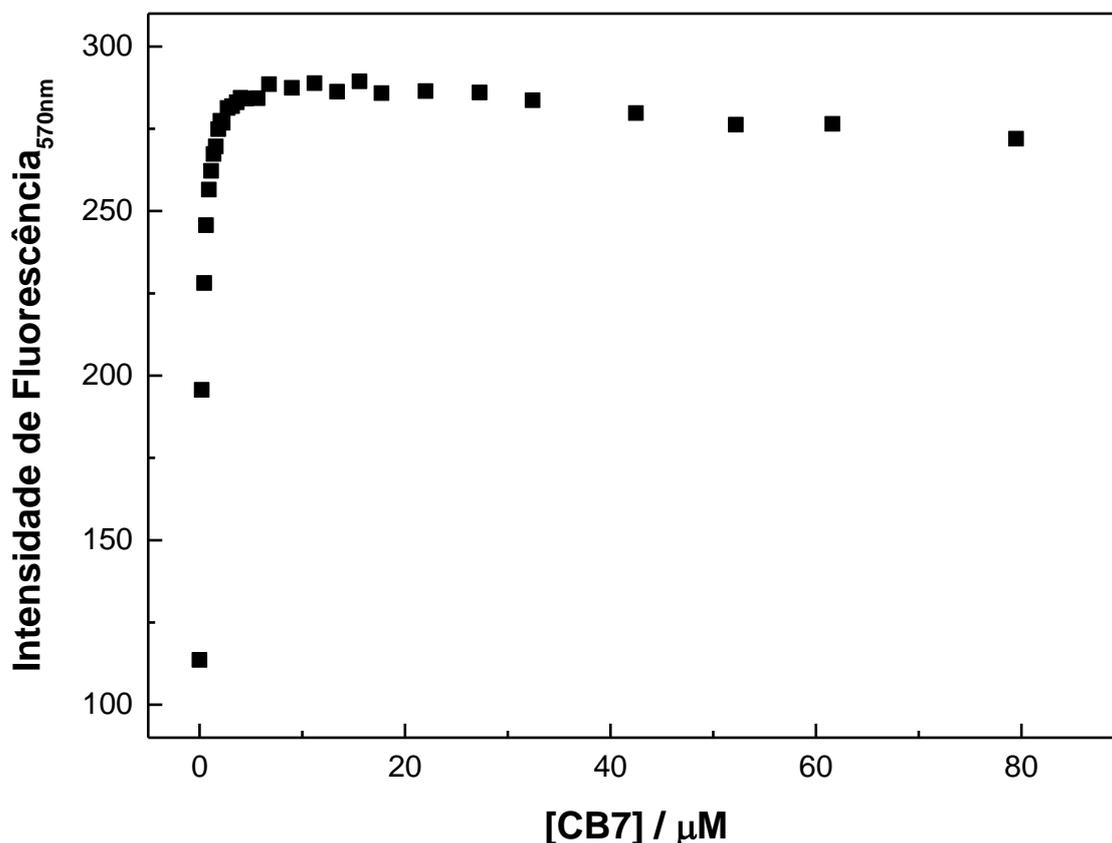


Figura 11: Intensidade máxima de fluorescência do HMF em função da razão molar do CB[7].

Para obter a(s) constante(s) de incorporação do HMF dentro da cavidade do CB[7] deve-se primeiramente saber a estequiometria de formação do complexo. A constante de ligação para a formação do complexo HMF/CB[7] foi determinada, de acordo com Singh e colaboradores (2004), a partir da análise das mudanças de intensidade no máximo da banda de fluorescência com a concentração de CB[7]. Então, no caso da estequiometria de formação do complexo hospedeiro-hóspede 1:1, formado entre o HMF e o CB[7] o equilíbrio pode ser escrito da seguinte forma:



A constante de equilíbrio K_{11} para a reação acima pode ser expressa como:

$$K_{11} = \frac{[\text{HMF@CB}[7]]_{eq}}{[\text{HMF}]_{eq}[\text{CB}[7]]_{eq}} \quad (1)$$

onde $[\text{HMF@CB}[7]]_{eq}$ é a concentração no equilíbrio do complexo 1:1 para uma dada concentração de $\text{CB}[7]$. Se $[\text{HMF}]_o$ e $[\text{CB}[7]]_o$ são as concentrações iniciais de HMF e $\text{CB}[7]$, respectivamente, e, $[\text{CB}[7]]_o \gg [\text{HMF@CB}[7]]_{eq}$, a equação 1 torna:

$$K_{11} = \frac{[\text{HMF@CB}[7]]_{eq}}{([\text{HMF}]_o - [\text{HMF@CB}[7]]_{eq})[\text{CB}[7]]_o} \quad (2)$$

Em qualquer estágio a intensidade de fluorescência I_f observada é a soma das intensidades de fluorescência do HMF e $\text{HMF@CB}[7]$, ambos livres. Essas intensidades de fluorescência são proporcionais às suas respectivas concentrações presentes na solução. Com isso, temos:

$$I_f = I_f^o \frac{[\text{HMF}]_{eq}}{[\text{HMF}]_o} + I_{\text{HMF@CB}[7]} \frac{[\text{HMF@CB}[7]]_{eq}}{[\text{HMF}]_o} \quad (3)$$

onde I_f^o é a intensidade de fluorescência na ausência de $\text{CB}[7]$ e $I_{\text{HMF@CB}[7]}$ é a intensidade de fluorescência quando todas as moléculas de HMF estão complexadas com $\text{CB}[7]$ formando um complexo $\text{HMF/CB}[7]$ 1:1. Uma vez que $[\text{HMF}]_{eq}$ é igual a $([\text{HMF}]_o - [\text{HMF@CB}[7]]_{eq})$, a equação anterior pode ser rearranjada da seguinte maneira:

$$\frac{[\text{HMF@CB}[7]]_{eq}}{[\text{HMF}]_o} = \frac{I_f - I_f^o}{I_{\text{HMF@CB}[7]} - I_f^o} \quad (4)$$

A partir das equações 2 e 4 obtém-se a equação 5.

$$\frac{1}{I_f - I_f^o} = \frac{1}{I_{\text{HMF@CB}[7]} - I_f^o} + \frac{1}{I_{\text{HMF@CB}[7]} - I_f^o} \left(\frac{1}{K_{11}[\text{CB}[7]]_o} \right) \quad (5)$$

Com isso, supondo a formação do complexo de inclusão com estequiometria 1:1 $\text{HMF@CB}[7]$, foi plotado o gráfico do duplo recíproco de

$(1/I/I_f^0 - 1)$ versus $1/[CB[7]]$, como pode ser visto na Figura 12. De acordo com o esse modelo, para obter uma estequiometria do complexo de inclusão 1:1 o gráfico do duplo recíproco deveria produzir uma linha reta. Contudo, para esse complexo de inclusão esse modelo não foi adequado, pois os pontos desviam de uma linha reta.

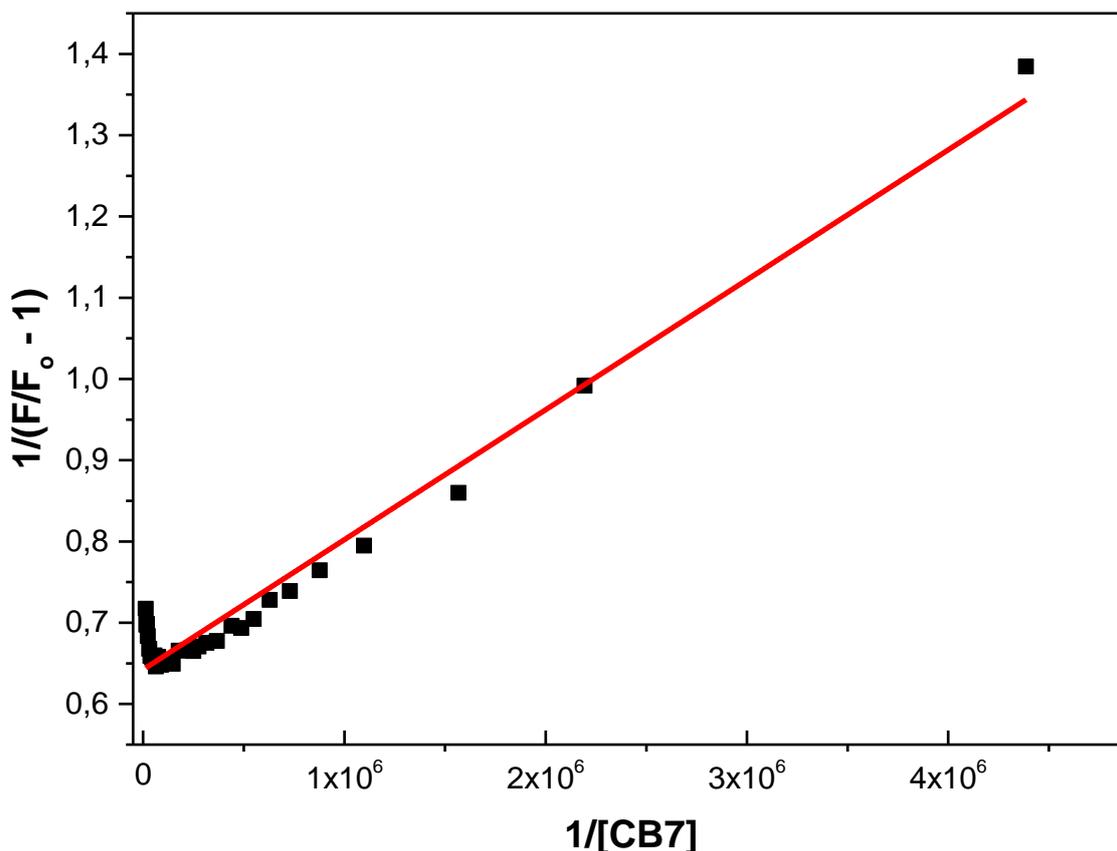


Figura 12: Método do duplo recíproco para a estequiometria 1:1

Regressão não-linear dos mínimos quadrados é uma alternativa, quando não é possível descrever um fenômeno através de um modelo de regressão linear, ajustando-se os dados diretamente a equação desejada. Logo, a equação 5 foi rearranjada para:

$$I_f = \frac{I_f^0 + I_{HMF@CB[7]}K_{11}[CB[7]_o]}{1 + K_{11}[CB[7]_o]} \quad (6)$$

Usando a equação 6, os dados foram ajustados utilizando o programa Origin 9.1, como pode ser visto na Figura 13.

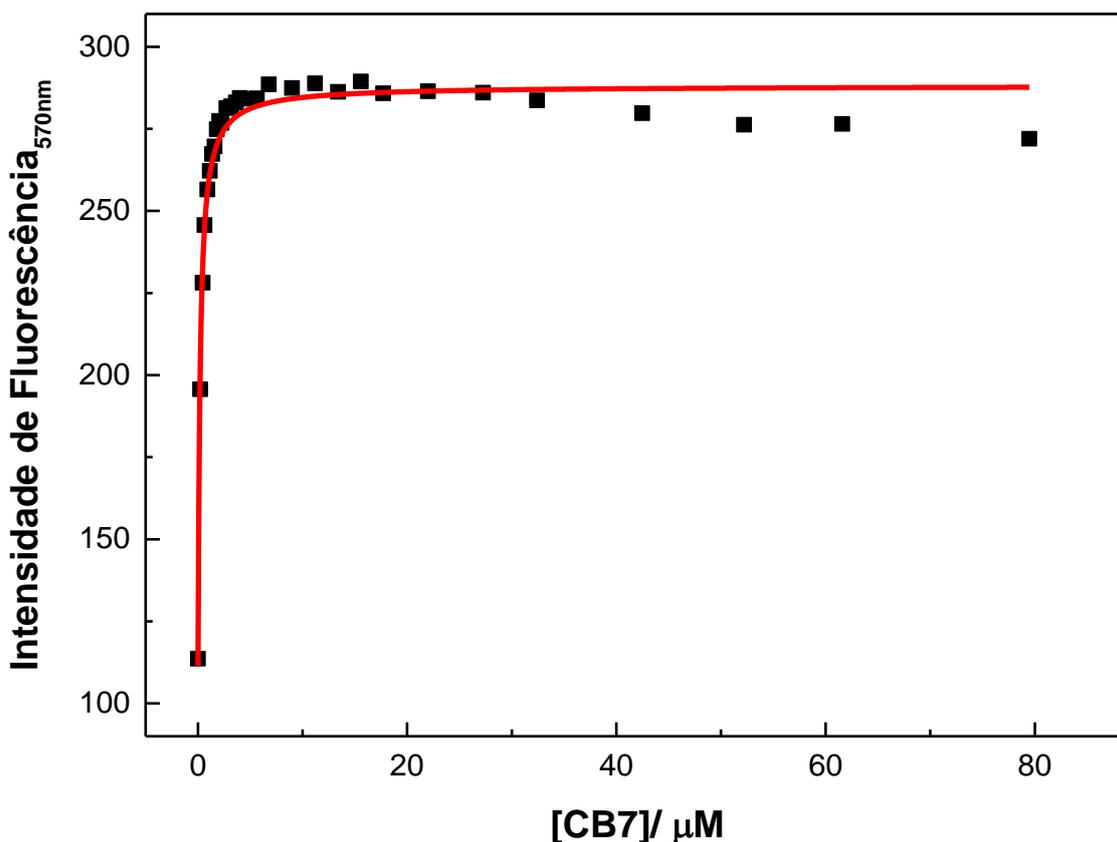
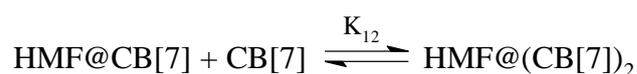


Figura 13: Intensidade de fluorescência versus [CB[7]] para HMF complexado com CB[7]. A linha representa o ajuste de regressão não linear aos dados experimentais considerando a estequiometria 1:1, HMF@CB[7], usando a equação 6.

A regressão não-linear dos mínimos quadrado mostra claramente que os dados analisados apresentam um grande desvio nos pontos finais e não foram bem ajustados para as concentrações elevadas de CB[7]. Contudo, esse resultado também mostra que a estequiometria da formação do complexo de inclusão do HMF com CB[7] não é inteiramente 1:1.

Para a formação sucessiva do complexo 1:2 entre o HMF e CB[7] uma segunda etapa do equilíbrio pode ser levada em conta:



Para essa estequiometria de complexação, a seguinte equação é obtida:

$$I_f = \frac{I_f^0 + I_{\text{HMF@CB[7]}} K_{11} [\text{CB[7]}]_0 + I_{\text{HMF@}(\text{CB[7]})_2} K_{11} K_{12} [\text{CB[7]}]_0^2}{1 + K_{11} [\text{CB[7]}]_0 + K_{11} K_{12} [\text{CB[7]}]_0^2} \quad (7)$$

Usando a equação 7, para uma estequiometria 1:2, os dados experimentais foram ajustados para obter o seguinte gráfico:

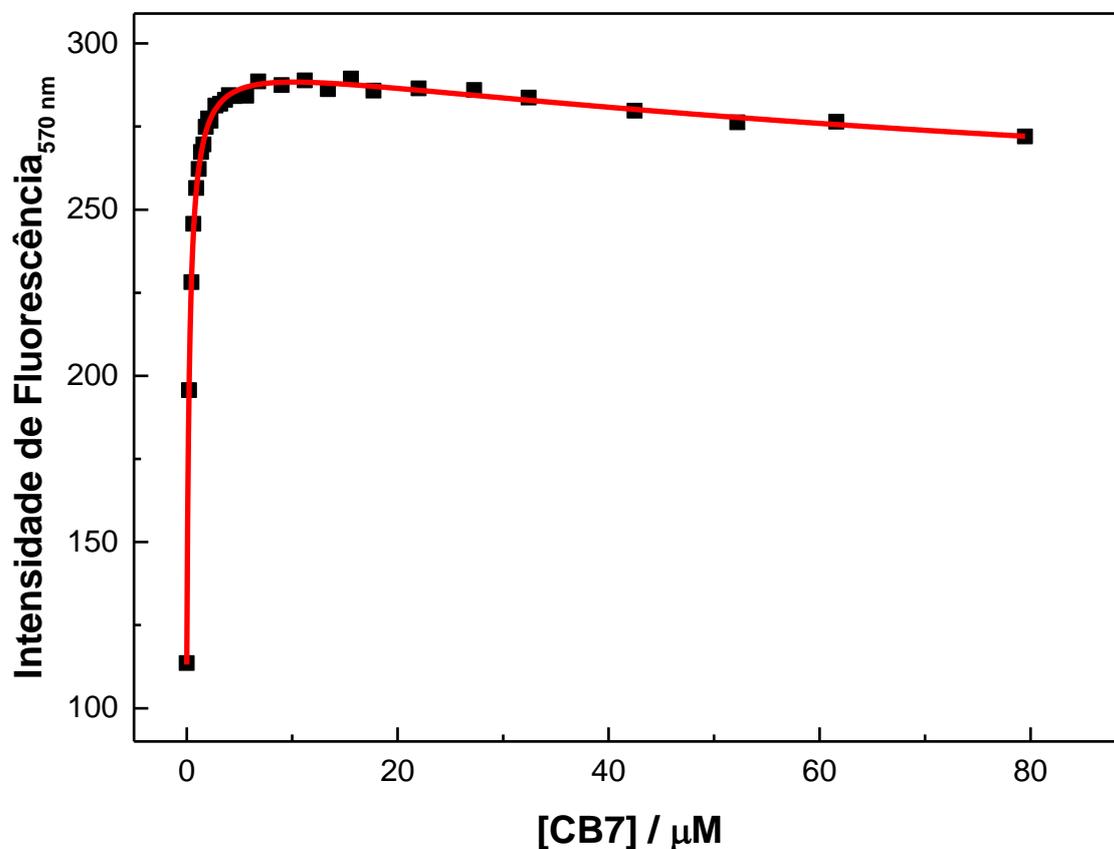


Figura 14: *Intensidade de fluorescência versus [CB[7]] para HMF complexado com CB[7]. A linha representa o ajuste de regressão não linear aos dados experimentais considerando a estequiometria 1:2, $HMF@(CB[7])_2$, usando a equação 7*

De acordo com o gráfico acima, é notório que esse modelo apresenta um melhor ajuste para a formação do complexo 1:2, com um valor de R^2 de 0,9996 para o ajuste ao modelo de complexação 1:2. Diante disso, as constantes de equilíbrio K_{11} e K_{12} foram estimadas em $(3,71 \pm 0,1) \times 10^6$ e $(8,96 \pm 3,67) \times 10^3 M^{-1}$, respectivamente. O maior valor para a primeira constante de ligação, K_{11} , em comparação com a segunda constante de ligação, K_{12} , sugere uma forte interação íon-dipolo entre os portais da carbonila do CB[7] e a carga positiva localizada no anel benzopirílio, na formação do complexo 1:1. Já a o valor

segunda constante de ligação, K_{12} , sugere que a segunda interação do CB[7] é principalmente de natureza hidrofóbica (Choudhury et al., 2009)

Para o MMF foi realizado o mesmo tratamento descrito para o HMF para saber que tipo de complexo é formado e encontrar as constantes. O MMF também forma um complexo do tipo 1:2, ou seja, uma molécula hospedeira e duas moléculas hóspedes, com um R^2 de 0,99813 para o ajuste ao modelo de complexação 1:2. Os valores de K_{11} e K_{12} foram de $(7,29 \pm 1,41) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $(2,16 \pm 1,19) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Todos os gráficos para a determinação das constantes do MMF encontram-se no apêndice.

