

ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS CONTROLADAS POR pH, LUZ E/OU INTERAÇÕES INTERMOLECULARES EM SISTEMAS MULTIESTADO BASEADOS EM DERIVADOS DE 2-FENIL-1-BENZOPIRÍLIO.

AMBRÓSIO LUÍS GANDALA CAMUENHO
Mestre em Química Bioorgânica

DOUTORAMENTO EM QUÍMICA
Universidade NOVA de Lisboa
Abril, 2024

ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS CONTROLADAS POR pH, LUZ E/OU INTERAÇÕES INTERMOLECULARES EM SISTEMAS MULTIESTADO BASEADOS EM DERIVADOS DE 2-FENIL-1-BENZOPIRÍLIO.

AMBRÓSIO LUÍS GANDALA CAMUENHO
Mestre em Química Bioorgânica

DOUTORAMENTO EM QUÍMICA
Universidade NOVA de Lisboa
abril, 2024

ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS CONTROLADAS POR pH, LUZ E/OU INTERAÇÕES INTERMOLECULARES EM SISTEMAS MULTIESTADO BASEADOS EM DERIVADOS DE 2-FENIL-1-BENZOPIRÍLIO.

AMBRÓSIO LUÍS GANDALA CAMUENHO

Mestre em Química Bioorgânica

Orientador: António Jorge Dias Parola,
Professor Catedrático, Universidade NOVA de Lisboa

Coorientadores: César António Tonicha Laia,
Professor Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa
Nuno Miguel Jesuino Basílio,
Professor Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Maria João Seixas de Melo,
Professora Catedrática, Universidade NOVA de Lisboa

Arguentes: Luís Miguel Ferreira Serra Cruz,
Investigador Auxiliar, Universidade do Porto
José Paulo da Silva,
Investigador Auxiliar, Universidade do Algarve

Orientador: António Jorge Dias Parola,
Professor Catedrático, Universidade NOVA de Lisboa

Membros: Luisa Maria da Silva Pinto Ferreira,
Professora Associada com Agregação, Universidade NOVA de Lisboa
Ana Sofia Diogo Ferreira,
Investigadora, Universidade NOVA de Lisboa

Alterações físico-químicas controladas por pH, luz e/ou interações intermoleculares em sistemas multiestado baseados em derivados de 2-fenil-1-benzopirílio.

Copyright © Ambrósio Luís Gandala Camuenho, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutoramento ao meu amado pai, Celestino Camuenho. Desde o início da minha jornada académica, você tem sido minha fonte constante de inspiração, apoio e encorajamento. Seu amor incondicional e sua sabedoria têm sido as luzes que iluminaram o caminho em direção a este momento significativo.

À medida que mergulhei nas complexidades da química, sua presença e orientação me fortaleceram, capacitando-me a enfrentar desafios e a alcançar conquistas que antes pareciam inatingíveis. Seu exemplo de dedicação, diligência e resiliência moldou meu caráter e me incentivou a persistir mesmo diante das adversidades.

Esta tese é um tributo ao seu apoio inabalável e ao seu profundo impacto em minha vida. Que cada descoberta, cada avanço e cada conquista contida nestas páginas reflitam não apenas minha dedicação à ciência, mas também a profunda gratidão que sinto por você, meu pai querido.

Com todo o meu amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos aos meus orientadores, Prof. Dr. António Jorge Parola, Dr. César António Tonicha Laia e Dr. Nuno Basílio, pelo acompanhamento constante, disponibilidade inabalável e paciência infinita diante das minhas inúmeras dificuldades. Acima de tudo, sou imensamente grato pela motivação que me proporcionaram e pela orientação excecional que moldou o sucesso deste projeto.

Um agradecimento especial ao Prof. Fernando Pina, cuja presença constante e orientação nos momentos mais desafiadores iluminaram meu caminho e renovaram minha determinação. Agradeço sinceramente ao Prof. Carlos Lima, cuja perspectiva realista em momentos cruciais reavivou minha determinação e vontade de continuar. À Dra. Patrícia Máximo, devo uma enorme gratidão por seu entusiasmo e assistência incansável na área de síntese orgânica.

Ao Grupo de Ciências dos Materiais, em memória Prof. Dra. Teresa Cidade, expresso minha profunda gratidão pela colaboração essencial nas medidas de reologia. Ao grupo de cristalografia, especialmente à Dra. Clara Gomes, devo um reconhecimento especial pelo papel crucial na revelação das estruturas cristalográficas que enriqueceram esta tese.

Expresso minha gratidão ao grupo de "Cultural Heritage and Responsive Materials" pelo apoio dado durante estes anos todos. Suas ideias, experiências e recursos enriqueceram o meu trabalho, e agradeço a cada membro pela contribuição, solidariedade e espírito de equipe, tanto dentro quanto fora do laboratório. Sentirei falta dos momentos compartilhados, como as sardinhas. Não posso deixar de mencionar o apoio emocional e encorajamento constante recebidos de minha família e amigos, cuja presença foi vital nos momentos desafiadores. Aos meus pais, Celestino e Luísa Camuenho, merecem um agradecimento especial. Mesmo à distância, seu apoio inabalável e orientação sábia foram fundamentais para minha jornada.

Este projeto foi apoiado pelo Laboratório Associado para Química Verde (LAQV)-financiado por fundos nacionais FCT/MCTES (UID/QUI/50006/2019) e pelo projeto PTDC/QUI-QFI/30951/2017. Bolsas de Pós-Graduação Destinadas a Estudantes dos PALOP e Timor-Leste Nº 219201 - Fundação Calouste Gulbenkian. Bolsa de Mérito 2020 – INAGBE Angola.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim” (Chico Xavier).

RESUMO

A cinética e termodinâmica da rede de equilíbrio de espécies dependente do pH (multiestado) geradas por três tipos de derivados de 2-fenil-1-benzopirílio foram estudadas por espectroscopia UV-Vis, ^1H RMN e HPLC/MS. Foi estudada a velocidade de degradação de duas antocianinas naturais, a oenina e a malvina; foram sintetizadas e caracterizadas três piridinochalconas, e foi desenhado, sintetizado e caracterizado um sistema tetrachalcona para aplicação em fluidos fotoreológicos.

O estudo dos processos químicos reversíveis e irreversíveis dos derivados da glicosilação da malvidina, nomeadamente a malvidina-3-O-glucósido (oenina) e a malvidina-3,5-O-diglucósido (malvina), foi realizado em soluções aquosas. Para estes estudos, foram realizados uma série de saltos de pH: i) adição de base a soluções equilibradas do catião flavílio a $\text{pH} \leq 1$ (saltos diretos de pHs) ou ii) adição de ácido a soluções de pH elevado de volta ao catião flavílio a $\text{pH} \leq 1$ (saltos inversos de pHs), incluindo a zona básica de pH, permitindo calcular as taxas de degradação. A taxa de degradação segue a sequência diglucósido > monoglucósido. Existe uma gama de pH em que o equilíbrio não chega a ser alcançado porque a velocidade de degradação é superior à velocidade com que se atingiria o equilíbrio. Este estudo permite conceber estratégias de proteção para estabilizar as antocianinas.

Foram sintetizadas e estudadas três piridinochalconas (derivadas de 2-piridil-1-benzopirílio). As espécies presentes no multiestado variam com a posição do nitrogénio da piridina e com a introdução de um grupo amina na posição 7 do benzopirílio. Enquanto a 3'-piridinochalcona possui um multiestado semelhante ao da 4'-piridinochalcona, o multiestado da 2'-piridinochalcona contém dois novos produtos, que foram caracterizados por HPLC-MS. Por outro lado, a introdução de um grupo amina na posição 7 para formar a 7-dietilamino-4'-piridinochalcona permite a formação do respetivo (pseudo)flavílio, 7-dietilamino-4'-piridino-1-benzopirílio. Estes exemplos demonstram que o mesmo multiestado geral de espécies é seguido não apenas para derivados do 2-fenil-1-benzopirílio decorados com diversos substituintes, mas também pela substituição do átomo de carbono na unidade do benzeno por um átomo de nitrogénio, abrindo novas perspectivas para a aplicação destes compostos.

Uma aplicação muito interessante do sistema 2-fenil-1-benzopirílio foi no campo da fotoreologia. A maioria dos fluidos fotoreológicos desenvolvidos até agora utiliza reações de fotoisomerização que, através de mudanças estruturais a nível molecular, conduzem a variações macroscópicas nas propriedades reológicas (fotoreologia). Neste contexto, as propriedades fotoquímicas de um sistema

multiestado de 2-fenil-1-benzopirílio foram usadas para modificar a viscosidade de um fluido usando luz. Para esse fim, foi selecionado o sistema fotoquímico da *trans*-chalcona de 7-metoxi-4'-O-metilenotriazol-PEG e o respetivo catião flavílio (produto fotoquímico) na presença de cucurbit[8]urilo (CB[8], macrociclo capaz de formar associações supramoleculares do tipo recetor-substrato). Enquanto a *trans*-chalcona mal interage com o recetor, o catião flavílio é capaz de formar complexos homoternários através da inclusão de duas unidades de flavílio na cavidade do CB[8], levando a um aumento significativo da viscosidade, sob irradiação.

Palavas-chave: antocianinas, piridinochalconas, química supramolecular, fotoreologia

ABSTRACT

The kinetics and thermodynamics of the pH-dependent equilibrium network of species (multi-state) generated by three types of 2-phenyl-1-benzopyrylium derivatives were studied using UV-Vis spectroscopy, ^1H NMR, and HPLC/MS. The degradation rate of two natural anthocyanins, oenin and malvin, was studied; three pyridinylchalcones were synthesized and characterized, and a tetrachalcone system was designed, synthesized, and characterized for application in photorheological fluids.

The study of reversible and irreversible chemical processes of malvidin glycosylation derivatives, namely malvidin-3-O-glucoside (oenin) and malvidin-3,5-O-diglucoside (malvin), was conducted in aqueous solutions. In these studies, a series of pH jumps were performed: i) addition of base to equilibrated solutions of the flavylum cation at $\text{pH} \leq 1$ (direct pH jumps) or ii) addition of acid to high pH solutions back to the flavylum cation at $\text{pH} \leq 1$ (reverse pH jumps), including the basic pH zone, allowing the calculation of degradation rates. The degradation rate follows the sequence diglucoside > monoglucoside. There is a pH range where equilibrium is not reached because the degradation rate is higher than the rate at which equilibrium would be reached. This study allows for the conception of protection strategies to stabilize anthocyanins.

Three pyridinylchalcones (derivatives of 2-pyridyl-1-benzopyrylium) were synthesized and studied. The species present in the multistate change with the position of the pyridine nitrogen and the introduction of an amine group at position 7 of the benzopyrylium. While 3'-pyridinylchalcone has a multistate similar to that of 4'-pyridinylchalcone, the multistate of 2'-pyridinylchalcone contains two new products, which were characterized by HPLC-MS. On the other hand, the introduction of an amine group at position 7 to form 7-diethylamino-4'-pyridinylchalcone allows the formation of the respective (pseudo)flavylum, 7-diethylamino-4'-pyridino-1-benzopyrylium. These examples demonstrate that the same general multistate of species is followed not only for derivatives of 2-phenyl-1-benzopyrylium decorated with various substituents but also by substituting the carbon atom in the benzene unit with a nitrogen atom, opening new perspectives for the application of these compounds.

A very interesting application of the 2-phenyl-1-benzopyrylium system was in the field of photorheology. Most photorheological fluids developed so far use photoisomerization reactions that, through structural changes at the molecular level, lead to macroscopic variations in rheological properties (photorheology). In this context, the photochemical properties of a multistate system of 2-phenyl-1-benzopyrylium were

used to modify the viscosity of a fluid using light. For this purpose, the photochemical system of *trans*-chalcone of 7-methoxy-4'-O-methylenetriazol-PEG and the respective flavylum cation (photochemical product) in the presence of cucurbit[8]uril (CB[8], a macrocycle capable of forming supramolecular receptor-substrate associations) was selected. While *trans*-chalcone poorly interacts with the receptor, the flavylum cation is able to form homoternary complexes by including two flavylum units in the CB[8] cavity, leading to a significant increase in viscosity under irradiation.

Keywords: anthocyanins, pyridinylchalcones, supramolecular chemistry, photorheology.

ÍNDICE

1	Introdução	1
1.1	Antocianinas	1
1.1.1	Sistemas multiestado (processos cinéticos e termodinâmicos)	1
1.1.2	Cinética e termodinâmica	8
1.2	Sais de flavílio sintéticos	13
1.2.1	O sistema fotocromico	15
1.2.2	Outras aplicações de sais de flavílio sintético	16
1.2.3	Efeito dos substituintes	17
1.3	Química supramolecular	18
1.3.1	Estruturas auto-organizadas	20
1.3.2	Complexos de inclusão (recetor-substrato)	21
1.4	Fluidos fotoreológicos	24
1.4.1	Fluidos	25
1.4.2	Fotoreologia	27
1.5	Objetivos	31
1.5.1	Objetivo geral	31
1.5.2	Objetivos Específicos	32
2	O Efeito da Glicosilação nos Processos Reversíveis e Irreversíveis da Malvidina	33
2.1	Saltos diretos de pH	34
2.1.1	Primeira etapa (1º passo)	34
2.1.2	Segunda etapa (2º passo)	36
2.1.3	Terceira etapa (3º passo)	40
2.2	Saltos inversos de pH	43
2.3	Processos irreversíveis	48
2.4	Conclusões	49

2.5	Metodologia experimental	50
3	Reações Térmicas e Fotoquímicas de n-Piridinabenzopirílio	53
3.1	Novos compostos da família das piridinochalconas	55
3.2	Sistema multiestado do composto 2'-piridinochalcona (Py2)	55
3.2.1	Fotoquímica	62
3.2.2	O efeito do solvente	64
3.3	Sistema multiestados do composto 3'-piridinochalcona (Py3)	67
3.3.1	Fotoquímica	71
3.3.2	Efeito do solvente	72
3.4	7-Dietilamino-4'-piridinochalcona (7NPy4).....	73
3.5	Estudos de difração de raios X	84
3.6	Conclusões	85
3.7	Metodologia experimental	86
3.7.1	Materiais e métodos	86
3.7.2	Estudos termodinâmicos e cinéticos	86
3.7.3	Estudos fotoquímicos	87
3.7.4	Síntese.....	87
3.7.5	Difração de raios X de monocristal.....	89
4	Fluidos Fotoreológicos Supramoleculares	91
4.1	Definição do método matemático (composto modelo).....	92
4.2	Composto fotoresponsivo	93
4.3	Estudos termodinâmicos e fotoquímicos	94
4.3.1	Constantes de acidez	95
4.3.2	Constantes de associação.....	96
4.3.3	Reatividade fotoquímica do complexo.....	98
4.4	Viscoelasticidade.....	99
4.4.1	Curvas de viscosidade em função da taxa de corte e da tensão de corte	100
4.5	Conclusões	101
4.6	Metodologia experimental	101
4.6.1	Estudos termodinâmicos	102
4.6.2	Estudos fotoquímicos	102
4.6.3	Síntese do tetra(<i>trans</i> -chalcona 7-metoxi-4'-O-metileno-triazol)PEG (4-armPEG-Ct) 102	
4.6.4	Viscoelasticidade	104
5	Conclusões Gerais	105

6	Bibliografia	107
	Apêndice A Constantes ácidas	113
	Apêndice B Efeito da glicosilação	115
	Apêndice C Piridinochalconas	123
	Apêndice D Fotoreologia	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação geral das antocianinas. Direitos autorais 2020, <i>Elsevier</i> . [1]	1
Figura 1.2. Variação da energia padrão de Gibbs por unidade de pH.	4
Figura 1.3. Distribuição da fração molar da calistefina. [11]	7
Figura 1.4. Pelargonidina-3-O-glucósido. a) curvas de titulação que permitiram obter os pK_a s do Esquema 1.4; b) Espectro de absorção de cada espécie individual.	9
Figura 1.5. Demonstração da mudança de regime ($k_h > k_t$).	12
Figura 1.6. Cátion flavílio.	13
Figura 1.7. Alguns exemplos de flavílio sintéticos.	14
Figura 1.8. Um exemplo de memória ótica. [34] Copyright 2008, American Chemical Society.	16
Figura 1.9. Distribuição da fração molar no equilíbrio do cátion flavílio e derivados 3-metilflavílio. [3] Copyright 2012, <i>Chem. Soc. Rev.</i>	17
Figura 1.10. Ilustração da transição da Química Molecular para a Química Supramolecular. [48], [50]	19
Figura 1.11. Um transportador de rotaxano alimentado por irradiação projetado para realizar o alongamento de uma mola molecular. [52]	19
Figura 1.12. Polímero supramolecular formado por unidades do monómero ureido-pirimidinona (Upy). [54] Copyright 2001 <i>Chem. Rev.</i>	20
Figura 1.13. Representação estrutural das ciclodextrinas.	22
Figura 1.14. Estrutura do Cucurbit[n]urilo, $n=6,7,8$, ou 10.	22
Figura 1.15. Caracterização da deformação aplicando uma força de cisalhamento externa. a) Sólido; b) Fluido. [62]	25
Figura 1.16. Caracterização reológica dos fluidos.	26
Figura 1.17. Curva de fluidos dependente do tempo.	27
Figura 1.18. Curva de fluidos que não dependente do tempo.	27
Figura 1.19. Variação da viscosidade por ação da luz em micelas.	28
Figura 1.20. Fotoindução da quebra de micelas. [65]	28
Figura 1.21. Irradiação do hidrogel usando uma máscara. [59]	30
Figura 1.22. Compostos caracterizados.	31
Figura 2.1. a) Curvas de titulação da oenina, $1,2 \times 10^{-5} M$, obtidas a partir dos espectros de absorção coletados 10ms após uma série de saltos diretos de pH monitorizados por fluxo interrompido. O ajuste foi obtido para $pK_a=3,8$, $pK_{A/A-}=6,3$ e $pK_{A-/A2-}=8,1$. [1], [13] b) Desconvolução dos espectros de absorção utilizando as constantes ácido-base calculadas em (a). c) Variações espectrais da malvina, $7,3 \times 10^{-6} M$, capturadas 10 ms após um salto direto de pH monitorizado por fluxo interrompido para $0,9 < pH < 4,3$. d) O mesmo para $4,3 < pH < 8,9$. e) Curvas de titulação em 518nm e 617nm. O ajuste foi obtido para $pK_a=3,8$ e $pK_{A/A-}=7,0$. Erro estimado $\pm 0,1$.	35
Figura 2.2. a) Alterações espectrais na solução aquosa de oenina $1,0 \times 10^{-5} M$ após um salto direto de pH de $pH=1,0$ para $pH=5,0$; a curva azul corresponde ao espectro de absorção após o final da reação de hidratação (pseudo-equilíbrio), e a curva vermelha ao espectro de absorção no equilíbrio (ver abaixo); b) Constantes de velocidade de isomerização em meio ácido. O ajuste foi feito de acordo com	

a Eq. 2.2 para as constantes ácido-base calculadas na seção 2.1.1 e $k_h=0,08\text{ s}^{-1}$, $k_{-h}=47\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_t=0,52$ (calculado por saltos inversos de pH, veja abaixo; c) Constantes de velocidade da malvina após saltos diretos de pH monitorizados por fluxo interrompido. O ajuste foi alcançado por meio da Eq. 2.2, para $k_h=0,33\text{ s}^{-1}$ e $k_{-h}=25\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.	37
Figura 2.3. Esquema cinético proposto após um salto direto de pH em meio básico.	38
Figura 2.4. a) Variações espectrais após um salto direto de pH da malvidin-3-O-glucósido para pH=13,1 monitorizado por fluxo interrompido sem filtro; b) Traços de fluxo interrompido após saltos diretos de pH na ausência e presença de um filtro de corte de 410 nm em dois valores de pH básico representativos; c) Variações espectrais da malvina após um salto direto de pH para pH=10.1 monitorizado por fluxo interrompido usando um filtro de corte de 410 nm; d) o mesmo que c) para pH=12; e) Constantes de velocidade da adição nucleofílica de OH^- na malvina medidas por fluxo interrompido (etapa mais rápida). A constante de velocidade é diretamente proporcional à concentração de hidróxido de acordo com $140[\text{OH}^-]\text{ s}^{-1}$.	39
Figura 2.5. a) Constantes de velocidade de isomerização <i>cis-trans</i> da oenina e malvina em meio ácido; b) Variações espectrais da oenina após um salto direto de pH para pH=12.8, seguido por um espectrofotômetro. Neste caso, o equilíbrio é alcançado antes de uma degradação significativa, ver abaixo; c) Constantes de velocidade de isomerização da oenina em meio básico. O ajuste foi obtido para $0.045[\text{OH}^-]\text{ s}^{-1}$.	41
Figura 2.6. a) Variações espectrais da malvina após um salto direto de pH para pH=10.0; b) Traço em 615 nm e 399 nm. O ajuste foi realizado com uma função bi-exponencial com constantes de velocidade $4 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ e $7.5 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$; c) Sequência de saltos de pH: i) direto para pH=9.8, ii) 160 min a este pH, iii) salto inverso de pH de volta para pH=1; d) Constantes de velocidade da etapa de isomerização versus pH.	42
Figura 2.7. a) Traços do salto inverso de pH da oenina monitorizado pelo fluxo interrompido a pH=5,5; A amplitude A corresponde ao catião flavílio obtido de todas as bases quinoidais e catião flavílio presentes antes do salto; a amplitude B ao catião flavílio que aparece devido às espécies hemietais; a amplitude C ao catião flavílio resultante das espécies <i>cis</i> -chalconas; b) representação das amplitudes calculadas como em (a) versus pH após deixar as soluções durante 4 horas; c) representação da amplitude total dos saltos inversos de pH das soluções em equilíbrio na Figura 2.1a; d) traços dos saltos inversos de pH monitorizados pelo fluxo interrompido de volta para pH=1 após deixar as soluções durante 4 horas após um salto direto de pH.	44
Figura 2.8. a) Salto inverso de pH da oenina após 4 horas a pH=10,8, seguido por um espectrofotômetro. b) Extensão dos experimentos para uma faixa de pH na região básica; c) Absorvância total normalizada para toda faixa de pH; d) Representação das frações o equilíbrio não é alcançado na zona vermelha e apenas bases quinoidais aniônicas estão presentes.	45
Figura 2.9. a) Distribuição da fração molar no pseudo-equilíbrio; b) Representação das frações de <i>trans</i> -chalconas e todas as bases quinoidais, hemietais e <i>cis</i> -chalconas; c) Distribuição da fração molar no equilíbrio. As constantes de equilíbrio estão relatadas na Tabela 2.1; d) Cinética do salto inverso de pH após um salto direto de pH para uma série de valores de pH ao permanecer por 4 horas.	47
Figura 2.10. a) Fração molar dos processos de degradação após um salto de pH de oenina $2 \times 10^{-5}\text{ M}$ a pH=6,3 calculada em 520 nm por meio da Eq. 2.4 em função do tempo de espera. A cinética é mono-exponencial com a constante de velocidade de degradação $k_{\text{deg.}} = 1,5 \times 10^{-6}\text{ s}^{-1}$; b) (●) Representação	

das constantes de velocidade de degradação da oenina em função do pH, pK do equilíbrio entre chalconas dianiônicas e trianiônicas ≈ 11 ; (■) Constante de velocidade para a cinética do desaparecimento da base quinoidal; c) (●) Constantes de velocidade de degradação da malvina $1,3 \times 10^{-5} \text{ M}$	49
Figura 3.1. Piridinochalconas.	55
Figura 3.2. a) e b) variações espectrais do composto Py2 $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1) os espectros foram traçados imediatamente após o salto de pH; c) curvas de titulação. O ajuste foi alcançado para $pK_{\text{Ct}^+/\text{Ct}}=1,9$ e $pK_{\text{Ct}/\text{Ct}^-}=9,4$	56
Figura 3.3. Espectros de ^1H RMN (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1), Py2 $1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$; a) pH=0,5, $\sim 100\% \text{ Ct}^+$; b) pH=6,5, $\sim 100\% \text{ Ct}$; c) pH=12, $\sim 100\% \text{ Ct}^-$. (A numeração foi feita de acordo com a estrutura do cátion flavílio)	57
Figura 3.4. a) Variações espectrais de uma solução de Py2 $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$, a pH=6,2; b) A cinética desta solução foi ajustada com uma mono-exponencial com constantes de velocidade $1,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$; c) Variações espectrais após um salto de pH de soluções recém-preparadas de Py2, para pH=1,3; d) O ajuste dos dados de c) foi obtido com um bi-exponencial com constantes de velocidade $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; e $2,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	58
Figura 3.5. Cromatogramas de HPLC a 280 nm de Py2, $1,1 \times 10^{-4} \text{ M}$ em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1 v/v): a) a pH=6,0: I inicial; II após 5 dias; III após 7 dias. Picos detetados: 1 (Ct ; rt = 27,0 min) e pico 5 (rt = 28,7 min); b) a 0,48 M em HCl: I inicial; II após 6 horas; III após 22 horas; IV após 5 dias; V após 8 dias. Picos detetados: Pico 3 (B ; rt = 22,5 min) (o respectivo tempo de retenção é coincidente com um hemiacetal puro obtido na Fig. 9) e pico 4 (rt = 15,7 min) que exibe $m/z=224$ (modo positivo) , consulte o esquema 7b para a estrutura proposta.	59
Figura 3.6. Espectros de ^1H RMN de Py2 ($1,7 \times 10^{-2} \text{ M}$ em $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ (1:1 v/v), 0,48 M DCl): I) inicial ; II) 7h; III) 30h; IV) 54h; compostos representativos (3 ⁺ (B ⁺ (■)), 2 ⁺ (Cc ⁺ (□)), 1 ⁺ (Ct ⁺ (○)) e 4 (♦).	61
Figura 3.7. Soluções de Py2 ($1,1 \times 10^{-4} \text{ M}$, água/metanol(1:1 v/v)) irradiadas a 365 nm. a) A pH=6,5; b) A pH=1,3.	62
Figura 3.8. Cromatogramas de HPLC a 280 nm relativos à recuperação térmica no escuro após a irradiação a 365 nm da ct $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v): a) a pH=6; I - estado fotoestacionário alcançado após 15 min de irradiação; II – a solução I após 2 dias de recuperação térmica escura; III - a solução I após 6 dias de recuperação térmica escura; picos identificados: 1 (Ct, rt = 27,0 min); 3 (B, rt = 22,5 min) e 5 (rt = 28,7 min). b) com 0,48M de HCl; I - após 15 min de irradiação; II - A solução I após 2 dias de recuperação térmica escura; III - a solução I após 6 dias de recuperação térmica escura; picos identificados: 1 (Ct ⁺ , rt = 27,0 min); 3 (B ⁺ , rt = 22,5 min), 4 (rt = 15,7 min) e 5 (rt = 28,7 min); *pico não identificado.	63
Figura 3.9. a) R recuperação da reação fotoquímica a pH=6,5 após irradiação a 365 nm como na Fig. 6a. O ajuste da recuperação de Ct foi obtido com um mono-exponencial com constante de velocidade $1,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; b) O mesmo a pH=1,3 na irradiação relatada na Fig. 6b. O ajuste foi obtido para um processo bi-exponencial com constantes de velocidade $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e $1,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	64
Figura 3.10. a) ^1H RMN em <i>d</i> -metanol. I - Composto Py2, $1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$, após 90 min de irradiação a 365 nm; II - a mesma amostra del após 90 min no escuro; III – a mesma amostra de I após 20 horas no escuro; hemiacetal (■); <i>cis</i> -chalcona(□); b) Cromatogramas de HPLC a 280 nm das soluções I e III ; picos identificados: 1 (Ct, rt = 27,0 min); 2s (Cc, rt = 29,1 min) e 3 (B, rt = 22,5 min).	65

Figura 3.11. Espectro de ^1H RMN e cromatogramas de HPLC a 280 nm de Py2 $1,7 \times 10^{-2}$ M em *d*-metanol: **a)** Espectro de ^1H RMN; **I** - após 90 min de irradiação a 365 nm e 20 horas de recuperação térmica no escuro (composto **3**); **II** - o mesmo de **I** após adição de 20 μl de DCI 12 M. Esta solução não se altera após 5 dias (mistura de **B⁺** e **Cc⁺**); **III** - o mesmo de **II** após adição de D_2O , final *d*-metanol:água(1:1); **IV** - o mesmo de **III** após 48 horas no escuro; hemicetal (**■**, **3**); *cis*-chalcona (**□**, **2**); composto **4** (**◆**). **b)** cromatogramas de HPLC a 280 nm; **I)** solução a); **II)** solução a)III após 85 horas de equilíbrio no escuro. Pico identificados: pico **1** (Ct, $r_t = 27,0$ min); **2** (Cc, $r_t = 29,1$ min), **3** (B, $r_t = 22,5$ min), **4** ($r_t = 15,7$ min) e **5** ($r_t = 28,7$ min). 65

Figura 3.12. a) Espectros de absorção de **Py2** 4×10^{-3} M em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1 v/v) e HC 0,48 M. Espectro inicial (preto) obtido após 2 horas de irradiação a 365 nm (hemicetal, composto **3**) e sua evolução no escuro até 85h (espectro vermelho, composto **4**); **b)** Espectros de absorção de hemicetal e composto **5** do mesmo experimento. 66

Figura 3.13. Resumo do comportamento do composto **Py2** em misturas de metanol puro e metanol:água (1:1 v/v). 67

Figura 3.14. a) e b) espectros de absorção dependentes de pH de **Py3** ($1,2 \times 10^{-4}$ M, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v)); **c)** curvas de titulação. O ajuste foi alcançado para $pK_{a1}=2,7$ e $pK_{a1}=9,3$ 68

Figura 3.15. Estabilização da carga positiva em **Py2** e **Py3** protonados. EWG: Grupo de retirada de elétrons. 69

Figura 3.16. Variações espectrais do composto **Py3** $1,2 \times 10^{-4}$ M em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) após 96 horas: **a)** pH=6,5; **b)** pH = 1,5. 69

Figura 3.17. Espectros de ^1H RMN de **Py3** $1,7 \times 10^{-2}$ M em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v). **I)** imediatamente após um salto de pH de pH=6,6 para pH=1,0, 100% de **Ct⁺**; **II)** a mesma solução de a) mantida no escuro por 5 dias, 14,5% **Cc⁺** (**□**); 14,5% **B⁺** (**■**); 71% **Ct⁺** (**○**); **III)** solução a pH = 6,6, **Ct** (pureza superior a 95%). 70

Figura 3.18. Irradiação a 365 nm do composto **Py3**, $1,2 \times 10^{-4}$ M em metanol:água (1:1 v/v). **a)** A pH=6,5; **b)** A pH = 1,5. 71

Figura 3.19. Espectros de ^1H RMN, recuperação termodinâmica de **Py3** ($1,7 \times 10^{-2}$ M em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a pH=6,95: **I** - espectro inicial após 1 hora de irradiação contínua a 365 nm; **II** – após 5 horas de repouso no escuro, **B** (**■**), **Cc** (**□**) e **Ct** (**○**); **III** – após 27 horas de repouso no escuro; **II** – após 51 horas de repouso no escuro. 72

Figura 3.20. a) Espectros de ^1H RMN de **Py3** $1,7 \times 10^{-2}$ M em CD_3OD : **I** - Após irradiação a 365 nm durante 2 h 75% **Cc**(**□**) e 25% **B** (**■**); **II** - após equilíbrio no escuro 2h 50% **Cc** (**□**) e 50% **B** (**■**); **III** - após 20 h 100% **B** (**■**). O espectro não muda após 5 dias após a adição de DCI (concentração final de ácido 0,48 M). **b)** Diagrama qualitativo de energia de **Py3** em MeOD. 73

Figura 3.21. Espectros de absorção de soluções equilibradas do composto **7NPy4** após saltos de pH de pH=6,5 *trans*-chalcona neutra, $1,1 \times 10^{-4}$ M em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1 v/v) para as seguintes faixas de pH: **a)** ~0,5 (HCl 0,3 M)<pH< 3,1; **b)** 3,1<pH<7,3; **c)** 7,3<pH<12. **d)** O ajuste simultâneo dos dados de absorvância em 330, 472 e 520 nm leva às seguintes constantes globais de acidez: $pK'_a=2,7$, $pK''_a=4,3$, $pK'''_a=9,5$, com a correspondente distribuição da fração molar das espécies. 74

Figura 3.22. O multiestado de espécies observado no composto **7NPy4**. 75

Figura 3.23. Variações espectrais depois de um salto de pH de uma solução de **7NPy4** a pH=6,4 em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1 v/v), para pH=0,6, **a)** monitorizado por fluxo interrompido, $[\text{7NPy4}]=9,0 \times 10^{-5}$ M; inserção: o ajuste foi obtido com uma equação bi-exponencial com constantes de velocidade de $0,5 \text{ s}^{-1}$