A estequiometria de inclusão 1:2, $\text{HMF}@\text{(CB[7])}_2$, também foi verificada pelo método da variação contínua, ou método Job, como pode ser observado na figura abaixo, na qual o valor máximo da intensidade corresponde a fração molar do HMF de 0,33, sendo esse valor característico de estequiometria 1:2 (Renny, 2013; Wang, 2012; Zhang, 2012)

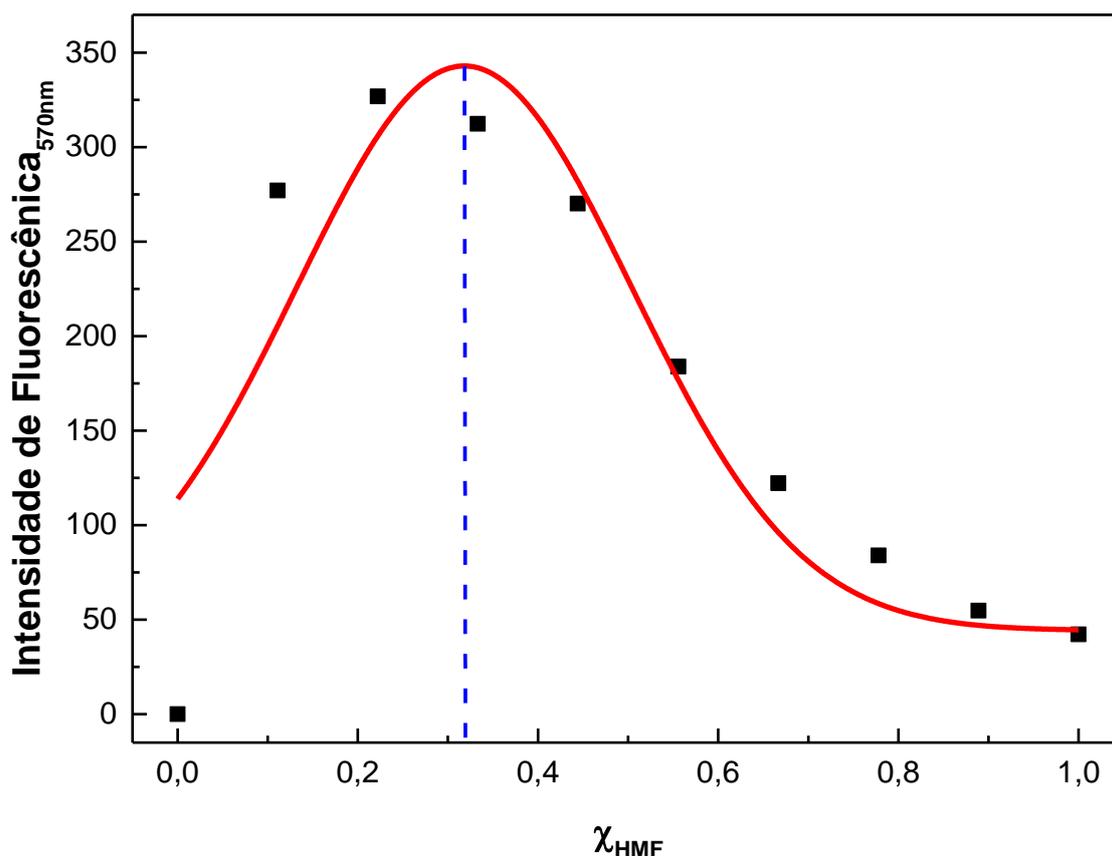


Figura 15: Job plot para a inclusão do HMF em CB[7], mostrando a estequiometria 1:2. A concentração total de HMF e CB[7] foi de 100 μM

A Figura 16 mostra a possível estrutura de inclusão do HMF dentro da cavidade do CB[7].

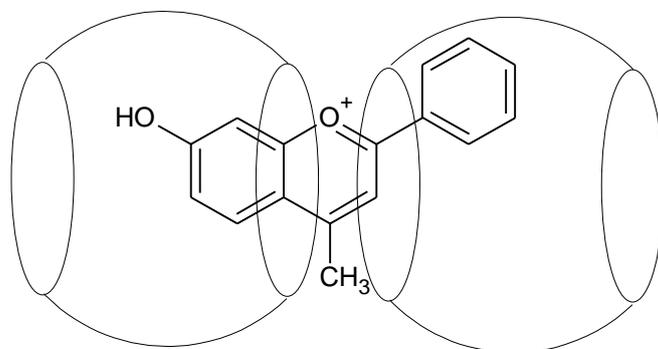


Figura 16: Modelo de inclusão do HMF em CB[7].

O modelo de inclusão do HMF em CB[7] foi desenvolvido através do programa Avogrado. De acordo com a de minimização de energia é observado que o anel piríliu fica localizado no portal das duas moléculas de CB[7], mostrando a forte interação da carga positiva com as carbonilas dos portais do macrociclo, refletindo uma forte interação íon-dipolo entre as espécies hóspede (HMF) e hospedeira (CB[7]).

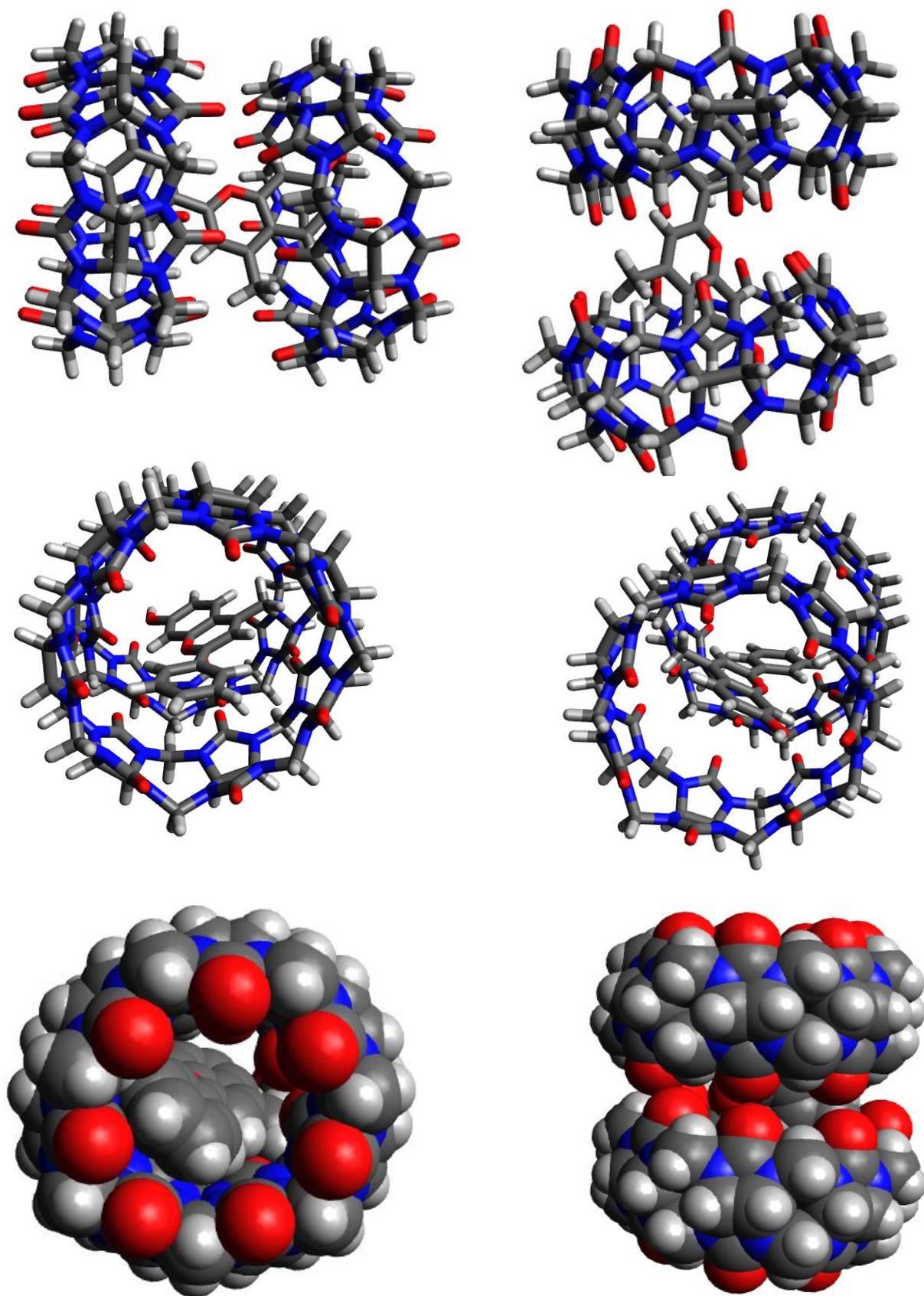


Figura 17: Modelo de inclusão do HMF dentro da cavidade do CB[7].

4.2 Isoterma de Inclusão de Antocianinas Naturais em CB[7] por Espectroscopia de Fluorescência

A inclusão das antocianinas naturais, cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3,5-di-glicosídeo, e as antocianinas presentes no extrato do jamelão em CB[7] também foram realizadas por espectroscopia de fluorescência. Todas as análises foram realizadas em pH 1,96 para garantir que a forma catiônica esteja presente, pois as antocianinas naturais começam a sofrer reação de hidratação em pH aproximadamente 3,0.

4.2.1. Isoterma de Inclusão da cianidina-3-glicosídeo

Assim como os íons flávílios estudados, a intensidade de fluorescência da cianidina-3-glicosídeo, Figura 18, também aumenta com o aumento da concentração do CB[7]. Os espectros de fluorescência da cianidina-3-glicosídeo com adições sequenciais de CB[7] são mostrados na Figura 19.

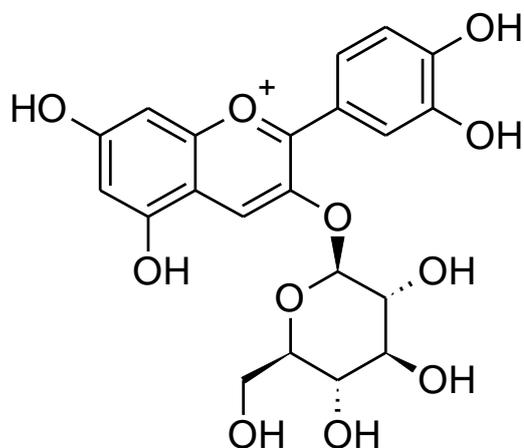


Figura 18: Cianidina-3-glicosídeo

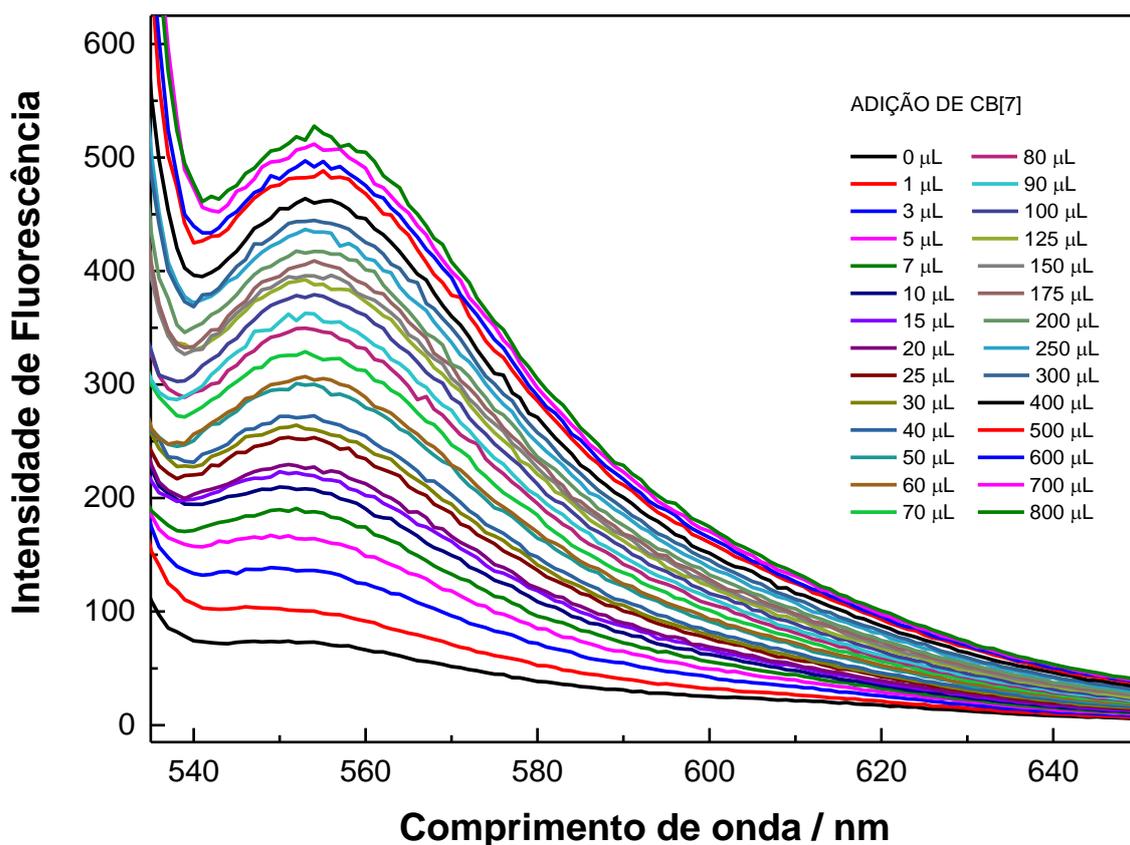


Figura 19: Espectro de fluorescência da cianidina-3-glicosídeo ($4,12 \mu\text{M}$) em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] ($0 - 216,35 \mu\text{M}$), em pH 1,96.

A estequiometria de formação do complexo, antocianina@CB[7], foi realizada pelo mesmo tratamento matemático descrito anteriormente. Pelo método do duplo recíproco a estequiometria 1:1 não se ajusta adequadamente, ou seja, a formação do complexo de inclusão não é inteiramente 1:1, como pode ser visualizado no gráfico do duplo recíproco da Figura 20

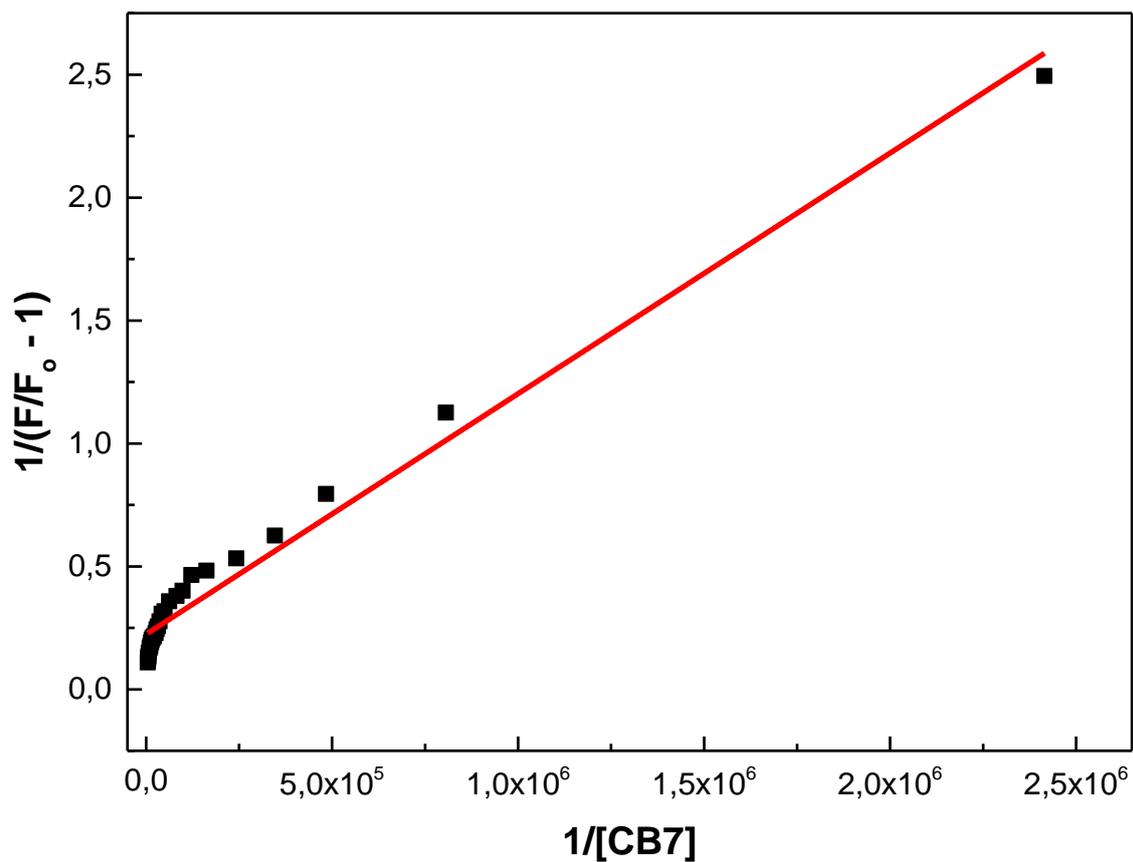


Figura 20: Método do duplo recíproco para a estequiometria 1:1 do complexo cianidina-3-glicosídeo@CB[7].

De acordo com método da regressão não-linear os seguintes resultados para a estequiometria de inclusão foram obtidos.

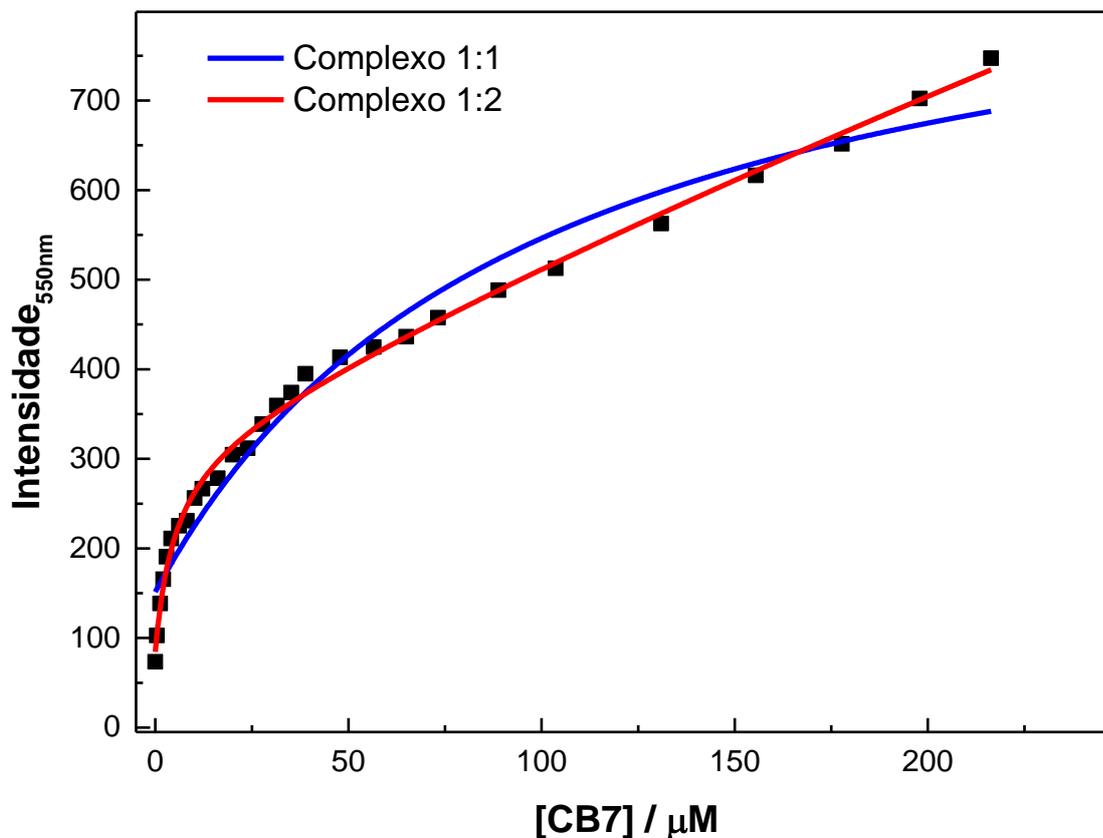


Figura 21: Ajuste de regressão não-linear para a inclusão da cianidina-3-glicosídeo em CB[7]. A linha azul considera a estequiometria 1:1 e a linha vermelha a estequiometria 1:2.

De acordo com o ajuste realizado pelo programa Origin 9.1, pode-se notar que a formação do complexo com estequiometria 1:2 apresenta um melhor ajuste. As constantes de incorporação obtidas foram de $(2,02 \pm 0,49) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $(4,64 \pm 7,33) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para K_{11} e K_{12} , respectivamente. Pode-se perceber que a primeira constante de incorporação K_{11} apresenta um valor da mesma ordem de magnitude dos íons flavílios. Porém, o valor da segunda constante de incorporação exibe um valor muito inferior em relação à magnitude da segunda constante de incorporação dos íons flavílios estudados. Esse valor inferior está relacionado com o impedimento estérico causado pela molécula de glicose no C3 da cianidina-3-glicosídeo, possivelmente essa molécula de açúcar fica exposta para fora da molécula hospedeira, sendo que a unidade glicosídica não apresenta uma boa interação com o CB[7]. O elevado erro da segunda constante

de incorporação também é justificado pelo impedimento estérico provocado pela molécula de açúcar; nesse erro também está incluído o erro da primeira constante de incorporação. Uma possível estrutura do complexo de inclusão é mostrado nas Figuras 22 e 23.

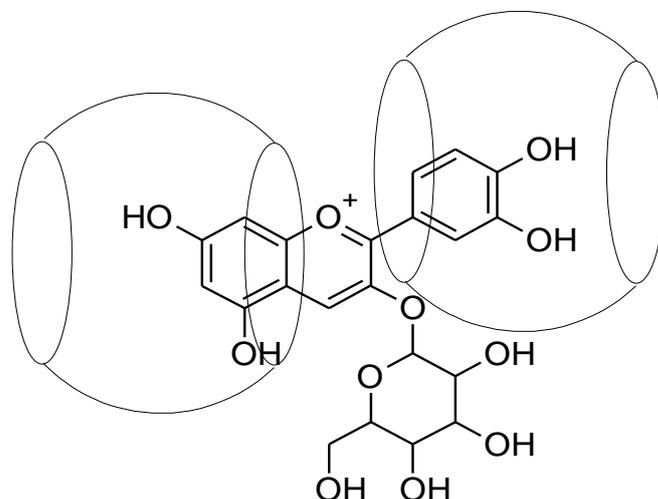


Figura 22: Modelo de inclusão da cianidina-3-glicosídeo em CB[7]

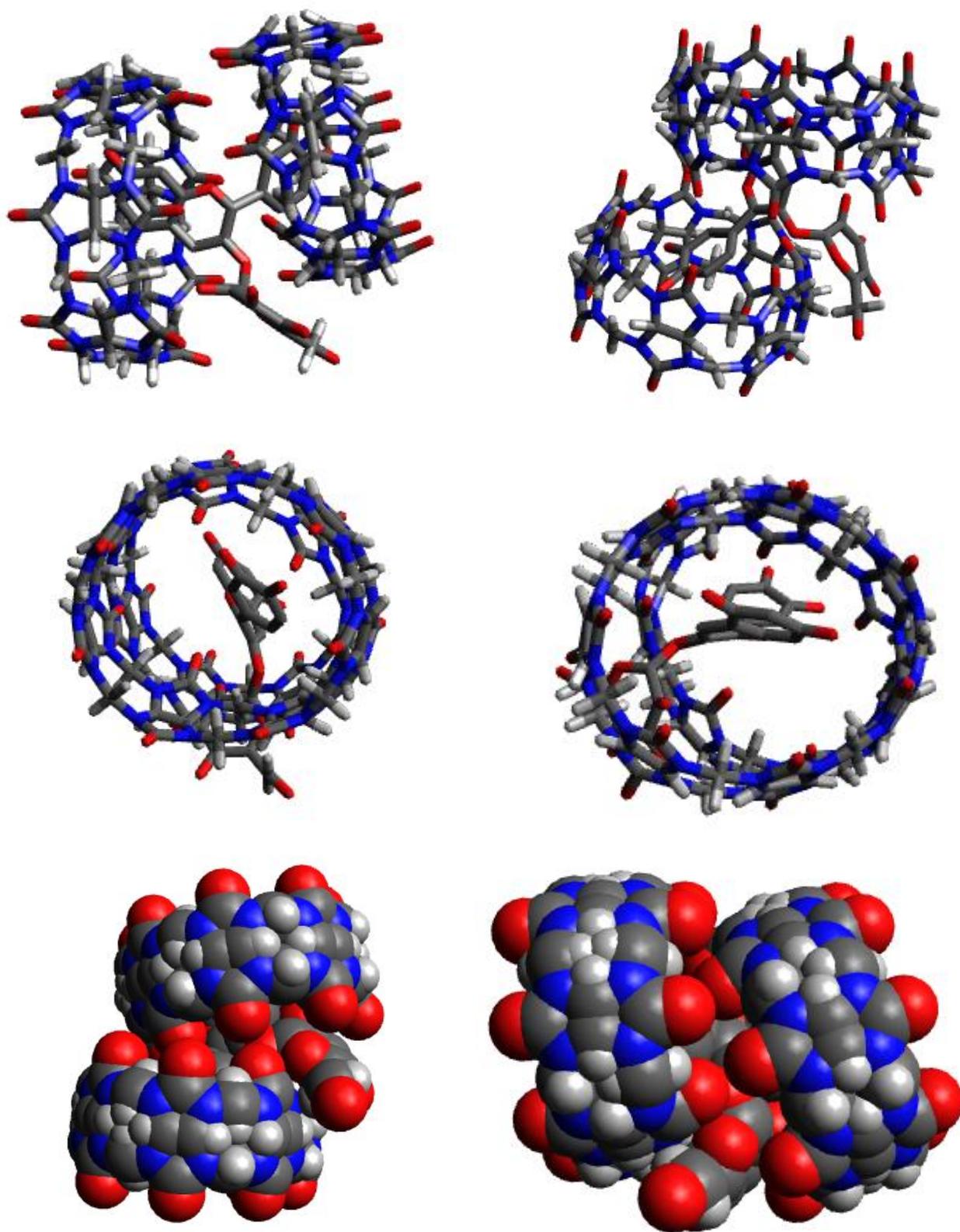


Figura 23: Modelo de inclusão da cianidina-3-glicosídeo dentro da cavidade do CB[7], baseado no programa Avogadro.

4.2.2. Isoterma de Inclusão da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo

Quando o CB[7] foi adicionado à cianidina-3,5-di-O-glicosídeo, Figura 24, também ocorreu um aumento da intensidade de fluorescência. Os espectros de fluorescência da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo com as sucessivas adições de CB[7] são mostrados na Figura 25.

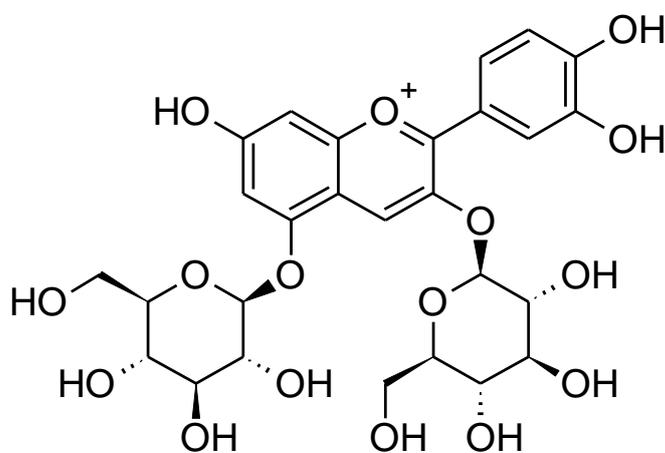


Figura 24: Cianidina-3,5-di-O-glicosídeo

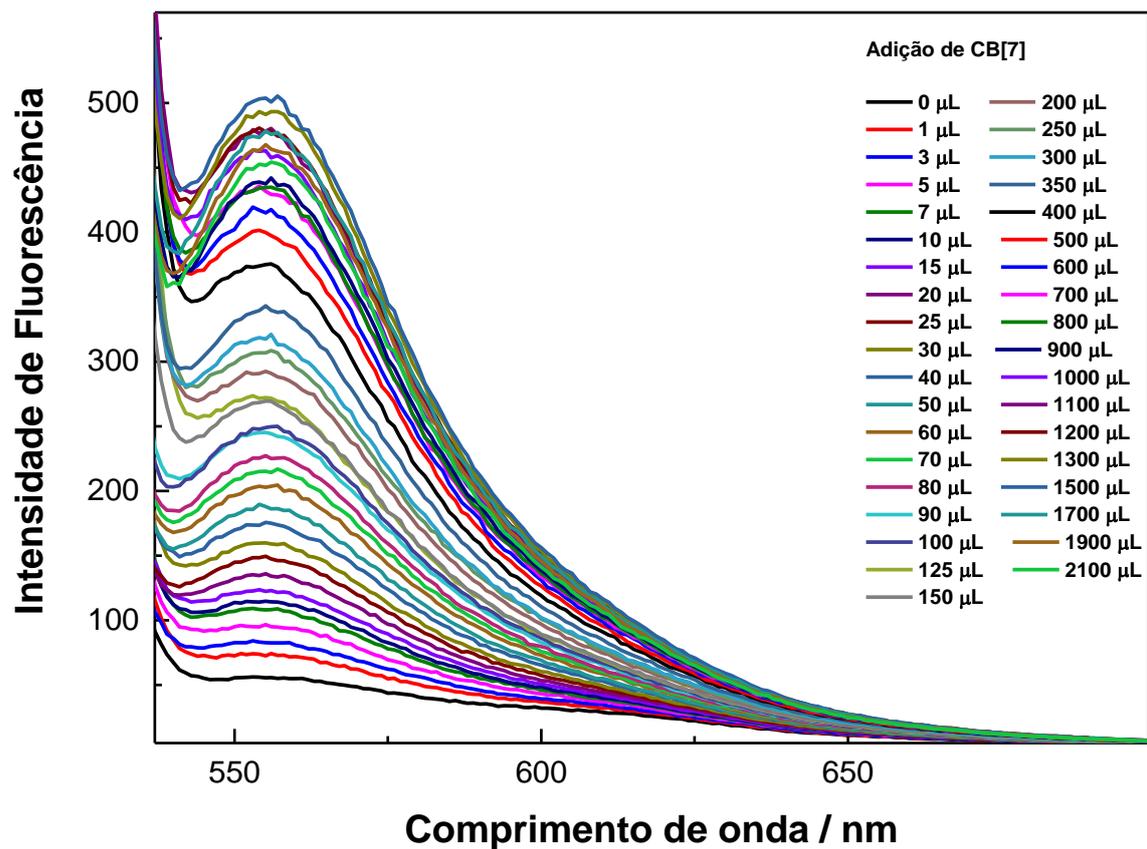


Figura 25: Espectro de fluorescência da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo (3,09 μM) em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] (0 – 363 μM), em pH 1,96.

De acordo com a figura acima, pode-se também notar que há uma inclusão da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo. De novo, de acordo com o método de regressão linear, duplo recíproco, a curva obtida não segue uma estequiometria puramente 1:1, como pode ser visualizada abaixo.

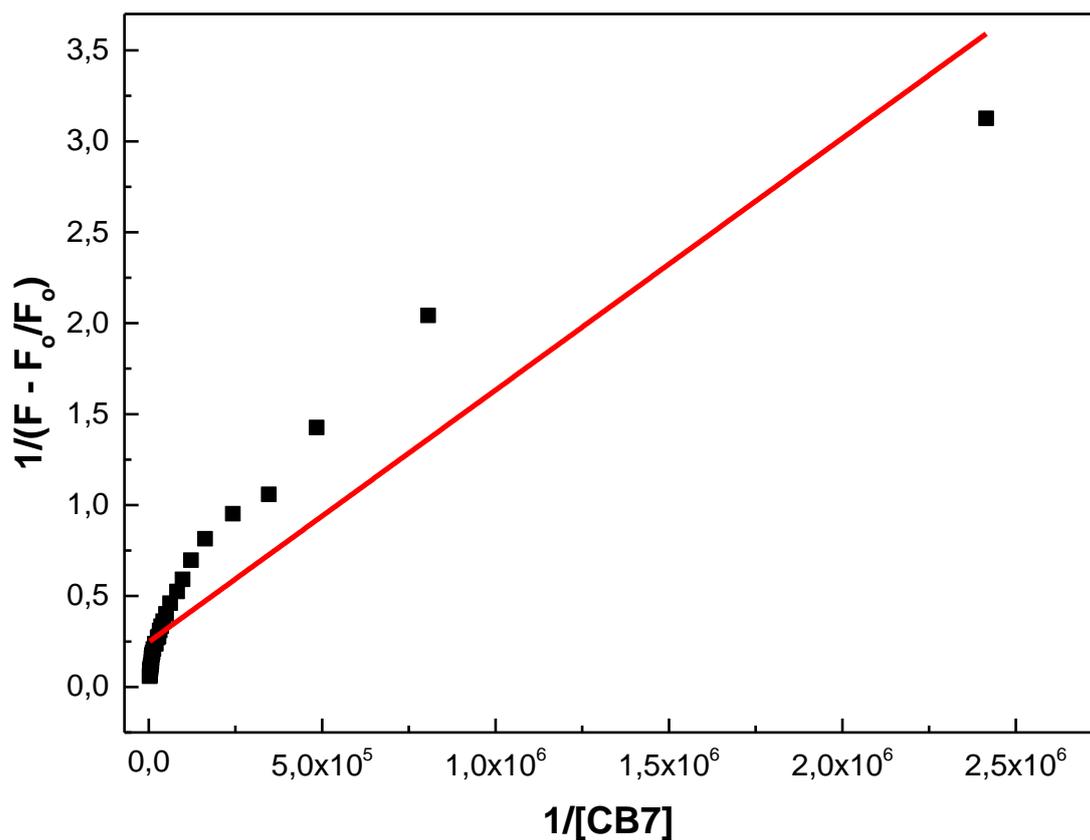


Figura 26: Método do duplo recíproco para a estequiometria 1:1 do complexo cianidina-3,5-di-O-glicosídeo@CB[7].

Pelo método da regressão não-linear o ajuste para estequiometria 1:2 apresentou uma adequação maior do que a estequiometria 1:1, Figura 27.

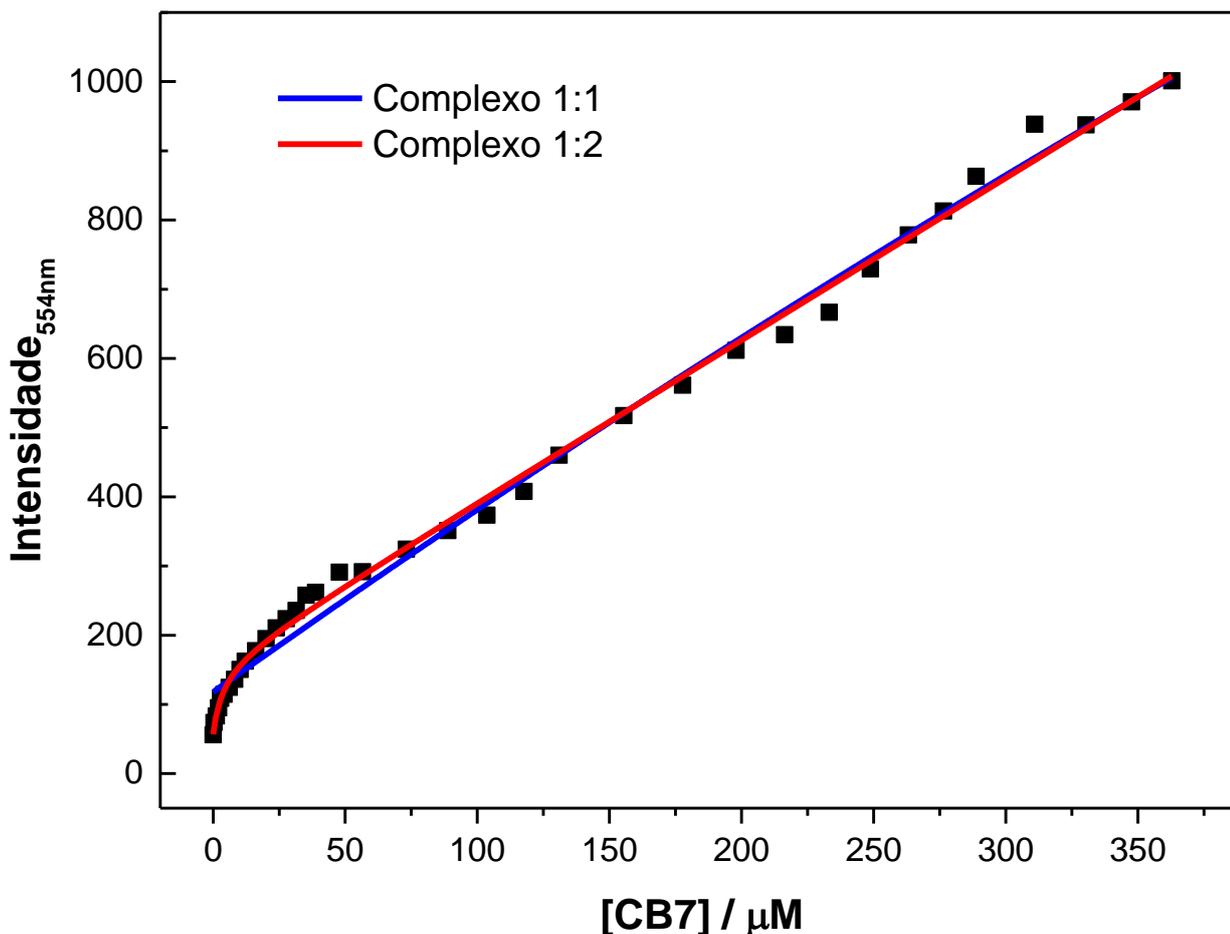


Figura 27: Ajuste de regressão não-linear para a inclusão da cianidina-3-glicosídeo em CB[7]. A linha azul considera a estequiometria 1:1 e a linha vermelha a estequiometria 1:2.

As constantes de incorporação obtidas foram $(2,58 \pm 1,6) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $(0,0083 \pm 1,78) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para os complexos 1:1, K_{11} , e 1:2, K_{12} , respectivamente. O valor extremamente baixo da segunda constante de incorporação está relacionada com o grande impedimento estérico provocado pelas moléculas de glicose, especialmente a molécula ligada no anel A da antocianina, na qual há uma dificuldade da molécula de CB[7] de incorporar essa parte da antocianina. Essa dificuldade de incorporação da segunda molécula de CB[7] reflete no valor do K_{12} . No entanto, que esse valor não é zero, indicando que há uma segunda molécula de CB[7] também pode participar do equilíbrio de inclusão. A Figura 28 mostra a possível estrutura do complexo de inclusão.

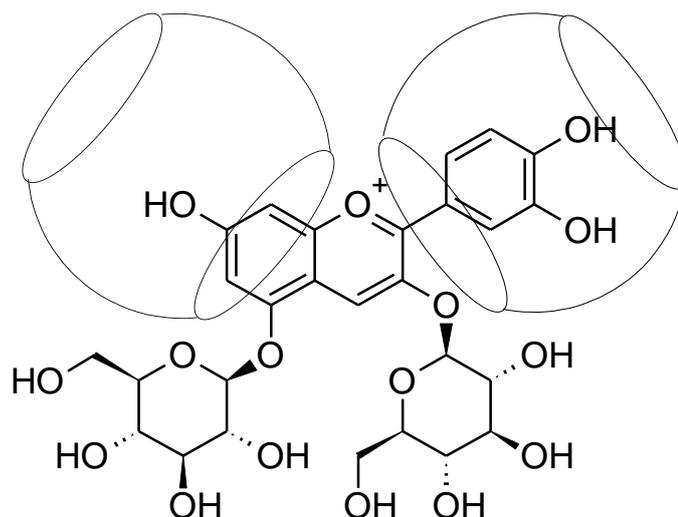


Figura 28: Modelo de inclusão da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo em CB[7].

O modelo do complexo de inclusão obtido pelo Avogadro é mostrado a seguir. Nesse modelo pode-se notar o elevado impedimento estérico provocada pelas moléculas de açúcares, o que justifica o baixo valor da segunda constante de incorporação. A segunda molécula de CB[7] inclui praticamente apenas o grupo hidroxila do anel A e, possivelmente, não há uma interação entre as carbonilas da segunda molécula de CB[7] com o anel pírilio, o que caracteriza um baixo valor da segunda constante.