¹ e 0,003 s ⁻¹ ; b) monitorizado por espectrofotômetro comum, [7NPy4]=1,8x10 ⁻⁴ M; inserção: o ajuste foi obtido com uma equação mono-exponencial com constante de velocidade de 0,003 s ⁻¹	76
Figura 3.24. Variações espectrais após um salto de pH de uma solução equilibrada de 7NPy4 (9,0x10 ⁻⁵ M em água/metanol (1:1 v/v) a pH=0,6) para pH=6,4 (seguido de fluxo interrompido: a) durante os primeiros 0,4 segundos; b) entre 0,4 s e 200 s; c) absorvância em 501 nm ajustada com uma equação bi-exponencial com constantes de velocidade de 9,9 s ⁻¹ e 0,004 s ⁻¹ . d) O mesmo salto de pH seguido de um espectrofotômetro comum, [7NPy4] =1,8x10 ⁻⁴ M; o ajuste foi obtido com uma equação mono-exponencial com k_{obs} =3,4x10 ⁻⁴ s ⁻¹	77
Figura 3.25. Variações espectrais após um salto de pH de uma solução equilibrada de 7NPy4 (9,0x10 ⁻⁵ M em água/metanol (1:1 v/v) a pH=6,4) para pH=3,4 seguido por: a) fluxo interrompido; inserção: dois processos foram observados com constantes de velocidade 0,9 s ⁻¹ (pequena amplitude) e 0,003 s ⁻¹ ; b) espectrofotômetro, [7NPy4]=1,8x10 ⁻⁴ M; inserção: ajuste com equação mono-exponencial com constante de velocidade 0,003 s ⁻¹	78
Figura 3.26. Variações espectrais após um salto de pH de uma solução equilibrada de 7NPy4 (9,0x10 ⁻⁵ M em água/metanol (1:1 v/v) a pH=3,4) para pH=6,4; a) os dois primeiros passos cinéticos, seguidos de fluxo interrompido; b) o processo mais lento, seguido por um espectrofotômetro.....	79
Figura 3.27. Resumo da composição multiestado de 7NPy4 e taxas de conversão a pH 0,6, 3,4 e 6,4.	80
Figura 3.28. a) Dependência do pH das constantes de velocidade do processo mais rápido após o pH saltar de pH=6,4 para valores de pH mais baixos. O ajuste foi obtido com constantes de isomerização de 0,5 s ⁻¹ , 0,3 s ⁻¹ e 23 s ⁻¹ para Ct²⁺ , Ct⁺ e Ct , respectivamente, levando em consideração os valores de pK_a e $pK_{Ct2+/Ct+}$ =2,2 e $pK_{Ct+/Ct}$ =3,8. O erro associado a essas constantes de taxa é de aproximadamente 30%. b) Constantes de velocidade do processo mais lento em função do pH; (●) salto de pH=6,4 para pH mais baixos; (○) O pH salta de pH=3,4 (ou 0,6) para 6,4.	81
Figura 3.29. Zona aromática do espectro de ¹ H-RMN de soluções de 7NPy4 (1,7x10 ⁻³ M, CD ₃ OD/D ₂ O(1:1 v/v)) equilibrado no escuro: a) pD =0,5; 80% AH²⁺ (◆); 6% Ct²⁺ (○); 9% Cc²⁺ (□); 5% B²⁺ (■); b) pD =3; 81% AH⁺ (◆), 16% Ct⁺ (○), ~ 3% B⁺ + Cc⁺ (□); c) pD =6,5; o sistema não evolui neste pH (100% Ct).	82
Figura 3.30. a) Deslocalização de carga positiva na porção benzopirílio da espécie AH²⁺ de 7NPy4; b) detalhe dos espectros de ¹ H RMN cobrindo os picos de dietilamino.	83
Figura 3.31. Evolução temporal da distribuição da fração molar da espécie durante a etapa cinética mais lenta após um salto de pD de pD=6,4 (100 % Ct) para: a) pD =0,5; b) pD =3,0; dados obtidos por integração dos picos de ¹ H RMN ([7NPy4]=1,7x10 ⁻³ M, CD ₃ OD/D ₂ O(1:1 v/v)).	83
Figura 3.32. Desenhos de Mercúrio das estruturas moleculares dos compostos a) Py2, b) Py3, c) Py4; d) 7NPy4.	85
Figura 4.1. Variação dos espectros de absorção da solução aquosa de ET3G-Ct (5,4x10 ⁻⁵ M) com tampão citrato (0,1 M) em função do pH.	92
Figura 4.2. Espectros de emissão do composto ET3G-Ct (5,3x10 ⁻⁶ M, pH=1, irradiado a 478 nm), em função da concentração de CB[8]: a) [CB[8]] varia de 0 – 5,8 μM; b) [CB[8]] varia de 5,8 - 60 μM.....	93
Figura 4.3. Tetra(<i>trans</i> -chalcona 7-metoxi-4'-O-metileno-triazol-PEG (4-armPEG-Ct).	94
Figura 4.4. Variação dos espectros de absorção da solução aquosa de 4-armPEG (4,38x10 ⁻⁶ M) com tampão citrato (10 mM): a) na ausência de CB[8]; b) com o CB[8] (2,2x10 ⁻⁶ M).	95

Figura 4.5. Espectros de absorção do composto 4-armPEG ($1,1 \times 10^{-6}$ M, pH=1), traçados com o aumento da concentração de CB[8]: a) [CB[8]] varia de 0 - 3,7 μ M; b) [CB[8]] varia de 3,7 - 60 μ M. .	96
Figura 4.6. Controlo da viscosidade pela irradiação da mistura 4-arm PEG-CT/CB[8] (1:4, 4% m/m, pH 4,7) irradiado a 365 nm durante 1 hora.	99
Figura 4.7. Preparação do hidrogel a pH=1 de 4-arm PEG/CB[8] (1:4, 4% w/w).....	99
Figura 4.8. Varrimento de tensão do hidrogel (4% m/m) a 25°C com razão molar 1:4 (4-armPEG/CB[8]).	100
Figura 4.9. Curva de escoamento do hidrogel (4% m/m) a 25°C com razão molar 1:4 (4-armPEG/CB[8]): a) Viscosidade versus tensão. b) viscosidade versus deformação.....	101
Figura 4.10. Rota seguida para a derivatização de 4armPEG-OH.	104

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.1. Multiestado da pelargonidina-3-glucósido (calistefina) a pH moderadamente ácido.	2
Esquema 1.2. Multiestado de espécies químicas de calistefina.	2
Esquema 1.3. Diagrama do nível de energia da calistefina.	5
Esquema 1.4. Desprotonação da calistefina nos primeiros 10ms após o salto de pH.	9
Esquema 1.5. Saltos inversos de pH da calistefina.	12
Esquema 1.6. Esquematização do comportamento de três tipos de sistemas fotocromicos. a) Tipo-T; b) Tipo-P; c) Sistema de multiestados.	15
Esquema 1.7. Formação do polímero supramolecular formado por unidades de monómero diferentes.	21
Esquema 1.8. Indução da complexação do catião flavílio com o cucurbit[7]urilo (CB[7]) por conversão da chalcona à catião flavílio por irradiação ou por salto de pH.	23
Esquema 1.9. Indução da conversão chalcona-catião flavílio por irradiação/salto de pH e complexação com cucurbit[8]uril (CB[8]).	24
Esquema 1.10. Fotodimerização supramolecular do PEG4a-BM, controlada pela irradiação. [59].	29
Esquema 2.1. Sequência de reações reversíveis após adição de base a soluções equilibradas de catião flavílio de oenina (saltos diretos de pH). Este esquema é aplicável a todas as antocianinas. Adaptado com permissão da referência[11]. direitos autorais de 2022 pela Sociedade Americana de Química.	34
Esquema 3.1. Proposta mecanística da formação do composto 5 em condições neutras.	59
Esquema 3.2. Mecanismo de formação do composto 5 em condições ácidas.	60
Esquema 3.3. Resumo do comportamento térmico do composto Py2 em soluções de H ₂ O/MeOH (1:1 v/v).	62
Esquema 4.1. Processo reversível do composto modelo controlado por estímulos externos.	92
Esquema 4.2. Processo reversível Ct/AH ⁺	95
Esquema 4.3. Mecanismo de complexação do composto 4-armPEG com o CB[8].	97
Esquema 4.4. Fotoindução supramolecular H-G (1:2) da mistura 4-armPEG (7,3x10 ⁻⁶ M) e CB[8] (2,7x10 ⁻⁵ M) a pH=4,8 irradiado a 365 nm.	98

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. <i>Constantes termodinâmicas da calistefina.</i> [11]	7
Tabela 2.1. Constantes ácido-base das bases quinoidais da oenina e malvina, bem como o equilíbrio de tautomerização. Erro estimado de 10%.	36
Tabela 2.2. (2º passo). Constantes de velocidade da oenina e malvina em meio ácido. Erro estimado 10%	38
Tabela 2.3. (2ª etapa). Constantes de velocidade do ataque de OH ⁻ aos monoglucósidos e diglucósidos de malvidina em meio básico. Erro estimado de 10%.	40
Tabela 2.4. (3ª etapa). Constantes de isomerização da oenina e malvina.	43

ACRÓNIMOS

1. (Cc + B)*	<i>Cis</i> -chalcona e hemicetal no estado excitado
2. ¹H-RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogénio-1
3. ¹³C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
4. 7NPy4	7-(N,N-dietilamino)-4-piridinochalcona
5. A	Base quinoidal
6. AcOEt	Acetato de etilo
7. AE	Análise elementar
8. AE	Análise elementar
9. AH⁺	Catião flavílio
10. AH²⁺	Catião flavílio protonado
11. B	Hemicetal
12. B⁺	Hemicetal monoprotonado
13. B²⁺	Hemicetal biprotonado
14. C₃H₃Br	Brometo de propargilo
15. ca	Cerca
16. Calist.	Calistefina
17. CB	Base conjugada do catião flavílio no equilíbrio ([CB] = [A] + [B] + [Cc] + [Ct])
18. CB[n]	Cucurbiturilo (onde n é o número de unidades de glicoluril)
19. CB[^]	Base conjugada do catião flavílio no pseudoequilíbrio ([CB [^]] = [A] + [B] + [Cc])
20. Cc	<i>Cis</i> -chalcona
21. Cc⁻	<i>Cis</i> -chalcona ionizada
22. Cc⁺	<i>Cis</i> -chalcona monoprotonada
23. Cc²⁺	<i>Cis</i> -chalcona biprotonada
24. COSY	Espectroscopia de correlação duplete
25. Ct	<i>Trans</i> -chalcona
26. Ct⁻	<i>Trans</i> -chalcona ionizada
27. Ct[*]	<i>Trans</i> -chalcona no estado excitado
28. Ct⁺	<i>Trans</i> -chalcona monoprotonada

29. Ct²⁺	<i>Trans</i> -chalcona biprotonada
30. CuSO₄.5H₂O	Sulfato de cobre(II) pentahidratado
31. DCM	Diclorometano
32. dd	Dupleto de dupleto
33. ddd	Dupleto de dupleto de dupleto
34. DMF	Dimetilformamida
35. dt	Dupleto de tripleto
36. ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização por electrospray
37. Glc	Glucose
38. H-RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
39. H₂SO₄	Ácido sulfúrico
40. HMBC	Correlação heteronuclear com múltiplas ligações
41. HOAc	Ácido acético (Acetato)
42. HSQC	Correlação heteronuclear de ligações simples
43. j	Constante de acoplamento escalar
44. K_a	Constante de equilíbrio ácido-base aparente
45. K_a[^]	Constante ácido-base no pseudoequilíbrio
46. K_a	Constante de equilíbrio ácido-base
47. k_a	Constante de velocidade da reação de dissociação da base quinoidal ao AH⁺
48. K_{ass}	Constante de equilíbrio da complexação
49. K_h	Constante de equilíbrio da reação de desidratação AH⁺/B
50. k_h	Constante de velocidade da reação de hidratação AH⁺/B
51. K_i	Constante de equilíbrio da reação de isomerização Cc/Ct
52. k_i	Constante de velocidade da reação de isomerização Cc/Ct
53. MsCl	Cloreto de Metanosulfonilo (também conhecido como Cloreto de Mesilo)
54. Na₂SO₄	Sulfato de sódio
55. NaN₃	Azida de sódio
56. NaOH	Hidróxido de sódio
57. ov	sobreposição de sinal (overlap)
58. pK_(x)	Constante aparente ácido-base (x indica o processo envolvido na dissociação)
59. pK_(x)	Constante ácido-base
60. PMDETA	N,N,N',N'',N'''-pentametildietilenotriamina
61. Py2	2'-piridinochalcona
62. Py3	3'-piridinochalcona
63. Py4	4'-piridinochalcona
64. TEA	Trietilamina

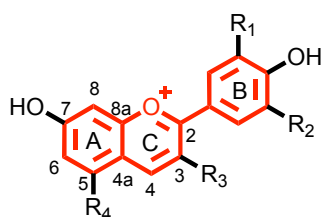
INTRODUÇÃO

Neste capítulo, será apresentada uma revisão bibliográfica dos trabalhos já publicados relacionados com os temas que trago como novidade científica. Serão discutidos os principais estudos, teorias e descobertas relevantes para o contexto da pesquisa.

No final do capítulo, serão apresentados os objetivos desta tese. Serão delineadas as metas e propósitos que nortearam a investigação, destacando a contribuição esperada para o campo científico em questão.

1.1 Antocianinas

Os compostos 2-fenil-1-benzopirílio mais importantes são as antocianinas. As antocianinas constituem uma grande família de corantes naturais, sendo responsáveis pela variedade de cores de flores e frutos, do vermelho ao azul na maioria das plantas [1], [2], [3]. São compostos solúveis em água, por isso são utilizados na indústria alimentar. A partir da base estrutural 2-fenil-1-benzopirílio podem ser obtidos diversos compostos antocianínicos (Figura 1.1) [1].



3-deoxiantocianidinas (R ₃ =H; R ₄ =OH)	λ_{max} (nm) ^a	antocianinas (R ₃ =OGlc, R ₄ =OH ou OGlc)	λ_{max} (nm) ^a
apigeninidinas (R ₁ =R ₂ =H)	480	pelargonidina (R ₁ =R ₂ =H; R ₄ =OH)	516
luteolinidina (R ₁ =OH; R ₂ =H)	498	peonina (R ₁ =OMe; R ₂ =H; R ₄ =OH)	528
trictetinidina (R ₁ =R ₂ =OH)	530	cianidina (R ₁ =R ₄ =OH; R ₂ =H)	530
		malvidina (R ₁ =R ₂ =OMe; R ₃ =R ₄ =OH)	538
		petunidina (R ₁ =OMe; R ₂ =R ₄ =OH)	540
		delfinidina (R ₁ =R ₂ =R ₄ =OH)	541

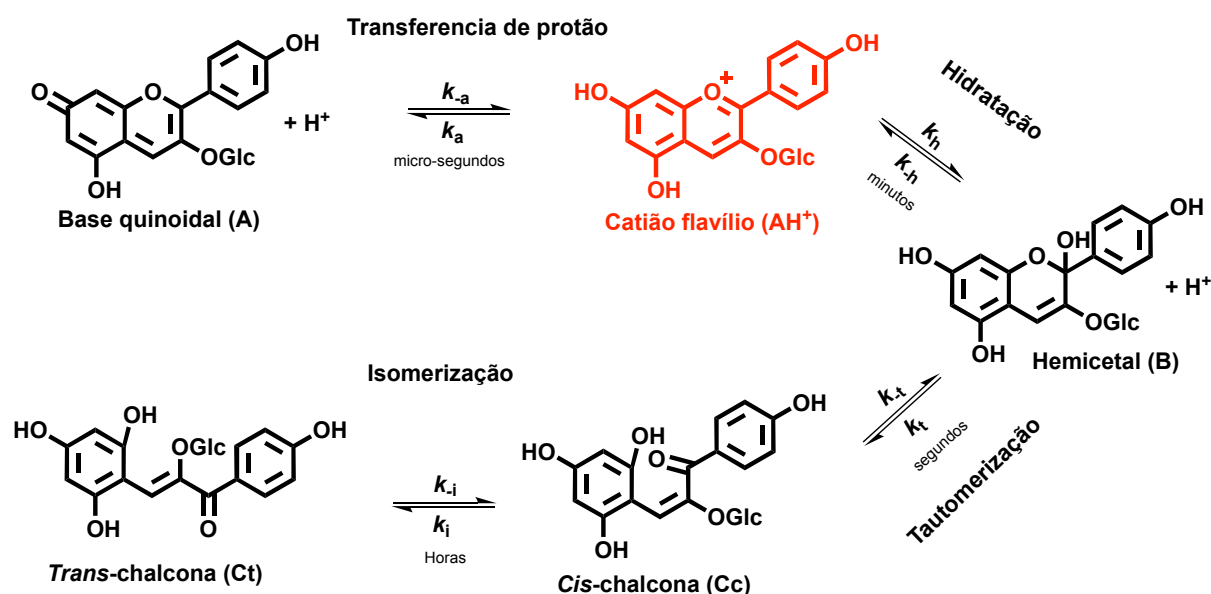
^a em MeOH 0,01% HCl.

Figura 1.1. Representação geral das antocianinas. Direitos autorais 2020, *Elsevier*. [1]

As propriedades físico-químicas das antocianinas são diretamente dependentes dos grupos substituintes. [4], [5] Estas propriedades têm sido utilizadas para diversas aplicações em diferentes áreas, desde a indústria alimentar [2], [6] até fotossensibilizadores para células solares sensibilizadas por corantes (DSSCs) [1]. As diferentes cores que as soluções de flavílio apresentam são o resultado de diferentes estados/espécies em equilíbrio, que podem ser atingidos reversivelmente por estímulos térmicos, de pH, luminosos e até elétricos. [7], [8]

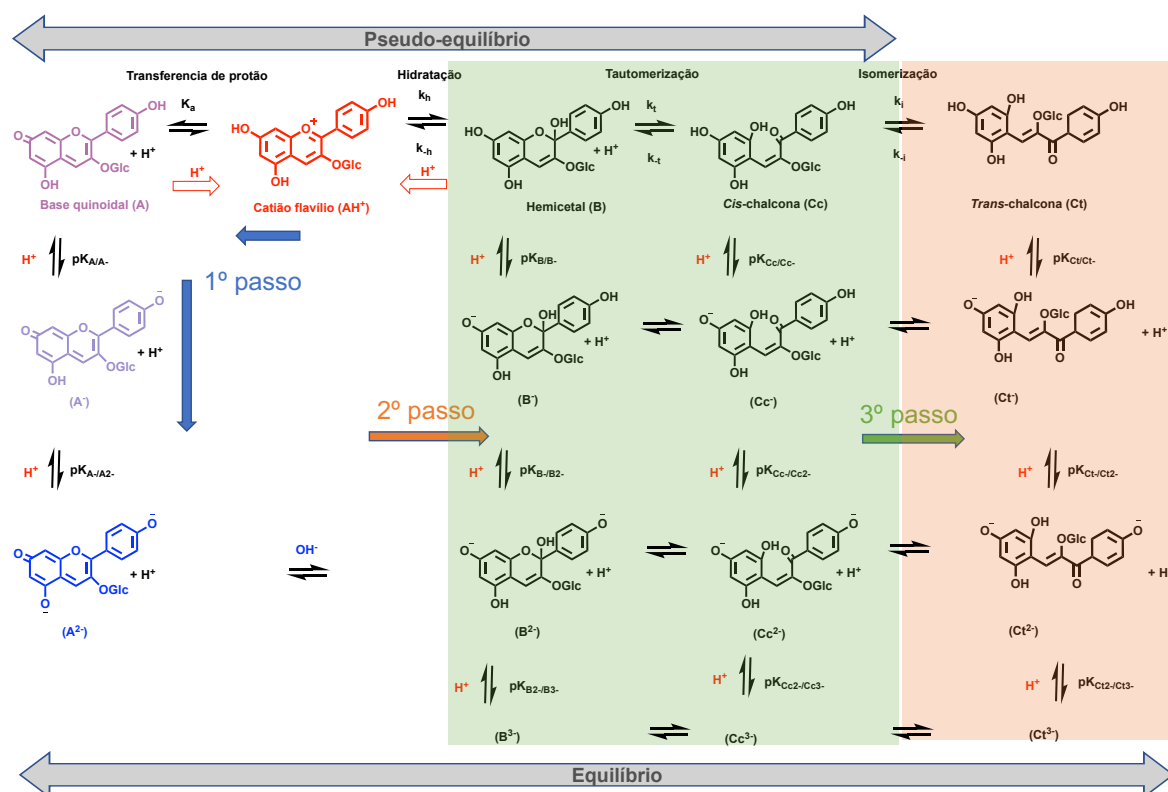
1.1.1 Sistemas multiestado (processos cinéticos e termodinâmicos)

Em condições ácidas (pH≤1) o catião flavílio é a espécie predominante em solução. Quando se adiciona base a uma solução equilibrada do catião flavílio, salto direto de pH, este gera uma rede de espécies químicas reversivelmente interligadas. A pH≤6, é possível observar 5 espécies, ver Esquema 1.1



Esquema 1.1. Multiestado da pelargonidina-3-glucósido (calistefina) a pH moderadamente ácido.

A pH ácidos ou moderadamente ácidos, a espécie dominante no equilíbrio é o hemicetal, seguido das chalconas e da base quinoidal. Na zona básica, a rede de equilíbrio é ampliada pela desprotonação do hemicetal e das chalconas Cc e Ct, formando espécies monoaniónicas, ou pluri aniónicas[7] Esquema 1.2.



Esquema 1.2. Multiestado de espécies químicas de calistefina.

Outra forma de visualização desses sistemas é a construção de um diagrama de níveis de energia.[4] No Esquema 1.3 é apresentado o diagrama de níveis de energia do equilíbrio das espécies geradas pelo catião flavílio em meio ácido (pH≤6). Os níveis de energia são obtidos diretamente a partir da Eq. 1.1 onde ΔG^0 é a energia livre de Gibbs em condições padrão, R é a constante dos gases perfeitos, T é a temperatura absoluta, e K é a constante de equilíbrio para cada processo do sistema das antocianinas.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad \text{Eq. 1.1}$$

Vamos considerar uma reação ácido-base como o catião flavílio e a base quinoidal com uma constante de equilíbrio K_a , Eq. 1.2.



A razão entre as concentrações da base quinoidal e do catião flavílio é dada Eq. 1.3.

$$\frac{[A]}{[AH^+]} = \frac{K_a}{[H^+]} \quad \text{Eq. 1.3}$$

Quando pH = pK_a a razão base quinoidal catião flavílio é igual a 1 e necessariamente ambas as espécies estão no mesmo nível de energia, Eq. 1.4.

$$\frac{AH^+}{A} = \frac{1}{K_a} \quad \text{Eq. 1.4}$$

$pH = pK_a$

Considerando agora pH=pK_a-1 ou [H⁺]=10K_a

Substituindo [H⁺] na Eq. 1.3, a razão base quinoidal catião flavílio é dada pela Eq. 1.5.

$$\frac{[A]}{[AH^+]} = \frac{1}{10} \quad \text{Eq. 1.5}$$

Consequentemente a energia livre de Gibbs é dada por $\Delta G^0 = -RT \ln(1/10)$, substituindo as constantes na Eq. 1.1, $\Delta G^0 = +5,7 \text{ kJmol}^{-1}$. Conforme ilustrado na Figura 1.2, observa-se que a estabilidade do catião flavílio é diretamente influenciada pelo pH do ambiente. Cada unidade de pH abaixo do ponto em que

pH=pK_a resulta numa estabilização adicional de 5,7 kJ/mol para o catião flavílio. Por outro lado, cada unidade de pH acima desse ponto exerce um efeito desestabilizador equivalente sobre o catião flavílio.

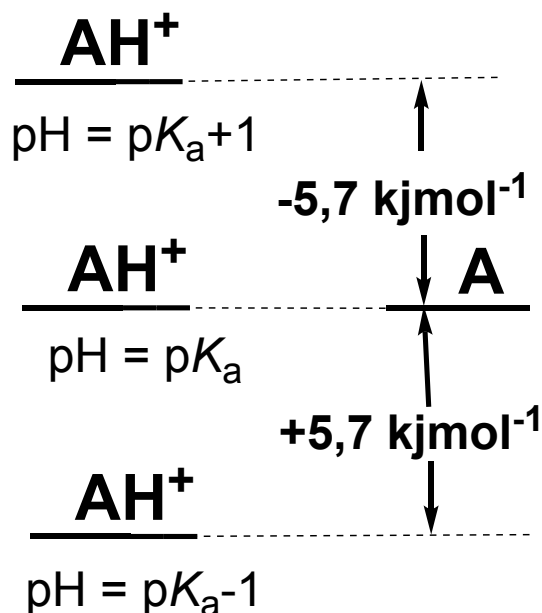
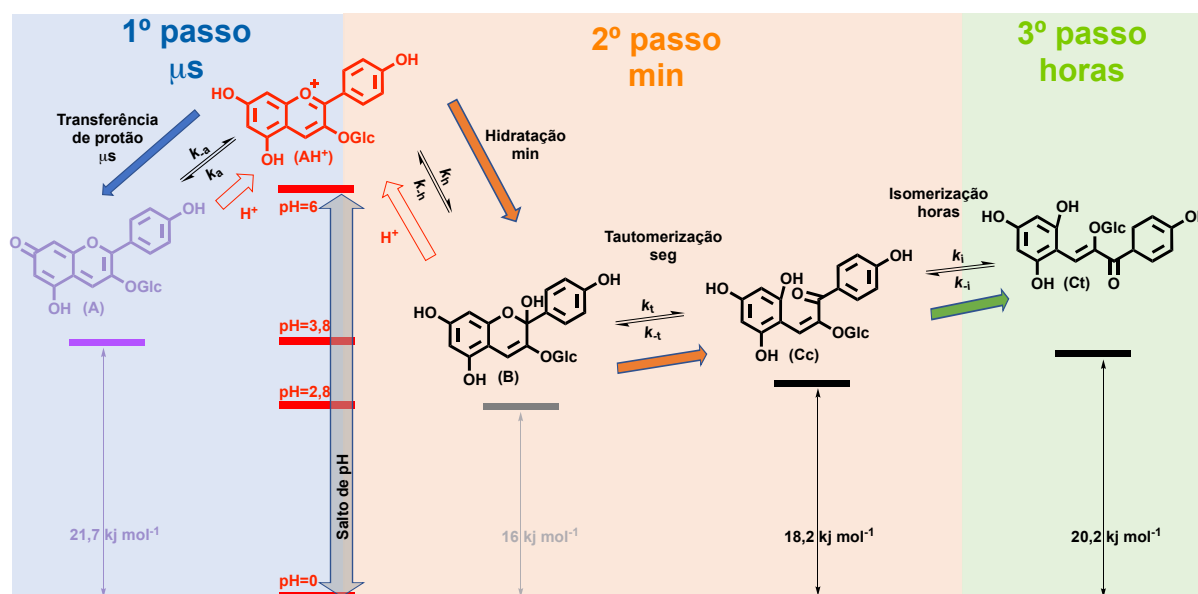


Figura 1.2. Variação da energia padrão de Gibbs por unidade de pH.

É conveniente usar como referência AH⁺ à pH=0. O nível de energia do catião flavílio para pH=pK_a dá a posição da base quinoidal, Eq. 1.2. Raciocínio idêntico pode ser feito para obter a posição do hemicetal, correspondente a pH=pK_h, apresentado na Eq. 1.6.



O nível de energia da *cis*-chalcona é obtido a partir da posição do hemicetal e o ΔG^0 é calculado para a constante de equilíbrio K_t . O mesmo procedimento é aplicado para a *trans*-chalcona usando a constante de equilíbrio K_i .



Esquema 1.3. Diagrama do nível de energia da calistefina.

Ao fazer um salto de pH de soluções equilibradas do catião flavílio ($\text{pH} \leq 1$) para $\text{pH} = 6$, acontecem 3 processos, o primeiro processo é a transferência protônica que desloca o equilíbrio para a formação da base quinoidal em submicrosegundos, Eq. 1.7.[9], [10] Na segunda etapa acontecem dois processos, Eq. 1.8 e Eq. 1.9. Primeiro a hidratação, formação do hemiacetal, e segundo a tautomerização, abertura do anel para formar a *cis*-chalcona. Considerando que a hidratação é o processo mais lento, a formação do hemiacetal controla esta segunda etapa.



Dado que a isomerização *cis-trans* é significativamente mais lenta, todas as espécies envolvidas entram num estado de equilíbrio, formando o pseudoequilíbrio. Nesse estado transitório, todas as espécies, exceto a *trans*-chalcona, estão em equilíbrio, Eq. 1.10 e Eq. 1.11.

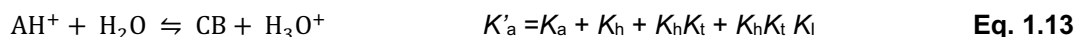


$$[CB^*] = [A] + [B] + [Cc] \quad \text{Eq. 1.11}$$

O equilíbrio final é alcançado quando se obtém a *trans*-chalcona, através da isomerização *cis-trans*, Eq. 1.12.



As equações Eq. 1.12 à Eq. 1.14 e Eq. 1.17 representam o equilíbrio termodinâmico, que pode ser simplificado num equilíbrio ácido base, isto é, um equilíbrio entre AH^+ e a sua base conjugada CB. Esta simplificação está apresentada na Eq. 1.13 e Eq. 1.14, e facilita muito o tratamento matemático das equações do sistema.



$$[CB] = [A] + [B] + [Cc] + [Ct] \quad \text{Eq. 1.14}$$

A dedução da constante K'_a está apresentada no apêndice A.

A distribuição das frações molares das diversas espécies é obtida a partir da Eq. 1.13 à Eq. 1.18.

$$C_0 = [AH^+] + [CB] \quad \text{Eq. 1.15}$$

$$X_{AH^+} = \frac{H_3O^+}{H_3O^+ + K'_a}; \quad X_{CB} = \frac{K'_a}{H_3O^+ + K'_a} \quad \text{Eq. 1.16}$$

A fração molar das espécies de CB é determinada utilizando coeficientes de distribuição conforme a Eq. 1.17 e Eq. 1.18.

$$a_0 + a_1 + a_2 + a_3 = 1 \quad \text{Eq. 1.17}$$

$$X_A = a_0 X_{CB}; \quad X_B = a_1 X_{CB}; \quad X_{Cc} = a_2 X_{CB}; \quad X_{Ct} = a_3 X_{CB} \quad \text{Eq. 1.18}$$

Os cálculos matemáticos permitem identificar e compreender as diferentes faixas de acidez e basicidade, mostrando a reatividade e comportamento em solução. A Tabela 1.1 apresenta os distintos valores de pK_a da calistefina.

Tabela 1.1. Constantes termodinâmicas da calistefina.[11]

	pK'_a	pK''_a	pK'''_a	pK''''_a	pK_a^*	$pK_{A/A-}^*$	$pK_{A-/A2-}^*$
Calist.	3,07	6,3	7,4	10,7	4,3	6,3	7,5

*Erro estimado de 10%

Por meio de cálculos matemáticos meticulosos, foi possível elaborar o gráfico detalhado de distribuição das frações molares, conforme exemplificado na Figura 1.3. Essa abordagem analítica proporcionou uma representação visual precisa da distribuição das diferentes espécies moleculares em relação às condições específicas de pH.