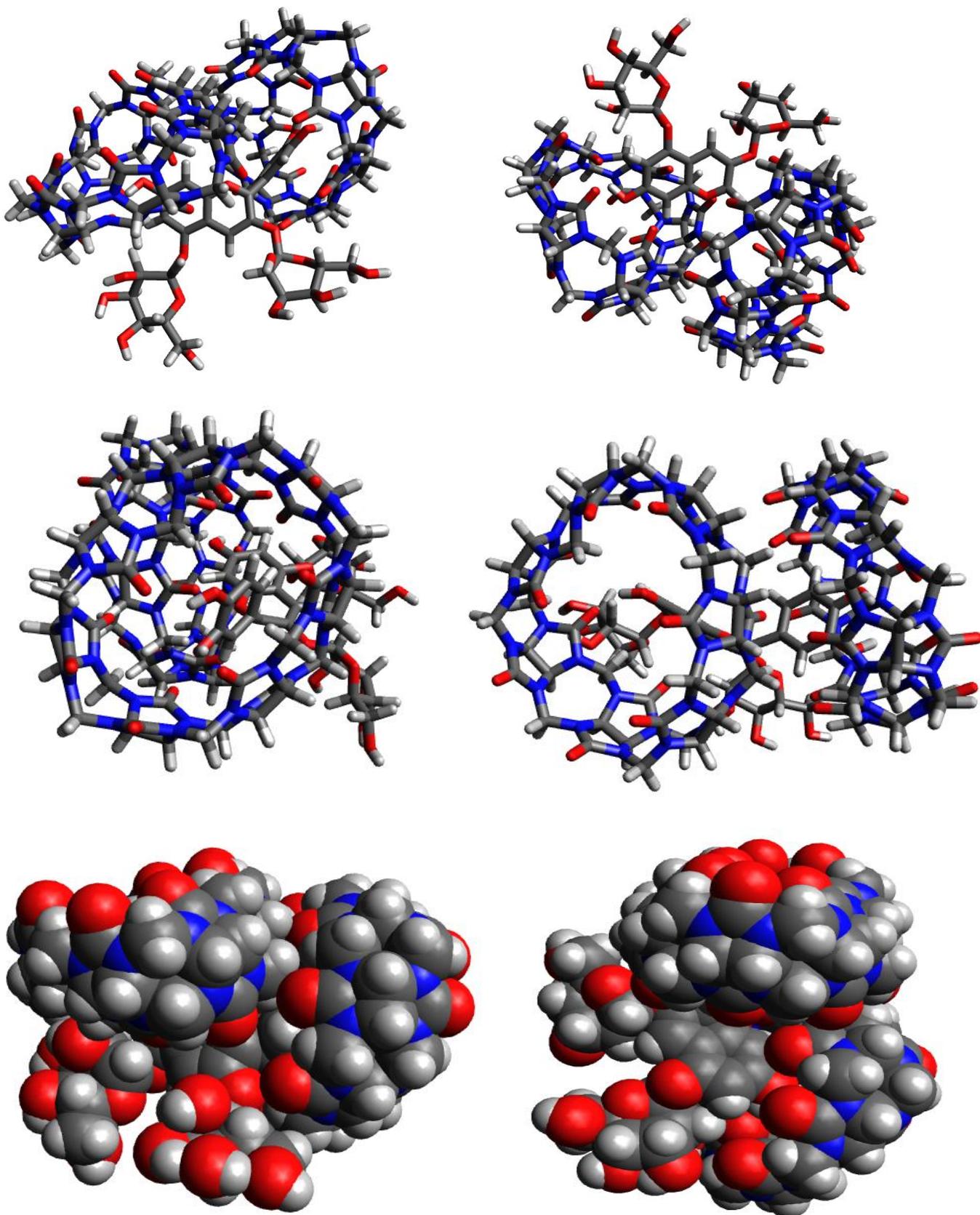


Figura 29: Modelo de inclusão da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo dentro da cavidade do CB[7].

4.2.3. Isotherma de inclusão de antocianinas presentes no extrato do jambolão (*Syzygium cumini*)

O fruto do jambolão (*Syzygium cumini*), um fruto tropical largamente encontrado no Brasil, pertence à família das Myrtaceae e é originário da Ásia tropical. O fruto apresenta uma forma oval, lembrando uma azeitona, e, quando maduro, apresenta uma coloração roxa. É um fruto rico em pigmentos antocianínicos, principalmente na sua casca. (Faria et al., 2011; Jampani et al., 2014; Sari et al.; 2012). Esses pigmentos apresentam diversas propriedades biológicas como antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, antidiabética, anticardiovascular (Faria et al., 2011, Flores et al., 2015, Kruger et al., 2014, Szymanowska et al., 2015). As antocianinas obtidas a partir de frutas, vegetais, ervas, têm um grande potencial como nova fonte de corantes naturais utilizadas em alimentos.

As principais antocianinas encontradas no fruto do jambolão são 3,5-diglicosídeos da malvidina, petunidina, delphinidina, cianidina e peonidina (Faria et al., 2011; Sharma et al., 2016).

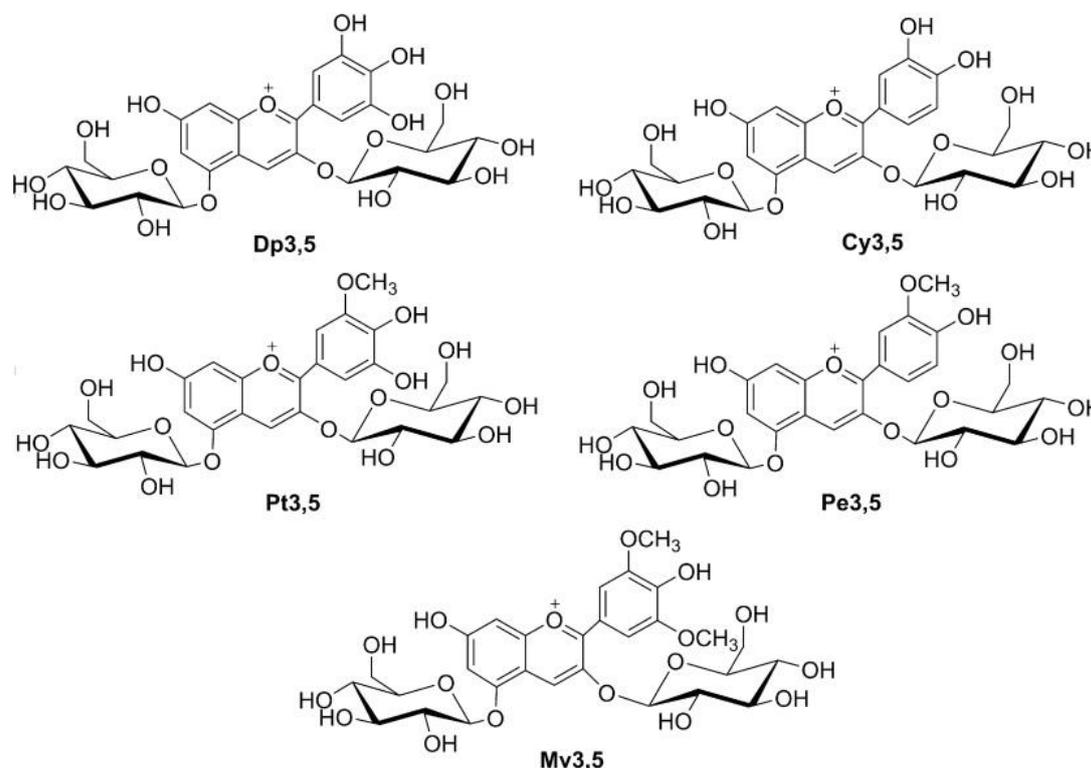


Figura 30: Estrutura das cinco principais antocianinas presentes no jambolão (Sharma et al., 2016)

Antes de realizar a inclusão das antocianinas presentes no extrato do jambolão foi realizado a identificação preliminar desses compostos.

A presença de antocianinas em extratos vegetais pode ser identificada por diversas técnicas a depender dos estudos que serão realizados. Dentro dessas técnicas, a espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-vis) é bastante utilizada apenas para confirmar a presença desses pigmentos, pois em meio ácido as antocianinas apresentam duas bandas distintas de absorção, uma menos intensa na região de 260 a 280 nm e outra mais pronunciada na região de 480 a 550 nm. Entretanto, nada se pode concluir a respeito da estrutura dessa classe de compostos apenas analisando o espectro UV-vis (Março et al., 2008). A Figura 21 mostra o espectro de absorção do extrato purificado do jambolão. De acordo com essa figura há uma banda de absorção máxima em 520 nm e outra em 275 nm. Esse resultado, de acordo com Março e colaboradores, confirma a presença de antocianinas no extrato purificado do jambolão (Março et al., 2008)

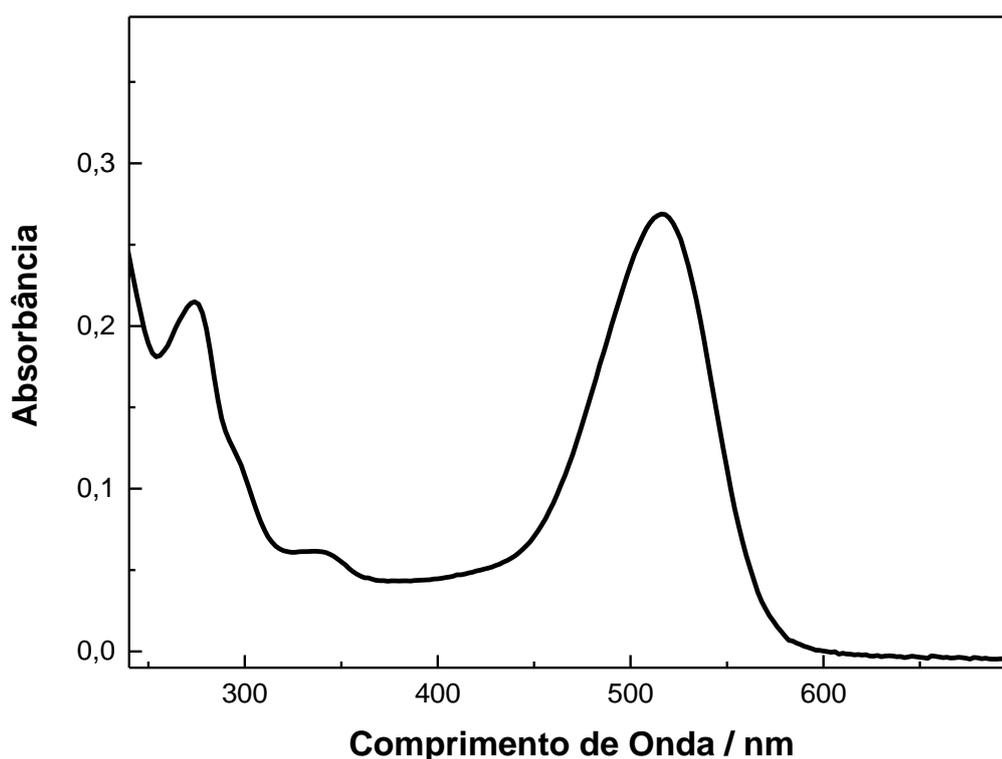


Figura 31: Espectro de absorção de antocianinas presentes no extrato do jambolão em pH 0,82

Outra técnica utilizada para detecção de pigmentos antociânicos é a cromatografia em camada delgada (CCD), na qual a presença ou a ausência de antocianinas pode ser determinada com base na reação que envolve a mudança reversível da coloração em função do pH. O aparecimento de manchas coloridas é o primeiro indício da possibilidade de existência de antocianinas (Março, 2008). A placa cromatográfica, Figura 22, obtido pela técnica de cromatografia em camada delgada confirma a presença de antocianinas no extrato purificado.

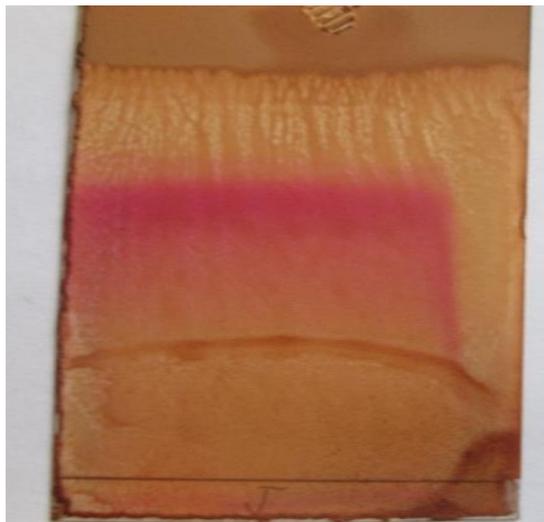


Figura 32: Cromatograma do extrato purificado do jambolão

A presença das antocianinas no extrato do jambolão é evidenciada pelo aparecimento de manchas rosas. A mancha rosa presente no cromatograma indica que as antocianinas presentes no extrato são similares, ou seja, esses pigmentos possuem polaridades semelhantes, resultando em uma dificuldade de separá-las por cromatografia em camada delgada. Assim como na espectrofotometria UV-vis, não é possível obter informações de quais antocianinas estão presentes nesse extrato, pois o intuito foi apenas confirmar a presença das antocianinas.

As antocianinas apresentam uma alta sensibilidade ao pH, sendo este um fator determinante da cor e da estabilidade química desses pigmentos, ou seja, o pH provoca intensas alterações na coloração das antocianinas (Freitas, 2005). A figura a seguir mostra essa variação da coloração do extrato do jambolão em função do pH do meio.

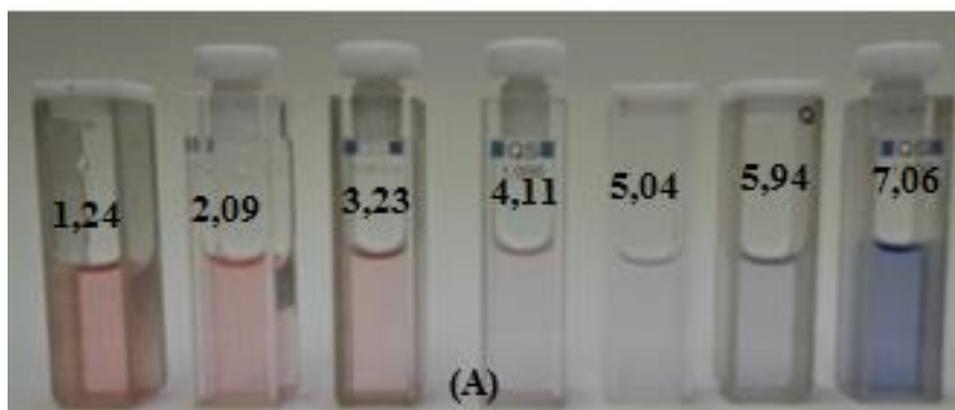


Figura 33: *Coloração apresentada pelas antocianinas presentes no extrato do jambolão em diferentes valores de pH (variação de 1,24 a 7,06)*

Espectrofotometricamente, os resultados frente à variação do pH indicaram um perfil espectroscópico variado, Figura 35, já esperado para essa classe de composto, em função da sensibilidade ao meio. O perfil observado indica o favorecimento de uma banda de absorção por volta de 515 nm, referente ao cátion flavílio, em meio ácido. Essa absorção máxima perde intensidade a medida que o pH do meio aumenta. Em pH superior a 5,0 uma nova banda de absorção surge referente à base quinonoidal. O cátion flavílio e a base quinonoidal são as únicas espécies coloridas em meio aquoso.

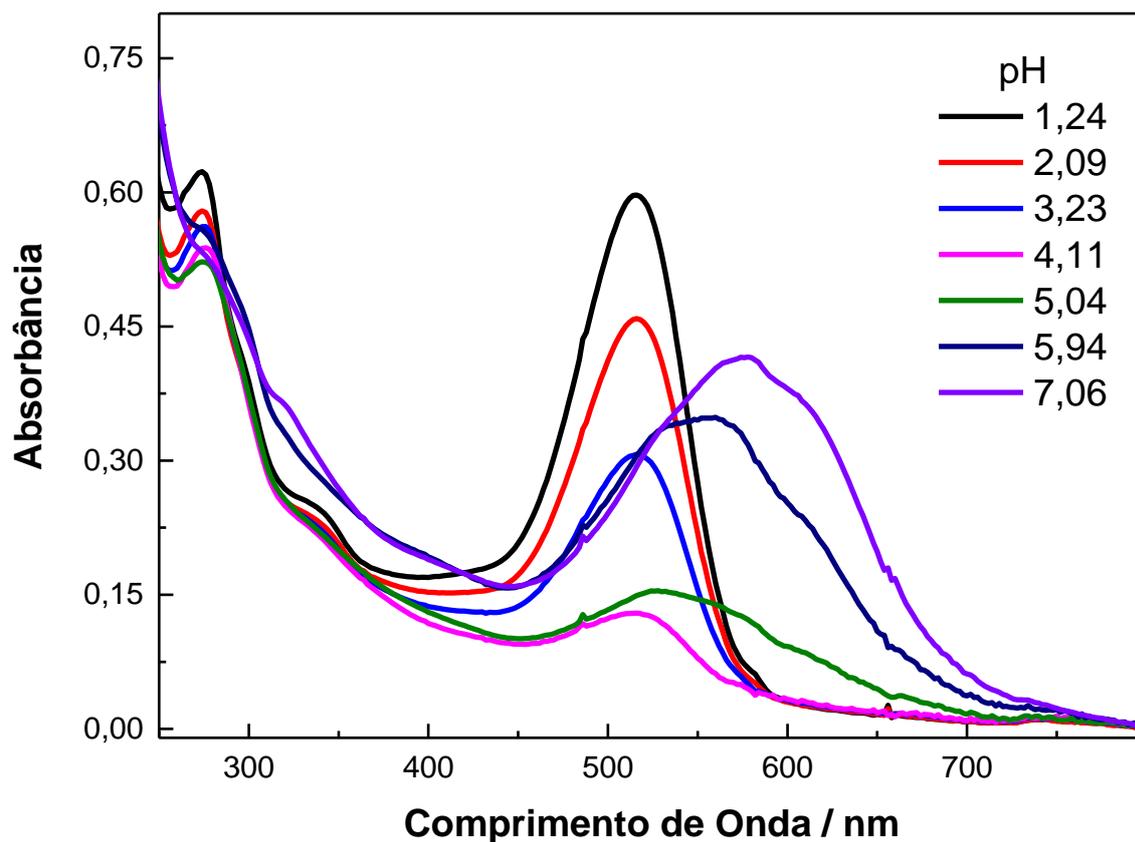


Figura 34: Espectro de absorção do extrato do jambolão em diferentes pHs.

A avaliação do efeito do pH comprova a existência de antocianinas presente no extrato do jambolão. O teor total de antocianinas presentes no extrato é de 3,91 g/L, obtido pelo método do pH diferencial. A isoterma de ligação utilizando o CB[7] foi determinada a partir dos espectros de fluorescência do extrato do jambolão com adições subsequentes do CB[7], mostrados na figura abaixo.

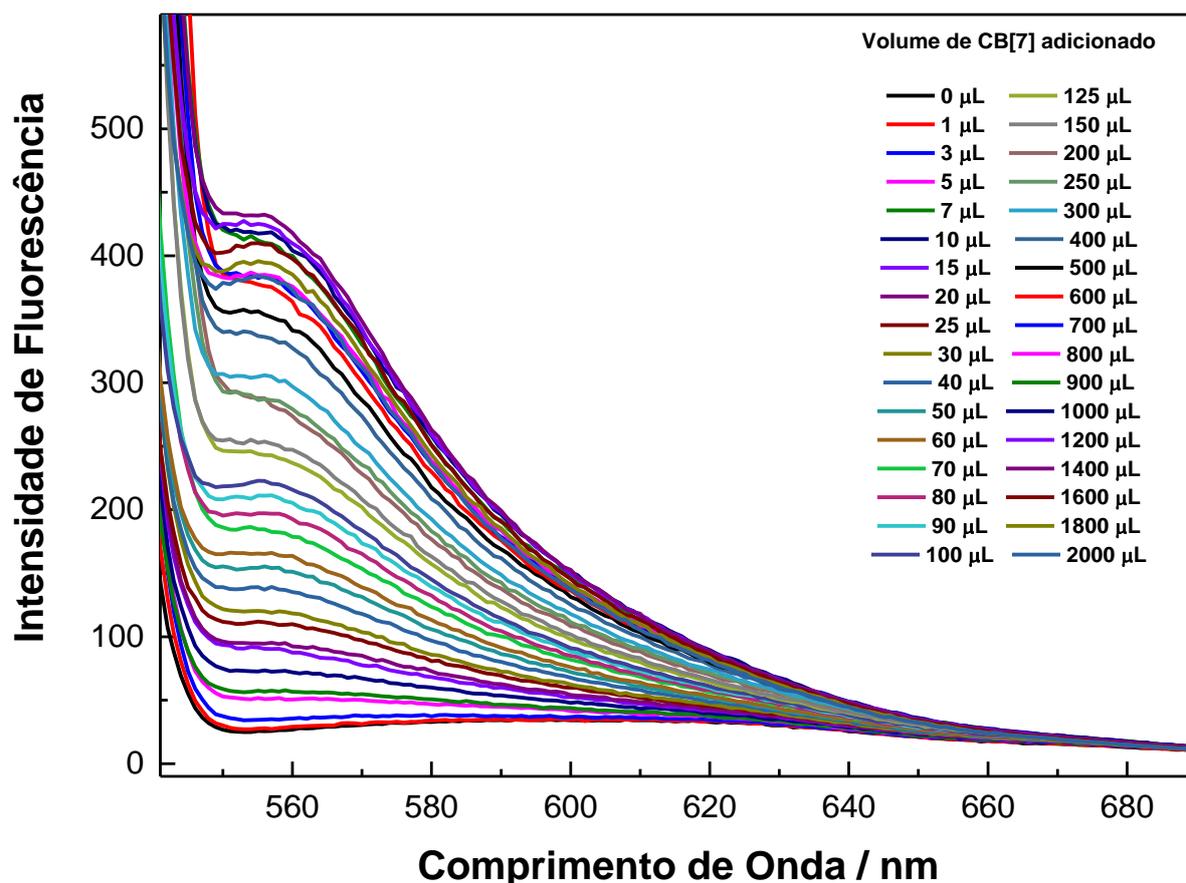


Figura 35: Espectro de fluorescência do extrato do jambolão em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] (0 – 362,83 μM), em pH 1,96.