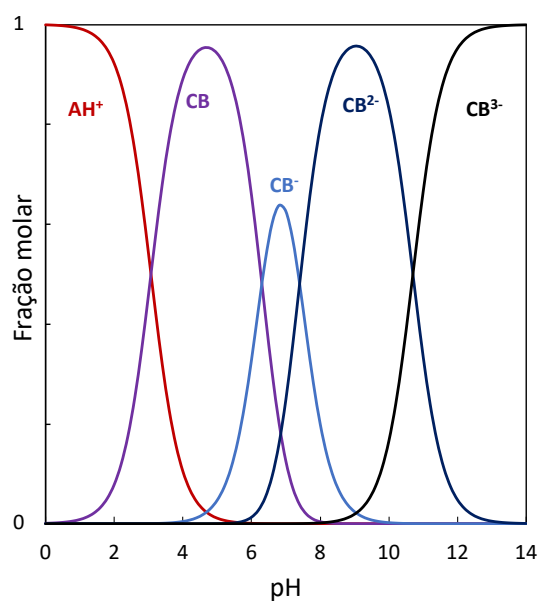


Figura 1.3. Distribuição da fração molar da calistefina.[11]

Quando o pH atinge valores mais elevados, $pH > 6$, as espécies neutras podem desprotonar, Esquema 1.2, este processo é apresentado pelas Eq. 1.19 à Eq. 1.24.





$$\text{CB} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CB}^- + \text{H}_3\text{O}^+; K''_a = \frac{K_{\text{A/A}^-}K_a + K_{\text{A/A}^-}K_h + K_{\text{A/A}^-}K_hK_t + K_{\text{A/A}^-}K_hK_tK_i}{K'_a} \quad \text{Eq. 1.23}$$

$$[\text{CB}^-] = [\text{A}^-] + [\text{B}^-] + [\text{Cc}^-] + [\text{Ct}^-] \quad \text{Eq. 1.24}$$

O sistema pode ser estendido para as espécies dianiónicas, ver referencia[8]

1.1.2 Cinética e termodinâmica

Para o estudo dos processos cinéticos e termodinâmicos, foi realizada uma série de saltos de pH: i) adição de base a soluções equilibradas do catião flavílio a $\text{pH} \leq 1$ (saltos diretos de pH) ou ii) adição do ácido a soluções de pH mais elevado de volta ao catião flavílio a $\text{pH} \leq 1$ (saltos inversos de pH).[1], [8], [11]

1.1.2.1 Saltos diretos de pH

Ao fazer o salto de pH ocorrem processos cinéticos muito rápidos na ordem dos milissegundos. Usando o equipamento de fluxo interrompido é possível obter os espectros de absorção 10ms depois do salto de pH e representá-los em função do pH. Para monitorizar estes processos é usado o fluxo interrompido (stopped flow). O que permite traçar os espectros antes da base quinoidal desaparecer para formar hemicetal e sequencialmente outras espécies da rede de equilíbrio. Representando a absorção a um dado comprimento de onda em função do pH, obtemos as curvas de titulação e por um processo de ajuste matemático às constantes de acidez, apresentadas como $\text{p}K = -\log K$, Figura 1.4a. Por decomposição matemática é possível obter o espectro de cada espécie, desde o catião flavílio à base quinoidal bi-desprotonada sem que reajam, apresentados na Figura 1.4b.[11]

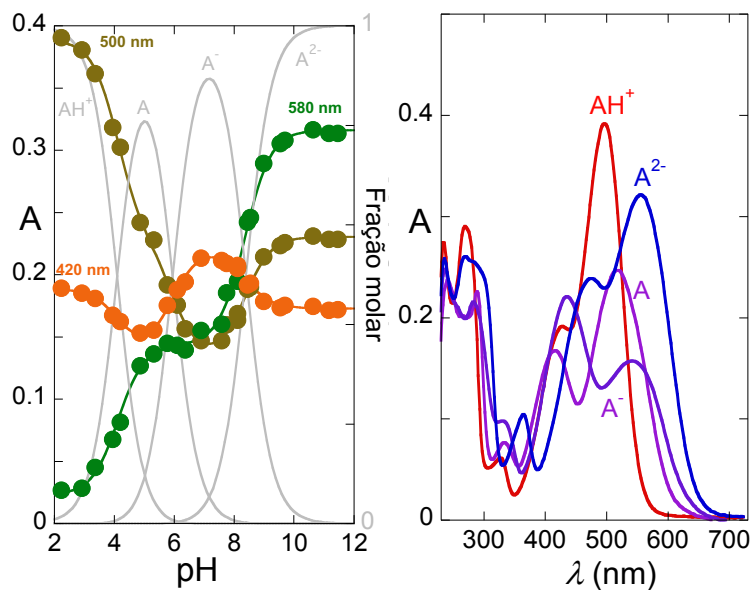
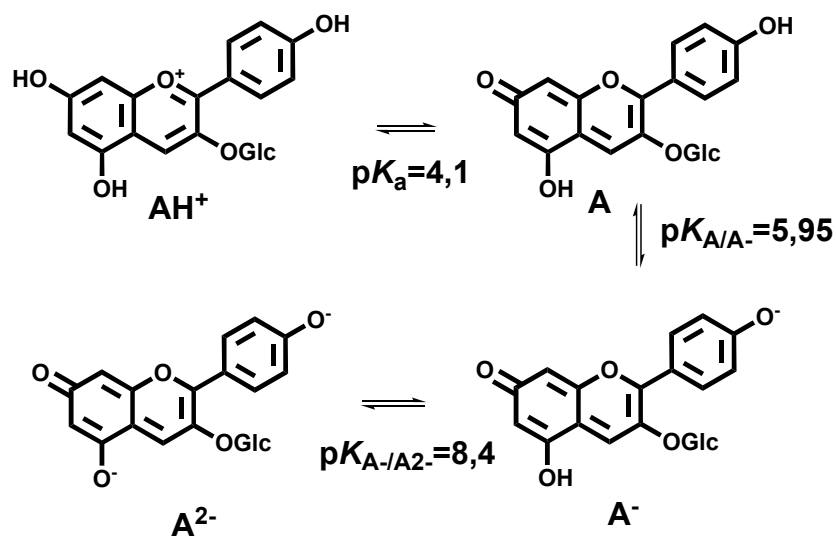


Figura 1.4. Pelargonidina-3-O-glucósido. a) curvas de titulação que permitiram obter os pK_a s do Esquema 1.4; b) Espectro de absorção de cada espécie individual.

No Esquema 1.4 é apresentada a sequência de desprotonação da calistefina nos primeiros 10ms após o salto de pH, saltos diretos de pH=1 para valores pH mais elevados.[11]



Esquema 1.4. Desprotonação da calistefina nos primeiros 10ms após o salto de pH.

Este é o primeiro passo cinético após o salto direto de pH. As constantes termodinâmicas podem ser apresentadas conforme as Eq. 1.25 à Eq. 1.27.



Hidratação – No segundo passo acontecem dois processos cinéticos; um mais lento na ordem dos minutos (hidratação para formação do hemicetal) seguido de outro mais rápido na ordem dos segundos (tautomerização, abertura do anel e formação da *cis*-chalcona). Esta etapa é, por conseguinte, controlada pela hidratação. Usando técnicas de monitorização sensíveis a reações de cinética rápida, como o fluxo interrompido, é possível ver o desaparecimento da base quinoidal por um processo mono-exponencial.[1], [8], [11] Pode ser apresentado matematicamente pela Eq. 1.28.

$$k_{2^\circ\text{passo}} = X_{AH^+}k_h + X_Bk_{-h}[H^+] \quad \text{Eq. 1.28}$$

Considerando a situação em valores de pH ácidos e moderadamente ácidos antes da interferência das espécies aniónicas. X_{AH^+} é a fração molar de AH^+ no equilíbrio com A, e X_B é a fração molar de B no equilíbrio com Cc, a substituição destes dados é apresentada na Eq. 1.29.

$$k_{2^\circ\text{passo}} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a}k_h + \frac{1}{1 + K_t}k_{-h}[H^+] \quad \text{Eq. 1.29}$$

Quando os valores de pH variam de ácidos a moderadamente básicos, X_{AH^+} passa a ser a fração molar de AH^+ no equilíbrio com as bases quinoidais A e A^- , e X_B é a fração molar de B no equilíbrio com Cc e Cc^- , a cinética é apresentada conforme Eq. 1.30.

$$k_{2^\circ\text{passo}} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_a[H^+] + K_aK_{A/A^-}}k_h + \frac{[H^+]}{(1 + K_t)[H^+] + K_{B/B^-} + K_{Cc/Cc^-}K_t}k_{-h}[H^+] \quad \text{Eq. 1.30}$$

Isomerização - Durante o processo de isomerização em meio ácido todas as espécies, exceto a Ct, estão em equilíbrio (pseudoequilíbrio). A cinética da isomerização em meio ácido antes da interferência das espécies aniônicas é apresentada pela Eq. 1.31.

$$k_{3^o\text{passo}} = X_{Cc}k_i + X_{Ct}k_{-i} \quad \text{Eq. 1.31}$$

Onde X_{Cc} é a fração molar de Cc no pseudo-equilíbrio e X_{Ct} é igual a 1, temos Eq. 1.32.

$$k_{3^o\text{passo}} = \frac{K_h K_t}{[H^+] + K_a} k_i + k_{-i} \quad \text{Eq. 1.32}$$

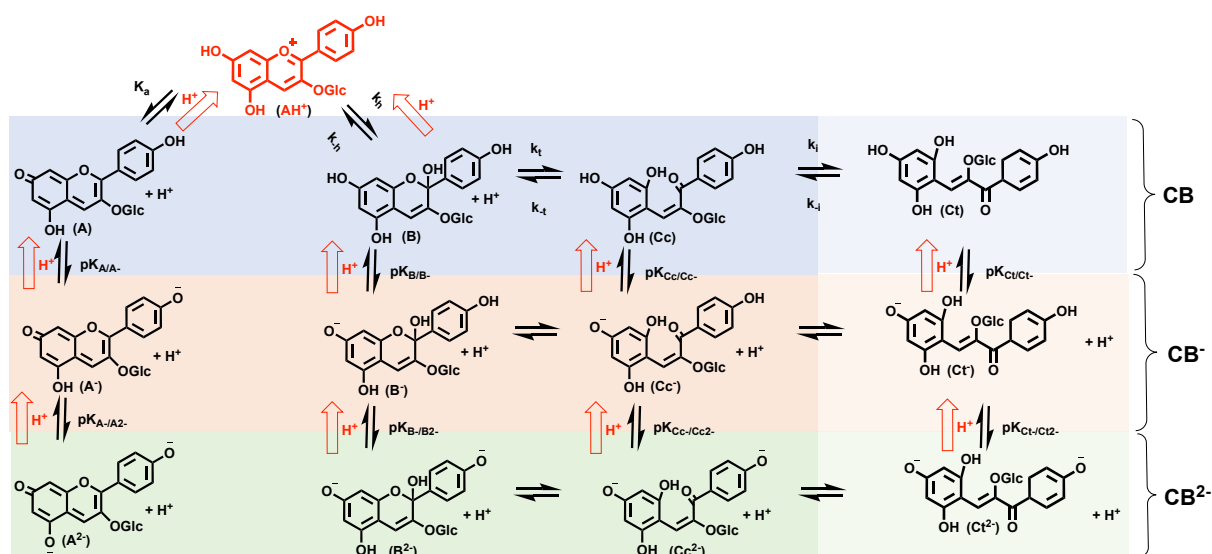
Quando passamos para uma faixa de pH em que as espécies aniônicas se formam, a cinética do terceiro passo é apresentada nas Eq. 1.33 e Eq. 1.34.

$$k_{3^o\text{passo}} = X_{Cc}k_i + X_{Ct}k_{-i} + X_{Cc^-}k_{i^-} + X_{Ct^-}k_{-i^-} \quad \text{Eq. 1.33}$$

$$k_{3^o\text{passo}} = \frac{K_h K_t [H^+]}{[H^+]^2 + K_a [H^+] + K_a K_a} k_i + \frac{[H^+]}{[H^+] + K_{Cc/Cc^-}} k_{-i} + \frac{K_h K_t K_{Cc/Cc^-}}{[H^+]^2 + K_a [H^+] + K_a K_a} k_{i^-} + \frac{K_{Ct/Ct^-}}{[H^+] + K_{Ct/Ct^-}} k_{-i^-} \quad \text{Eq. 1.34}$$

1.1.2.2 Saltos inversos de pH

Os saltos inversos de pH monitorizados por fluxo interrompido são uma ferramenta poderosa para calcular as constantes de equilíbrio das antocianinas.[1], [8], [11], [12], [13] O procedimento consiste em equilibrar uma solução a valores de pH superiores àqueles onde o catião flavílio é a única espécie ($\text{pH} > 1$), aguardar o tempo necessário para atingir o equilíbrio (ou pseudo-equilíbrio) e realizar uma inversão do pH de volta para o catião flavílio ($\text{pH} \leq 1$), Esquema 1.5.[11]



Esquema 1.5. Saltos inversos de pH da calistefina.

Logo após o salto de pH todas espécies aniônicas (CB^- e CB^{2-}) presentes ao pH inicial, formam logo as respectivas espécies neutras (CB), porque a transferência de próton ocorre em milissegundos.

Aos valores de pH muito ácidos dos saltos inversos de pH acontece uma “mudança de regime”, isto é, a hidratação é mais rápida que a tautomerização. Como exemplo é apresentada a Figura 1.5. Depois do salto de pH não foi observado a base quinoidal (amplitude inicial) porque ela converte-se imediatamente em catião flavílio durante o tempo de mistura do fluxo interrompido. O ajuste da recuperação completa do catião flavílio é feito por uma bi-exponencial ($k_h > k_t$).

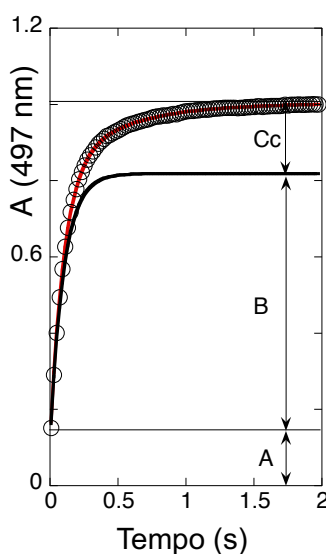


Figura 1.5. Demonstração da mudança de regime ($k_h > k_t$).

Os saltos inversos de pH revelam a distribuição da fração molar das espécies numa ampla faixa de pH. Portanto, estes estudos de saltos inversos de pH permitem contabilizar a fração molar de cada espécie em equilíbrio com a sua base conjugada em diferentes valores de pH.[1], [8], [11], [12], [13]

1.2 Sais de flavílio sintéticos

A utilização de sais de flavílios sintético como modelos de estudo para compostos naturais teve início no início do século XX, com a síntese do primeiro sal de flavílio por Carl Bullöw e Hermann Wagner.[14] A partir dessa data, uma série de trabalhos notáveis concluiu que o 2-fenil-1-benzopirílio (catião flavílio, representado na Figura 1.6 serve como base estrutural para os compostos responsáveis por uma ampla gama de cores, indo do vermelho ao puro azul. A cor vermelha está associada à forma ácida, com o oxigênio carregado positivamente, enquanto o número de grupos hidroxilo no anel B é responsável pelo deslocamento da cor em direção ao azul.[1], [3], [15]

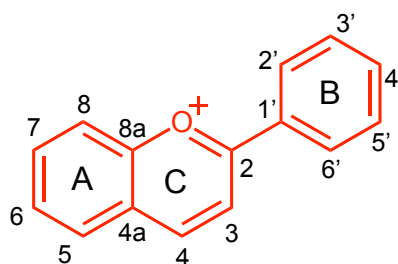


Figura 1.6. Catião flavílio.

A condensação de acetofenonas com 2-hidroxibenzaldeídos em meio ácido é um dos métodos mais empregados para a síntese de sais de flavílio,[16], [17] conhecida como síntese clássica de Robinson. Permitindo o acesso a uma vasta gama de sais de flavílio, dependendo do padrão de substituição dos reagentes. A síntese e elucidação da estrutura do cation flavílio representaram marcos históricos que impulsionaram avanços notáveis na compreensão da química das antocianinas.[16], [17], [18] O estudo da rede de reações químicas dos compostos de flavílio, acompanhado pelas primeiras medidas quantitativas de absorção UV-Vis do cation flavílio, desempenhou um papel crucial, contribuindo significativamente para a compreensão do comportamento químico desses compostos em solução.[19] Desde então até os dias atuais, pesquisas contínuas têm revelado a complexidade e versatilidade dos sais de flavílio, destacando sua capacidade única de alternar entre várias espécies em resposta a estímulos externos, como pH, temperatura, luz e elétricos.[4], [7], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26] Na Figura 1.7, são destacados alguns exemplos de flavílios sintéticos, cujas propriedades em solução podem ser controladas por estímulos externos.

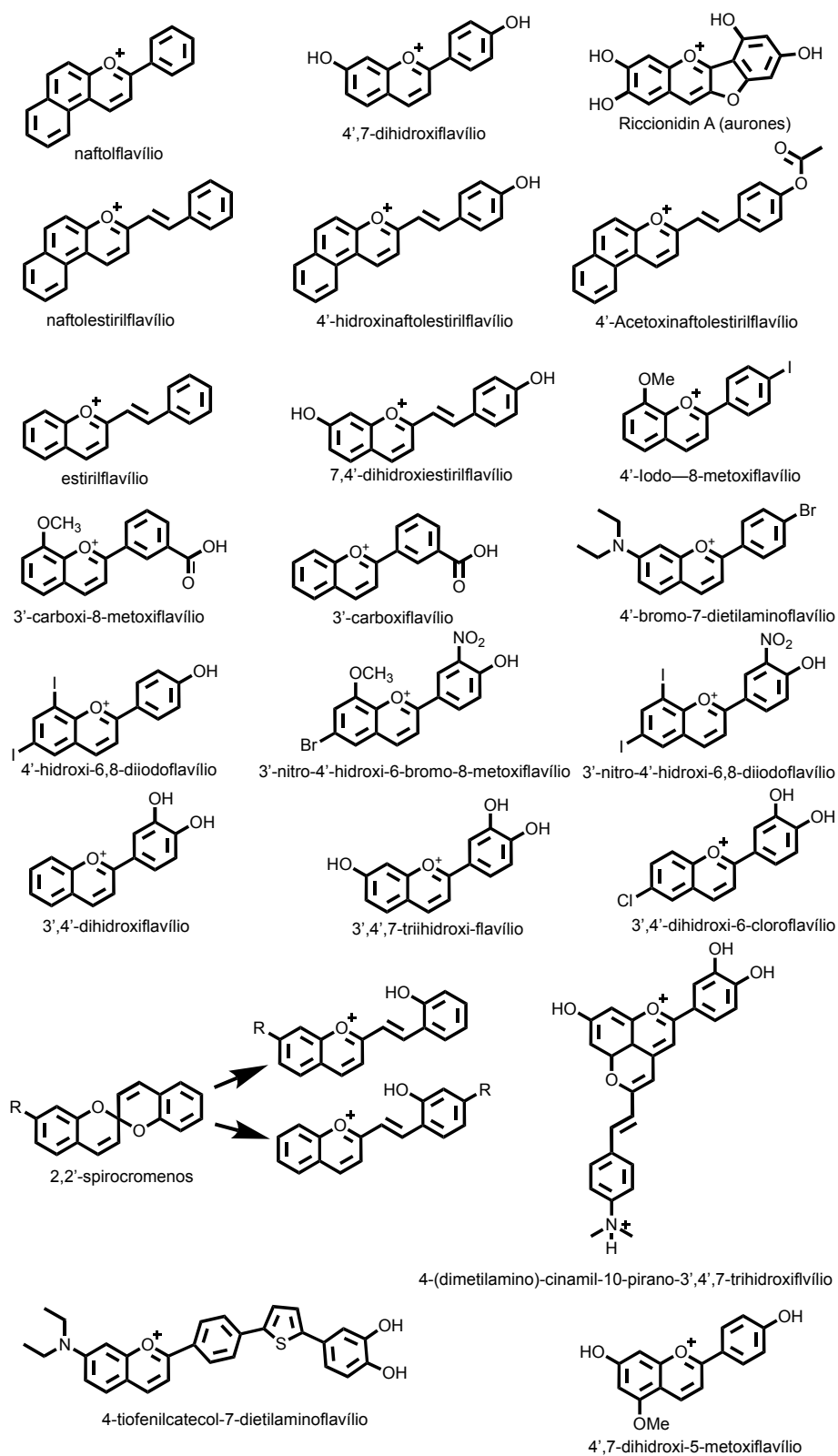
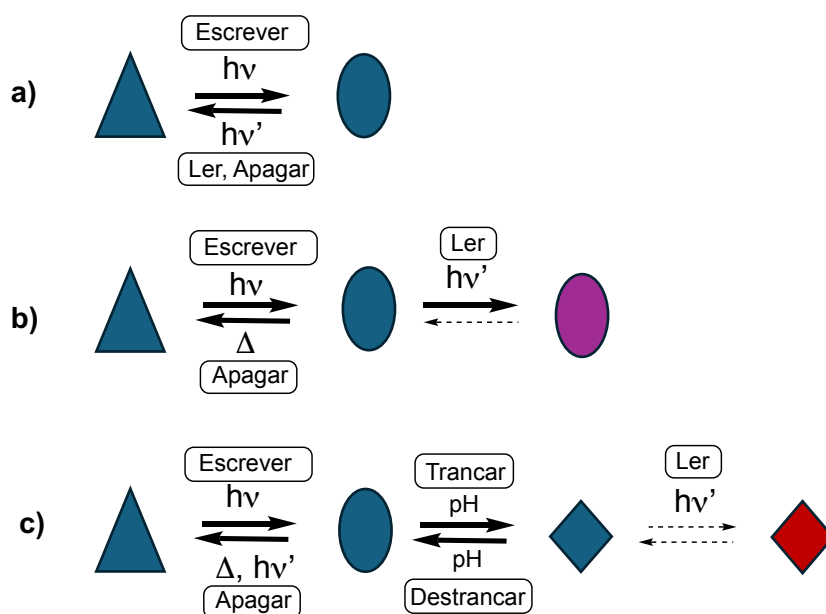


Figura 1.7. Alguns exemplos de flavílio sintéticos.

No contexto deste trabalho, dedicamos uma análise abrangente aos estímulos externos, com destaque para a luz e o pH. A influência da luz foi examinada, evidenciando sua capacidade de formar sistemas fotocromicos e induzir reversões de estados. Paralelamente, a variação do pH foi considerada como um estímulo externo fundamental, sendo discutido como um mecanismo-chave na formação de sistemas multiestado. Ao explorar de maneira detalhada esses dois estímulos, este trabalho busca fornecer uma compreensão aprofundada sobre a criação desses sistemas dinâmicos e multifacetados.

1.2.1 O sistema fotocromico

O sistema fotocromico ilustrado no Esquema 1.6, é definido como uma mudança reversível de forma/cor induzida pela luz numa espécie química, gerando duas formas distintas, X e Y, cada uma com espectros de absorção diferentes. A forma X, termodinamicamente estável, sofre transformação para a forma Y por irradiação, e a reação inversa pode ocorrer termicamente, caracterizando o fotocromismo do tipo T, conforme demonstrado no Esquema 1.6b. Em contraste, o fotocromismo do tipo P, representado Esquema 1.6a, refere-se a sistemas que não apresentam reversão térmica ao estado inicial, mas passam por reações fotoquímicas ao serem expostos a diversos comprimentos de onda. Por fim, o Esquema 1.6c destaca um processo reversível controlado por dois estímulos externos, luz e pH, capaz de criar mais de um estado estável, classificando-se como um sistema multiestado.[1], [4], [7], [20], [26], [27] Essa classificação fornece uma compreensão abrangente das características intrínsecas dos sistemas fotocromicos e da sua notável capacidade de resposta a estímulos específicos.



Esquema 1.6. Esquematisação do comportamento de três tipos de sistemas fotocromicos. **a)** Tipo-T; **b)** Tipo-P; **c)** Sistema de multiestados.

Além disso, é fundamental ressaltar que o fotocromismo transcende a mera variação na transmissão ótica, abrangendo fenômenos físicos reversíveis, como memórias óticas,[3] mudanças elétricas e transporte de íons por membranas.[1], [3], [28] A compreensão desses avanços históricos torna-se essencial para a exploração mais aprofundada da química e das aplicações dos compostos de flavílio, fornecendo insights valiosos num campo dinâmico e fascinante das antocianinas. Esses conhecimentos não apenas revelam a complexidade intrínseca desses compostos, mas também abrem portas para inovações num espectro diversificado de aplicações com veremos a seguir.

1.2.2 Outras aplicações de sais de flavílio sintético

Os compostos de flavílio desempenham um papel crucial em diversas aplicações tecnológicas, abrangendo desde a sua utilização como corantes em pinturas e aditivos alimentares, conferindo cores vibrantes e propriedades antioxidantes,[29], [30], [31] até a sua aplicação na eficiência energética de células solares sensíveis a corantes.[28] Além disso, a notável capacidade desses compostos de alternar entre diferentes espécies em resposta a estímulos externos, como pH, temperatura e luz, os torna valiosos em tecnologias de memórias óticas e materiais fotocromáticos.[32], [33] Outra área de destaque é o desenvolvimento de embalagens inteligentes para alimentos, onde esses compostos atuam como sensores de pH, contribuindo para a inovação em embalagens.[29] Além disso, a versatilidade dos compostos de flavílio se estende a diversos setores tecnológicos e científicos, incluindo química supramolecular, nanotecnologia e sistemas biológicos, promovendo avanços em áreas como entregas de fármacos, catálise e sensores.[1], [3], [4], [7], [26], [33], [34], [35], [36], [37]

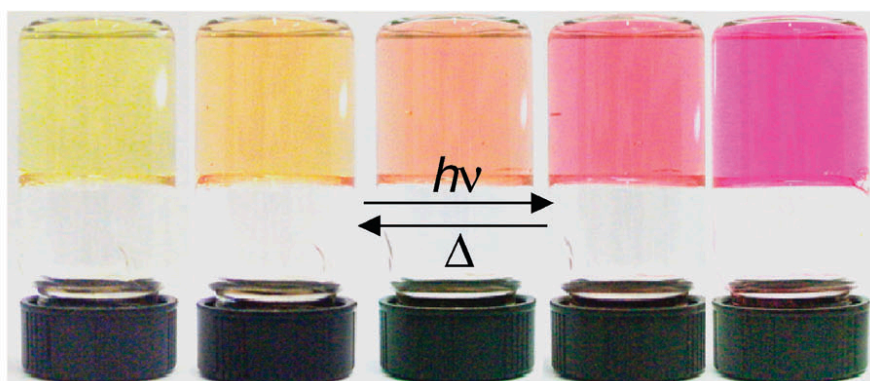


Figura 1.8. Um exemplo de memória ótica.[34] Copyright 2008, American Chemical Society.

Em síntese, a importância e o potencial significativo dos compostos de flavílio abrangem diversas aplicações, solidificando sua posição como componentes versáteis e valiosos na tecnologia humana. A manipulação dos substituintes incorporados ao 2-fenil-1-benzopirílio emerge como uma estratégia controladora e gerenciadora dessas aplicações, destacando a relevância da modulação precisa para otimizar suas propriedades em diferentes contextos tecnológicos.

1.2.3 Efeito dos substituintes

As propriedades físico-químicas dos sais flavílio são fortemente influenciadas pelos grupos substituintes. A presença de grupos amino na posição 7, por exemplo, promove um aumento na conjugação do sistema, resultando no deslocamento das bandas de absorção para valores de comprimentos de onda superiores.[38], [39] A distribuição das frações molares de todas as espécies depende do grau de substituição e da natureza dos substituintes, Figura 1.9.[3] No contexto da utilização de flavílios sintéticos como modelos de memória ótica, é crucial considerar um detalhe essencial, a existência de uma barreira cinética que evite a isomerização térmica da *cis*-chalcona para *trans*-chalcona, assegurando a estabilidade térmica do sinal gravado.[40], [41] É relevante notar que a presença dessa barreira cinética depende dos substituintes do flavílio, sendo geralmente aumentada por substituintes doadores na posição 4' e diminuída por substituintes doadores na posição 7.[1], [3], [40], [41]

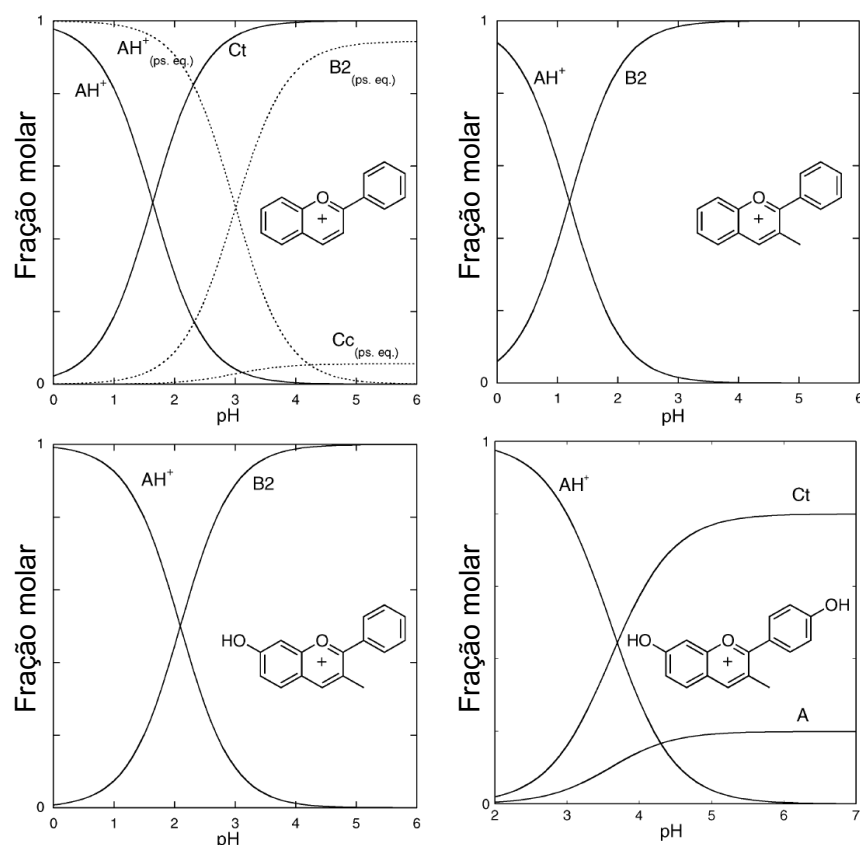


Figura 1.9. Distribuição da fração molar no equilíbrio do catião flavílio e derivados 3-metilflavílio.[3] Copyright 2012, Chem. Soc. Rev.

Em conclusão, os sais de flavílio sintético representam uma área fascinante e dinâmica da química, que tem desempenhado um papel fundamental no avanço do nosso entendimento sobre compostos naturais e na criação de novas tecnologias. Desde suas primeiras sínteses até os estudos mais

recentes sobre suas propriedades e aplicações, os sais de flavílio têm mostrado uma versatilidade surpreendente, respondendo a uma variedade de estímulos e encontrando uso numa ampla gama de campos, desde a arte até a ciência dos materiais. À medida que continuamos a explorar e compreender melhor esses compostos, podemos esperar ainda mais inovações e descobertas emocionantes que moldarão o futuro da química e da tecnologia.

1.3 Química supramolecular

Com o objetivo de economizar recursos, a atual era tecnológica tem avançado muito na miniaturização das máquinas e equipamentos tecnológicos.[42], [43] A dificuldade de manipular peças cada vez mais pequenas (na escala dos micrómetros) levou os químicos a trabalharem a nível molecular.[44] Jean-Marie Lehn, prémio Nobel da química em 1987, juntamente com Donald Cram e com Charles Pederson, definiu a química supramolecular, como “a química de complexos moleculares ou a química da ligação não covalente”. [45], [46] Esta área de estudo investiga a interação entre moléculas, que resulta na formação de estruturas hierárquicas maiores e mais complexas. Essas estruturas são geralmente mantidas por ligações não-covalentes, as quais, embora mais fracas do que as ligações covalentes, desempenham um papel fundamental na formação e estabilização das supramoléculas.

A Química Molecular, por sua vez, é a ciência que explora as interações entre a matéria, principalmente como os átomos se unem para formar moléculas, sendo a ligação covalente sua característica primordial, uma força forte que mantém as moléculas unidas.[47] No entanto, além das ligações covalentes, existem outras interações mais fracas, como as ligações de hidrogénio, interações dipolo-dipolo ou ião-dipolo e as forças de Van Der Waals, que podem ocorrer entre moléculas distintas ou mesmo dentro de uma única molécula, resultando em estruturas maiores e mais complexas conhecidas como supramoléculas ou complexos.[46], [48], [49] A Figura 1.10 apresenta a comparação entre a química molecular e a química supramolecular. A Figura 1.10a ilustra uma reação química (química molecular) na qual dois precursores reagem para formar um produto. Na Figura 1.10b, é mostrado que os produtos obtidos por meio de reações químicas podem se incorporar um ao outro, desde que sejam grandes o suficiente e as interações não covalentes favoreçam a formação do complexo. Por fim, a Figura 1.10c demonstra que dois monómeros obtidos por química molecular podem formar polímeros por meio de interações não covalentes. É importante destacar que os processos representados nas Figura 1.10b e Figura 1.10c são reversíveis.

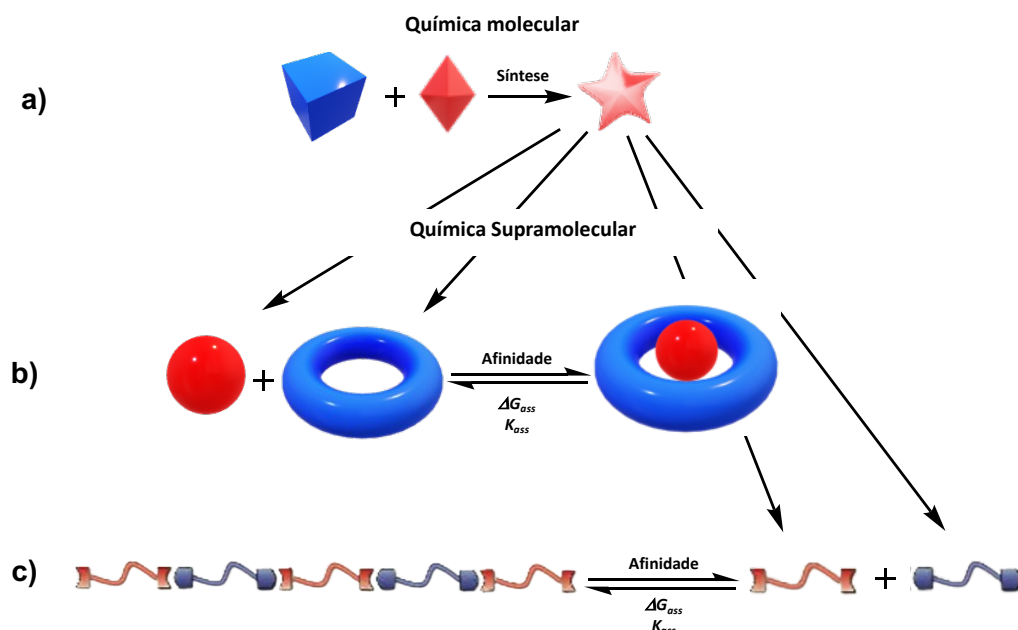


Figura 1.10. Ilustração da transição da Química Molecular para a Química Supramolecular.[48], [50]

A Química Supramolecular, cujo termo deriva do grego "Supra" significando "para além de", representa um campo que transcende a química molecular.[45], [46], [47] Inspirada em moléculas naturais como proteínas e oligonucleótidos, a Química Supramolecular tem sido fundamental no avanço da nanotecnologia e na criação de máquinas moleculares, como reconhecido pelo Prémio Nobel de Química de 2016.[20], [51] Assim como os dispositivos macroscópicos necessitam de energia para operar, os dispositivos moleculares também precisarão de estímulos externos, como energia química, energia elétrica ou luz, para desempenhar suas funções. Esses estímulos energéticos são essenciais para ativar os processos moleculares e realizar as operações desejadas pelos dispositivos em nível molecular, um exemplo é apresentado na Figura 1.11.[20], [44], [52]

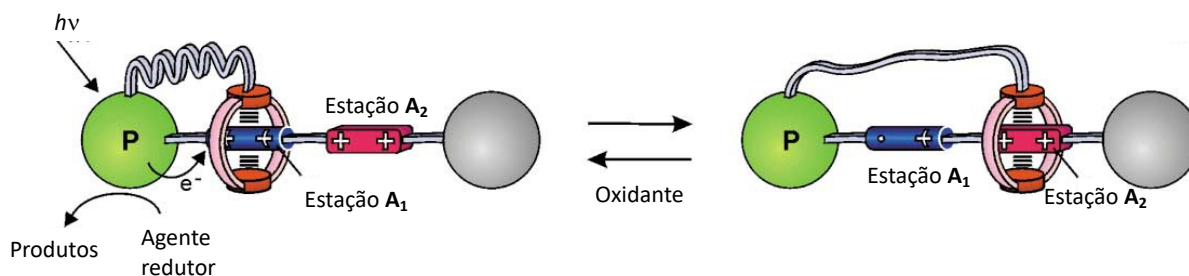


Figura 1.11. Um transportador de rotaxano alimentado por irradiação projetado para realizar o alongamento de uma mola molecular.[52]

O mecanismo intramolecular apresentado na Figura 1.11 mostra a fotoindução do alongamento de uma mola. A excitação da unidade fotoativa P desencadeia uma série de eventos. Primeiramente, há a

transferência de um elétron do estado excitado para a estação A₁, que é envolvida pelo anel acoplado à unidade fotoativa pela mola, resultando na 'desativação' dessa estação. Posteriormente, o anel se desloca da estação A₁ para A₂. Após a passagem do anel para A₂, um agente oxidante oxida a estação A₁. Enquanto a unidade fotoativa P é reativada por um agente redutor, ocorre o movimento de retorno do anel de A₂ para A₁. Esse processo ilustra a dinâmica intramolecular envolvida na operação do dispositivo molecular.

Para melhor entender, projetar e sintetizar os complexos supramoleculares destinados a funções específicas, é crucial explorar duas áreas fundamentais da construção dos polímeros supramoleculares: estruturas auto-organizadas e complexos recetor-substrato.

1.3.1 Estruturas auto-organizadas

Os polímeros supramoleculares são materiais macromoleculares formados por interações não covalentes reversíveis entre dois ou mais monómeros.[47], [53] Devido a essa reversibilidade, a extensão da reação está diretamente acoplada à termodinâmica, o que significa que fatores como concentração, temperatura e pressão influenciam a formação e estabilidade desses polímeros.[50], [53] A polimerização supramolecular pode ocorrer com várias unidades de um único monómero, capaz de formar um polímero supramolecular através da associação não covalente de seus grupos terminais, Figura 1.12.[54]

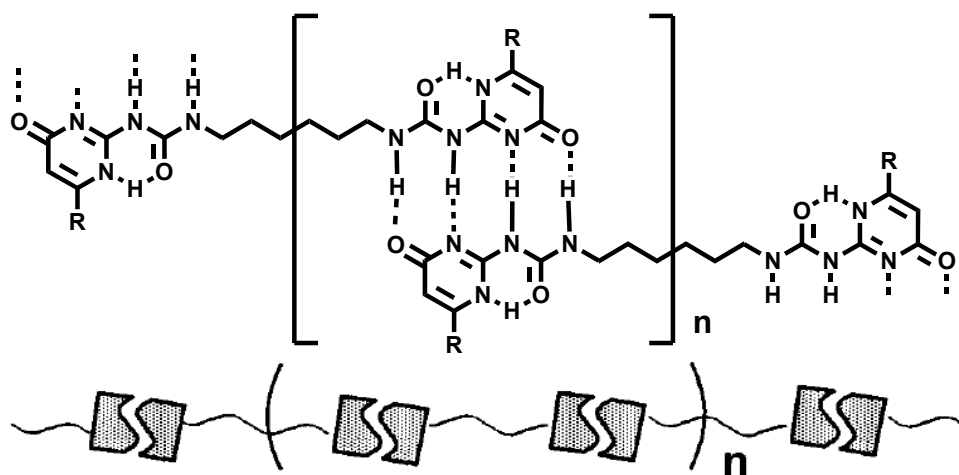
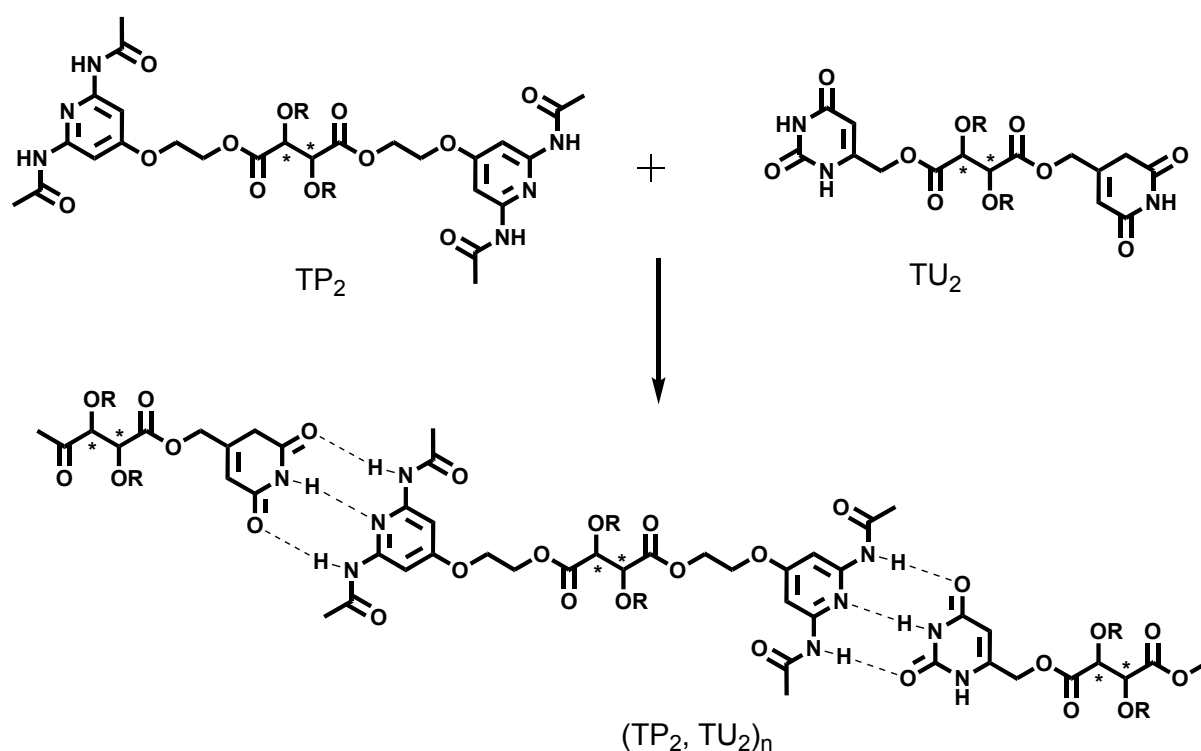


Figura 1.12. Polímero supramolecular formado por unidades do monómero ureido-pirimidinona (Upy).[54]

Copyright 2001 Chem. Rev.

Além disso, também é possível que diferentes monómeros se associem para formar polímeros supramoleculares, desde que haja complementaridade entre as interações moleculares envolvidas, Esquema 1.7.[47]



Esquema 1.7. Formação do polímero supramolecular formado por unidades de monômero diferentes.

Os principais requisitos para a formação dos polímeros supramoleculares auto-organizados abrangem uma série de elementos. Esses requisitos incluem a presença de reações autocatalíticas que aceleram o processo de polimerização, o fornecimento contínuo de energia química para impulsionar as reações e manter a organização molecular, bem como processos que envolvem a difusão competitiva das moléculas participantes para garantir uma organização ordenada. Além disso, é crucial que as moléculas envolvidas tenham geometrias compatíveis em termos de tamanho e forma, facilitando a autoorganização e a formação de estruturas supramoleculares estáveis. A habilidade desses complexos supramoleculares em se auto-organizar e crescer em larga escala os torna cruciais para a criação de materiais de interesse em diversas áreas, como nanotecnologia, nanorrobótica, medicina e engenharia de materiais. Eles são capazes de responder a estímulos externos desempenhando uma variedade de tarefas, tais como catálise, separação de substâncias, liberação controlada de fármacos,[51] transferência de elétrons[51] e sensores moleculares. Por exemplo, dispositivos capazes de fazer movimentos de vaivém ou de agarrar e mover blocos podem ser construídos utilizando moléculas que mudam de conformação em resposta a estímulos externos.

1.3.2 Complexos de inclusão (recetor-substrato)

Complexos de inclusão são estruturas supramoleculares compostas por duas ou mais moléculas/iões, unidas por interações não covalentes.[44], [47], [55] Esses complexos envolvem a coordenação de substratos catiónicos, aniônicos ou neutros dentro dos recetores, para que a complexação ocorra é

necessário que haja afinidade do substrato com a cavidade do recetor. Geralmente, são empregados macrociclos, como éteres de coroa, ciclodextrinas e cucurbiturilos, devido à sua capacidade de formar cavidades propícias para a inclusão de substratos.[56] As ciclodextrinas possuem uma cavidade com propriedades hidrofóbicas, o que as torna capazes de encapsular eficientemente compostos neutros.[37], [57] Entre as diversas ciclodextrinas investigadas, as mais proeminentes são alfa, beta e gama-ciclodextrinas, apresentadas na Figura 1.13.

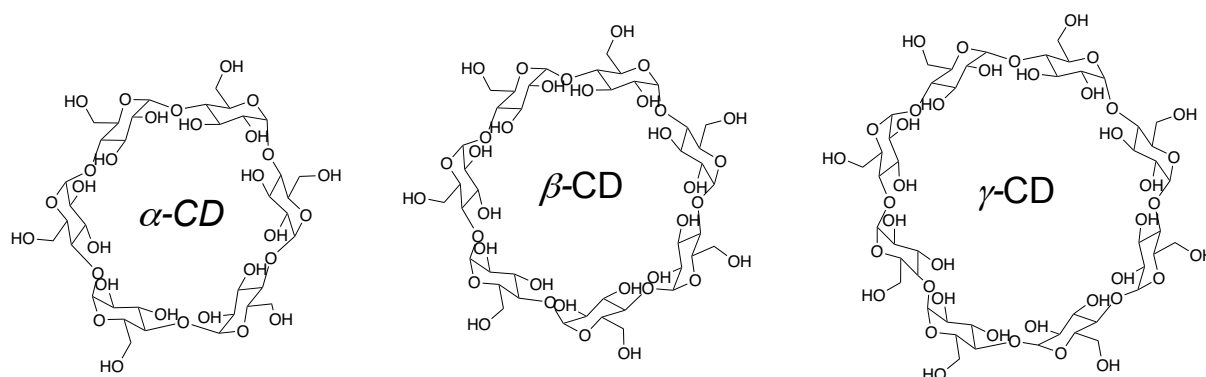


Figura 1.13. Representação estrutural das ciclodextrinas.

Estas variantes são conhecidas por apresentarem cavidades estruturalmente adequadas para acomodar moléculas de chalconas através de forças de Van der Waals. Essa capacidade de encapsulação é crucial não apenas para estabilizar as chalconas, mas também para promover reações químicas seletivas e controladas.[58]

O catião de flavílio sintético é eficientemente complexado pelos CB[n]s através de atração electrostática, onde os portais altamente eletronegativos das bordas carbonílicas atraem o substrato que é mantido na cavidade hidrofóbica. A estrutura dos CB[n]s é apresentada na Figura 1.14.

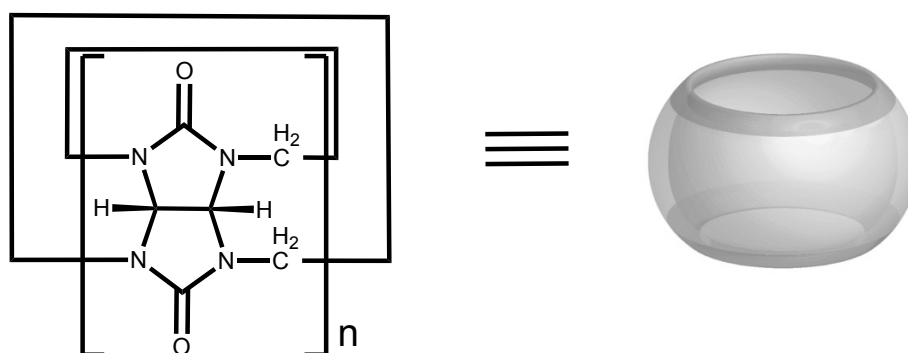
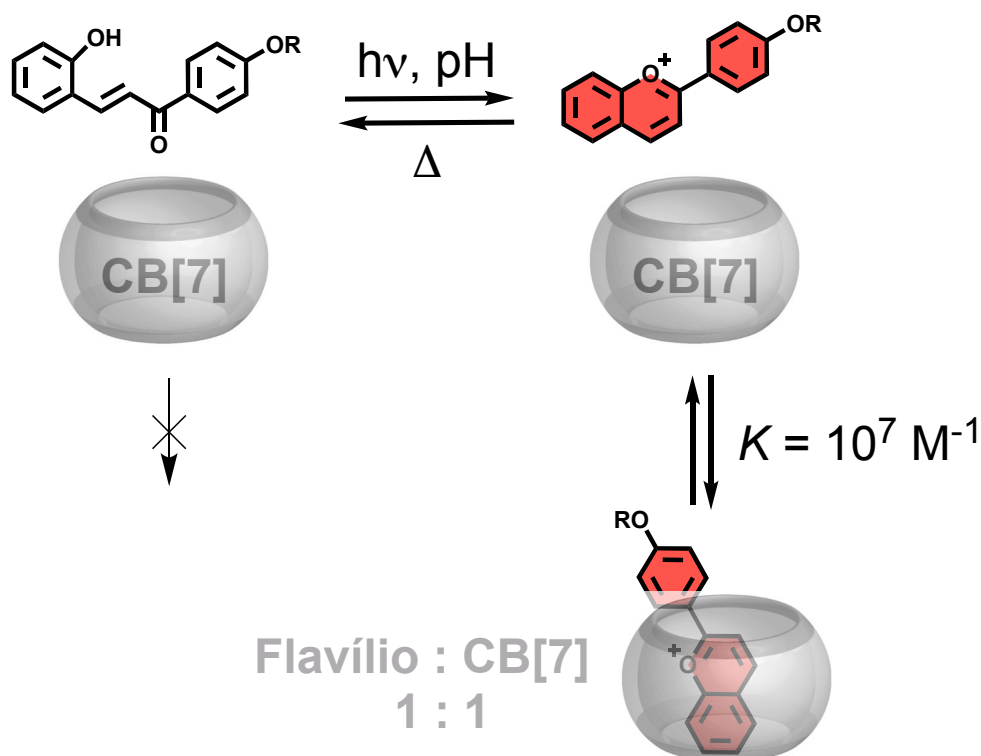


Figura 1.14. Estrutura do Cucurbit[n]urilo, $n=6,7,8$, ou 10.

Os complexos recetor-substrato entre o catião flavílio e o CB[n] demonstram afinidades diferentes influenciadas pela natureza e posição dos substituintes do substrato. O CB[n] tem maior afinidade com

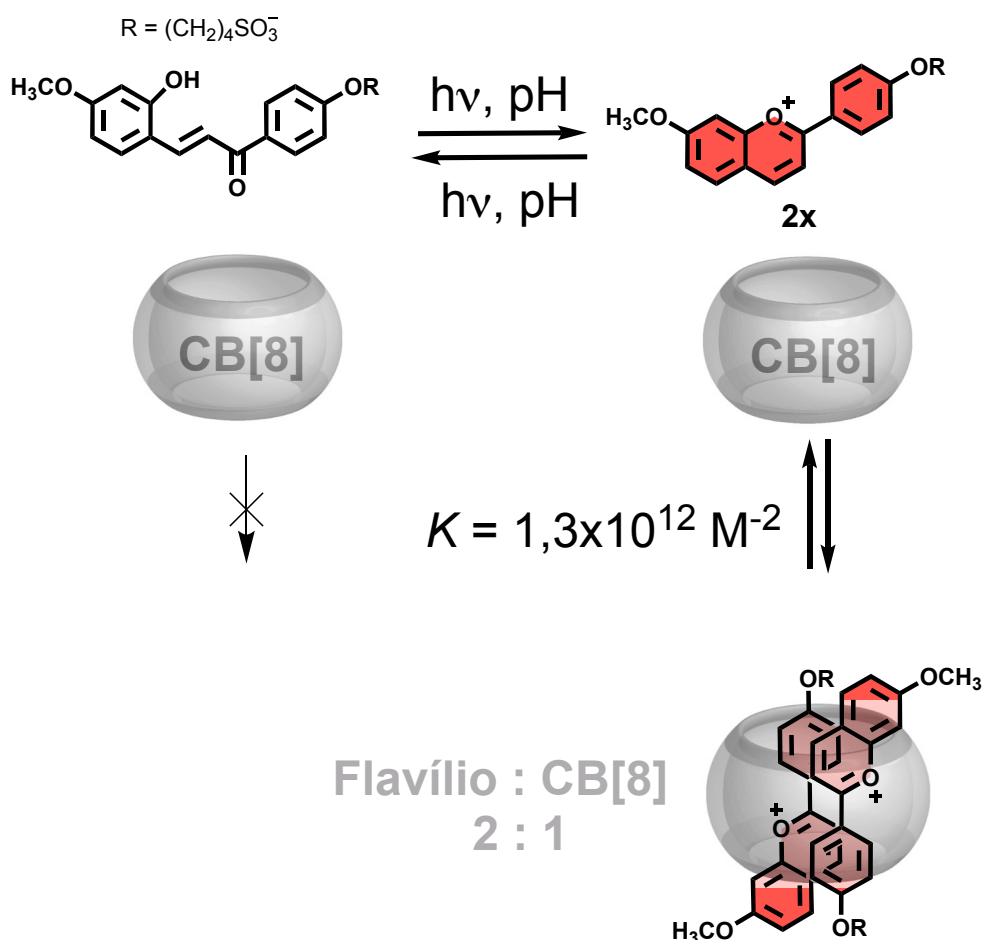
compostos de flavílio mais hidrofóbicos e aqueles que possuem substituintes amino. Dependendo da geometria tanto do recetor quanto do substrato, os complexos são formados com estequiometrias de 1:1, 1:2 e 2:1. Dois exemplos de complexação com estequiometria diferentes são apresentados no Esquema 1.8 e Esquema 1.9.

O Esquema 1.8 apresenta a complexação do catião flavílio com o CB[7] com uma constante de 10^7 M^{-1} , enquanto a complexação com a chalcona é praticamente nula.[1]



Esquema 1.8. Indução da complexação do catião flavílio com o cucurbit[7]urilo (CB[7]) por conversão da chalcona à catião flavílio por irradiação ou por salto de pH.

Além disso, a cavidade do CB[7] possui volume suficiente para acomodar um único substrato de flavílio. Por outro lado, o CB[8] tem a capacidade de formar complexos na proporção de 1:2, conforme ilustrado no Esquema 1.9.[55]



Esquema 1.9. Indução da conversão chalcona-catião flavílio por irradiação/salto de pH e complexação com cucurbit[8]uril (CB[8]).

Este complexo 1:2 entre o CB[8] e o catião flavílio, é um excelente exemplo de complexo homoternário em que há uma disposição simétrica que facilita a formação de cadeias de crescimento. Essas cadeias, por sua vez, têm a capacidade de auto-organizar-se em materiais supramoleculares mais complexos, como géis e polímeros supramoleculares.[49], [56], [59]

1.4 Fluidos fotoreológicos

A palavra "Reologia" tem origem grega, sendo a combinação de "Rheo", que significa "Deformação", e "Logia", que significa "Ciência" ou "Estudo". De maneira geral, a Reologia pode ser definida como a ciência que estuda tanto o escoamento quanto a deformação e o fluxo da matéria sob a influência de forças aplicadas. [60], [61], [62] Abrangendo tanto substâncias sólidas quanto fluidas, a Reologia descreve como esses materiais respondem a tensões mecânicas, cisalhamento e outras forças externas, como podemos ver na Figura 1.15.[62]

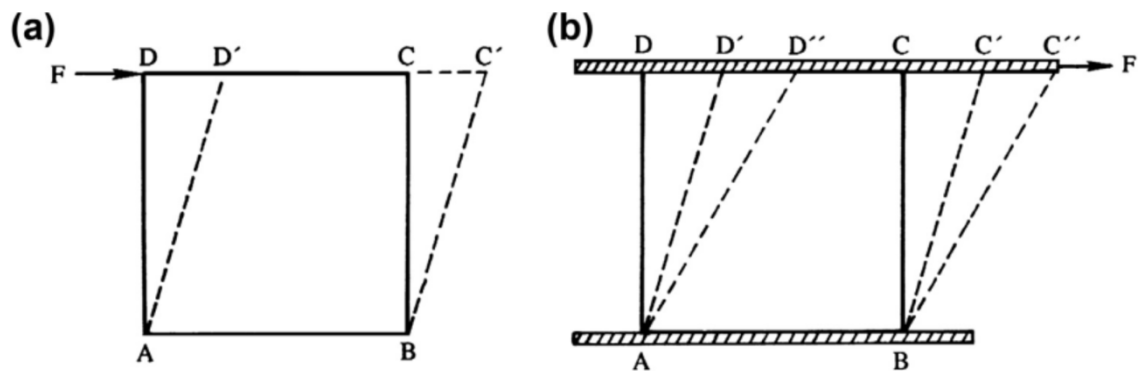


Figura 1.15. Caracterização da deformação aplicando uma força de cisalhamento externa. a) Sólido; b) Fluido.[62]

Na Figura 1.15a), é perceptível que o elemento desvia até que sua tensão interna equilibre a força aplicada externamente, resultando numa deformação estática representada pela forma ABC'D'. Por outro lado, na Figura 1.15b), o elemento continua a se deformar continuamente enquanto a força de cisalhamento é aplicada, levando a uma deformação que aumenta com o tempo, conforme representado pela forma ABC'D'.

A resposta dos fluidos à força de cisalhamento externa varia consideravelmente dependendo de sua composição, o que leva a uma classificação diferenciada. Essas variações estão relacionadas a propriedades físicas e químicas específicas de cada fluido.

1.4.1 Fluidos

Os fluidos podem ser classificados em diferentes categorias com base em suas propriedades de deformação e fluxo.[60], [61], [63], [64] Na Figura 1.16 é apresentado o esquema geral de classificação dos fluidos.

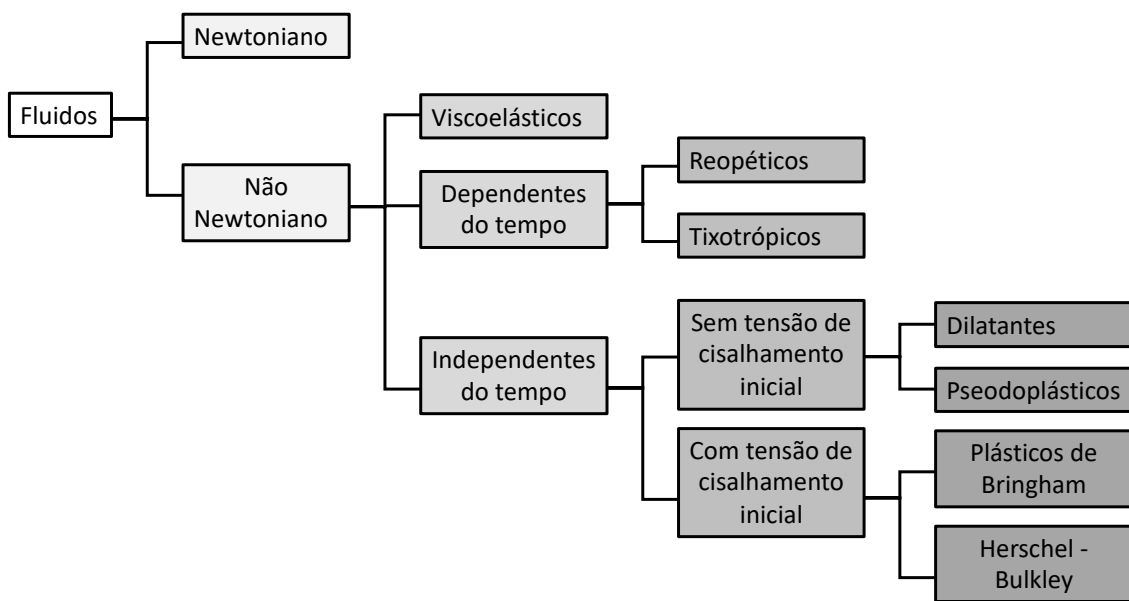


Figura 1.16. Caracterização reológica dos fluidos.

Podemos observar que as diferenças são influenciadas por uma série de fatores, tais como a composição química e a estrutura molecular, que determinam a forma como o fluido reage às forças aplicadas. Isso resulta numa ampla variedade de comportamentos reológicos observados na prática.

Newtonianos: caracteriza os fluidos que apresentam uma resposta à tensão de cisalhamento diretamente proporcional à taxa de deformação, exibindo uma viscosidade constante. Os fluidos newtonianos seguem a Lei de Newton da Viscosidade, com uma relação linear entre tensão de cisalhamento e gradiente de velocidade.

Não-Newtonianos: em contraste, os fluidos não-newtonianos desafiam a simplicidade dos fluidos newtonianos, demonstrando uma viscosidade variável em resposta à tensão de cisalhamento e ao tempo de aplicação. Essa complexidade permite uma ampla gama de comportamentos.

Viscoelásticos: esse tipo de fluido combina características tanto de fluidos elásticos quanto viscosos, exibindo tanto comportamento de recuperação reversível quanto de deformação irreversível, isto é, respondem de forma diferente dependendo das condições de aplicação da tensão de cisalhamento.

Dependente do tempo: descreve fluidos que apresentam variação de viscosidade ao longo do tempo sob condições constantes de taxa de cisalhamento. A **tixotropia** é um exemplo em que a viscosidade diminui com o tempo sob tensão constante e aumento quando esta tensão de cisalhamento é interrompida. Enquanto a **reopexia** descreve uma situação em que a viscosidade aumenta com o tempo sob deformação constante, mas diminui quando a tensão de cisalhamento é interrompida.

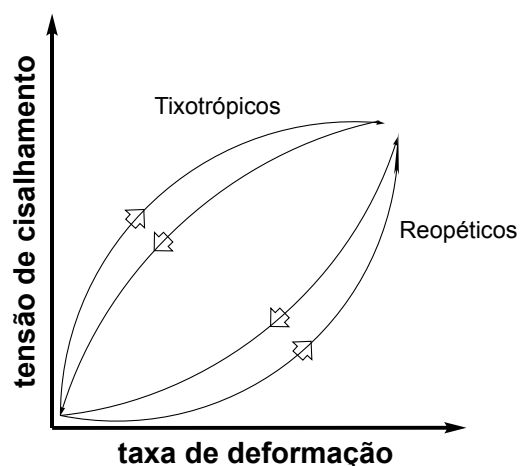


Figura 1.17. Curva de fluidos dependente do tempo.

Independente do tempo: Neste grupo, os fluidos dilatantes aumentam de volume sob tensão de cisalhamento, enquanto os fluidos pseudoplásticos têm sua viscosidade reduzida com o aumento da tensão de cisalhamento.

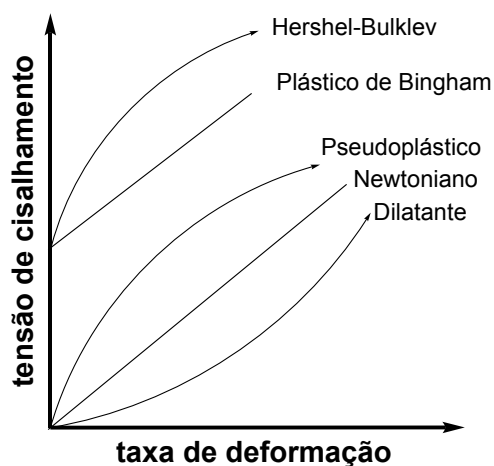


Figura 1.18. Curva de fluidos que não dependente do tempo.

Esses comportamentos distintos ilustram a diversidade e complexidade dos fluidos não-newtonianos em diferentes condições de aplicação.

1.4.2 Fotoreologia

A fotoreologia é um campo que se dedica ao estudo e desenvolvimento de fluidos capazes de alterar suas propriedades viscosas e de fluxo em resposta à ação da luz. Este domínio de pesquisa desafia os limites tradicionais da reologia ao explorar a interação entre a luz e sistemas moleculares complexos.[59], [65] A construção desses sistemas fotoreológicos ocorre por meio da química supramolecular. Os fluidos fotoreológicos são exemplos de sistemas supramoleculares, que consistem

numa suspensão de partículas que mudam de forma em resposta à luz.[60], [61], [63], [64] A Figura 1.19 ilustra a variação da viscosidade em micelas por ação da luz.[65]

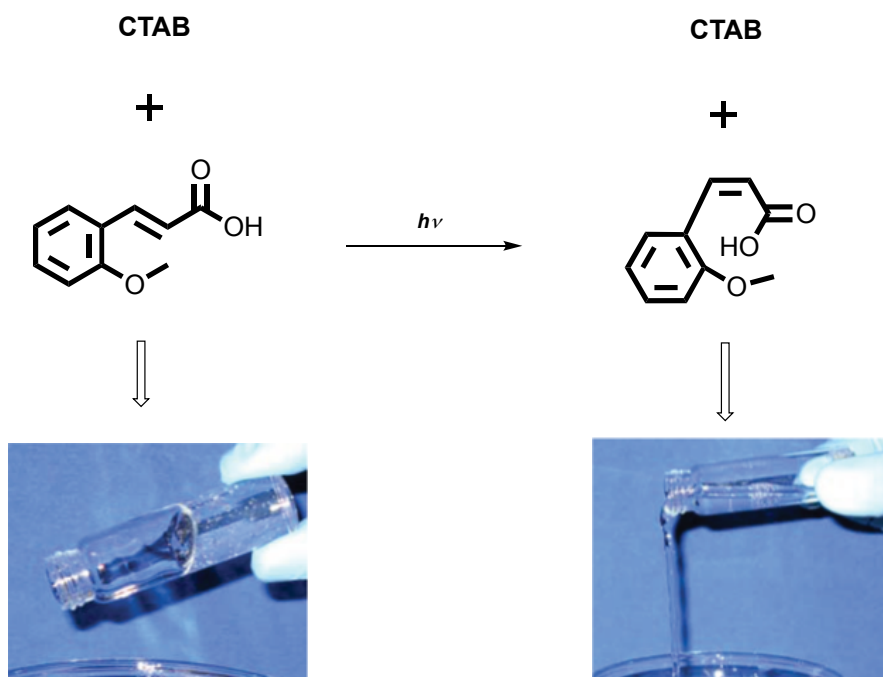


Figura 1.19. Variação da viscosidade por ação da luz em micelas.