A partir dos espectros de fluorescência, pode-se perceber que há uma inclusão de antocianinas presentes no extrato pelo macrociclo. Como as antocianinas majoritárias presentes no extrato são derivadas da 3,5-di-glicosídeo, espera-se que o complexo de inclusão seja aproximadamente equivalente à inclusão da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo dentro da cavidade do CB[7].

O tratamento matemático pelo duplo recíproco não mostra uma estequiometria puramente 1:1 (figura em anexo). Logo, pelo método da regressão não-linear pode-se notar que há um favorecimento da estequiometria 1:2.

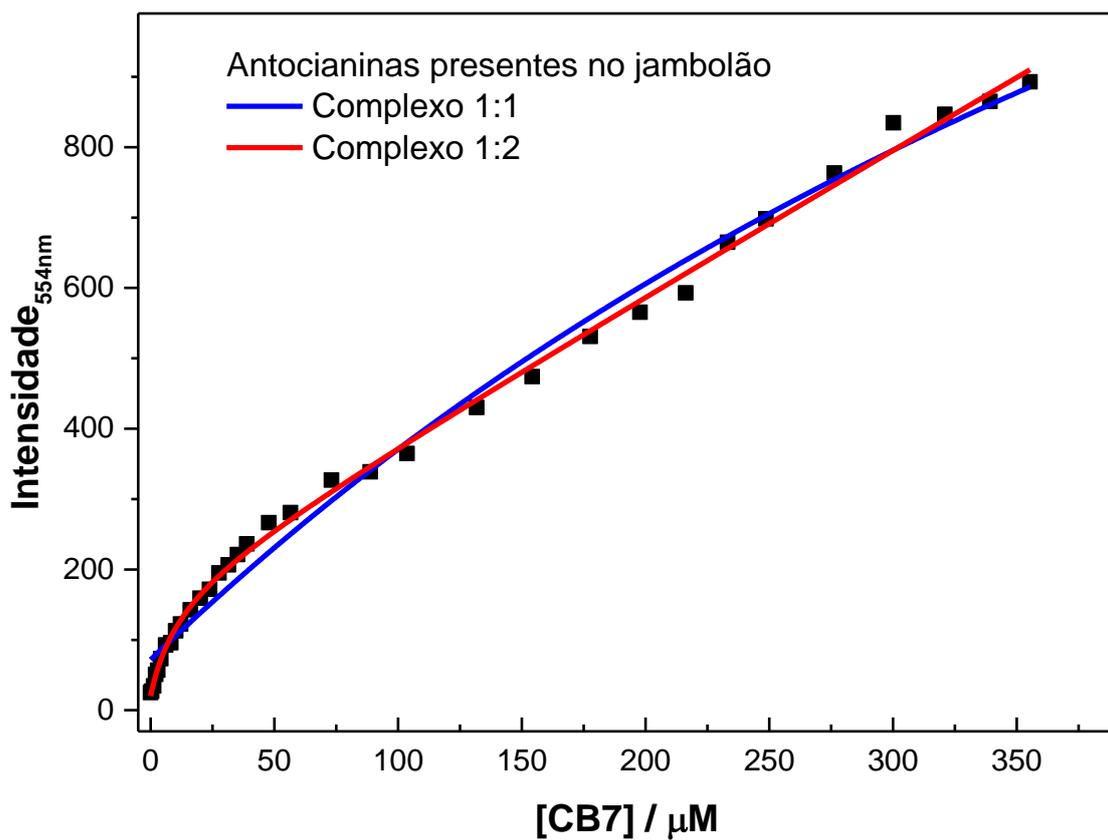
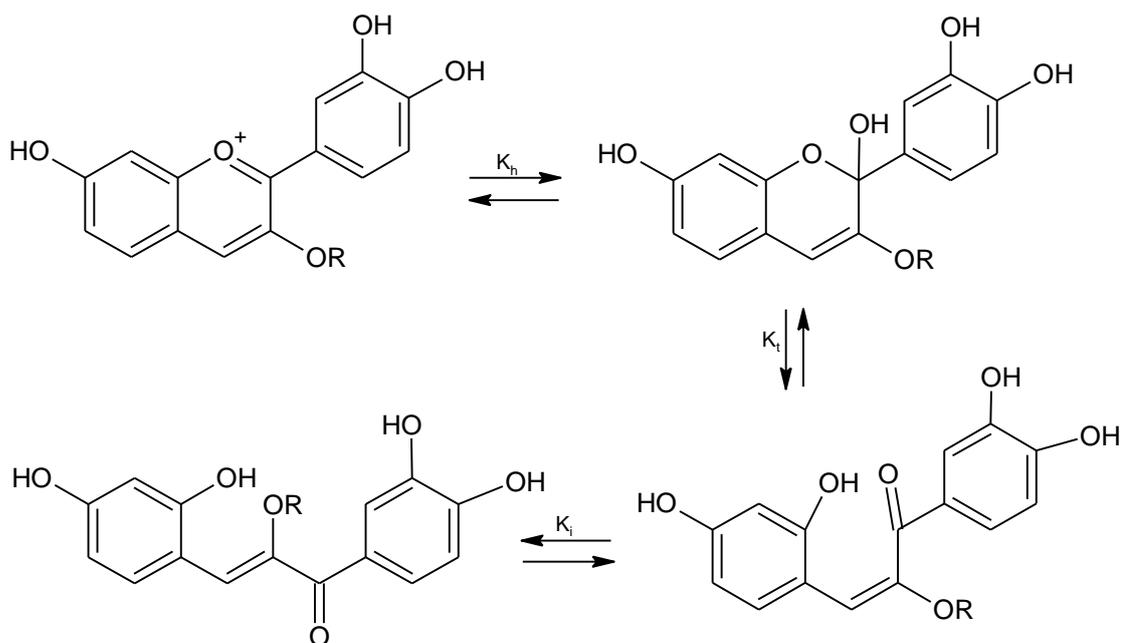


Figura 36: Ajuste de regressão não-linear. A linha azul considera a estequiometria 1:1 e a linha vermelha a estequiometria 1:2.

A constante de incorporação obtida considerando a estequiometria 1:1 foi de $(8,9 \pm 3,6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $(0,26 \pm 2,28) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ para a estequiometria 1:2.

4.3 Cinética de Hidratação-Desidratação de Antocianinas Presentes no Jambolão

A hidratação de antocianinas é um grande problema para a estabilidade desses pigmentos. As antocianinas sofrem ataque nucleofílico da água, fazendo com que o anel C sofra uma abertura transformando nas cis e trans chalconas.



Esquema 2: Reação de equilíbrio de formação das chalconas.

A constante velocidade de hidratação foi obtida através do espectro de absorção na qual a banda de absorção com máximo em 516 nm, referente ao cátion flavílio, foi monitorada em função do tempo num pH de 4,62. A constante de velocidade de hidratação obtida foi de $(1,08 \pm 0,01) \text{ min}^{-1}$, a partir da função monoexponencial pelo programa Oringin 9.1.

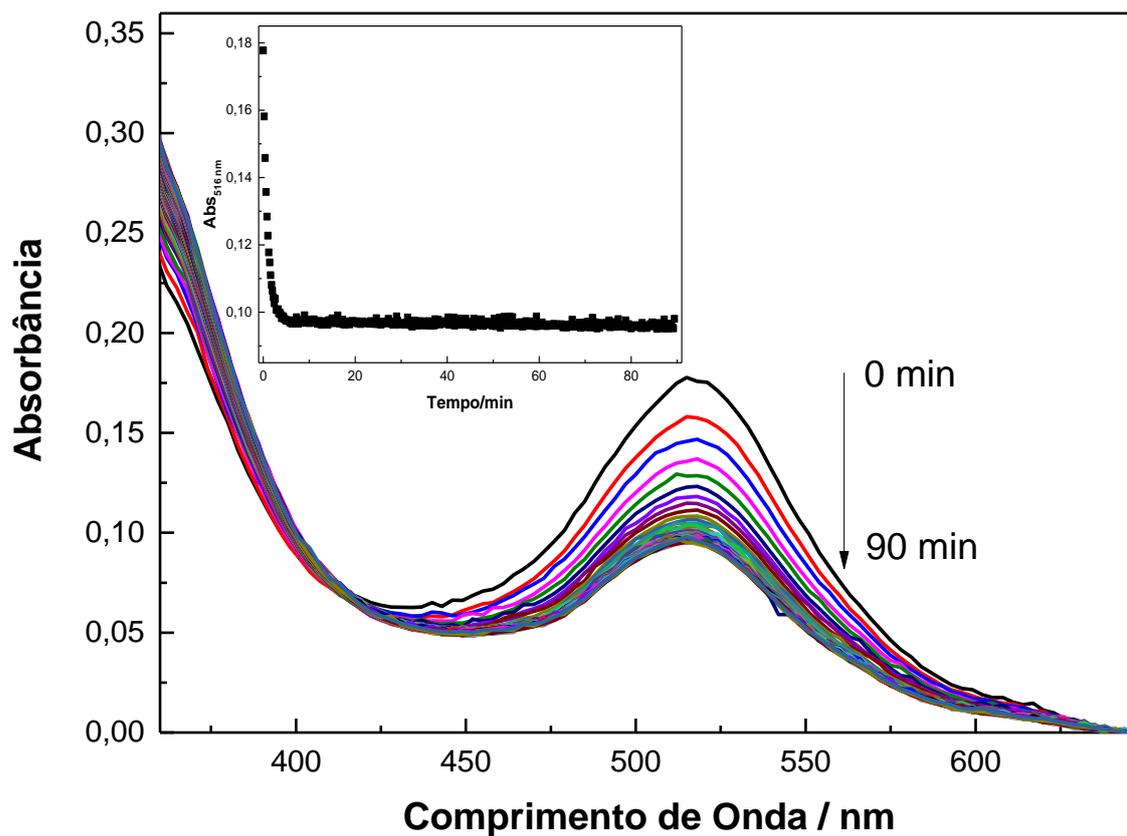


Figura 37: Espectro de absorção em função do tempo das antocianinas do jambolão, mostrando a cinética de hidratação em pH 4,62.

A adição de CB[7] na cela contendo as antocianinas em meio aquoso pH 4,62 provoca um aumento na intensidade no máximo de absorção, como pode ser observado na figura abaixo.

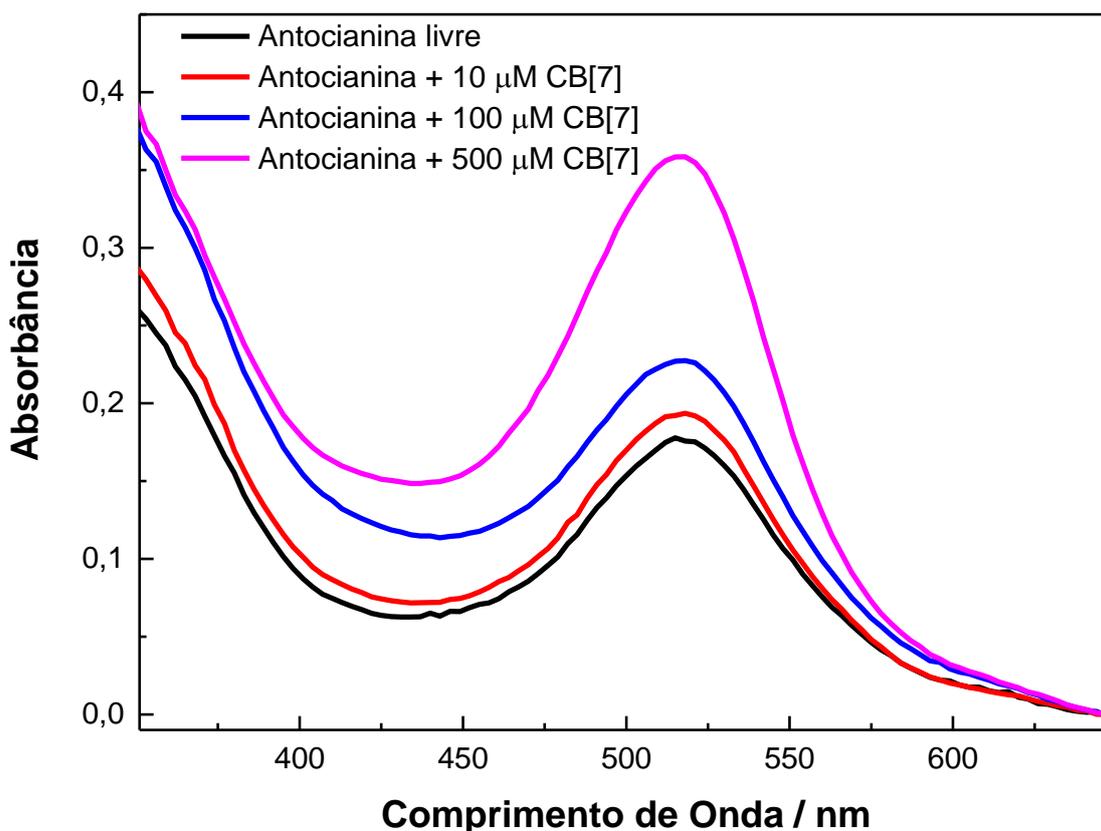


Figura 38: Espectros de absorção das antocianinas presente no jambolão em pH 4,62 obtidos imediatamente após a adição de CB[7].

A hidratação das antocianinas ocorre com uma cinética rápida ($k_h \sim 1-2 \text{ min}^{-1}$), Figura 39 (A). As antocianinas presentes no jambolão foram mantidas por 24 horas em meio aquoso, pH 4,62, para ter certeza que o equilíbrio fosse deslocado em direção de formação das chalconas. Após esse período foi adicionado CB[7] nas concentração de 10, 10 e 500 μM .

A Figura 39 (B) mostra o comportamento das antocianinas presentes no jambolão com e sem a adição de CB[7]. Conforme a figura, pode-se notar que a adição da maior concentração de CB[7], 500 μM , resulta num aumento da intensidade de absorção das antocianinas. Há um deslocamento dos equilíbrios em direção ao cátion flavílio, que é a forma colorida das antocianinas. Essa concentração elevada de CB[7] comprova o efeito de incorporação das antocianinas dentro da cavidade do macrociclo, como foi demonstrado nos resultados anteriores. As antocianinas e os íons flavílios em concentrações elevadas formam complexo de inclusão, majoritariamente, 1:2.

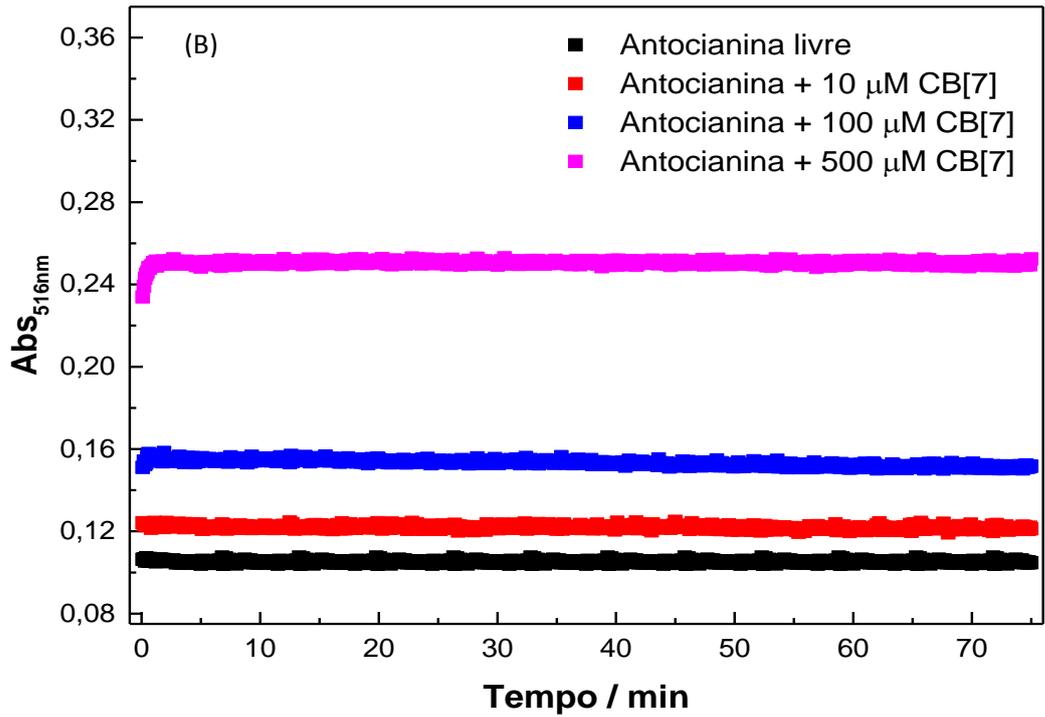
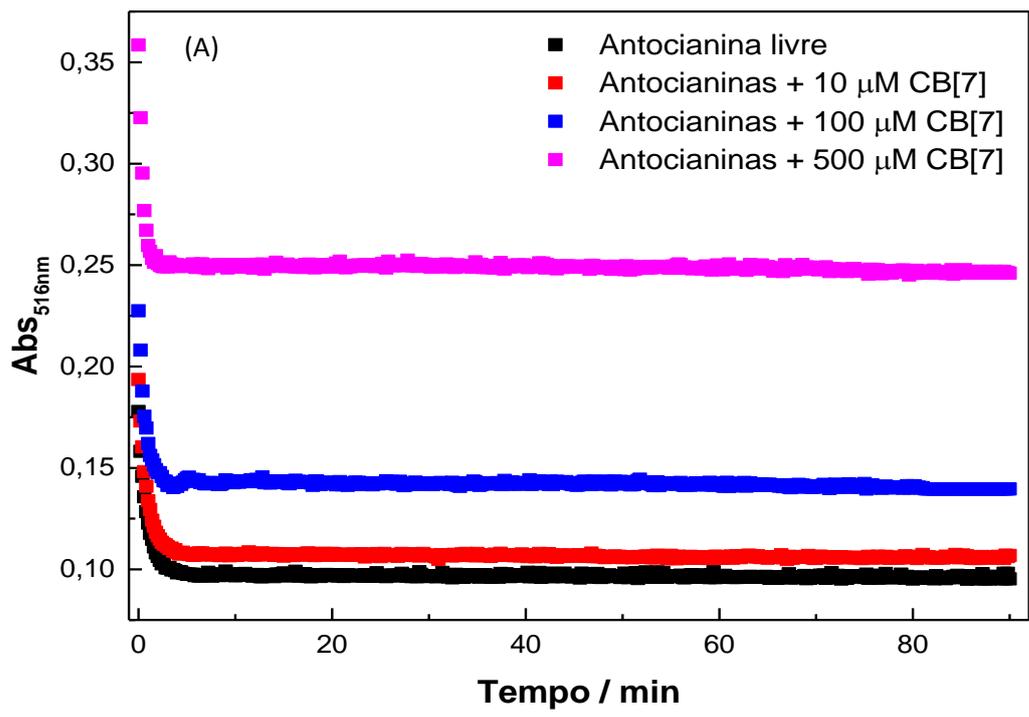


Figura 39: Variação da absorbância das antocianinas do jambolão em diferentes concentrações de CB[7] em pH 4,62. Em (A) a absorbância foi monitorada imediatamente após a adição do extrato e em (B) as antocianinas permaneceram por 24 horas hidratando e depois a CB[7] foi adicionada, e os espectros foram registrados.