Acima da concentração micelar crítica (CMC), os surfactantes e aditivos fotoreativos, em condições específicas, podem induzir a transformação de micelas esféricas em micelas longas devido a uma variedade de fatores, incluindo interações moleculares que alteram as propriedades do surfactante, mudanças na solubilidade das moléculas, modificações na tensão superficial do sistema e reações fotoinduzidas que geram produtos capazes de promover a formação de micelas longas. Estas micelas apresentam propriedades viscosas e elásticas controladas pela luz.[66], [67], [68] O exemplo retratado na Figura 1.20 ilustra a indução da quebra das micelas longas por ação da luz, resultando numa redução significativa da viscosidade.

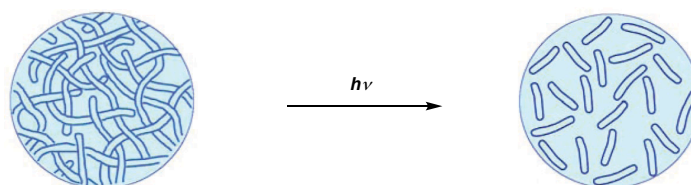
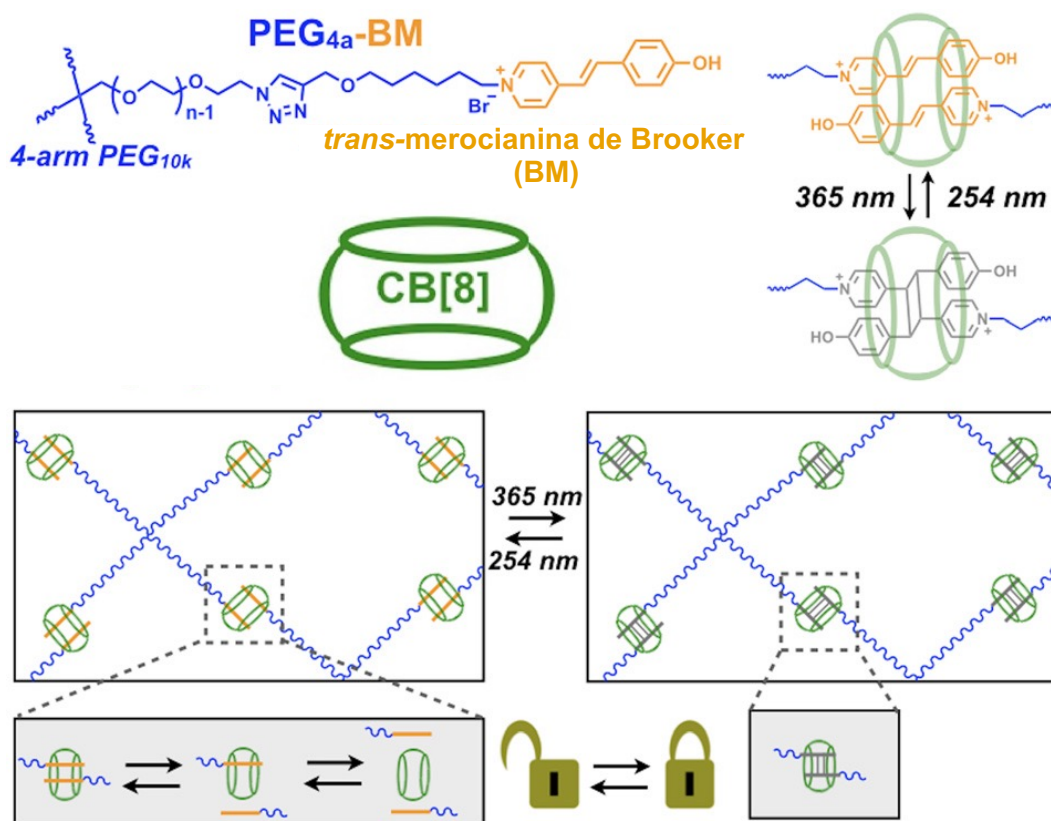


Figura 1.20. Fotoindução da quebra de micelas.[65]

A química supramolecular desempenha um papel importante na fabricação e modificação desses sistemas, permitindo o controle das propriedades dos fluidos em resposta a diferentes condições e

estímulos externos.[9] A maioria dos fluidos fotoreológicos descritos na literatura depende de reações de fotoisomerização unimoleculares.[9], [69] No entanto, as reações de fotodimerização menos usadas têm um grande potencial em fotoreologia, uma vez que envolvem mudanças significativas na organização estrutural molecular local e levam à formação de ligações covalentes, permitindo a reticulação entre diferentes porções.[59] Um exemplo de fotodimerização reversível é apresentado no Esquema 1.10.



Esquema 1.10. Fotodimerização supramolecular do PEG4a-BM, controlada pela irradiação. [59]

No Esquema 1.10 é observado o sistema supramolecular controlado por irradiação, em que o substrato de 4 braços com *trans*-Brooker Merocianina anexado em cada braço, na presença de CB[8], ocorre a fotodimerização [2+2], induzida por irradiação a 365 nm, resultando na formação de ligações cruzadas. Por outro lado, a irradiação a 254 nm promove a quebra dessas ligações. Esse processo de fotodimerização reversível oferece um controle preciso sobre as propriedades do hidrogel, permitindo a modulação de suas características físicas e químicas de acordo com a aplicação desejada.

O sistema fotoreológico é altamente versátil e pode ser projetado para responder a comprimentos de onda ou intensidades de luz específicas, permitindo sua utilização numa ampla variedade de aplicações. Entre essas aplicações, destacam-se:

Campo Biomédico: Os fluidos fotoreológicos (PR) têm um potencial significativo no campo biomédico, onde podem ser empregados na criação de sistemas de distribuição de medicamentos. Esses sistemas

permitem a liberação controlada de medicamentos em resposta a estímulos luminosos específicos, oferecendo um controle preciso sobre o momento e o local de administração dos medicamentos.

Revestimentos Inteligentes: Em aplicações de revestimentos inteligentes, os fluidos PR são utilizados para criar superfícies que modificam suas propriedades em resposta à luz. Por exemplo, podem tornar-se mais escorregadias ou pegajosas, proporcionando uma adaptação dinâmica às condições ambientais.

Dispositivos de Comutação Ótica: Os fluidos PR desempenham um papel importante na criação de dispositivos de comutação ótica, permitindo o controle do fluxo de luz. Nesse contexto, a alteração da viscosidade do fluido em resposta a um sinal luminoso possibilita uma regulação eficaz do fluxo luminoso.

Amortecedores Adaptativos: Os fluidos PR também encontram aplicação na criação de amortecedores adaptativos, os quais ajustam sua viscosidade em resposta a um estímulo luminoso. Esses amortecedores oferecem uma capacidade de adaptação dinâmica às condições de operação, melhorando a eficiência e o desempenho dos sistemas.

A Figura 1.21 apresenta um exemplo prático de hidrogéis fotoresponsivos, demonstrando a criação de um padrão tridimensional através da irradiação do hidrogel com o uso de uma máscara.[59], [70]

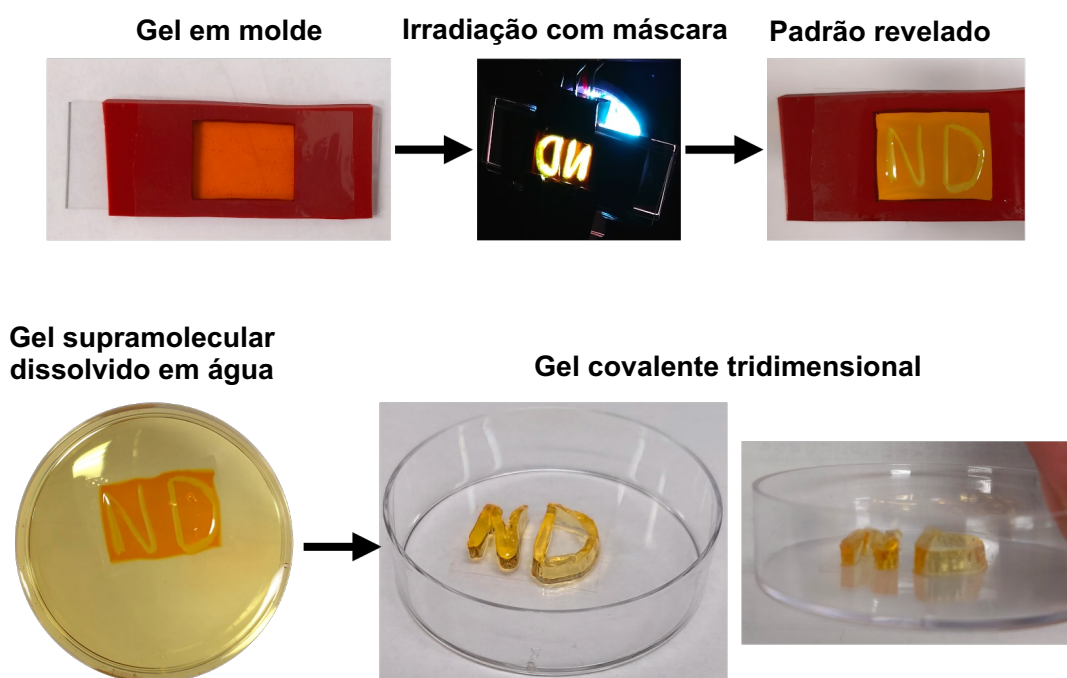


Figura 1.21. Irradiação do hidrogel usando uma máscara.[59]

A capacidade de controlar e modular as propriedades desses fluidos por meio de estímulos luminosos abre portas para inovações em diversas áreas da ciência e da tecnologia.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto é a síntese de derivados de 2-fenil-1-benzopirílio e compostos semelhantes, a descrição do sistema multiestado e a construção do fluido foto-reológico. A Figura 1.22 destaca o papel central do 2-fenil-1-benzopirílio como espinha dorsal dos compostos estudados.

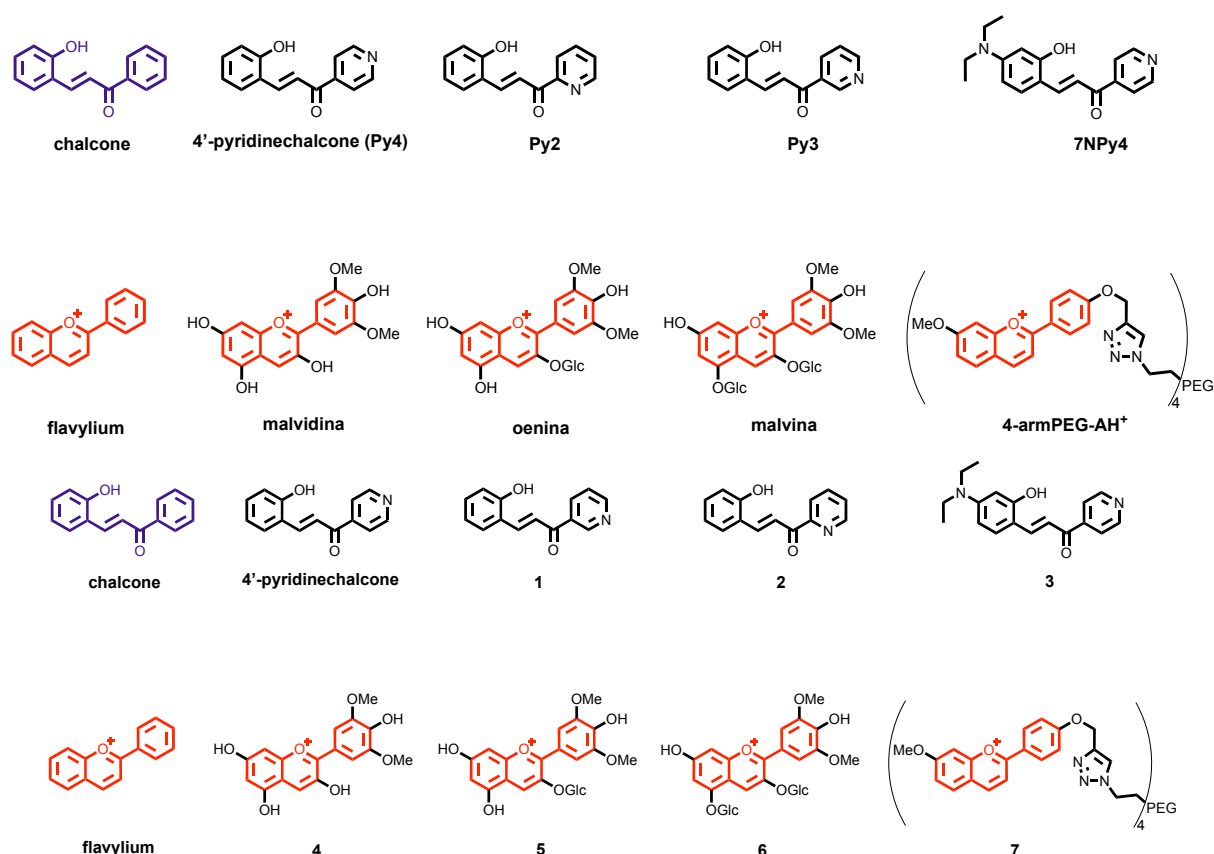


Figura 1.22. Compostos caracterizados.

A Figura 1.22 ilustra os compostos que fundamentam este trabalho, incluindo a chalcona e o catião flavílio correspondente, 4'-piridinochalcona[71], 2'-piridinochalcona (Py2), 3'-piridinochalcona (Py3), 7-dietilamino-4'-piridinochalcona (7NPy4), malvidina (aglicona), malvidin-3-O-glucósido (oenina, monoglucósido), malvidin-3,5-O-diglucósido (malvina, diglucósido) e tetra(7-metoxiflavílio-4'-O-metilenotriazol)-PEG (4-armPEG-AH⁺). Quatro dos sete compostos (Py2, Py3, 7NPy4 e 4-armPEG-AH⁺) são compostos novos sintetizados para esta tese. Para caracterizar o sistema multiestado, os processos cinéticos e termodinâmicos, fotoquímica, fluorescência e propriedades reológicas, os compostos foram agrupados de acordo com espécies semelhantes. O que resultou em três capítulos de discussão de resultado com objetivos específicos distintos.

1.5.2 Objetivos Específicos

Capítulo 2 – O Efeito da Glicosilação nos Processos Reversíveis e Irreversíveis da Malvidina:

Estudo da degradação de uma serie homologa de antocianinas para desenhar estratégias de proteção para estabilizar diferentes compostos em solução aquosa através de saltos de pH.

Capítulo 3 - Reações Térmicas e Fotoquímicas de n-Piridinobenzopirílio: Exploração da formação de uma nova família de derivados de 2-fenil-1-benzopirílio quando o grupo fenil na posição 2 do benzopirílio é substituído por uma piridina.

Capítulo 4 - Fluidos Fotoreológicos Supramoleculares: Síntese de unidades estruturais fotoresponsivas, preparação de hidrogéis controláveis pela luz e análise das propriedades reológicas antes e depois da irradiação.

O EFEITO DA GLICOSILAÇÃO NOS PROCESSOS REVERSÍVEIS E IRREVERSÍVEIS DA MALVIDINA

As antocianinas, apesar de suas vantagens, apresentam desafios significativos em relação à estabilidade, o que limita sua aplicação em situações que requerem armazenamento prolongado. Para abordar esse problema, os mecanismos de degradação da oenina e malvina foram minuciosamente investigados por meio de variações de pH, diretas e inversas, em toda a faixa relevante. Diversas técnicas de monitorização foram empregues para compreender os processos cinéticos e termodinâmicos envolvidos, visando fornecer uma análise abrangente. Esses estudos foram conduzidos com o propósito de desenvolver estratégias de proteção para estabilizar a malvidina (aglicona), malvidin-3-O-glucósido (oenina, monoglucósido) e malvidin-3,5-O-diglucósido (malvina, diglucósido) em solução aquosa.

Os resultados apresentados e discutidos neste capítulo são fruto da colaboração entre dois grupos, um na NOVA FCT e outro na FCUP, e resultaram na publicação de dois artigos científicos.¹² A minha contribuição neste trabalho esteve centrada no estudo da degradação em função do pH monitorizado por espectroscopia Uv-vis.

¹ Camuenho A., *et al* "Intermolecular Copigmentation of Malvidin-3- O-glucoside with Caffeine in Water: The Effect of the Copigment on the pH-Dependent Reversible and Irreversible Processes" *ACS Omega*, 2022, 7, 25502.

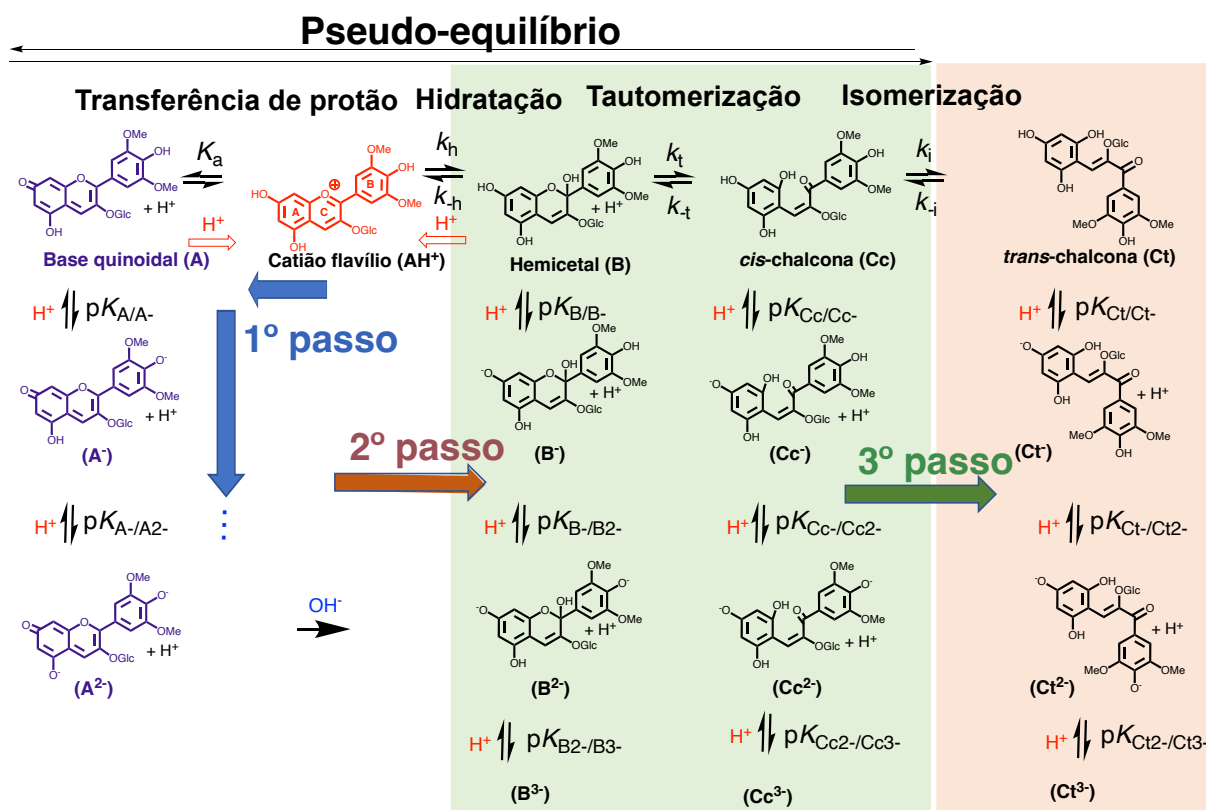
² Seco A., *et al* "Comparing the Chemistry of Malvidin-3-O-glucoside and Malvidin-3,5-O-diglucoside Networks: A Holistic Approach to the Acidic and Basic Paradigms with Implications in Biological Studies", *J. Agric. Food Chem.*, 2024, 72, 7497.

2.1 Saltos diretos de pH

O equilíbrio reversível envolvendo a oenina é detalhado no Esquema 2.1. Em soluções suficientemente ácidas, todas as espécies convergem para o catião flavílio, comumente a $\text{pH} \leq 1$. Quando uma base é adicionada a soluções equilibradas do catião flavílio, isso é definido como um salto direto de pH, desencadeando vários processos divididos em três passos.

2.1.1 Primeira etapa (1º passo)

Embora as antocianinas sejam identificadas pelo seu respectivo catião flavílio, são compostos muito mais complexos do que essa molécula sugere. Como ilustrado no Esquema 2.1, para oenina e, de forma geral, para a maioria das antocianinas e compostos sintéticos de flavílio, o catião flavílio é apenas uma das espécies num sistema complexo, envolvendo pelo menos 16 espécies.



Esquema 2.1. Sequência de reações reversíveis após adição de base a soluções equilibradas de catião flavílio de oenina (saltos diretos de pH). Este esquema é aplicável a todas as antocianinas. Adaptado com permissão da referência[11]. direitos autorais de 2022 pela Sociedade Americana de Química.

Quando ocorre um salto direto de pH, uma série de processos químicos é desencadeada, com a primeira etapa cinética correspondente à desprotonação do catião flavílio para formar bases quinoidais, conforme representado na primeira coluna do Esquema 2.1. A transferência de prótons ocorre numa

escala de tempo muito rápida, em submicrosegundos, o que torna inadequado o uso da técnica de fluxo interrompido para medir essa cinética. Essa desvantagem pode ser superada coletando os espectros de absorção 10 milissegundos após a mistura, uma vez que a segunda etapa representada no Esquema 2.1 é relativamente mais lenta. Os resultados das curvas de titulação da oenina e da malvina, bem como a desconvolução para o cálculo dos espectros de absorção de cada espécie, são apresentados na Figura 2.1.

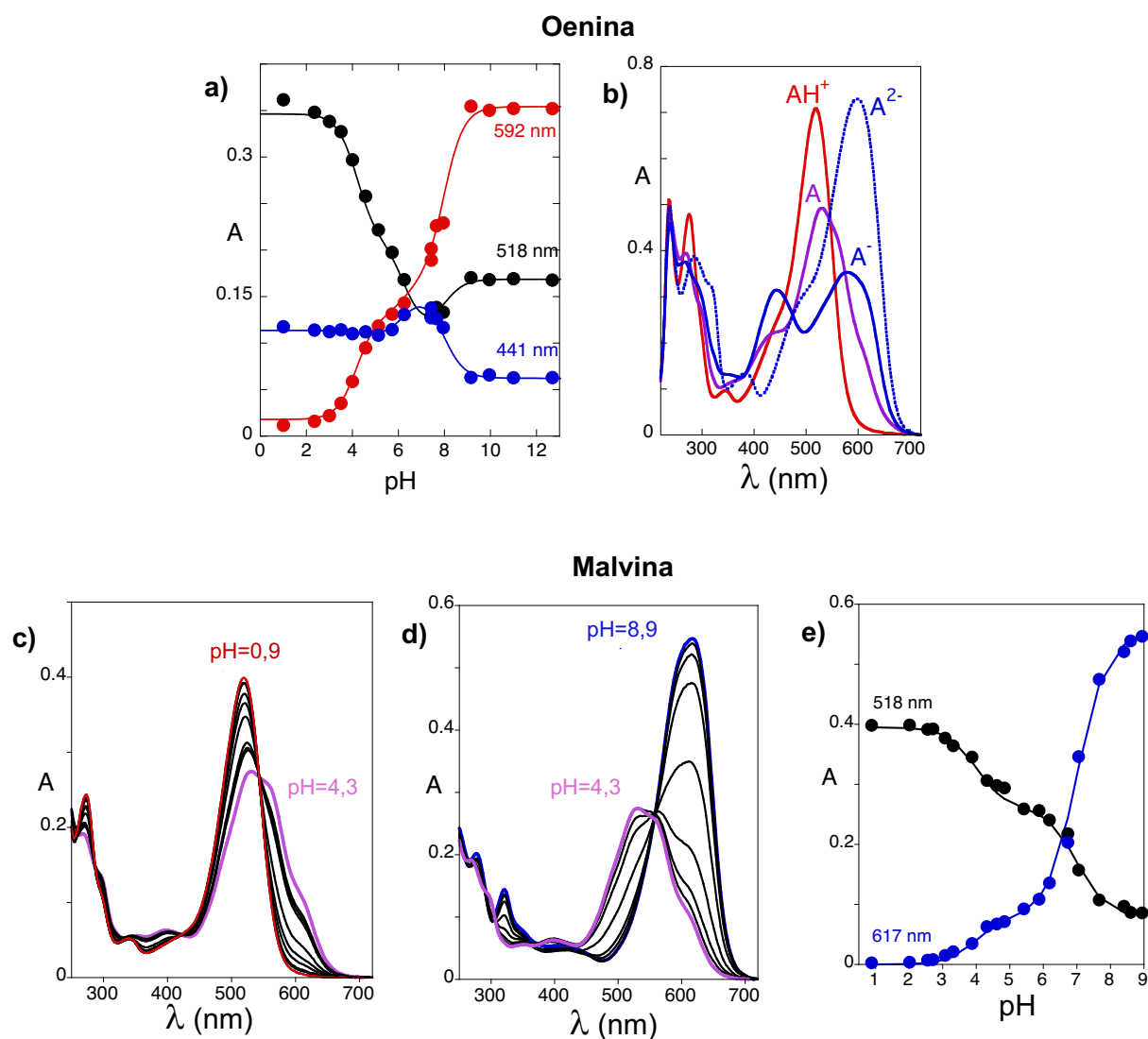


Figura 2.1. a) Curvas de titulação da oenina, $1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$, obtidas a partir dos espectros de absorção coletados 10ms após uma série de saltos diretos de pH monitorizados por fluxo interrompido. O ajuste foi obtido para $pK_a=3,8$, $pK_{A/A^-}=6,3$ e $pK_{A^-/A^{2-}}=8,1$. [1], [13] b) Desconvolução dos espectros de absorção utilizando as constantes ácido-base calculadas em (a). c) Variações espectrais da malvina, $7,3 \times 10^{-6} \text{ M}$, capturadas 10 ms após um salto direto de pH monitorizado por fluxo interrompido para $0,9 < \text{pH} < 4,3$. d) O mesmo para $4,3 < \text{pH} < 8,9$. e) Curvas de titulação em 518 nm e 617 nm. O ajuste foi obtido para $pK_a=3,8$ e $pK_{A/A^-}=7,0$. Erro estimado $\pm 0,1$.

As constantes de equilíbrio mencionadas na Figura 2.1 são determinadas diretamente por meio de saltos diretos de pH, seguidos por Fluxo interrompido. A cinética da primeira etapa não pode ser medida por fluxo interrompido, mas os espectros de absorção versus pH podem ser coletados 10ms após o salto, a partir dos quais as constantes de acidez são calculadas, conforme apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Constantes ácido-base das bases quinoidais da oenina e malvina, bem como o equilíbrio de tautomerização. Erro estimado de 10%.

	pK_a	$pK_{A/A-}$	$pK_{A-/A2-}$
Oenina	3,8	6,3	8,1
Malvina	3,8	7,0	-

2.1.2 Segunda etapa (2º passo)

Quando o pH final de um salto direto é inferior a $pH = 7$, as espécies da primeira coluna do Esquema 2.1 desaparecem devido à hidratação seguida por tautomerização (2ª etapa do Esquema 2.1). A tautomerização, em meio muito ácido, é consideravelmente mais lenta que a reação de hidratação, tornando-se o processo determinante da constante de velocidade da 2ª etapa. A Figura 2.2a mostra as variações espectrais da oenina após um salto direto de pH para $pH = 5,0$.

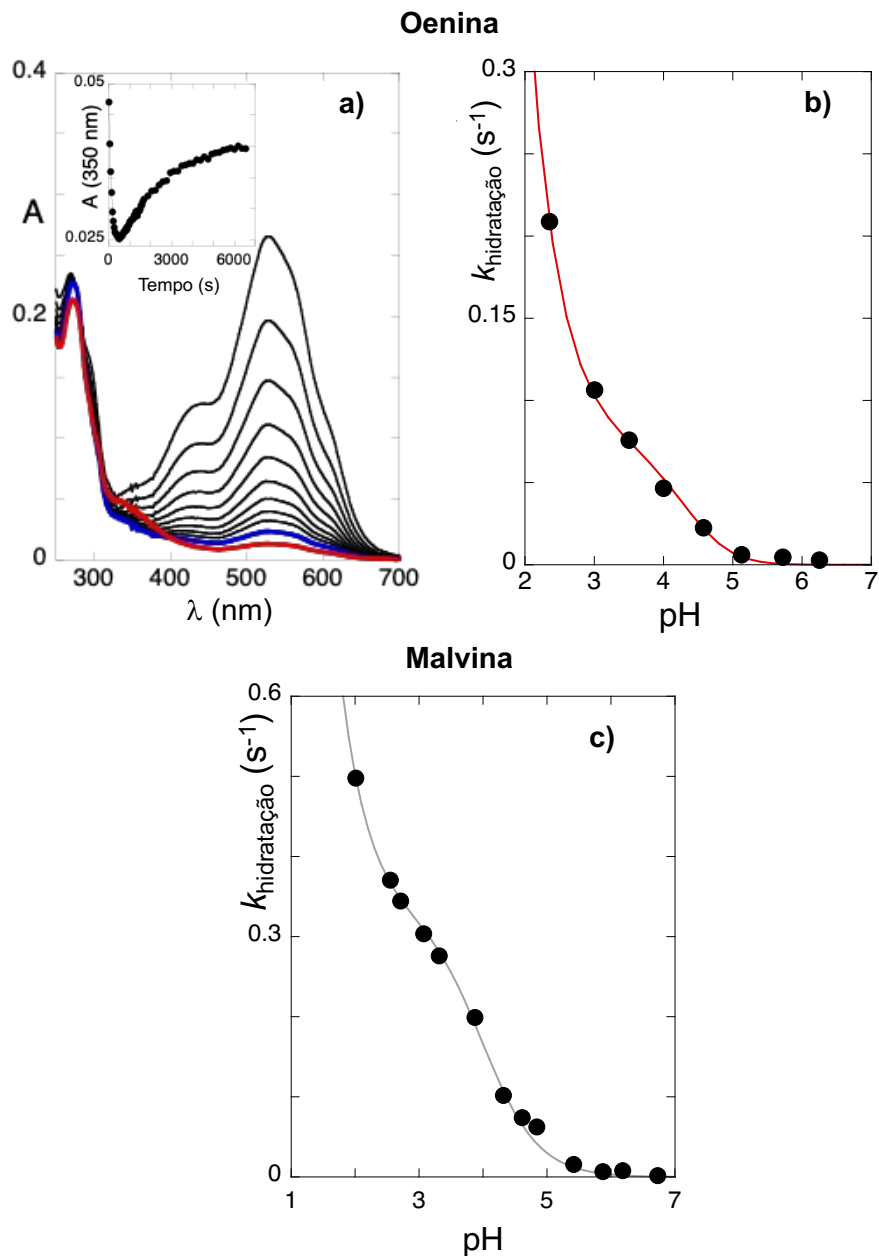


Figura 2.2. a) Alterações espectrais na solução aquosa de oenina $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ após um salto direto de pH de $\text{pH}=1,0$ para $\text{pH}=5,0$; a curva azul corresponde ao espectro de absorção após o final da reação de hidratação (pseudo-equilíbrio), e a curva vermelha ao espectro de absorção no equilíbrio (ver abaixo); b) Constantes de velocidade de isomerização em meio ácido. O ajuste foi feito de acordo com a Eq. 2.2 para as constantes ácido-base calculadas na seção 2.1.1 e $k_h=0,08 \text{ s}^{-1}$, $k_{-h}=47 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_i=0,52$ (calculado por saltos inversos de pH, veja abaixo; c) Constantes de velocidade da malvina após saltos diretos de pH monitorizados por fluxo interrompido. O ajuste foi alcançado por meio da Eq. 2.2, para $k_h=0,33 \text{ s}^{-1}$ e $k_{-h}=25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Além das constantes de equilíbrio, os saltos diretos de pH permitem a determinação das constantes da Tabela 2.2. A expressão matemática para calcular a constante de velocidade do segundo passo em meio ácido é dada pela Eq. 2.1. [1], [13]

$$k_{2^{\circ}\text{passo}} = \chi_{AH^+} k_h + \chi_B k_{-h} [H^+] \quad \text{Eq. 2.1}$$

Onde χ_{AH^+} e χ_B são, respectivamente, a fração molar do catião flavílio em equilíbrio com as bases quinoidais e o hemiacetal em equilíbrio com a *cis*-chalcona.

$$k_{2^{\circ}\text{passo}} = k_{\text{hidratação}} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_a[H^+] + K_a K_{A/A^-}} k_h + \frac{1}{1 + K_t} k_{-h} [H^+] \quad \text{Eq. 2.2}$$

O ajuste da Eq. 2.2 utilizando os dados da Tabela 2.2 permite a determinação das constantes de velocidade k_h e k_{-h} e, conseqüentemente, a constante de equilíbrio K_h respectiva, que deve ser coerente com o valor obtido por meio dos saltos inversos de pHs, Tabela 2.2.

Tabela 2.2. (2º passo). Constantes de velocidade da oenina e malvina em meio ácido. Erro estimado 10%

	k_h (s ⁻¹)	k_{-h} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_t
Oenina	0.08	47	0.52
Malvina	0.33	25	0.45

A constante de velocidade do segundo passo tende a zero e é muito lenta em valores altos de pH. No entanto, em meio básico, um novo canal de reatividade é aberto por meio da adição nucleofílica de OH⁻. [11]

O estudo dos processos cinéticos em meio básico é mais complexo do que no meio ácido porque a degradação das antocianinas é mais rápida no primeiro. Os processos químicos resultantes do ataque de OH⁻ são resumidos no Figura 2.3.

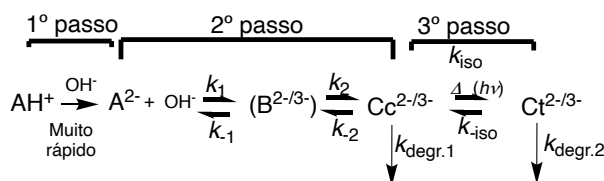


Figura 2.3. Esquema cinético proposto após um salto direto de pH em meio básico.

Assim como no meio ácido, é possível identificar três etapas: a primeira etapa corresponde à transferência de prótons e já foi relatada e discutida na Figura 2.1. A segunda etapa é devida ao ataque de OH⁻ (equivalente à hidratação seguida pela tautomerização em meio ácido) e a terceira etapa corresponde à isomerização *cis-trans*. Diferentemente do meio ácido, a degradação pode competir no processo cinético em direção ao equilíbrio. O estudo da segunda etapa em meio básico requer o uso do equipamento de fluxo interrompido, exemplo apresentado na Figura 2.4.

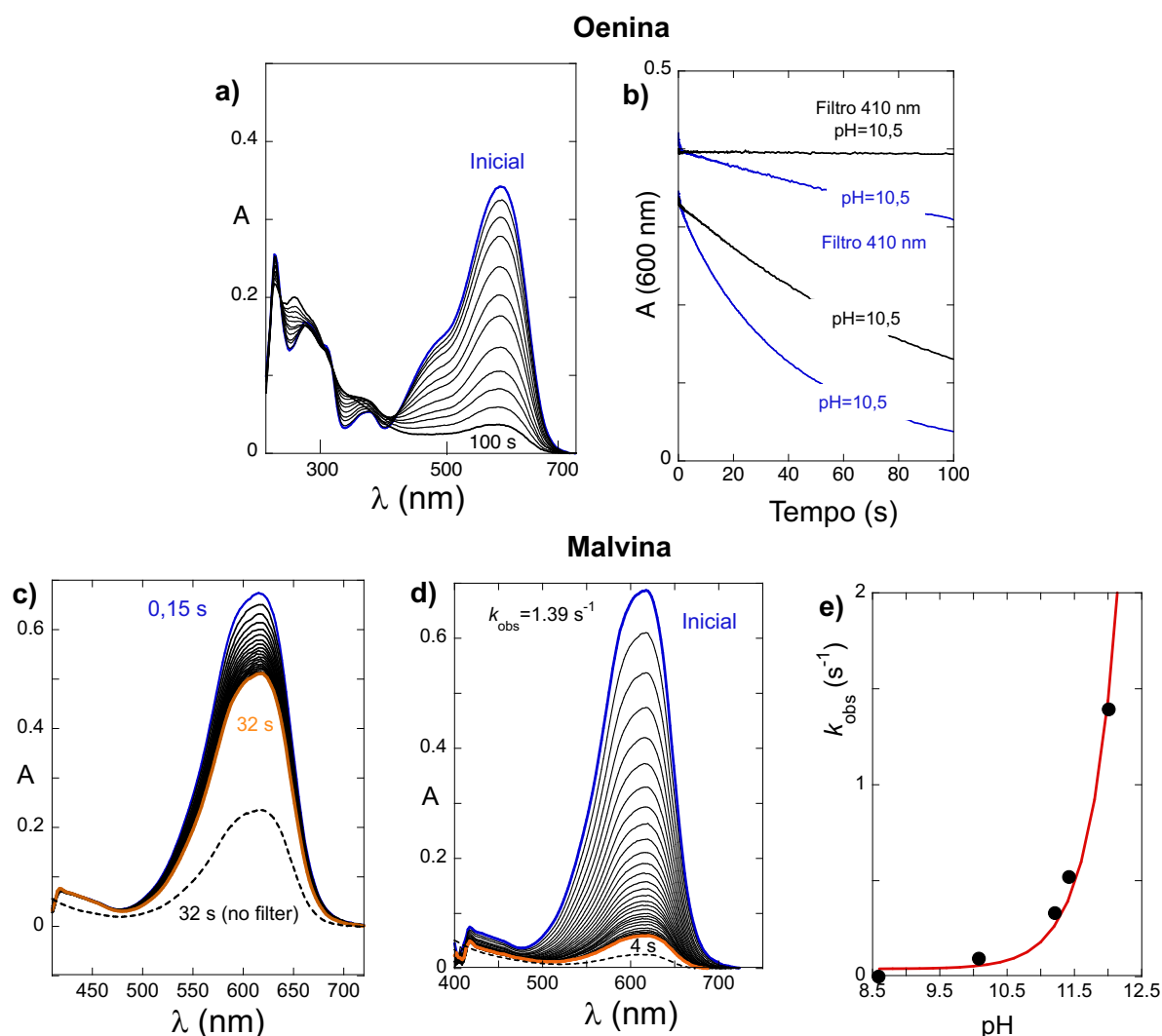


Figura 2.4. a) Variações espectrais após um salto direto de pH da malvidin-3-O-glucósido para pH=13,1 monitorizado por fluxo interrompido sem filtro; b) Traços de fluxo interrompido após saltos diretos de pH na ausência e presença de um filtro de corte de 410 nm em dois valores de pH básico representativos; c) Variações espectrais da malvina após um salto direto de pH para pH=10.1 monitorizado por fluxo interrompido usando um filtro de corte de 410 nm; d) o mesmo que c) para pH=12; e) Constantes de velocidade da adição nucleofílica de OH^- na malvina medidas por fluxo interrompido (etapa mais rápida). A constante de velocidade é diretamente proporcional à concentração de hidróxido de acordo com $140[\text{OH}^-] \text{ s}^{-1}$.

Uma série de saltos diretos de pH da oenina foram monitorizados por fluxo interrompido para $10,5 < \text{pH} < 13,5$, Figura 2.4. Devido à alta intensidade da lâmpada de análise do fluxo interrompido, foi necessário usar um filtro para evitar a reação fotoquímica. As variações espectrais a pH=13,1 na ausência do filtro de corte (410 nm) são apresentadas na Figura 2.4a, mostrando que após 100 s a base quinoidal (A^{2-}) praticamente desaparece. A comparação dos traços de fluxo interrompido na ausência e presença de um filtro em dois valores de pH básico representativos é mostrada na Figura 2.4b. Em ambos os casos (na ausência do filtro), é evidente a existência de uma reação fotoinduzida

que consome a base quinoidal aniônica A^{2-} . No entanto, o traço obtido a pH=10,5 na presença do filtro indica que A^{2-} não é responsável pela fotoquímica (ainda absorve luz com este filtro e sua absorvância não muda em 100 s). Na presença do filtro, o traço, para pH=13,1, pode ser ajustado com uma exponencial única com velocidade de $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$, Figura 2.4b. Uma vez que tanto hemiacetal quanto *cis*-chalcona são esperados para exibir abertura do anel fotoinduzida e isomerização *cis-trans*, respectivamente, a explicação mais simples é atribuir a reação fotoquímica a uma destas duas espécies. Isso implicaria que o hemiacetal e/ou *cis*-chalcona já estão formados durante o tempo de mistura do fluxo interrompido. Os dados da segunda etapa em meio básico podem, portanto, ser explicados por um controle cinético da adição nucleofílica de OH^- . Na presença do filtro, a cinética observada é o processo em direção ao equilíbrio.

Para a malvina, os dados relatados na Figura 2.4d e Figura 2.4e mostram que ao final dessa cinética é alcançado um equilíbrio (pseudo-equilíbrio) envolvendo A^- , B^- e Cc^- . Este equilíbrio favorece as espécies B^- e Cc^- em valores de pH mais altos. A isomerização *cis-trans* é excluída, pois ocorre de maneira muito mais lenta, veja abaixo. O efeito da luz pode ser na abertura do anel ou isomerização *cis-trans*. A representação da constante de velocidade desse processo foi ajustada para $140[\text{OH}^-] \text{s}^{-1}$. A dependência da concentração de hidróxido e o desvio do pseudo-equilíbrio com o pH indicam um controle da segunda etapa pela adição nucleofílica de OH^- . Ao contrário da oenina, a segunda etapa não conduz ao equilíbrio, mas, como em meio ácido, há um pseudo-equilíbrio. Os resultados são resumidos na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. (2ª etapa). Constantes de velocidade do ataque de OH^- aos monoglucósidos e diglucósidos de malvidina em meio básico. Erro estimado de 10%.

	Ataque de OH^- ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Oenina	$0,045[\text{OH}^-]$
Malvina	$140[\text{OH}^-]$

2.1.3 Terceira etapa (3º passo)

Em meio ácido, o sistema alcança o equilíbrio a partir do pseudo-equilíbrio através da isomerização *cis-trans*.

$$k_{3^{\text{a}}\text{passo}} = X_{Cc}k_i + k_{-i} = \frac{K_h K_t}{[H^+] + K_a + K_h + K_h K_t} k_i + k_{-i} \quad \text{Eq. 2.3}$$

onde X_{Cc} é a fração molar de Cc no pseudo-equilíbrio. Apesar das pequenas variações espectrais do pseudo-equilíbrio ao equilíbrio, como mostrado acima na Figura 2.2a, as respectivas constantes de

velocidade podem ser calculadas e representadas como uma função do pH para a oenina[1] e malvina[72], conforme Figura 2.5.

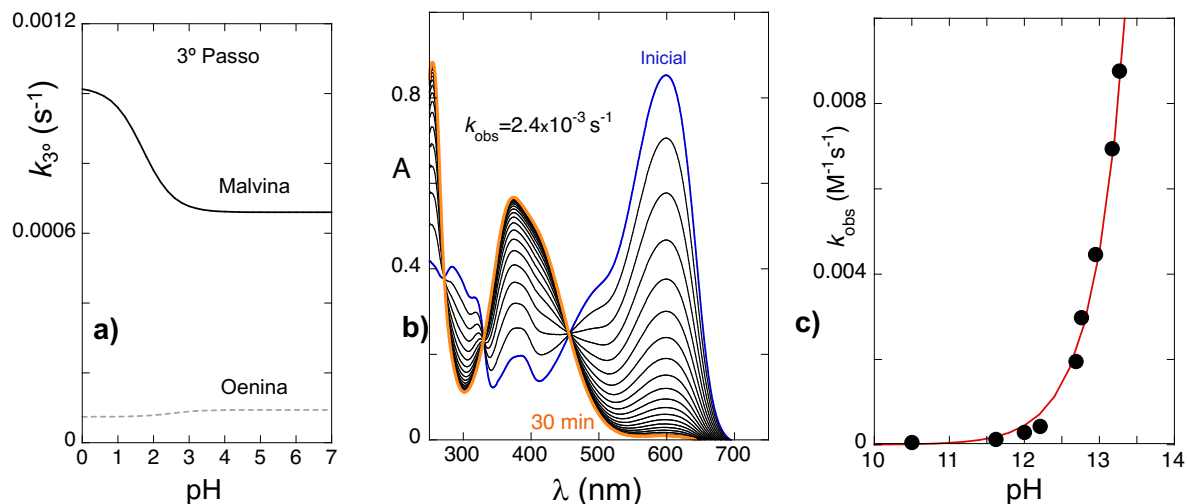


Figura 2.5. a) Constantes de velocidade de isomerização *cis-trans* da oenina e malvina em meio ácido; b) Variações espectrais da oenina após um salto direto de pH para pH=12.8, seguido por um espectrofotômetro. Neste caso, o equilíbrio é alcançado antes de uma degradação significativa, ver abaixo; c) Constantes de velocidade de isomerização da oenina em meio básico. O ajuste foi obtido para $0.045[\text{OH}^-] \text{ s}^{-1}$.

Mais informações da oenina foram obtidas por meio de uma série de saltos diretos de pH monitorizados por fluxo interrompido para $10,5 < \text{pH} < 13,4$, resultados apresentados em Figura 2.5c. Em todo esse intervalo de pH, a base quinoidal di-aniónica (A^{2-}) é a espécie que é formada durante o tempo de mistura do fluxo interrompido. Na Figura 2.5c estão apresentadas as constantes de velocidades da isomerização *cis-trans* em função do pH. O fato de que um platô não ser alcançado em valores de pH elevados, como observado na Figura 2.6 para malvina, está de acordo com um processo controlado pelo ataque de OH^- nucleofílico.

Uma série de saltos diretos de pH da malvina foram monitorizados por um espectrofotômetro. Neste caso, a degradação compete com a cinética em direção ao equilíbrio. As variações espectrais da malvina após um salto direto de pH=1 para pH=10.0 são mostradas na Figura 2.6. Como mostrado na 2ª etapa, neste pH, o catião flavílio é transformado na base quinoidal aniónica (A^{2-}) em sub-microssegundos e um pseudo-equilíbrio é alcançado, Figura 2.4d. Os resultados relatados na Figura 2.6a mostram que após cerca de 1 min (espectro inicial), uma absorção que pode ser atribuída a uma *cis*-chalcona aniónica já é observada. O crescimento da absorvância a 399 nm corresponde à formação de *trans*-chalcona aniónica, seguido de uma diminuição que pode ser atribuída isomerização *cis-trans*. A constante de velocidade observada mais rápida poderia ser atribuída à tautomerização, enquanto a mais lenta à isomerização *cis-trans*. Em conclusão, as constantes de velocidade em direção ao equilíbrio são mais rápidas do que a velocidade de degradação. Na Figura 2.6d, as velocidades de isomerização são representadas em função do pH. O ajuste da isomerização foi obtido considerando

que $pK_{Ct^+/Ct^{2-}}=10,5$, a contante de velocidade de isomerização de Ct^+ não pôde ser determinada com precisão e a de Ct^{2-} é igual a $3,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Mais informações podem ser obtidas realizando um salto inverso de pH de volta para $pH=1$ após a solução do salto direto de pH durante 160 min, Figura 2.6c), como será detalhado nas próximas seções. Após o salto para $pH=1$, observa-se que todas as espécies presentes se convertem rapidamente em catião flavílio. Tanto o hemiacetal (se presente) quanto a *cis*-chalcona evoluem para o catião flavílio em poucos segundos, um processo que requer a aplicação do método de fluxo interrompido para monitorizar a cinética. Em contraste, a conversão da *trans*-chalcona em catião flavílio ocorre de forma consideravelmente mais lenta. As evidências obtidas indicam que a $pH=9.8$ não há presença de hemiacetal. Portanto, a absorção inicial observada pode ser atribuída à *cis*-chalcona, enquanto a amplitude do passo mais lento reflete a transformação da *trans*-chalcona e a diferença em relação ao catião flavílio inicial fornece uma estimativa da fração de degradação durante o processo.

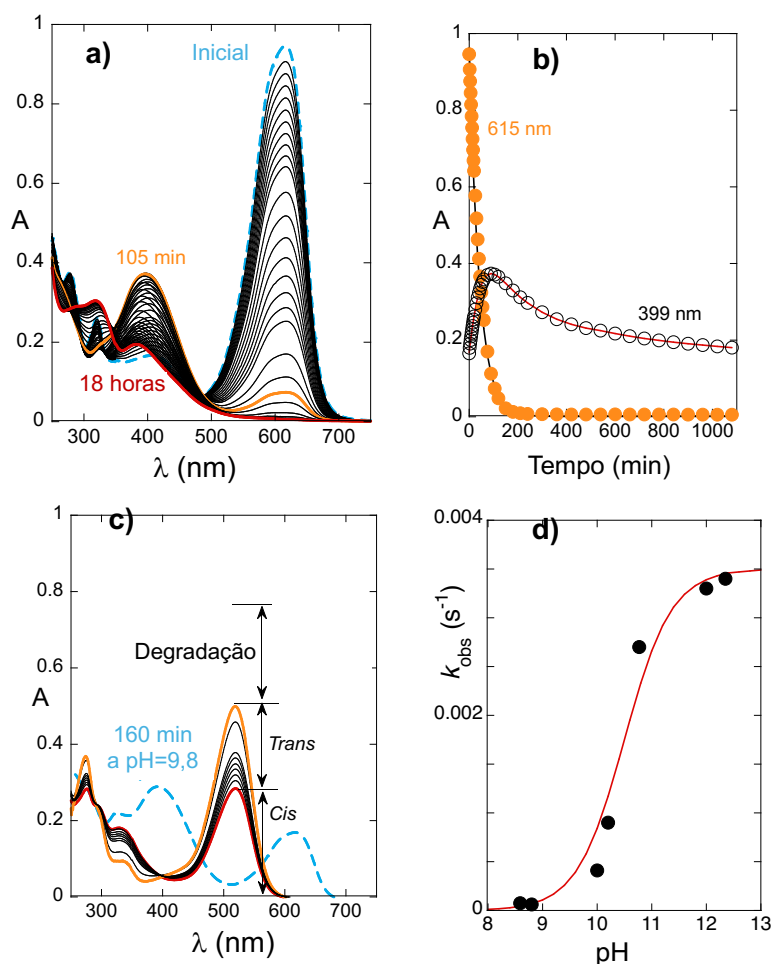


Figura 2.6. a) Variações espectrais da malvina após um salto direto de pH para $pH=10.0$; b) Traço em 615 nm e 399 nm. O ajuste foi realizado com uma função bi-exponencial com constantes de velocidade $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $7.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; c) Sequência de saltos de pH: i) direto para $pH=9.8$, ii) 160 min a este pH, iii) salto inverso de pH de volta para $pH=1$; d) Constantes de velocidade da etapa de isomerização versus pH.

Na Tabela 2.4, são apresentadas as constantes de isomerização da oenina e a malvidina em diferentes condições de pH, destacando suas respostas distintas a variações de pH.

Tabela 2.4. (3ª etapa). Constantes de isomerização da oenina e malvina.

	$k_i \text{ (s}^{-1}\text{)}^{(1)}$	$k_{-i} \text{ (s}^{-1}\text{)}^{(1)}$	$k_i \text{ (s}^{-1}\text{)}^{(2)}$	$k_{-i} \text{ (s}^{-1}\text{)}^{(2)}$
Oenina	9.8×10^{-5}	7.9×10^{-5}	Mais rápido	Mais rápido
Malvina	1.0×10^{-3}	5.9×10^{-4}	3.5×10^{-3}	$< 10^{-5}$

* Erro estimado 10%; (1) Meio ácido; (2) Meio básico.

2.2 Saltos inversos de pH

A adição de ácido em soluções equilibradas com valores de pH mais altos, forçando o sistema a retornar ao catião flavílio, é chamada de salto inverso de pH. Os saltos inversos de pH (monitorizados por fluxo interrompido e por meio de um espectrofotômetro) são uma ferramenta poderosa para calcular as constantes de equilíbrio envolvendo todas as espécies do Esquema 2.1. A curva de um salto inverso de pH monitorizado pelo fluxo interrompido, a partir de pH=5,5, é mostrado na Figura 2.7a. A amplitude inicial pertence a transformação das bases quinoidais em catião flavílio durante o tempo de mistura. A amplitude da primeira curva corresponde ao catião flavílio que é formado a partir dos hemicetais. Isso ocorre porque a $\text{pH} \leq 1$, a hidratação se torna mais rápida do que a tautomerização (mudança de regime)[73]. A amplitude da segunda curva é atribuída à conversão da *cis*-chalcona em mais catião flavílio, via hemicetal. A normalização das três amplitudes dá a respetiva fração molar a $\text{pH}=5,5$ [1], [74], [75] Resumindo, os saltos inversos de pH monitorizados pelo fluxo interrompido são um método analítico que permite medir a fração molar das espécies envolvidas em qualquer faixa de pH. Esses experimentos dizem respeito às espécies no pseudo-equilíbrio, a contribuição das *trans*-chalconas requer o uso de um espectrofotômetro.

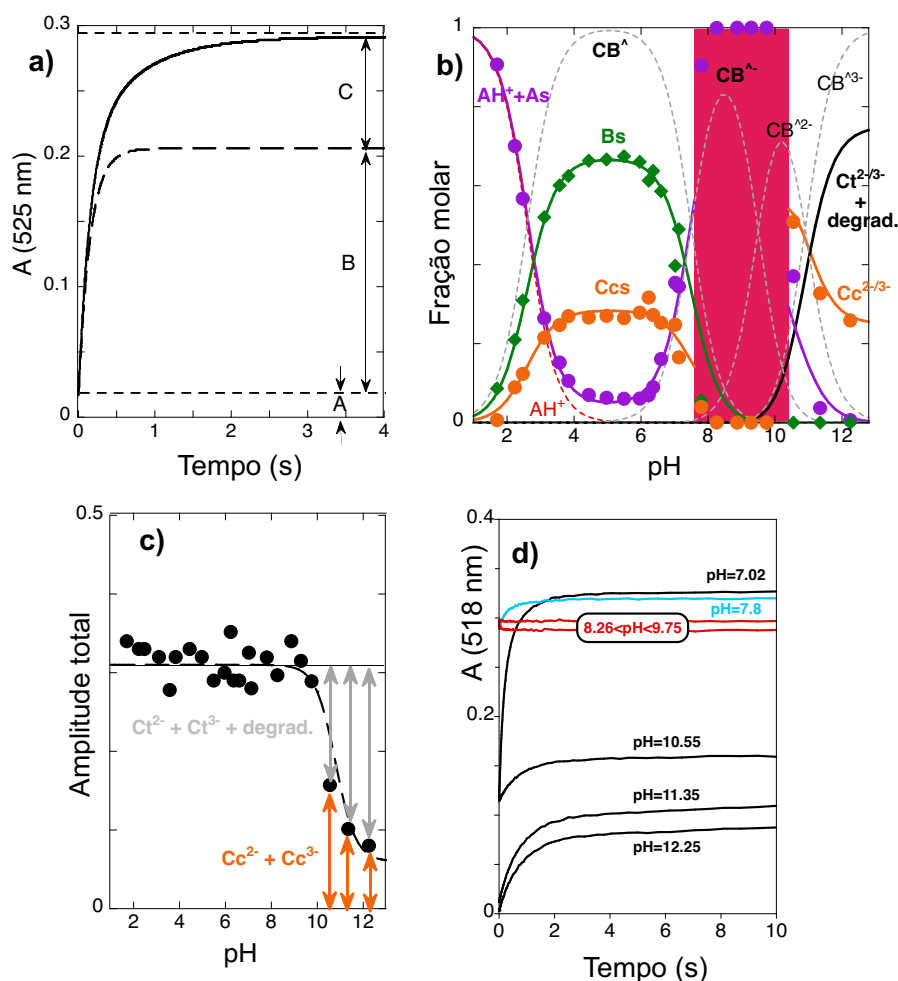


Figura 2.7. a) Traços do salto inverso de pH da oenina monitorizado pelo fluxo interrompido a pH=5,5; A amplitude **A** corresponde ao catião flavílio obtido de todas as bases quinoidais e catião flavílio presentes antes do salto; a amplitude **B** ao catião flavílio que aparece devido às espécies hemicetais; a amplitude **C** ao catião flavílio resultante das espécies *cis*-chalconas; b) representação das amplitudes calculadas como em (a) versus pH após deixar as soluções durante 4 horas; c) representação da amplitude total dos saltos inversos de pH das soluções em equilíbrio na Figura 2.1a; d) traços dos saltos inversos de pH monitorizados pelo fluxo interrompido de volta para pH=1 após deixar as soluções durante 4 horas após um salto direto de pH.

A distribuição da fração molar de todas as espécies e as constantes de equilíbrio respectivas, excluindo as *trans*-chalconas, são obtidas estendendo os saltos inversos de pH para todos os valores de pH, conforme mostrado na Figura 2.7b. Vale ressaltar que os saltos inversos de pH monitorizados pelo fluxo interrompido dizem respeito a todas as espécies do chamado pseudo-equilíbrio, excluindo as *trans*-chalconas. Para considerar essas últimas espécies, é necessário um espectrofotômetro, como mostrado na Figura 2.8. A amplitude total dos experimentos de saltos inversos de pH também fornece algumas informações sobre o sistema. Apesar de alguma dispersão dos valores devido à incerteza intrínseca das medições pelo fluxo interrompido, a concentração total de *cis*-chalconas diminui em valores de pH mais altos. Consequentemente, a amplitude das *cis*-chalconas obtidas em experimentos

de saltos inversos de pH deve ser corrigida. A diminuição de Cc^{2-} e Cc^{3-} pode ser explicada pela formação das respectivas *trans*-chalconas e/ou produtos de degradação. Vale ressaltar que a normalização dos dados na Figura 2.7a exclui a dependência da absorvância total e a precisão dos dados da Figura 2.7b é muito alta. Um comportamento singular dos monoglucósidos é a existência de uma faixa de pH marcada pela banda vermelha onde a velocidade de degradação da base quinoidal é maior do que a reação de hidratação em meio ácido e a adição nucleofílica em meio básico, isso pode ser observado na Figura 2.7b e Figura 2.7d. Em 4 horas, a absorvância das bases quinoidais aniônicas não muda significativamente. Enquanto a curva a partir de pH=7,02 é bi-exponencial, mostrando que tanto o hemiacetal quanto a *cis*-chalcona estavam presentes (e a hidratação ocorreu). Na faixa de pH $8,26 < pH < 9,75$, a absorvância não muda. Para valores de pH mais altos, apenas um processo cinético foi observado, o que leva à *cis*-chalcona (falta de hemiacetal). Para obter mais informações sobre o comportamento da oenina em meio básico, uma série de saltos diretos de pHs para a região básica, mantendo as soluções por 4 horas, seguida por um salto inverso de pH para pH=1, foi realizada, conforme mostrado na Figura 2.8.

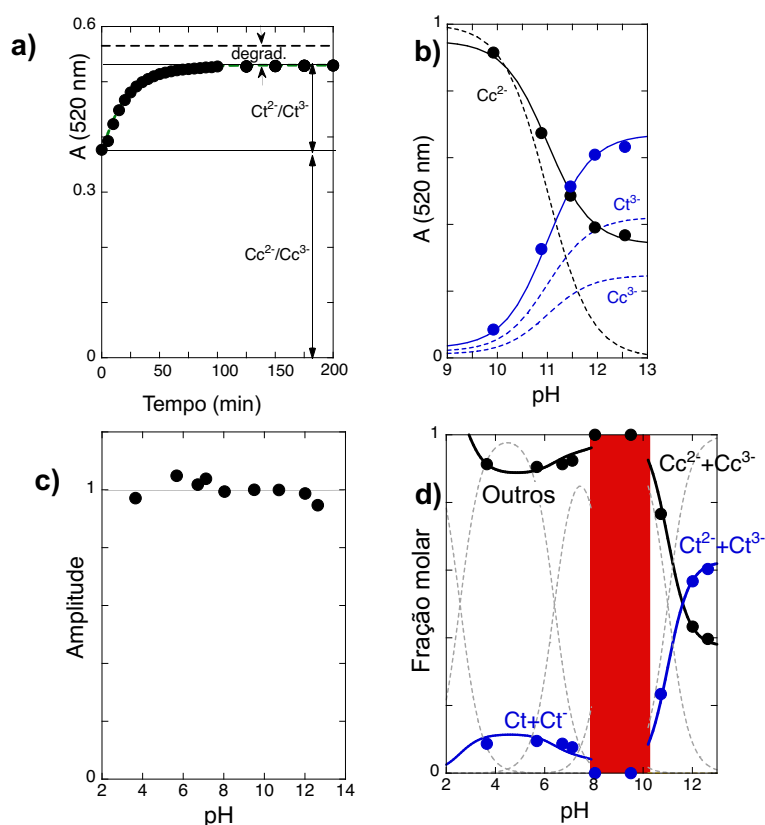


Figura 2.8. a) Salto inverso de pH da oenina após 4 horas a pH=10,8, seguido por um espectrofotômetro. b) Extensão dos experimentos para uma faixa de pH na região básica; c) Absorvância total normalizada para toda faixa de pH; d) Representação das frações o equilíbrio não é alcançado na zona vermelha e apenas bases quinoidais aniônicas estão presentes.

Na Figura 2.8a, a absorvância inicial corresponde a todas as bases quinoidais, hemicetal e *cis*-chalconas independentemente de seu estado de protonação. A amplitude da curva é devido à conversão da *trans*-chalcona em catião flavílio via hemicetal e *cis*-chalcona. Estendendo o experimento relatado na Figura 2.8a para outros valores de pH básicos, fornece a distribuição da fração molar dessas espécies no equilíbrio, Figura 2.8b. O ajuste foi realizado para uma constante ácido-base $pK_{\text{isome}}=11$. O equilíbrio para valores de pH mais altos é atingido para 63% de Ct^{3-} e 37% de Cc^{3-} . Os dados relatados na Figura 2.8b são compatíveis com um equilíbrio entre Cc^{2-} e Ct^{3-} . Em outras palavras, em meio menos básico, Cc^{2-} é a espécie dominante, enquanto em soluções mais básicas é Ct^{3-} . A prevalência das chalconas e, em particular, das *trans*-chalconas em meio básico é observada comumente em alguns compostos flavílicos sintéticos[1]. A Figura 2.8c diz respeito à amplitude total das espécies envolvidas nos experimentos de saltos inversos de pH. Não há sinal de degradação, pois a amplitude total é constante. Vale ressaltar a representação das *trans*-chalconas após 4 horas, Figura 2.8d. Na região de pH entre $8 < \text{pH} < 10$, nenhuma *trans*-chalcona é observada, pois o equilíbrio não é alcançado. Além disso, apenas bases quinoidais aniônicas são observadas, como relatado anteriormente[11].

Os valores de equilíbrio da malvina foram estudados por saltos inversos de pHs monitorizados por fluxo interrompido, Figura 2.9a e Figura 2.9b, bem como por um espectrofotômetro, Figura 2.9c. As soluções são mantidas no escuro por 4 horas antes do salto inverso de pH. Este é o tempo suficiente para alcançar o pseudo-equilíbrio e no meio básico o equilíbrio.