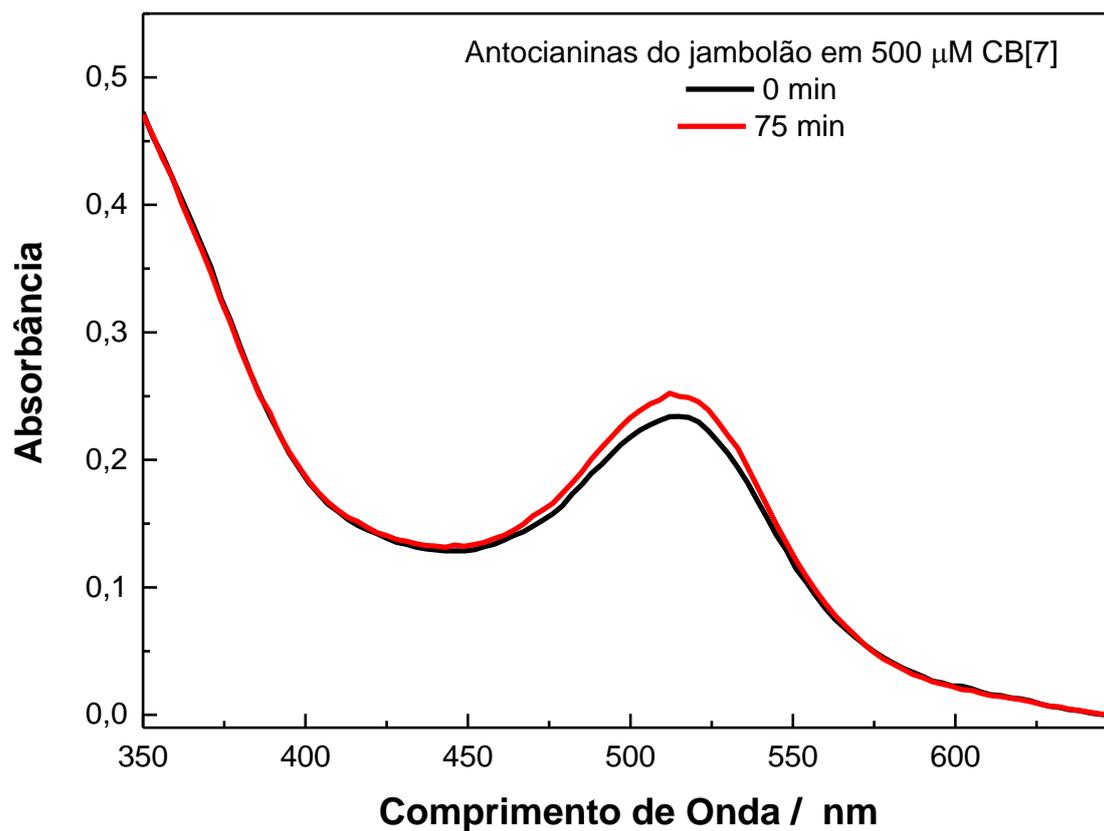
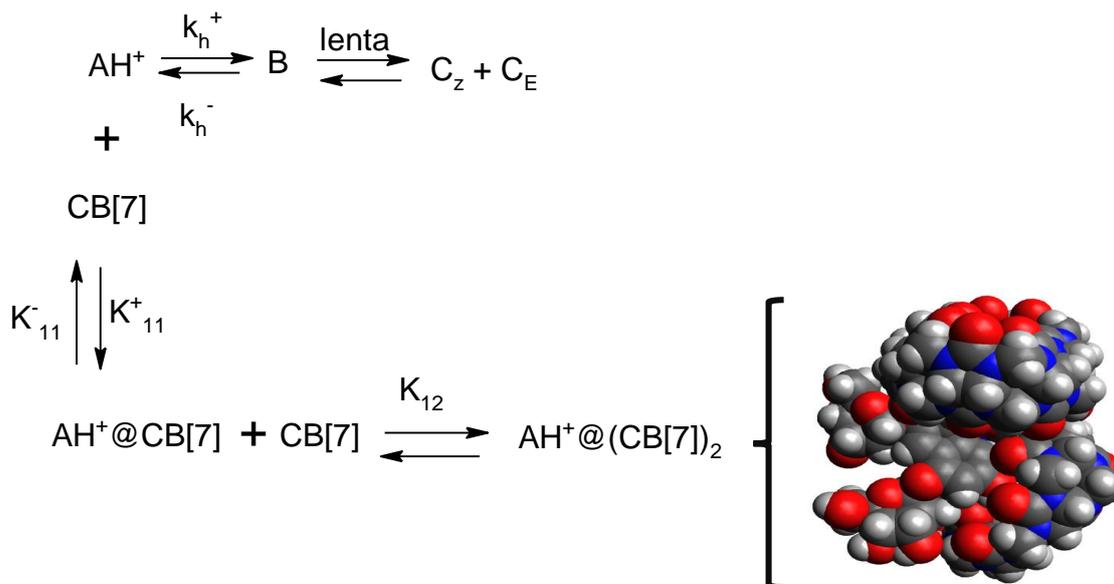


Figura 40: Espectro de absorção das antocianinas do jambolão em fase aquosa, pH 4,6, na presença de CB[7] 500 μ M.



Esquema 3: Representação da reação de hidratação e da incorporação das antocianinas do jambolão em CB[7]

4.4 Titulação UV-Vis do CB[7] com cobaltoceno – Determinação da Porcentagem de Pureza

As amostras de CB[7] frequentemente podem conter certas impurezas como água, cloreto de hidrogênio, sais de amônia e metais alcalinos, introduzidos durante a sua produção e purificação, prejudicando a sua pureza. Além disso, o CB[7] é relativamente higroscópico, podendo facilmente absorver umidade atmosférica. A remoção dessas impurezas é bastante difícil e essa remoção acarreta um longo trabalho. Por outro lado, as impurezas são relativamente inertes nos estudos de ligação hóspede-hospedeiro e a sua remoção não é necessário. Porém, é de extrema importância saber qual é a pureza real do macrociclo estudado (Yi & Kaifer, 2011).

O cobaltoceno (Cob^+) apresenta uma banda de absorção em 261 nm e forma um complexo de inclusão estável com o CB[7], com uma elevada constante de incorporação (Yi & Kaifer, 2011).

Quando o CB[7] é adicionado à solução do cobaltoceno a banda de absorção máxima decresce até uma certa quantidade de CB[7] e depois estabiliza, através do qual é possível determinar a pureza do macrociclo.

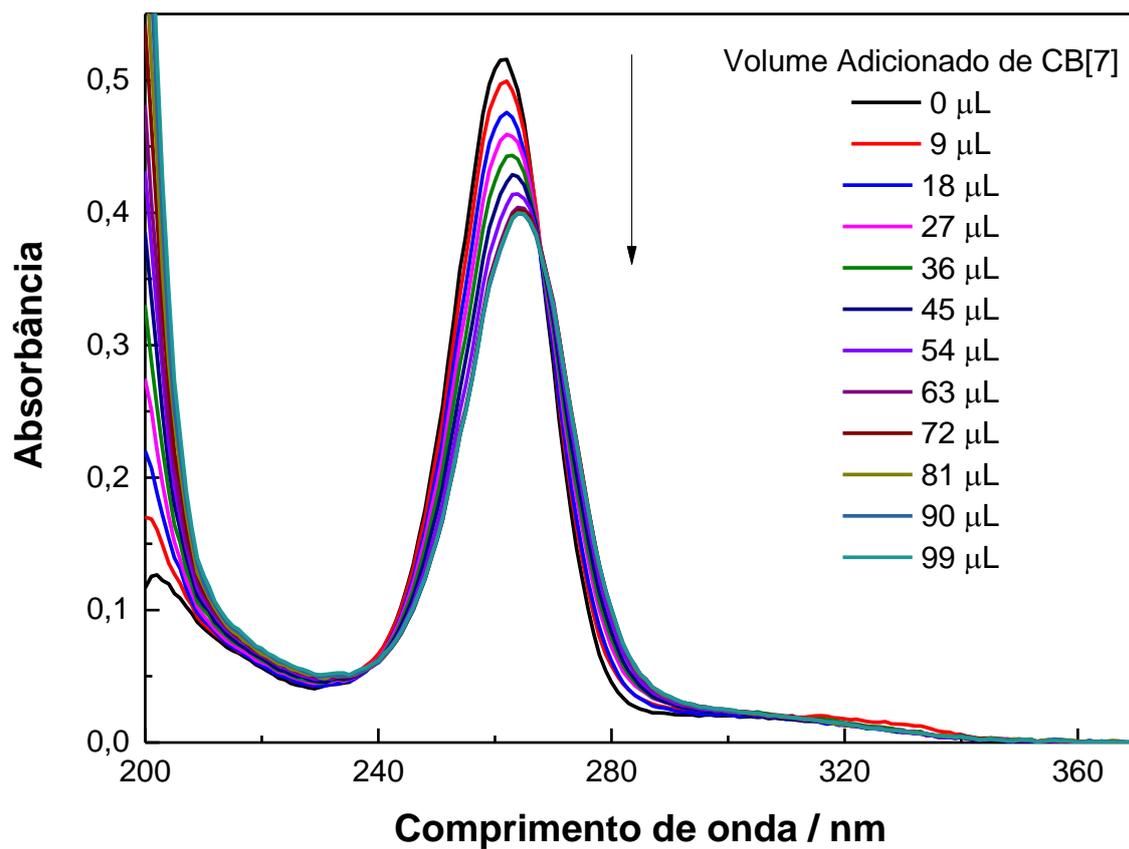
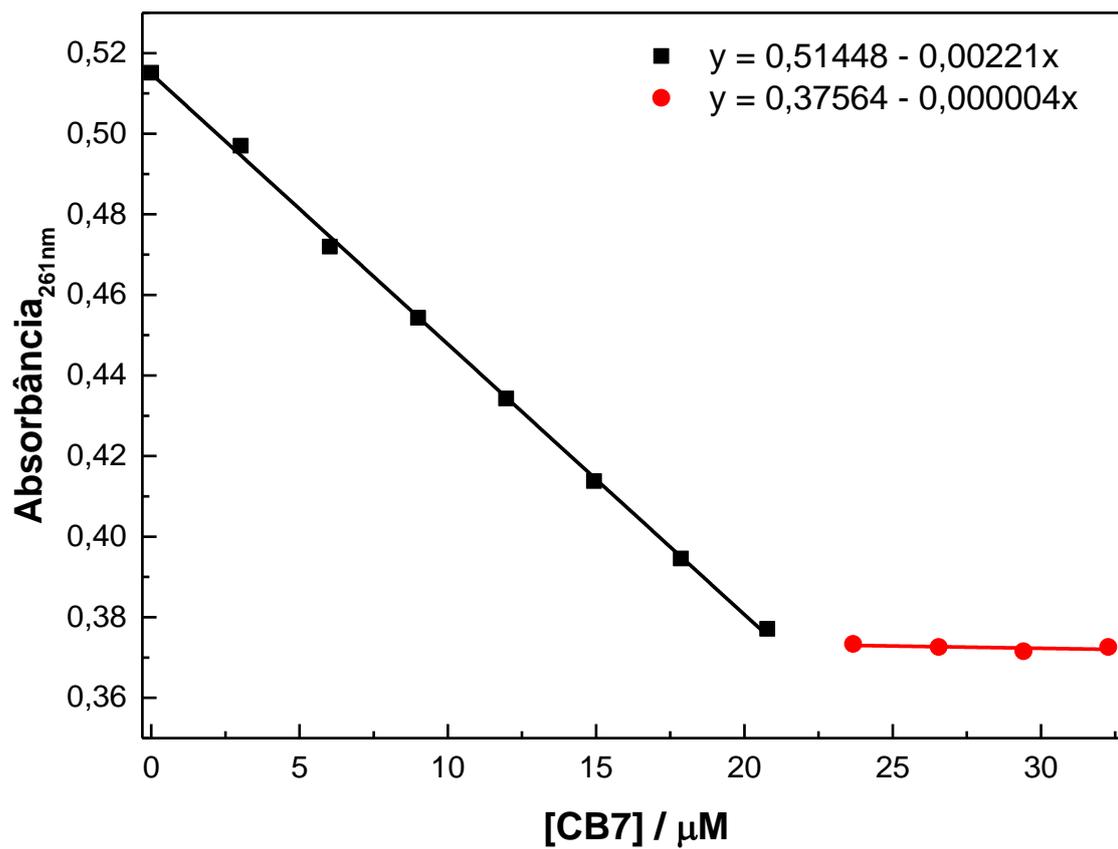


Figura 41: Espectro de absorção do cobaltoceno na presença de várias concentrações de CB[7]:

A pureza da CB[7] pode ser determinada a partir das equações de regressão linear da isoterma de ligação do colbaltoceno em 261 nm.



A pureza total do CB[7] é a razão entre a concentração real e a concentração do CB[7] preparada, considerado que essa concentração tinha 100% da cucurbiturila. Com isso, a pureza total do CB[7] foi de 70%.

5. CONCLUSÕES

Nos últimos anos as cucurbiturilas ganharam bastante atenção em química supramolecular devido a sua habilidade de formar complexos de inclusão estáveis com diversos tipos de moléculas hóspedes como pigmentos orgânicos, cátions metálicos, entre outros.

A inclusão do HMF e do MMF, sais de flavílio, na CB[7] mostrou uma estequiometria de incorporação 1:2, uma molécula hóspede e duas moléculas hospedeiras, com elevadas constantes de incorporação. A primeira constante de incorporação que corresponde à formação de um complexo de inclusão 1:1, apresenta um maior valor em relação à segunda constante de incorporação, para a formação do complexo de inclusão 1:2. Devido à forte interação entre as carbonilas da CB[7] e a carga positiva do anel pirílio, o anel fica alocado no portal da CB[7].

A inclusão das antocianinas naturais também apresentou uma estequiometria de inclusão 1:2. A cianidina-3-glicosídeo apresenta uma segunda constante de incorporação 10 vezes menor em comparação com o K_{12} dos íons flavílio. Essa diferença possivelmente está relacionada com o impedimento estérico provocado pela unidade glicosídica da antocianina, que não é incorporada pelas moléculas do macrociclo. Já com relação à cianidina-3,5-di-O-glicosídeo e as antocianinas presentes no extrato do jambolão, essa segunda constante de incorporação apresenta um valor bem inferior, que também é justificado pelo impedimento estérico provocado pelas moléculas de açúcares na posição 3 e 5 dos anéis C e A da antocianina. Isso sugere que a primeira molécula de cucurbit[7]uril incorpora o anel B das antocianinas naturais, como pode ser visualizado nos modelos de inclusão obtidos pelo programa Avogadro. Nas figuras nota-se claramente a inclusão do anel B por uma molécula do CB[7], com outra parte da antocianina apenas alocada no portal (“boca”) do macrociclo.

A hidratação das antocianinas e dos sais de flavílios sintéticos desimpedidos, na posição 4 resulta na abertura do anel do flavílio, deslocando o equilíbrio em direção de formação das chalconas. O processo de hidratação ocorre através de uma cinética muito rápida, o que caracteriza a dificuldade de trabalhar com esses compostos em meio aquoso. A adição de CB[7] às antocianinas em meio aquoso, pH 4,62, reduz a hidratação desses pigmentos, mas mesmo assim

esses compostos são hidratados. Quando as antocianinas são equilibradas por 24 horas a pH 4,62 e a CB[7] é adicionada, o processo de hidratação é revertido, deslocando o equilíbrio em direção ao cátion flávilio. Essa adição de CB[7] faz com que as antocianinas desidratadas incorporem dentro da cavidade do macrociclo, provocando uma maior estabilidade desses compostos.

Portanto, a utilização de cucurbiturilas para a estabilização da cor das antocianinas e análogos pode ser de extrema importância para diversas aplicações industriais. Com extensão do presente trabalho, seria interessante examinar a incorporação de antocianinas naturais e íons flavílios em cucurbiturilas de tamanho diferentes, como CB[6], CB[8] e CB[10].

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Amic, D.; Trinajstić, N. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction* 2, **1991**, 891-895.
- [2] Andersen, Ø. M.; Jordheim, M. *The anthocyanins*. In: Andersen, Ø. M.; Markham, K.R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Taylor & Francis, Boca Raton, **2006**.
- [3] Apurba, K.; Nau, W. *Supramolecular Journal*, **2007**, 19, 55-66.
- [4] Brouillard, R. *Chemical structure of anthocyanins*. In: Markakis, P. *Anthocyanins as food colors*. Academic Press, Inc., New York, **1982**.
- [5] Brouillard, R.; Chassaing, S.; Isorez, G.; Kueny-Stotz, M.; Figueiredo, P. *The visible flavonoids or anthocyanins: from research and application*. In: Santos-Buelga, C.; Escribano-Bailon, T.; Lattanzio, V. *Recent advances in polyphenol research*. Vol 2, Oxford: Wiley-Blackwell, **2010**.
- [6] Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.L.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. *Food Chemistry*, **2009**, 113, 859-871.
- [7] Chakraborty, B.; Basu, S. *Chemical Physics Letters*, **2011**, 507, 74-79.
- [8] Choudhury, S.D.; Mohanty, J.; Upadhyaya, H.P.; Bhasikuttan, A.C.; Pal, H. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2009**, 113, 1891-1898.
- [9] Christoff, M.; Okano, L.T.; Bohne, C. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2000**, 134, 169-176.
- [10] Cui, C.; Zhang, S.; You, L.; Ren, J.; Luo, W.; Chen, W.; Zhao, M. *Food Chemistry*, **2013**, 139, 1-8
- [11] Demets, G.J. *Química Nova*, **2007**, 30, 1313-1322.
- [12] Denev, P.; Ciz, M.; Ambrozova, G.; Lojek, A.; Yanakieva, I; Kratchanova, M. *Food Chemistry*, **2010**, 123, 1055-1061.
- [13] Drabent, R.; Pliszka, B.; Olszewska, T. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **1999**, 50, 53-58.
- [14] Faria, A. F.; Marques, M. C.; Mercadante, A. Z. *Food Chemistry*, 2011, 126, 1571-1578.
- [15] Fernandes, A.; Sousa, A.; Azevedo, J.; Mateus, N.; Freitas, V. *Food Research International*, **2013**, 51, 748-755.
- [16] Flores, G.; Castillo, M. L. R.; Costabile, A.; Klee, A.; Guergoletto, K. B.; Gibson, G. R. *Journal of Functional Foods*, **2015**, 16, 50-57.
- [17] Freitas, A. A.; Dias, L.G.; Maçanita, A.A.L.; Quina, F.H. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **2011**, 24, 1201-1208.

[18] Freitas, A.A. *Reatividade química e fotoquímica de antocianinas em sistemas organizados*. Tese de Doutorado, IQ, Universidade de São Paulo, **2005**.

[19] Fuleki, T.; Francis, F.J. *Quantitative methods for anthocyanins. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice*. *Journal of Food Science*, **1968**, 33 78-83

[20] Gonçalves, L.C.P.; Marcato, A.C.; Rodrigues, A.C.B.; Pagano, A.P.E.; Freitas, B.C; Machado, C.O.; Nakashima, K.K.; Esteves, L.C.; Lopes, N.B.; Bastos, E.L. *Revista Virtual de Química*, **2015**, 7, 292-309.

[21] Harbone, J.B. *Biochemichal Journal*, 1958, 70, 22-28.

[22] Harbone, J.B. *Phytochemistry*, **1966**, 5, 589-600.

[23] Hou, Z.; Qin, P.; Zhang, Y.; Cui, S.; Ren, G. *Food Research International*, **2013**, 50, 691-697.

[24] Jampani, C.; Naik, A.; Raghavarao. *Separation and Purification Techonology*, 2014, 125, 170-178.

[25] Khedkar, J.K.; Jagtap, K.K.; Pinjari, R.V.; Ray, A.K.; Gejji, S.P. *Journal of Molecular Modeling*, **2012**, 18, 3743-3750.

[26] Koner, A.L.; Ghosh, I.; Salesh, N.; Nau, W.M. *Canadian Journal of Chemistry*, **2011**, 89, 139-147.

[27] Kruger, M.J.; Davies, N.; Myburgh, K. H.; Lecour, S. *Food Research International*, **2014**, 59, 41-52

[28] Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. *Journal of AOAC International*, **2005**, 88, 1269-1278.

[29] Lee, J.W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H.; Kim, K. *American Chemical Society*, **2003**, 36, 621-630.

[30] Li, C-F.; Du, L-M.; Wu, W-T.; Sheng, A-Z. *Talanta*, **2010**, 80 1939-1944

[31] Longo, L.; Vasapollo, G. *Food Chemistry*, **2006**, 94, 226-231.

[32] Março, P.H. *Estudo da influência da radiação e pH no comportamento cinético de antocianinas de plantas do gênero Hibiscus por métodos quimiométricos*. Tese de Doutorado, IQ, Universidade Estadual de Campinas, **2009**.

[33] Março, P.H.; Poppi, R.J.; Scarminio, I.S. *Química Nova*, **2008**, 1218-1223.

[34] Markakis, P. *Anthocyanins as food colors*. Academic Press, Inc., New York, **1982**.

[35] Mateus, N.; Freitas, V. *Anthocyanins as food colorants*. In: Gould, K.; Davies, K.; Winefield, C. *Anthocyanins: biosynthesis, function, and applications*. Springer, New York, **2009**.

[36] Mercadante, A.Z.; Bobbio, F. *Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties*. In: Socaciu, C. *Food colorants: chemical and functional properties*. Taylor & Francis, Boca Raton, **2008**.

[37] Park, J.W. *Fluorescence Methods for studies of cyclodextrin inclusion complexation and excitation transfer in cyclodextrin complex*. In: Douhal, A. *Cyclodextrins materials, photochemistry, photophysics and photobiology*. Elsevier, Oxford, **2006**.

[38] Pina, F. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **1998**, 2109-2116.

[39] Quina, F.H.; Moreira, P.F.; Vautier-Giongo, C.; Rettori, D.; Rodrigues, R.F.; Freitas, A.A.; Silva, P.F.; Maçanita, A.L. *Pure Applied Chemistry*, **2009**, 1687-1694.

[40] Renny, J.S.; Tomasevich, L.L.; Tallmadge, E.H.; Collum, D.B. *Angewandte Reviews*, **2013**, 2-18.