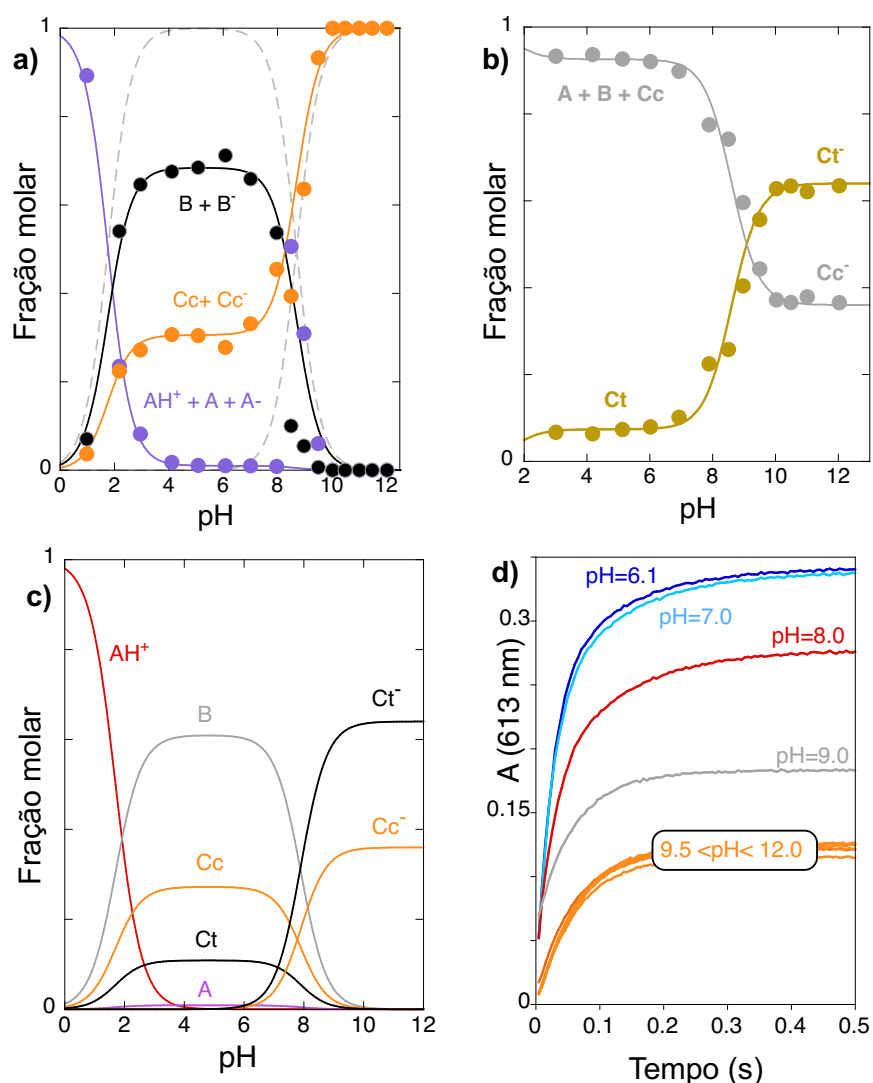


Figura 2.9. a) Distribuição da fração molar no pseudo-equilíbrio; b) Representação das frações de *trans*-chalconas e todas as bases quinoidais, hemiacetais e *cis*-chalconas; c) Distribuição da fração molar no equilíbrio. As constantes de equilíbrio estão relacionadas na Tabela 2.1; d) Cinética do salto inverso de pH após um salto direto de pH para uma série de valores de pH ao permanecer por 4 horas.

Comparando a amplitude da base quinoidal na Figura 2.7a e Figura 2.7b com a Figura 2.9d, pode-se concluir que a fração molar da base quinoidal é menor no diglucósido quando comparada com o monoglucósido. Na Figura 2.9d, apenas as *cis*-chalconas são observadas, pois não há tempo para observar a isomerização *cis-trans*. Na verdade, no equilíbrio em meio básico, a *trans*-chalcona aniônica é a principal espécie em seu equilíbrio com a *cis*-chalcona aniônica. Esta é a mesma tendência do monoglucósido. Os dados da Figura 2.9d confirmam que para $9,5 < \text{pH} < 12$ a pHs mais básicos as *cis* e *trans*-chalconas aniônicas são as espécies de equilíbrio.

2.3 Processos irreversíveis

O processo irreversível que conduz à degradação das antocianinas em soluções ácidas ou básicas pode ser estudado por uma sequência de saltos de pH da seguinte forma: i) salto direto de pH a partir de soluções equilibradas do catião flavílio para o pH desejado, ii) deixar a solução por um tempo determinado (tempo de espera); iii) realizar um salto inverso de pH para $\text{pH} \leq 1$ e esperar o tempo necessário para que o catião flavílio atinja o equilíbrio. A degradação para cada tempo de espera é medida por meio da Eq. 2.4, onde A inicial é a absorvância inicial do catião flavílio, antes do passo i) e A após o atraso é a absorvância após o passo iii).

$$\chi_{deg} = 1 - \chi_{AH^+ rec} = 1 - \frac{A_1}{A_0} \quad \text{Eq. 2.4}$$

Na Figura 2.10, são apresentadas as constantes de velocidade de degradação ($k_{deg.}$) da oenina e malvina em função do pH. Estas constantes são determinadas através de uma monitorização em diferentes tempos de espera. Os pHs de transição, incluem o pH fisiológico, no contexto deste trabalho $\text{pH}=7,4$, são delimitados pela reação de hidratação e pela adição nucleofílica de OH^- , **2ª etapa**, respetivamente em meio ácido e básico, Figura 2.10b e Figura 2.10c. Nesta região de faixa de pH, o equilíbrio não é alcançado, apenas bases quinoidais aniónicas estão presentes (juntamente com os produtos irreversíveis respetivos, alguns deles absorvendo na região visível, ver abaixo) e nenhum *cis*-chalcona é detetado, nos saltos inversos de pHs de volta para $\text{pH} \leq 1$. O fato de, nos pHs de transição da oenina, as constantes de velocidade de degradação seguirem a distribuição da fração molar da espécie A^- , Figura 2.10b, sugere que as vias de degradação são essencialmente iniciadas a partir desta espécie. Em meio básico (fora dos pHs de transição), a constante de velocidade de degradação segue a distribuição da fração molar das chalconas aniónicas (as únicas espécies observadas), sugerindo um ataque de OH^- a essas espécies, que é menos eficiente para as chalconas aniónicas mais carregadas negativamente devido à maior repulsão eletrostática.

A malvina se comporta de maneira diferente, Figura 2.10c. Os pHs de transição, também delimitados pela reação de hidratação e pela adição nucleofílica de OH^- , são mais estreitos em comparação com a oenina. Fora dos pHs de transição, a cinética em direção ao equilíbrio é sempre mais rápida do que a degradação, Figura 2.10c, seguindo a mesma tendência da oenina. Também deve ser enfatizado que a cinética de degradação do diglucósido em meio básico é mais rápida do que a do monoglucósido. Uma explicação provável é a menor estabilidade das espécies aniónicas.

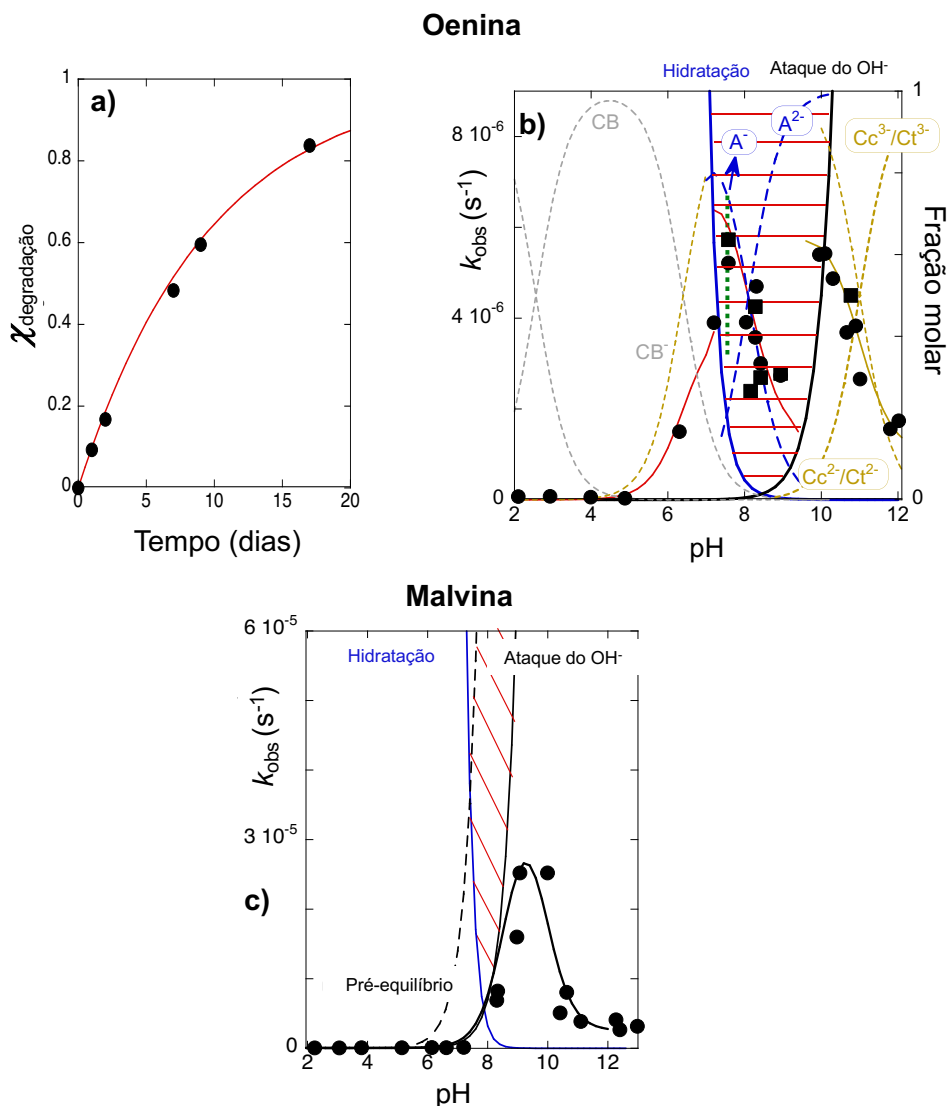


Figura 2.10. a) Fração molar dos processos de degradação após um salto de pH de oenina 2×10^{-5} M a pH=6,3 calculada em 520 nm por meio da Eq. 2.4 em função do tempo de espera. A cinética é mono-exponencial com a constante de velocidade de degradação $k_{\text{deg.}} = 1,5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$; b) (●) Representação das constantes de velocidade de degradação da oenina em função do pH, pK do equilíbrio entre chalconas dianiônicas e trianiônicas ≈ 11 ; (■) Constante de velocidade para a cinética do desaparecimento da base quinoidal; c) (●) Constantes de velocidade de degradação da malvina $1,3 \times 10^{-5}$ M.

2.4 Conclusões

Apesar da presença de um equilíbrio reversível, como demonstrado no Esquema 2.1, as antocianinas são intrinsecamente instáveis, especialmente a pH neutro à básico, com tempos de degradação variando de horas a vários dias, dependendo do pH.

Esta abordagem holística permitiu revelar uma faixa de pH (pHs de transição), que inclui o pH fisiológico, na fronteira entre os paradigmas ácido e básico, onde a hidratação e a adição nucleofílica de OH⁻ são muito lentas. Nesta faixa de pH, as bases quinoidais aniônicas são as principais espécies reversíveis e processos complexos de degradação controlam seu desaparecimento.

Estudos cinéticos detalhados em meio básico permitem concluir que a adição nucleofílica de OH⁻ é o passo controlador em direção ao equilíbrio e, em contraste com o meio ácido, a isomerização *cis-trans* é muito rápida. Apesar do passo limitante da constante de velocidade em direção ao equilíbrio reversível ser comum à oenina e malvina, este último apresenta um pré-equilíbrio envolvendo a base quinoidal aniônica e uma nova espécie transitória resultante do ataque OH⁻ na posição 4, levando à espécie B4²⁻ identificado por ¹H RMN.

A identidade e as concentrações de bases quinoidais, hemicetais e *cis*-chalconas são obtidas para toda a faixa de pH a partir de saltos inversos de pH monitorizados por fluxo interrompido, enquanto as *trans*-chalconas requerem um espectrofotômetro. A velocidade de aparecimento do catião flavílio nestes experimentos constitui uma assinatura cinética, que permite a identificação precisa das espécies e concentrações relativas a partir da amplitude das respectivas curvas cinéticas.

Além disso, as assinaturas cinéticas também são úteis para detetar a existência de outras espécies não observadas a pHs ácidos, como foi o caso do B4²⁻ para a malvina em meio básico. Não há nenhuma evidência espectral, a partir de saltos inversos de pH monitorizados por experimentos de fluxo interrompido, para formas aniônicas hemicetais.

2.5 Metodologia experimental

A metodologia experimental consistiu em várias técnicas analíticas para investigar a degradação das antocianinas em diferentes condições de pH:

Espectrofotometria UV-Vis: Utilizada para monitorizar os saltos de pH e as mudanças espectrais ao longo do tempo.

HPLC-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Array de Diodos): Empregada para acompanhar a degradação das antocianinas em diferentes concentrações e pH. A degradação de OENINA foi monitorizada ao longo do tempo em diferentes concentrações (3,33x10⁻⁵ M, 2x10⁻⁴ M e 1x10⁻³ M) a pH 8,12. A análise foi realizada num cromatógrafo líquido Thermo Ultimate 3000, utilizando uma coluna C18 de fase reversa Poroshell 120. Os eluentes utilizados foram ácido fórmico em água e acetonitrila, com detecção realizada por um detector Thermo Accela PHA.

Análise LC-MS (Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa): Realizada para identificar produtos de degradação. Utilizou-se um cromatógrafo líquido da série Finnigan Surveyor, equipado com uma coluna C18 de fase reversa Poroshell 120. Os eluentes foram ácido fórmico em água e acetonitrila. A detecção de massa foi realizada no modo ião positivo num detector de massa Finnigan LCQ DECA XP MAX.

RMN (Ressonância Magnética Nuclear): Empregada para estudar o processo de degradação e identificar espécies intermediárias. Utilizou-se um espectrômetro Bruker Ascend 600 operando a uma frequência de ^1H de 600,13 MHz. Os espectros ^1H foram registados ao longo do tempo a $25,00 \pm 0,01$ °C. O pH de todas as soluções foi determinado com um eletrodo de vidro previamente calibrado. Essas técnicas analíticas forneceram informações abrangentes sobre a degradação das antocianinas em diferentes condições de pH, permitindo uma compreensão mais detalhada dos processos envolvidos.

REAÇÕES TÉRMICAS E FOTOQUÍMICAS DE N-PIRIDINABENZOPIRÍLIO

A introdução de heterocíclicos de nitrogénio no núcleo do flavílio pode resultar em multiestados com diferentes constituições. Neste contexto, três derivados de 2-piridil-1-benzopirílio foram sintetizados e caracterizados por RMN, HPLC-MS e cristalografia de raios X. Esses compostos demonstraram uma rede de reações dependente do pH, semelhante às antocianinas e compostos relacionados. As diversas espécies presentes no equilíbrio de multiestado foram totalmente caracterizadas por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Além disso, a termodinâmica e a cinética do multiestado foram estudadas por meio de saltos de pH seguidos por ^1H RMN e absorção UV-vis, incluindo fluxo interrompido para os passos cinéticos mais rápidos.

Neste capítulo serão apresentados os estudos de três novos compostos, pertencentes a uma nova família de derivados de 2-piridil-1-benzopirílio, fruto de um trabalho que teve início com o estudo da 4'-piridinochalcona,[71] nos quais o grupo fenilo é substituído por uma piridina.[39], [71], [76] Esses compostos representam uma extensão significativa da pesquisa anterior e prometem contribuir para o entendimento mais amplo das propriedades e aplicações dos flavílios modificados.

Os resultados apresentados e discutidos neste capítulo são fruto da colaboração entre diversos pesquisadores e resultaram na publicação de dois artigos científicos.³⁴

³ Camuenho A., *et al* "Thermal and photochemical reactions of n-pyridinebenzopyrylium multistate of species ($n=2',3',4'$). Exploring the synthetic potentialities from the unique reactivity of position 2" *J. Photochem. Photobio.*, 2023, 440,114658.

⁴ Camuenho A., *et al* "A model compound for pyridinechalcone-based multistate systems. Ring opening-closure as the slowest kinetic step of the multistate", *New J. Chem.*, 2019, 43, 18229.

3.1 Novos compostos da família das piridinochalconas

Há alguns anos, foi publicado o composto 4'-piridinochalcona,[71] o qual, em comparação com as 2-hidroxicalconas, apresentou uma variação drástica na rede de reações químicas. Este composto deu origem a três espécies distintas: *trans*-chalcona (Ct), *cis*-chalcona (Cc) e hemiacetal b), além de suas formas protonadas. Na Figura 3.1, junto com a 4'-piridinochalcona, são apresentados os novos compostos sintetizados, os quais serão detalhados e discutidos nos subcapítulos a seguir.

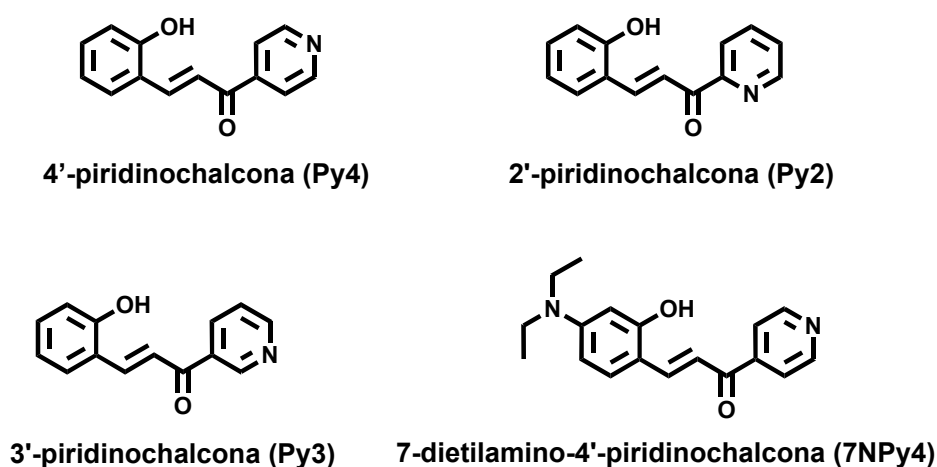


Figura 3.1. Piridinochalconas.

3.2 Sistema multiestado do composto 2'-piridinochalcona (Py2)

Os espectros de absorção dependentes do pH das soluções de *trans*-chalcona (Ct) de Py2 (recentemente preparadas) registrados imediatamente após os saltos de pH são mostrados na Figura 3.2. As variações espectrais observadas são compatíveis com a existência de dois valores de pK_a , indicando a presença das espécies Ct^+ , Ct e Ct^- . Na Figura 3.2a, o equilíbrio entre a espécie protonada e a forma neutra é evidenciado por um ponto isobéstico claro, e um comportamento semelhante é observado na Figura 3.2b para o equilíbrio envolvendo as formas neutra e aniônica. A análise da absorvância em função do pH em três comprimentos de onda representativos permite calcular os valores de pK_a como $pK_{Ct^+/Ct}=1,9$ e $pK_{Ct/Ct^-}=9,4$, conforme apresentado na Figura 3.2c.

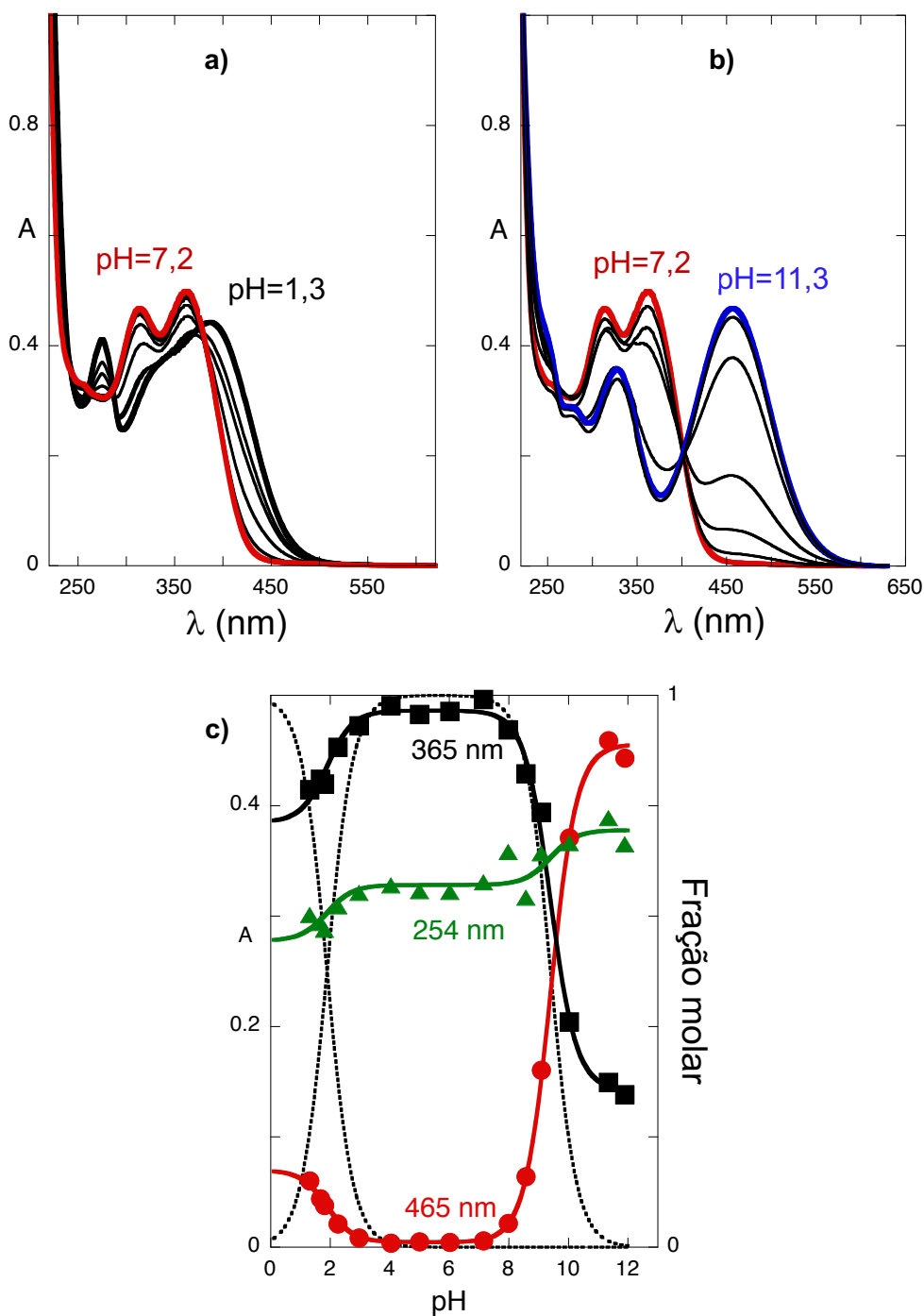


Figura 3.2. a) e b) variações espectrais do composto Py2 $1,3 \times 10^{-4}$ M ($H_2O/MeOH$ 1:1) os espectros foram traçados imediatamente após o salto de pH; c) curvas de titulação. O ajuste foi alcançado para $pK_{Ct+/Ct-}=1,9$ e $pK_{Ct/Ct-}=9,4$.

Os resultados da Figura 3.2 foram confirmados pela análise de 1H RMN, conforme demonstrado na Figura 3.3. Valores representativos de pH foram selecionados com base nos dados de espectroscopia de absorção UV-vis apresentados anteriormente na Figura 3.2. Os espectros de 1H RMN obtidos após os saltos de pH a partir de soluções recém-preparadas a pH=6,5 com ~100% de Ct são mostrados na

Figura 3.3, correspondendo às formas catiónica (Figura 3.3a), neutra (Figura 3.3b) e aniônica (Figura 3.3c) das *trans*-chalconas. A identificação do isômero *trans* foi realizada com base nas constantes de acoplamento dos prótons 3 e 4, as quais foram medidas como a) 15,6 Hz; b) 16,2 Hz; c) 16,6 Hz, respectivamente.

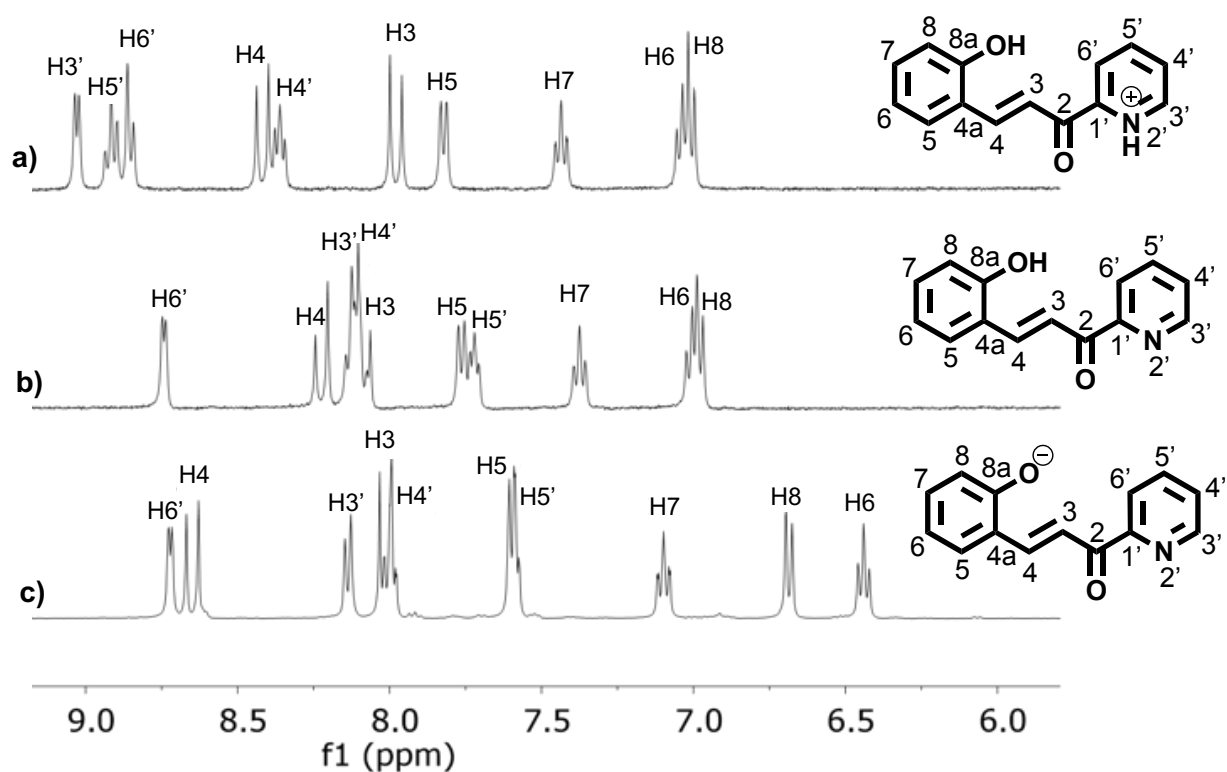


Figura 3.3. Espectros de ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD/D₂O 1:1), Py2 1,7x10⁻³ M; a) pH=0,5, ~100% Ct⁺; b) pH=6,5, ~100% Ct; c) pH=12, ~100% Ct⁻. (A numeração foi feita de acordo com a estrutura do catião flavílio)

Os espectros apresentados na Figura 3.3 foram adquiridos através da preparação de uma amostra fresca (recém-preparada) a pH=6,5, conforme mostrado na Figura 3.3b. Posteriormente, foram realizados dois saltos de pH: para pH=0,5 (Figura 3.3a) e para pH=12 (Figura 3.3c). A evolução térmica da absorção da *trans*-chalcona foi monitorizada por absorção UV-vis em meio ácido e neutro, conforme mostrado na Figura 3.4.

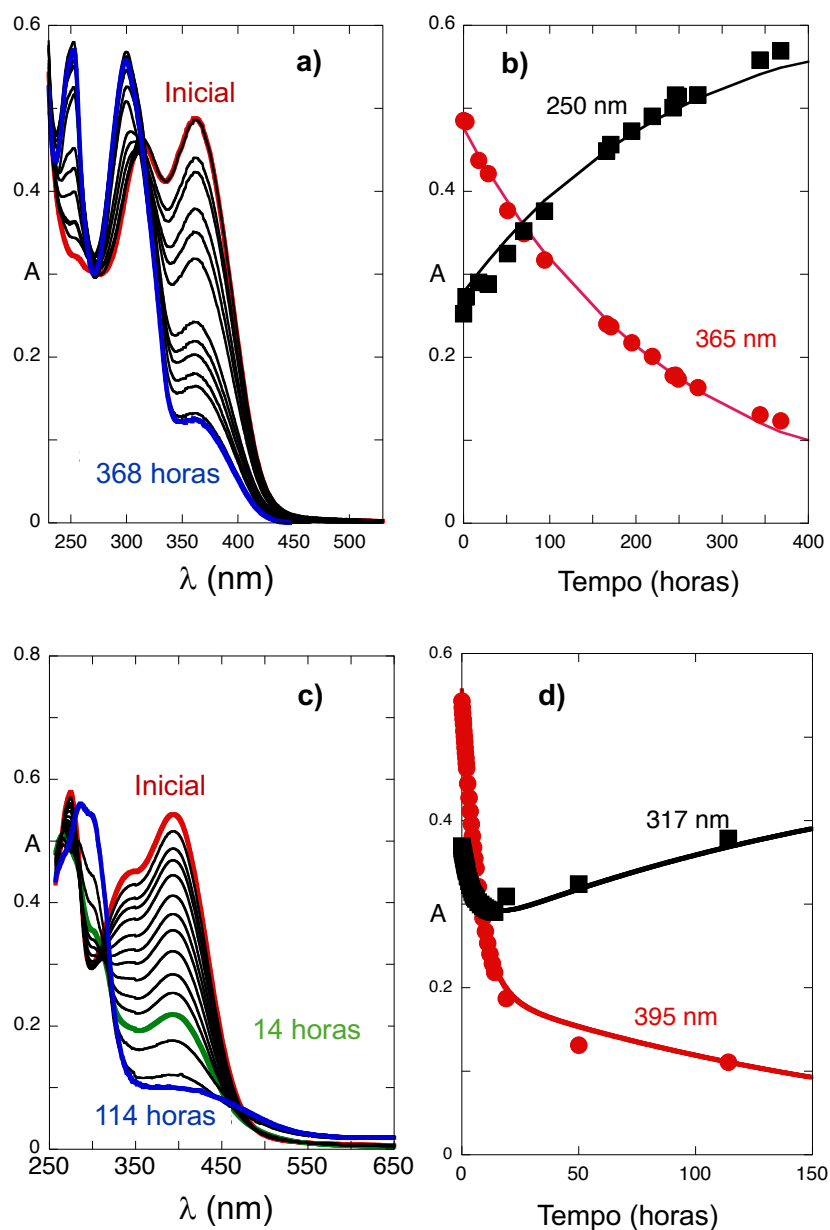


Figura 3.4. a) Variações espectrais de uma solução de Py2 $1,3 \times 10^{-4}$ M, a pH=6,2; b) A cinética desta solução foi ajustada com uma mono-exponencial com constantes de velocidade $1,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$; c) Variações espectrais após um salto de pH de soluções recém-preparadas de Py2, para pH=1,3; d) O ajuste dos dados de c) foi obtido com um bi-exponencial com constantes de velocidade $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; e $2,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

As variações espectrais relacionadas na Figura 3.4 indicam que a *trans*-chalcona desaparece tanto a pH=6,2 quanto a pH=1,3. Isso ocorre com uma cinética de decaimento mono-exponencial, com uma constante de velocidade de $1,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, e uma cinética de decaimento bi-exponencial, com constantes de velocidade de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e $2,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Para obter mais informações sobre este sistema, foi realizado um experimento de HPLC ao longo do tempo usando as mesmas misturas de solventes a pH=6,0 e em soluções ácidas contendo 0,48 M de HCl, conforme mostrado na Figura 3.5.