[41] Roque, A. L. D. M., Tese de Doutorado, FCT, Universidade Nova de Lisboa, **2001**.

[42] Sari, P.; Wijaya, C. H.; Sajuthi, D.; Supratman, U. *Food Chemistry*, **2012**, 132, 1908-1914.

[43] Scalzo, J.; Stevenson, D.; Hedderley, D. *Food Chemistry*, **2013**, 139, 44-50.

[44] Sharma, R. J.; Gupta, R. C.; Singh, S.; Bansal, A. K.; Singh, I.P. *Food Chemistry*, **2016**, 190, 808-817.

[45] Singh, M.K.; Pal, H.; Koti, A.S.R.; Sapre, A.V. *Journal of Physical Chemistry A*, **2004**, 108, 1465-1474.

[46] Sweeny, J.G.; Iacobucci, G.A. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **1983**, 31, 531-533.

[47] Szymanowska, U.; Zlotek, U.; Karás, M.; Baraniak, B. *Food Chemistry*, **2015**, 172, 71-77.

[48] Wang, Y.; Peng, X.; Shi, J.; Tang, X.; Jiang, J.; Liu, W. *Nanoscale Research Letters*, **2012**, 7:86

[49] Wang, W-D.; Xu, S-Y. *Journal of Food Engineering*, **2007**, 82, 271-275.

[50] Yi, S.; Kaifer, A. E. *The Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 76, 10275-10278.

[51] Zangh, H.; Liu, L.; Gao, C.; Sun, R.; Qiaochun, W. *Dyes and Pigments*, **2012**, 94, 266-270.

[52] Zhou, Y.; Yang, J.; Liu, M.; Wang, S.; Lu, Q. *Journal of Luminescence*, **2010**, 130, 817-820.

7. APÊNDICES

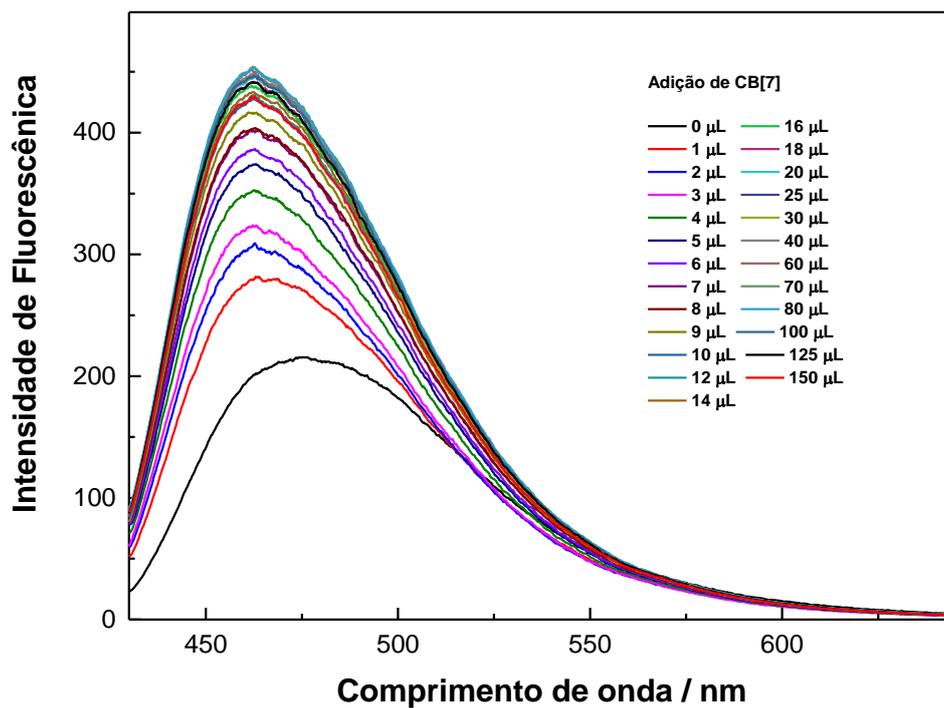


Figura 42: Espectro de fluorescência do MMF (0,2 μM) em solução aquosa na presença de várias concentrações de CB[7] (0-32,24 μM), em pH 3,0.

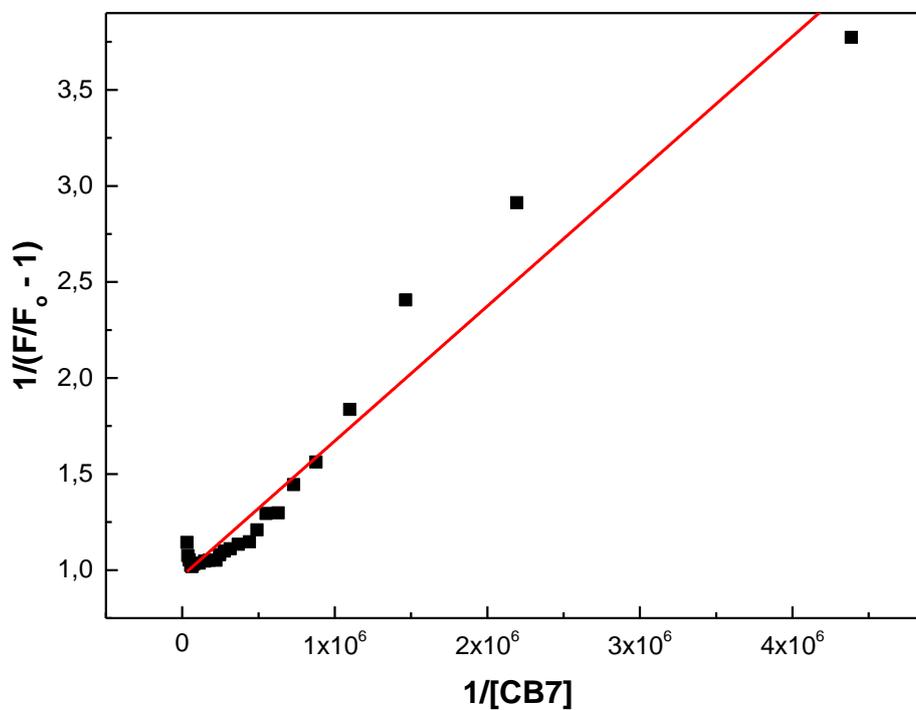


Figura 43: Método do duplo recíproco para a complexação 1:1, MMF@CB[7]

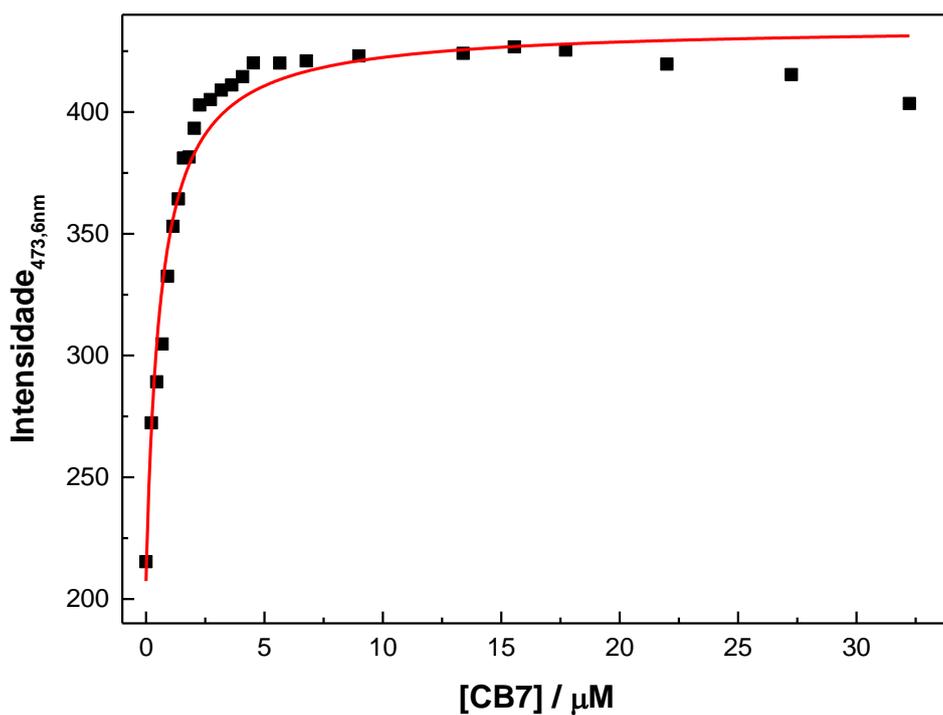


Figura 44: Intensidade de fluorescência versus a [CB[7]] do MMF complexado com CB[7]. A linha representa o ajuste de regressão não linear aos dados experimentais considerando a estequiometria 1:1, MMF@CB[7], usando a equação 6

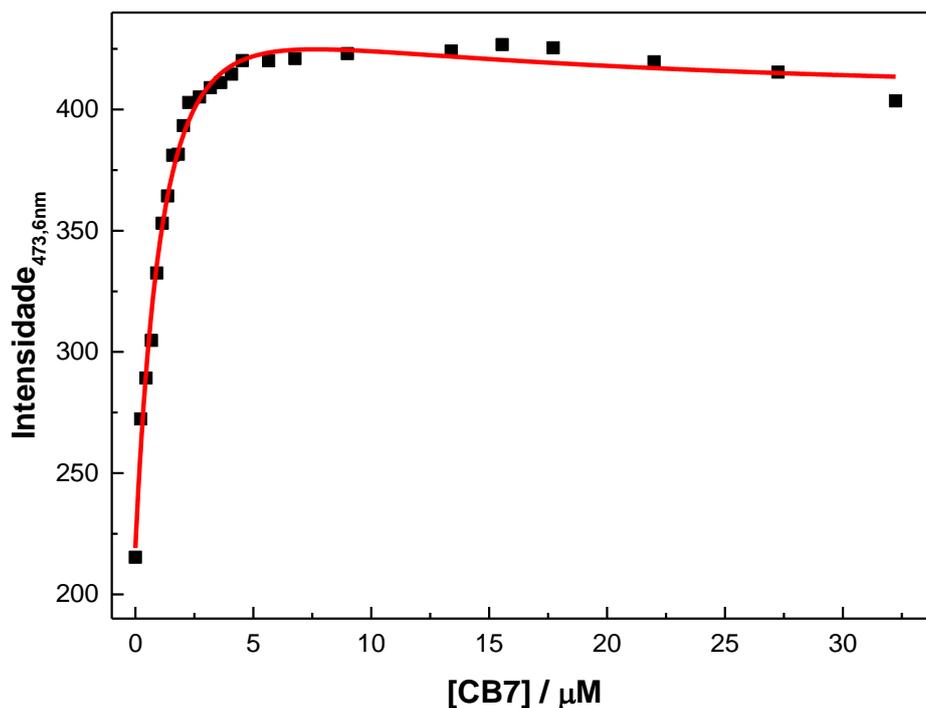


Figura 45: Intensidade de fluorescência versus a [CB[7]] do MMF complexado com CB[7]. A linha representa o ajuste de regressão não linear aos dados experimentais considerando a estequiometria 1:2, $MMF@(CB[7])_2$, usando a equação 7

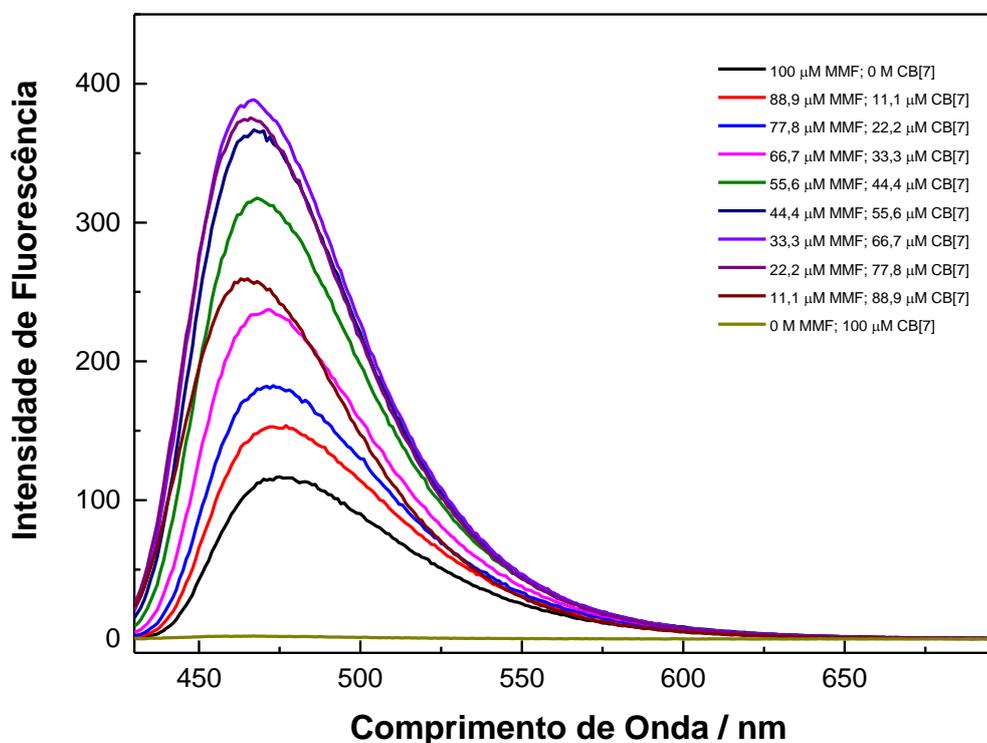


Figura 46: Espectros de fluorescência do MMF para o método da variação contínua: MMF-CB[7]

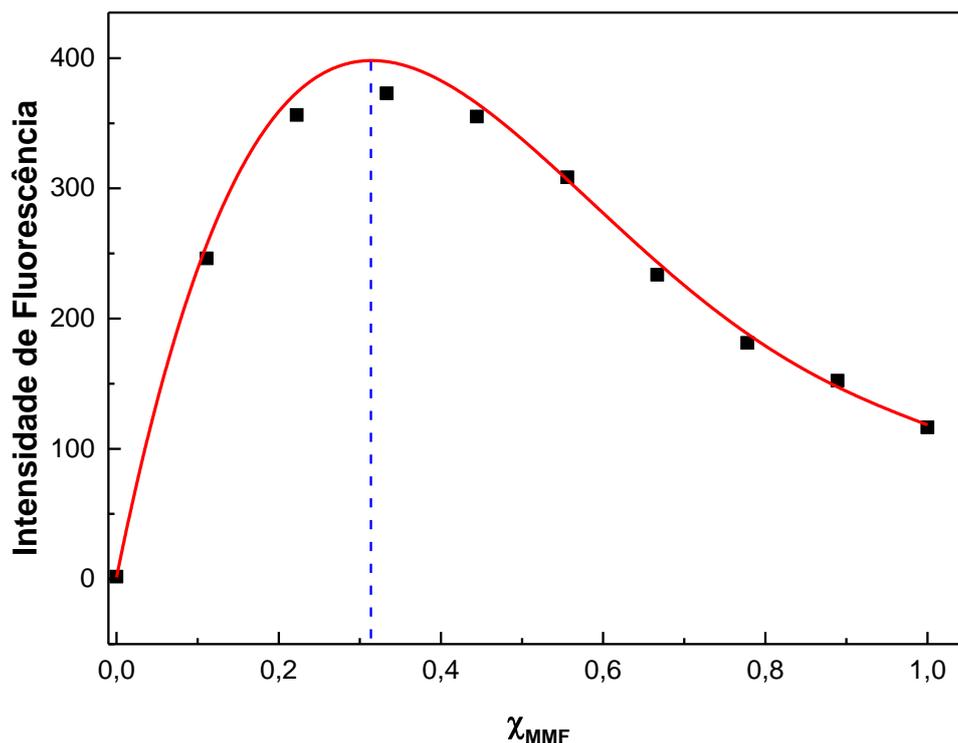


Figura 47: Job plot para a inclusão do MMF em CB[7], mostrando a estequiometria 1:2.

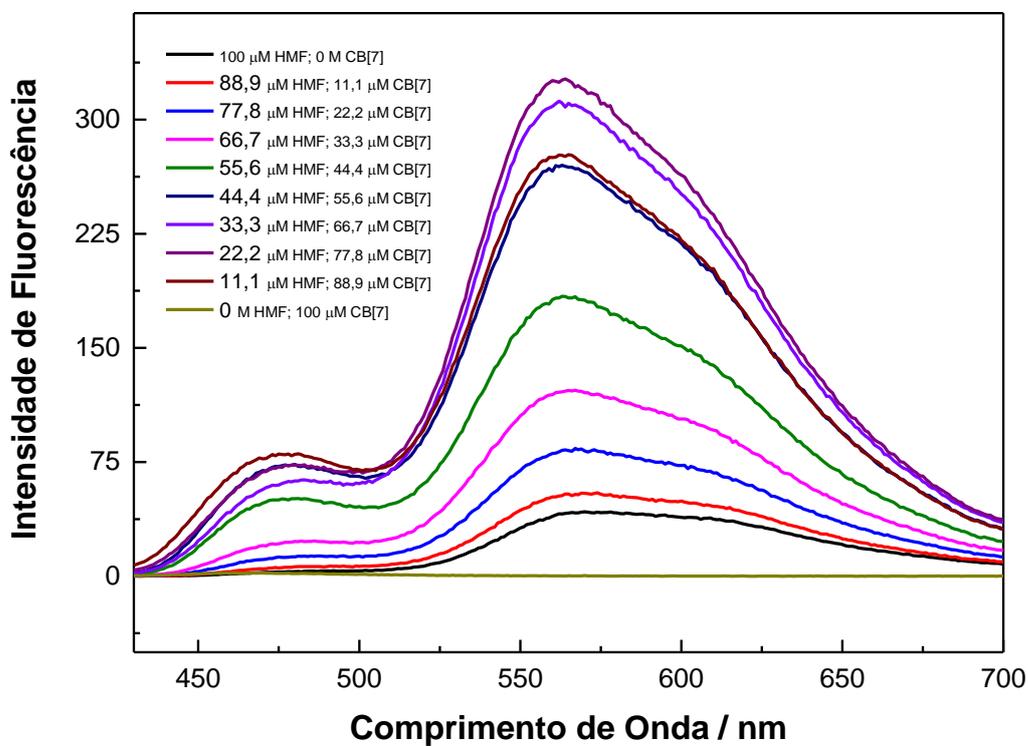


Figura 48: Espectros de fluorescência do HMF para o método da variação contínua: HMF-CB[7]

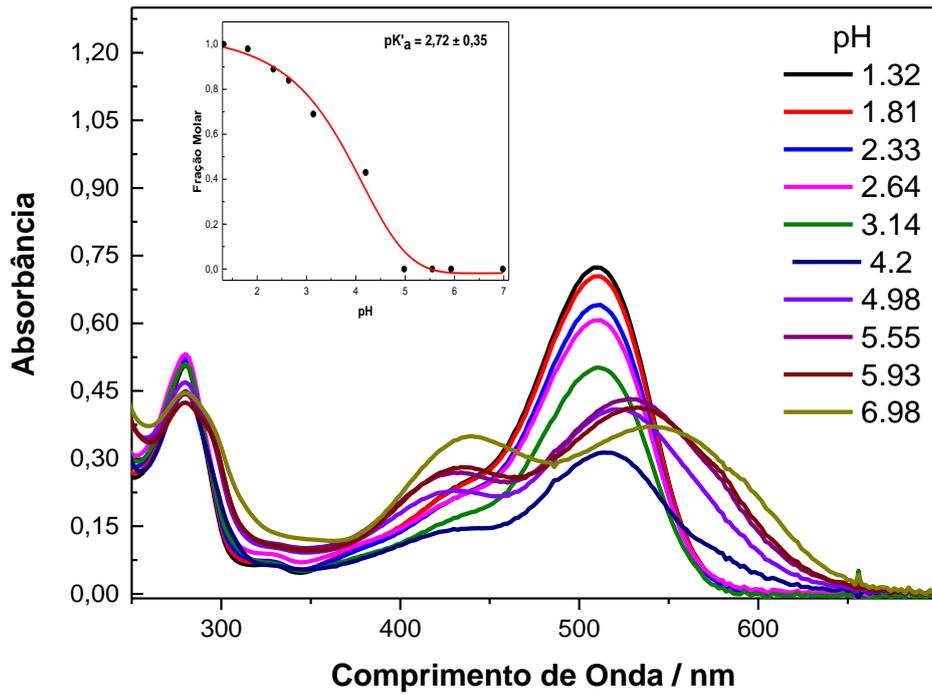


Figura 49: Especificação da cianidina-3-glicosídeo com o seu respectivo pK_h .

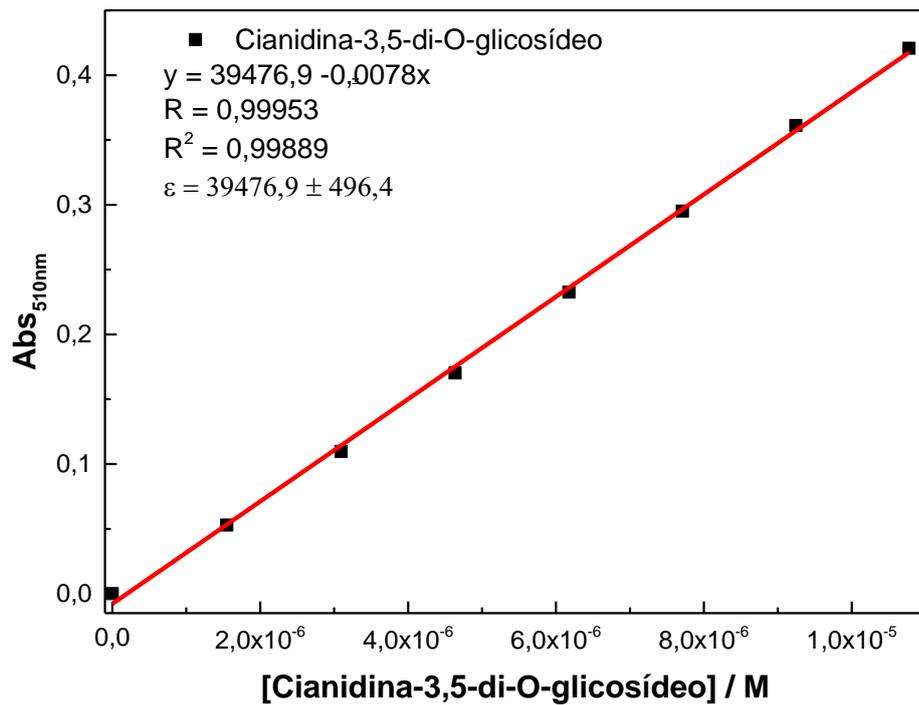


Figura 50: Determinação da absorptividade molar da cianidina-3,5-di-O-glicosídeo.

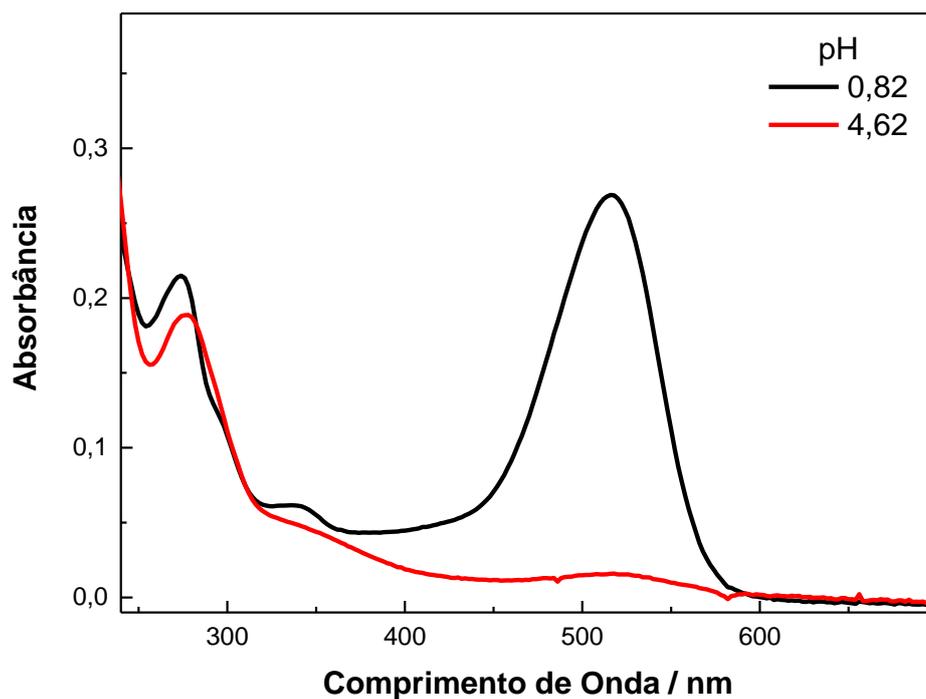


Figura 51: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em pH 0,82 e pH 4,62 para a quantificação pelo método do pH diferencial.

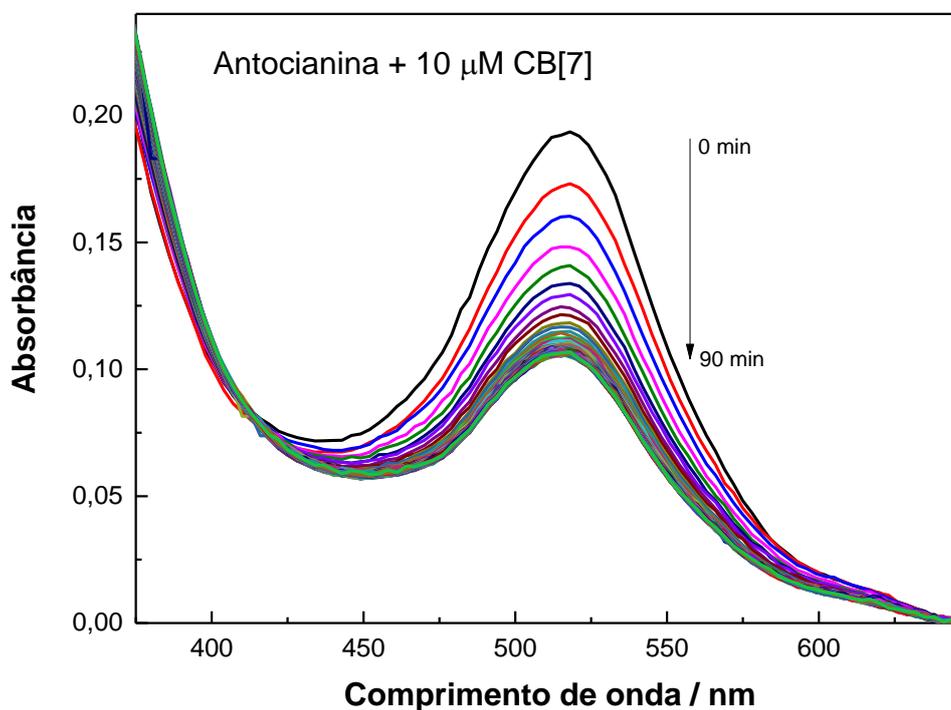


Figura 52: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de 10 μM CB[7]. Os espectros foram registrados imediatamente após o preparo da amostra.

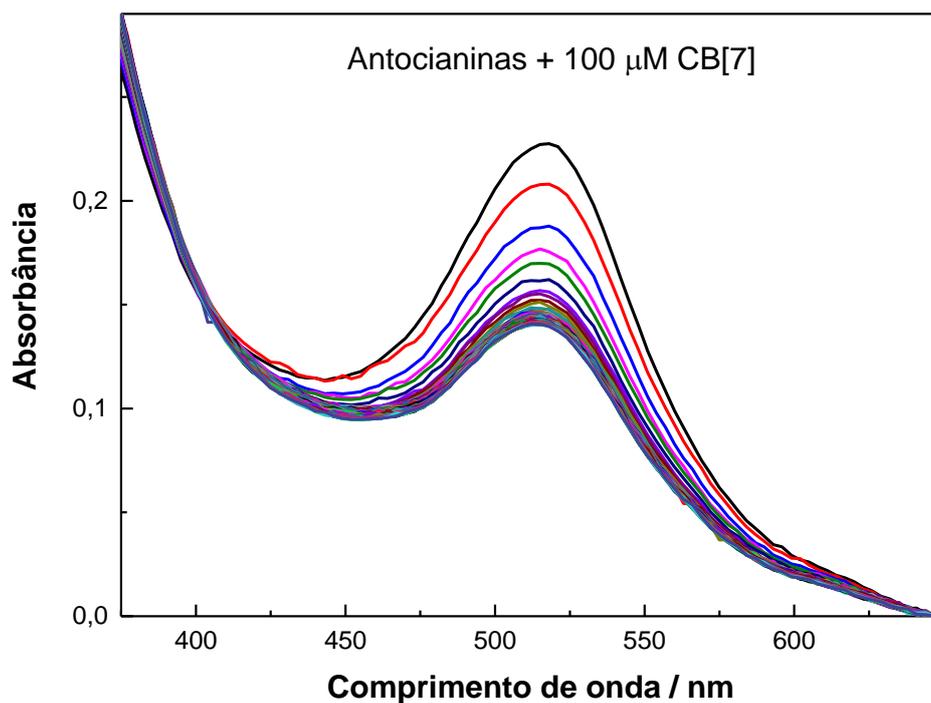


Figura 53: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de 100 μ M CB[7]. Os espectros foram registrados imediatamente após o preparo da amostra.

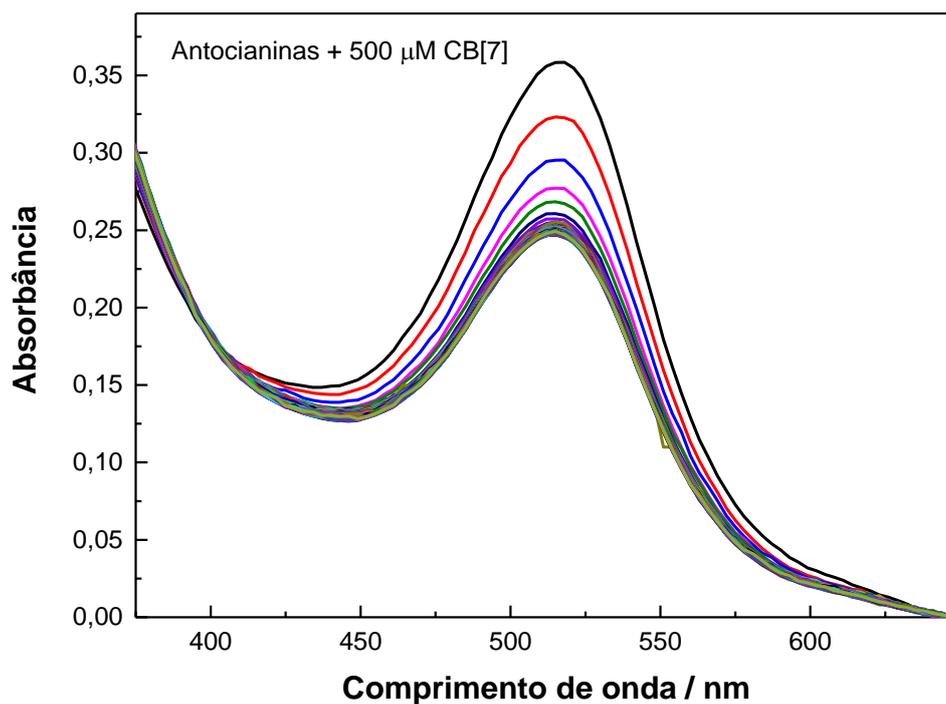


Figura 54: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de 500 μM CB[7]. Os espectros foram registrados imediatamente após o preparo da amostra.

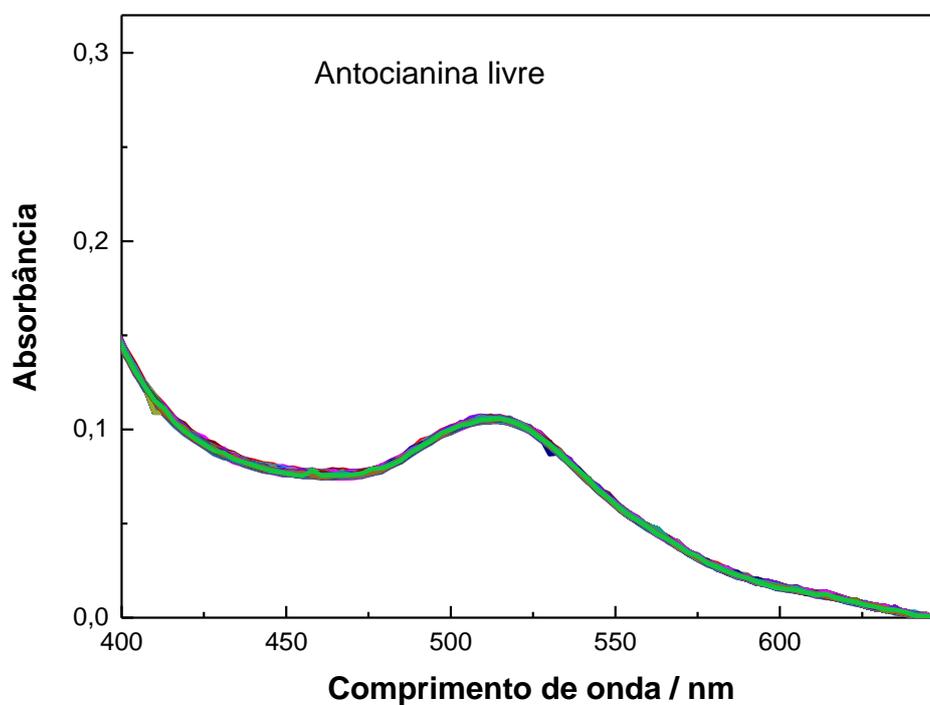


Figura 55: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62. Os espectros foram registrados após 24 horas de hidratação.

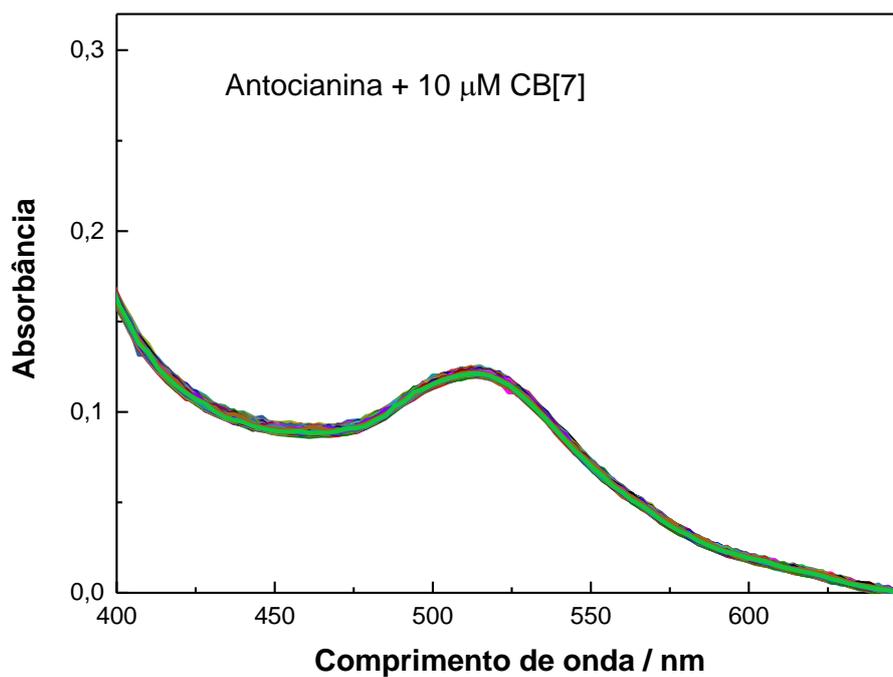


Figura 56: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de CB[7] 10 μ M. Os espectros foram registrados após 24 horas de hidratação.

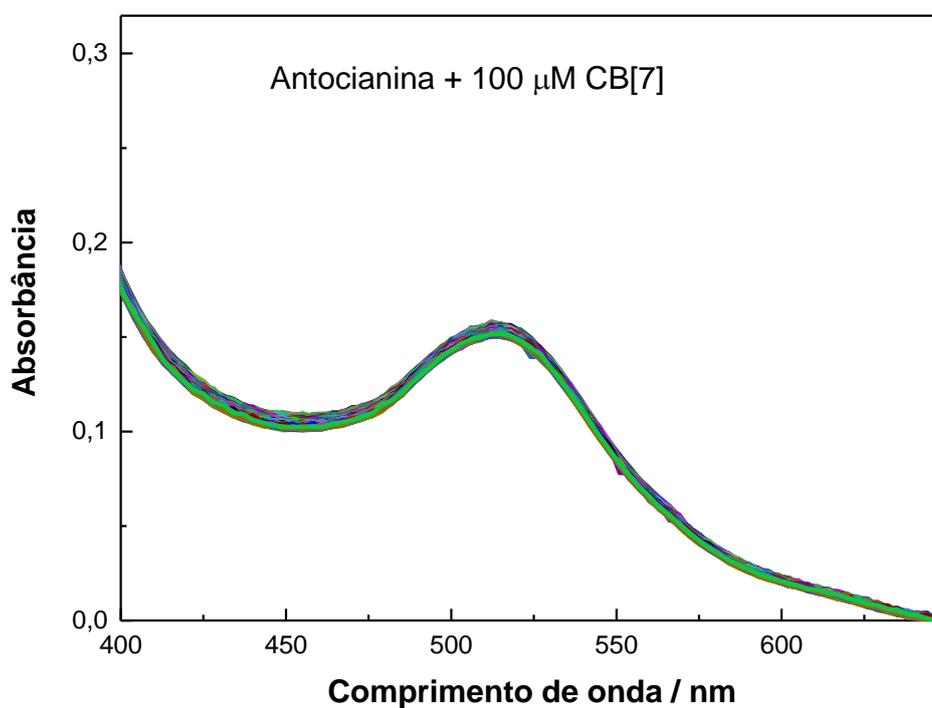


Figura 57: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de CB[7] 100 μ M. Os espectros foram registrados após 24 horas de hidratação.

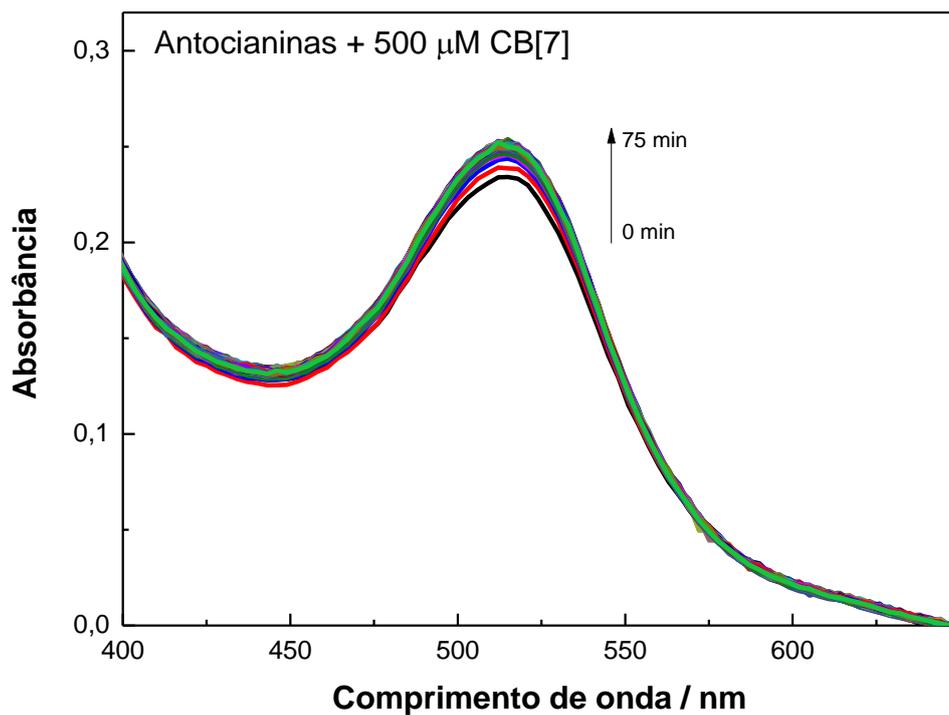


Figura 58: Espectros de absorção das antocianinas do jambolão em meio aquoso, pH 4,62, na presença de CB[7] 500 μ M. Os espectros foram registrados após 24 horas de hidratação.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Cassio Pacheco da Silva

Filiação: Osvaldo Pereira da Silva e Adalgisa Pacheco da Silva

Nascimento: 02/07/1988, Ibotirama - BA – Brasil

Educação

Ensino Médio

Colégio Estadual Antônio Inácio de Oliveira, Wanderley, BA, 2005

Ensino Superior

Universidade Federal da Bahia – Instituto de Ciências Ambientais e Desenvolvimento Sustentável, Barreiras, BA, Brasil.

Bacharelado em Química

Publicações

Held, B.; Tang, H.; Natarajan, P.; Silva, C. P. Silva, V.O.; Bohne, C.; Quina, F. Cucurbit[7]uril Inclusion Complexation as a Supramolecular Strategy for Color Stabilization of Anthocyanin Model Compounds. *Submetido*.