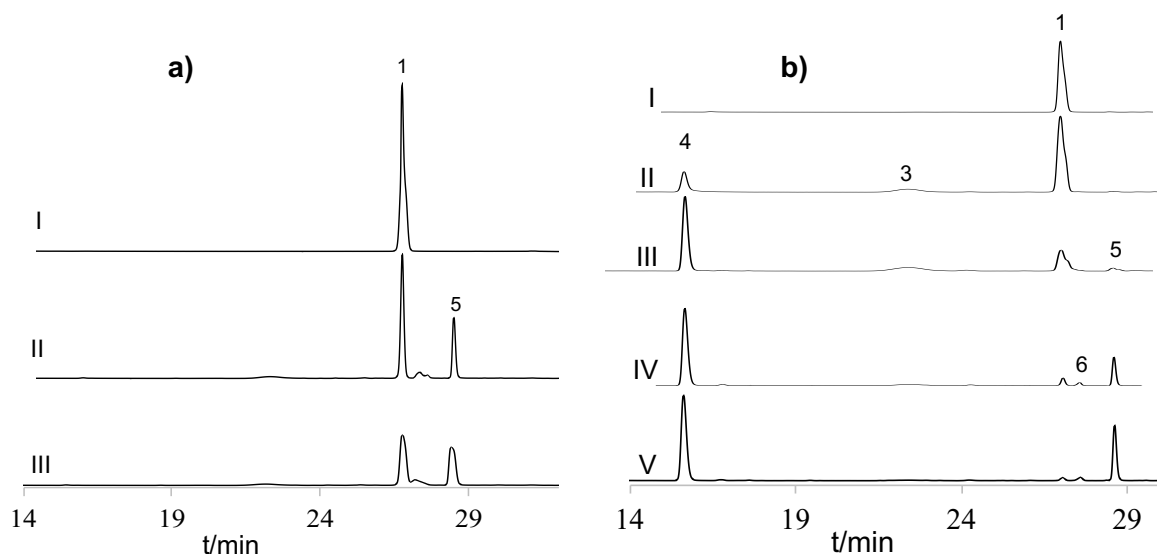
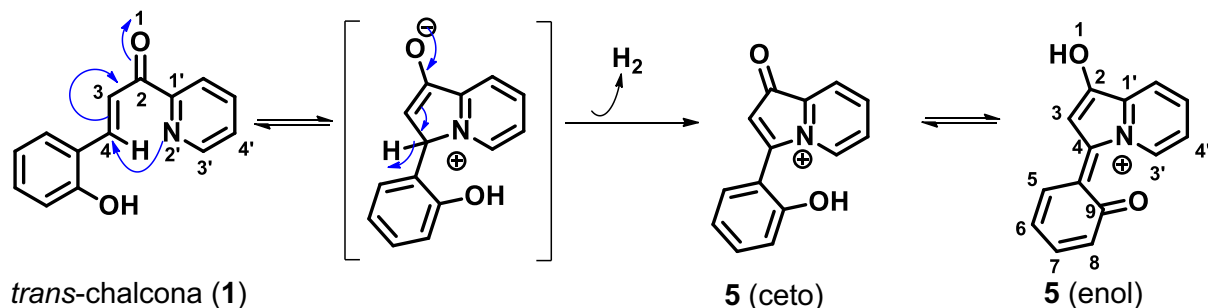


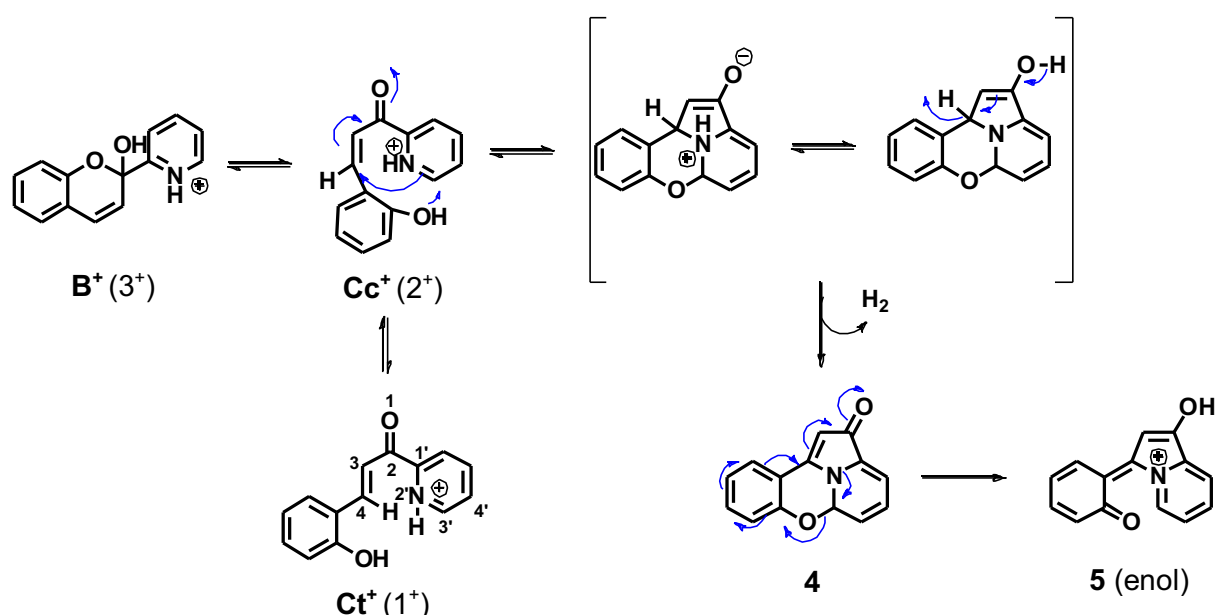
Figura 3.5. Cromatogramas de HPLC a 280 nm de Py2, $1,1 \times 10^{-4}$ M em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1 v/v): **a)** a pH=6,0: **I** inicial; **II** após 5 dias; **III** após 7 dias. Picos detetados: **1** (Ct ; $r_t = 27,0$ min) e pico **5** ($r_t = 28,7$ min); **b)** a 0,48 M em HCl: **I** inicial; **II** após 6 horas; **III** após 22 horas; **IV** após 5 dias; **V** após 8 dias. Picos detetados: Pico **3** (**B** ; $r_t = 22,5$ min) (o respectivo tempo de retenção é coincidente com um hemiacetal puro obtido na Fig. 3.10b e pico **4** ($r_t = 15,7$ min) que exibe $m/z=224$ (modo positivo) , consulte o esquema 3.2 para a estrutura proposta.

Os resultados de HPLC apresentados na Figura 3.5 confirmam que a *trans*-chalcona (**1**) não é estável em misturas de solventes de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, nem próximo do neutro, nem em soluções muito ácidas. Este comportamento contrasta com o observado para Py3 (conforme apresentado mais abaixo) e Py4,[71] sendo uma consequência da peculiaridade do nitrogénio na posição 2. A evolução da *trans*-chalcona a pH=6,0 para formar o produto final (**5**) ocorre em duas etapas distintas: (i) ocorre a adição de Michael do átomo de nitrogénio da chalcona de piridina a C4; (ii) oxidação. Uma estrutura proposta para este produto térmico é apresentada no Esquema 3.1.



Esquema 3.1. Proposta mecanística da formação do composto **5** em condições neutras.

Em valores de pH neutro (Figura 3.5a e Esquema 3.1), a *trans*-chalcona (1, $m/z=226$ no modo positivo) está na sua forma neutra. Nesse contexto, o par solitário do átomo de nitrogénio no anel de piridina está disponível como nucleófilo, capaz de realizar um ataque intramolecular à dupla ligação eletrofílica (posição 4). O intermediário formado, embora não detetado por HPLC ou MS, é oxidado rapidamente para recuperar a aromaticidade do sistema, resultando no composto 5 ($m/z=224$ no modo positivo). No Esquema 3.2 é apresentada a proposta de mecanismo da evolução da *trans*-chalcona em meio ácido para formar o composto 5. Este processo ocorre em quatro etapas: (i) Isomerização *cis-trans* e tautomerização; (ii) dupla ciclização nucleofílica ocorre pela adição do grupo hidroxilo em C3' e subsequente adição de Michael do átomo de nitrogénio da piridina chalcona em C4; (iii) oxidação para formar o composto 4; (iv) rearomatização do anel de piridina para formar o composto 5.



Esquema 3.2. Mecanismo de formação do composto 5 em condições ácidas.

Em valores de pH ácido (Figura 3.5b e Esquema 3.2), o átomo de nitrogénio da piridina está protonado e, como resultado, o seu efeito nucleofílico é totalmente reduzido. No entanto, o composto 5 também é produzido como produto termodinâmico, mas sua formação é alcançada por uma via diferente na qual o composto 4 desempenha um papel fundamental. Nesse caso, a protonação do átomo de nitrogénio na piridina aumenta o seu efeito eletrofílico no C3' que é atacado pelo grupo hidroxilo do anel benzênico quando é realizada a isomerização *cis-trans* da *trans*-chalcona. Este ataque nucleofílico promove a adição de Michael do átomo de nitrogénio ao C4 numa etapa concertada, alcançando a formação de um intermediário instável (não detetado) que é oxidado mais rapidamente para produzir o composto 4 ($m/z=224$ (modo positivo)). A última etapa é uma reação de abertura do anel para recuperar a aromatização no anel da piridina que permite a formação do composto 5. Mais informações sobre a evolução térmica da *trans*-chalcona protonada (1^+), foi obtido por 1H RMN, apresentado na Figura 3.6.

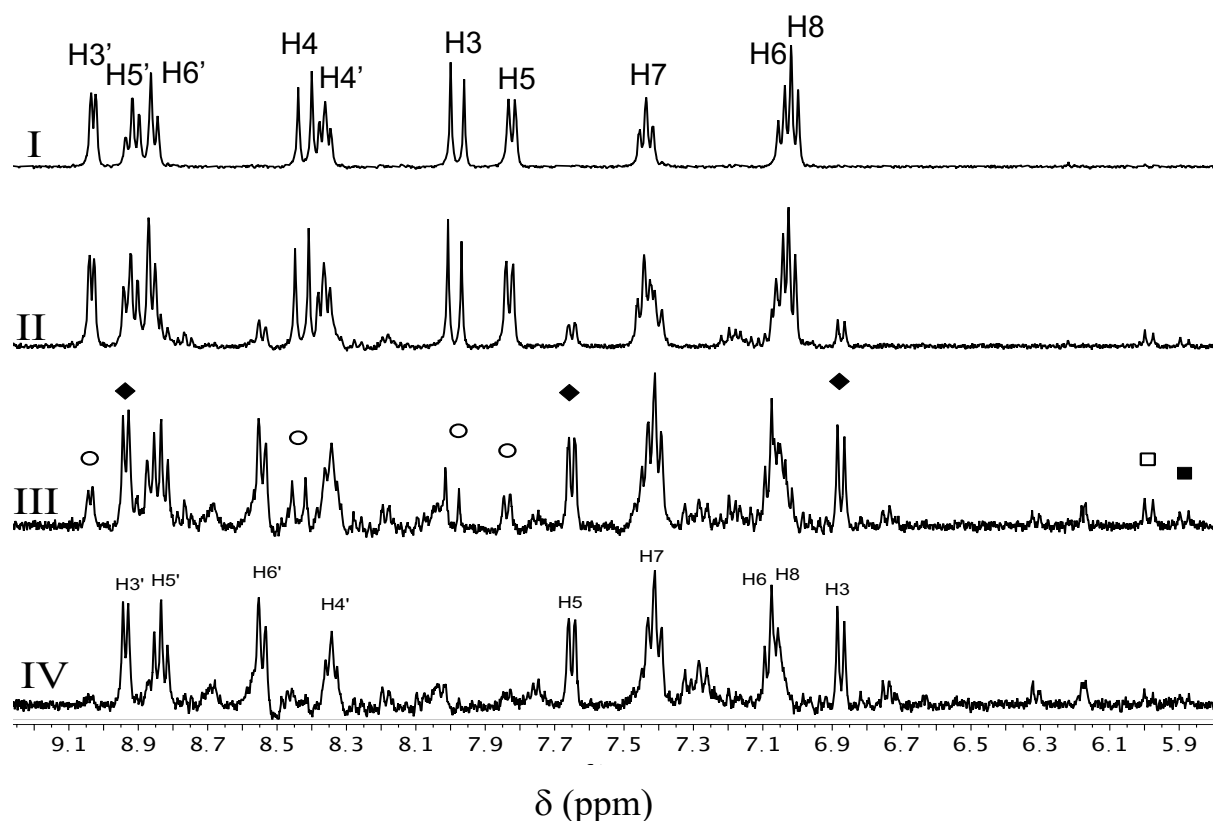
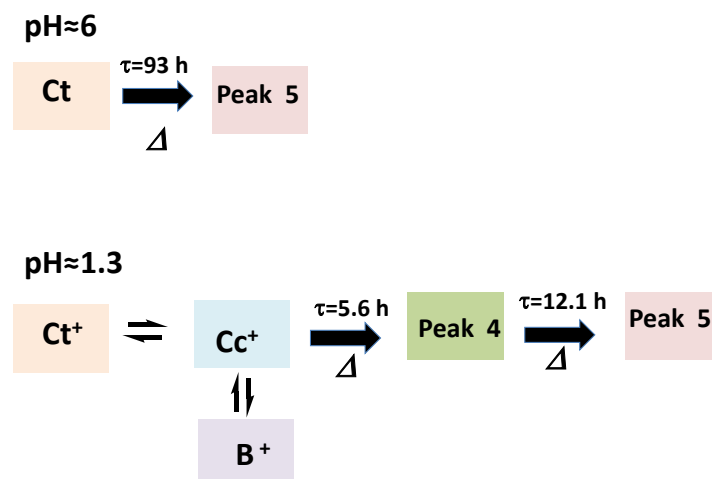


Figura 3.6. Espectros de ^1H RMN de Py2 ($1,7 \times 10^{-2}$ M em $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ (1:1 v/v), 0,48 M DCl): I) inicial ; II) 7h; III) 30h; IV) 54h; compostos representativos (3^+ (B^+ (■)), 2^+ (Cc^+ (□)), 1^+ (Ct^+ (○)) e 4 (◆).

Os dados apresentados na Figura 3.6 corroboram os experimentos de HPLC. Pôde-se observar a formação de B^+ e Cc^+ mantendo a proporção, o que é uma indicação de que a tautomerização é a etapa cinética mais rápida e essas duas espécies podem ser consideradas em equilíbrio durante todas as outras etapas cinéticas. Após 7 h (Figura 3.6II) o composto 4 começa a aparecer. É possível concluir que este composto é formado a partir do equilíbrio B^+/Cc^+ e após 54 h (Figura 3.6IV) é o produto majoritário em solução. A formação do composto 5 a partir do composto 4 é muito mais lenta conforme mostrado na Figura 3.5b e vários dias são necessários para observar a presença deste composto. De fato, o composto 5 pode ser isolado por HPLC semipreparativa (ver seção experimental) e totalmente caracterizado a partir de uma solução de dois meses de 1 em metanol/água (0,2M HCl) e foi totalmente caracterizado por RMN e MS. ^1H -RMN mostra 9 sinais aromáticos agrupados em três sistemas: dois sistemas A_2B_2 e um singlete isolado a 7,42 ppm atribuído a H3 (consulte as informações de suporte, tabela C1-5). ^{13}C RMN também mostra 14 sinais, 9 CH aromáticos e 5 sinais quaternários entre os quais podemos destacar o sinal em 180,8 ppm atribuído a um grupo ceto. Por análises de HMBC, foi possível atribuir a posição do grupo ceto em C9 devido à sua correlação com os sinais aromáticos A_2B_2 no campo inferior. Os outros sinais aromáticos A_2B_2 no campo ascendente foram atribuídos ao sistema de anel de piridina que está correlacionado com o sinal em 140,3 ppm associado ao carbono enólico em C2 (consulte as informações de suporte para uma atribuição completa, tabela C1-5). De

forma resumida, os processos irreversíveis da py2 estão ilustrados no Esquema 3.3. A *trans*-chalcona (1) é transformada no composto 5 por dois mecanismos diferentes, dependendo do pH. A pH neutro, Ct é transformada diretamente no composto 5. No entanto, em valores de pH ácido, essa transformação ocorre via composto 4.



Esquema 3.3. Resumo do comportamento térmico do composto Py2 em soluções de H₂O/MeOH (1:1 v/v).

3.2.1 Fotoquímica

As variações espectrais após a irradiação a 365 nm de soluções do composto Py2 recém-preparados são mostradas na Figura 3.7.

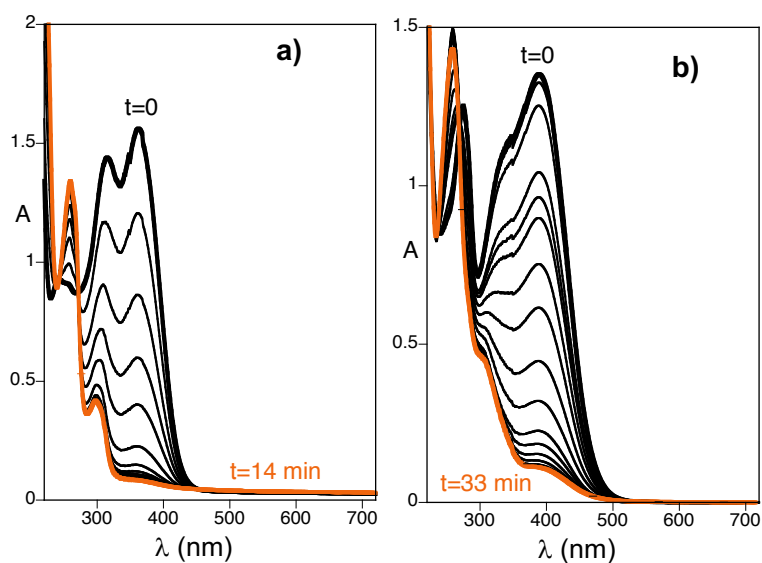


Figura 3.7. Soluções de Py2 ($1,1 \times 10^{-4}$ M, água/metanol (1:1 v/v)) irradiadas a 365 nm. **a)** A pH=6,5; **b)** A pH=1,3.

Os espectros de absorção UV-vis apresentados na Figura 3.7 mostram as irradiações em intervalos curtos da conversão da Ct em Cc para avaliar as reações termodinâmicas que ocorrem ao ultrapassar a barreira de isomerização *cis-trans*, o que não é alcançado por meio da evolução térmica a pH=6. O HPLC foi empregado para monitorar as reações que se desenrolam no escuro, conforme demonstrado na Figura 3.8.

Com o objetivo de avaliar as reações termodinâmicas que ocorrem ao superar a barreira de isomerização *cis-trans*, o que não é possível através da evolução térmica a pH=6. O HPLC foi utilizado para acompanhar as reações que ocorrem no escuro, conforme mostrado na Figura 3.8.

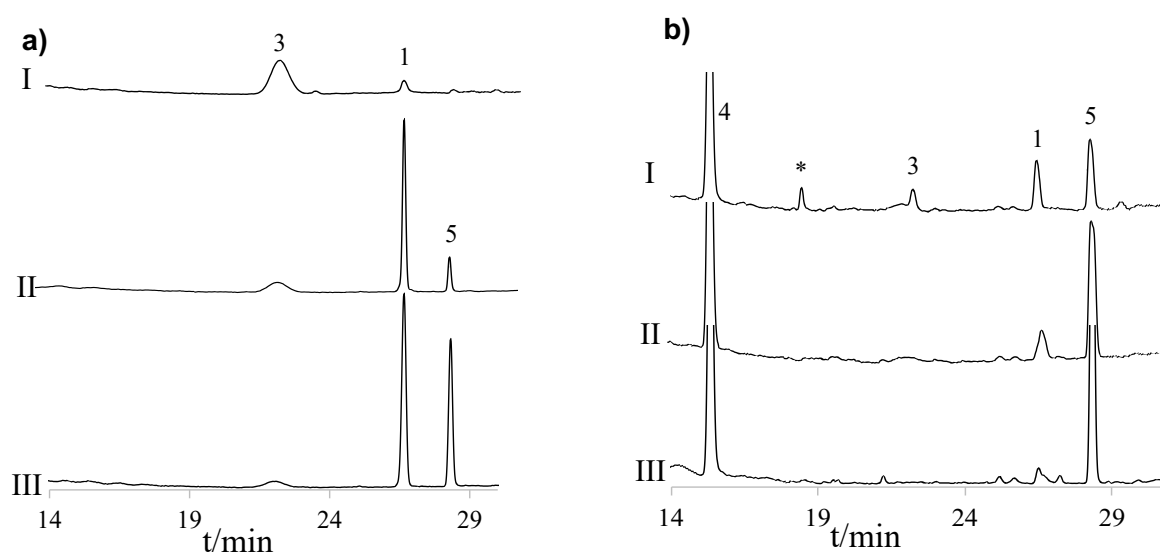


Figura 3.8. Cromatogramas de HPLC a 280 nm relativos à recuperação térmica no escuro após a irradiação a 365 nm da *ct* 1×10^{-4} M em MeOH/H₂O(1:1 v/v): **a)** a pH=6; **I** - estado fotoestacionário alcançado após 15 min de irradiação; **II** - a solução **I** após 2 dias de recuperação térmica escura; **III** - a solução **I** após 6 dias de recuperação térmica escura; picos identificados: **1** (Ct, *rt* = 27,0 min); **3** (B, *rt* = 22,5 min) e **5** (*rt* = 28,7 min). **b)** com 0,48M de HCl; **I** - após 15 min de irradiação; **II** - A solução **I** após 2 dias de recuperação térmica escura; **III** - a solução **I** após 6 dias de recuperação térmica escura; picos identificados: **1** (Ct⁺, *rt* = 27,0 min); **3** (B⁺, *rt* = 22,5 min), **4** (*rt* = 15,7 min) e **5** (*rt* = 28,7 min); *pico não identificado.

Num ambiente neutro, ao comparar a evolução termodinâmica a pH neutro (Figura 3.5a) com a evolução no escuro após a irradiação, superação da barreira de isomerização *cis-trans* (Figura 3.8a), a diferença mais significativa é a formação de um pico largo atribuído ao hemicetal, identificado como pico 3. Esse pico evolui para a mistura esperada de 1 e 5. O composto 4 novamente não é detectado em valores de pH neutros. A comparação idêntica em meio ácido (Figura 3.5b e Figura 3.8b) mostra que após 15 min de irradiação a fração molar de chalconas e hemicetal é muito pequena e o composto 4 é a espécie principal. Como esperado, a evolução termodinâmica corresponde à lenta transformação do composto 4 em composto 5. A recuperação térmica dos produtos fotoquímicos também foi acompanhada por absorção UV-vis, conforme mostrado na Figura 3.9, e os dados obtidos estão de acordo com as observações feitas por HPLC.

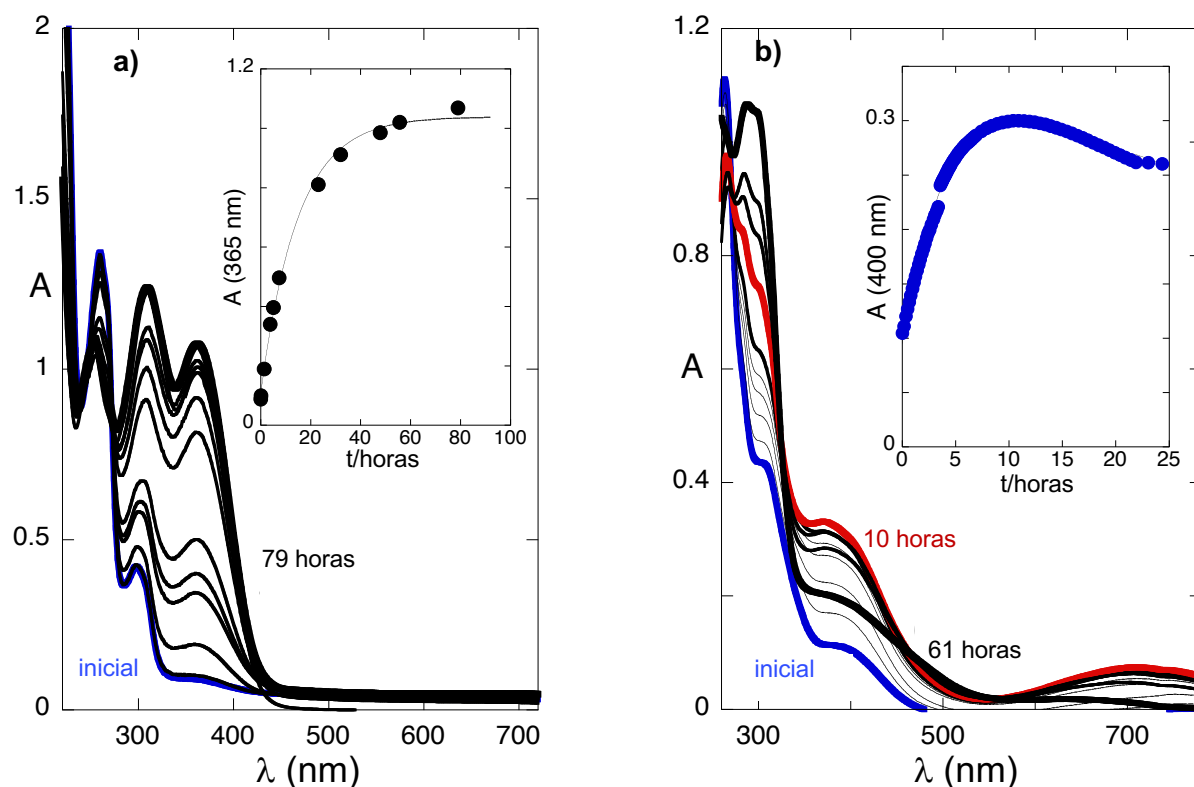


Figura 3.9. a) R recuperação da reação fotoquímica a pH=6,5 após irradiação a 365 nm como na Fig. 6a. O ajuste da recuperação de Ct foi obtido com um mono-exponencial com constante de velocidade $1,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; **b)** O mesmo a pH=1,3 na irradiação relatada na Fig. 6b. O ajuste foi obtido para um processo bi-exponencial com constantes de velocidade $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e $1,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

A pH = 6,2 (Figura 3.9a), a recuperação térmica da *trans*-chalcona (1) compete com a formação do composto 5. No entanto, em meio ácido, é evidente a formação dos espectros de absorção atribuídos ao composto 4 após 10 horas (conforme visto na Figura 3.12a), e do composto 5 após 61 horas (comparando com a Figura 3.12b).

3.2.2 O efeito do solvente

Foram realizados estudos em metanol monitorizados por RMN e UV-vis. A Figura 3.10 mostra a reação fotoquímica da *trans*-chalcona em *d*-metanol monitorizada por ^1H RMN. Após 90 minutos de irradiação a 365 nm, a *trans*-chalcona (1, $t_r = 27,0$ minutos) desaparece completamente, dando lugar a uma mistura de *cis*-chalcona (2, $t_r = 29,1$ minutos) e hemicetal (3, $t_r = 22,5$ minutos). Essa solução evolui no escuro para o produto final, identificado por ^1H RMN como hemicetal (Figura 3.10a). O HPLC (Figura 3.10b) corrobora os dados de ^1H RMN e permite obter os espectros de absorção do hemicetal isolado (Figura 3.12b).

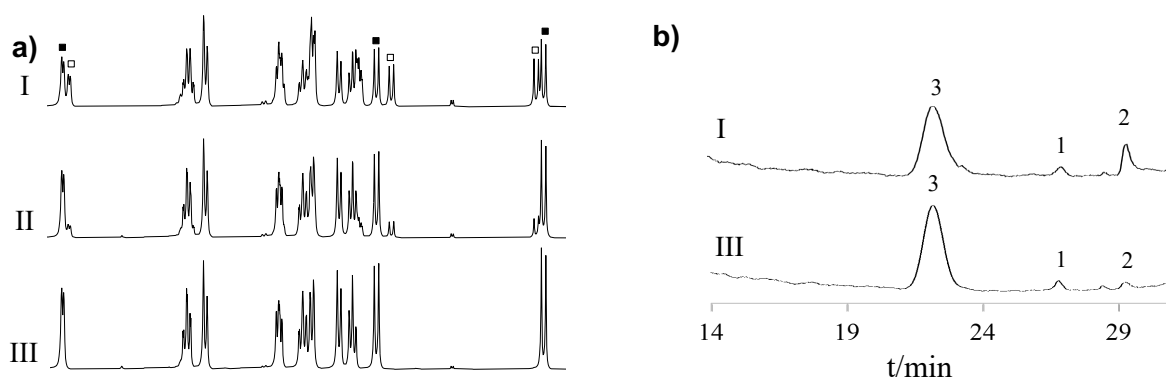


Figura 3.10. a) ^1H RMN em *d*-metanol. I - Composto Py2, $1,7 \times 10^{-3}$ M, após 90 min de irradiação a 365 nm; II - a mesma amostra de I após 90 min no escuro; III – a mesma amostra de I após 20 horas no escuro; hemiacetal (■); *cis*-chalcona(□); b) Cromatogramas de HPLC a 280 nm das soluções I e III ; picos identificados: 1 (Ct, $r_t = 27,0$ min); 2s (Cc, $r_t = 29,1$ min) e 3 (B, $r_t = 22,5$ min).

Para estudar o efeito da água no multiestado, foi realizado um estudo a partir da amostra em metanol com ~100% de hemiacetal equilibrado (Figura 3.10). Foi adicionado 20 μL de DCI 12 M à solução equilibrada de B, Figura 3.11a)I, levando a formação de B^+ , Figura 3.11a)II. Posteriormente, a adição de D_2O para obter uma solução final com metanol/água(1:1 v/v), Figura 3.11a)III, após 48 horas é observada uma mistura de produtos, onde o composto majoritário é atribuído ao composto 4 por HPLC (Figura 3.11a)IV e Figura 3.11b)II.

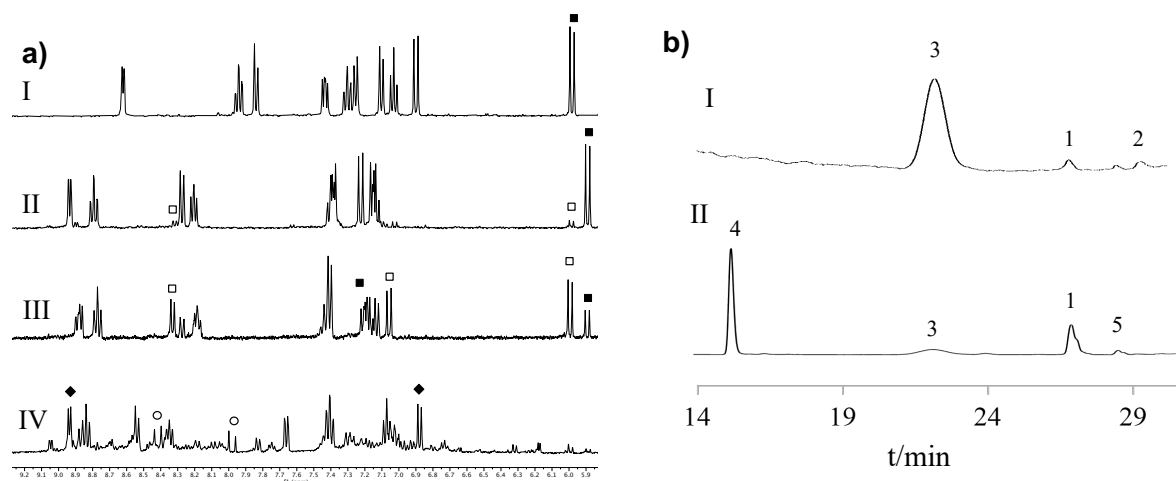


Figura 3.11. Espectro de ^1H RMN e cromatogramas de HPLC a 280 nm de Py2 $1,7 \times 10^{-2}$ M em *d*-metanol: a) Espectro de ^1H RMN; I - após 90 min de irradiação a 365 nm e 20 horas de recuperação térmica no escuro (composto 3); II - o mesmo de I após adição de 20 μL de DCI 12 M. Esta solução não se altera após 5 dias (mistura de B^+ e Cc^+); III - o mesmo de II após adição de D_2O , final *d*-metanol:água(1:1); IV - o mesmo de III após 48 horas no escuro; hemiacetal (■, 3); *cis*-chalcona (□, 2); composto 4 (◆). b) cromatogramas de HPLC a 280 nm; I) solução a)I; II) solução a)III após 85 horas de equilíbrio no escuro. Pico identificados: pico 1 (Ct, $r_t = 27,0$ min); 2 (Cc, $r_t = 29,1$ min), 3 (B, $r_t = 22,5$ min), 4 ($r_t = 15,7$ min) e 5 ($r_t = 28,7$ min).

Na Figura 3.12 são apresentados os espectros de absorção dos compostos 4 e 5. Quando esses espectros são comparados com o da Figura 3.7, percebe-se que o composto 4 tem alguma semelhança na região do visível. Isso permite concluir que um dos principais produtos obtidos na reação fotoquímica em meio ácido é definitivamente o composto identificado como o pico 4.

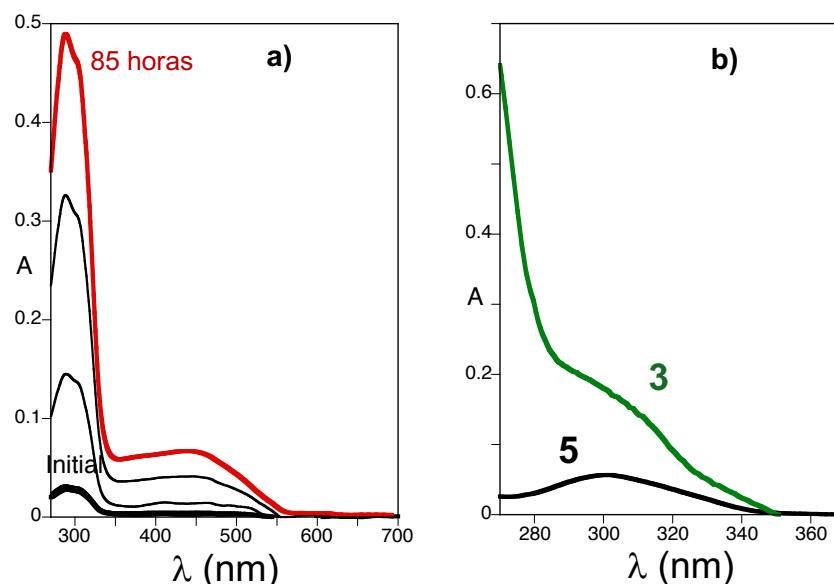


Figura 3.12. a) Espectros de absorção de **Py2** 4×10^{-3} M em H₂O/MeOH (1:1 v/v) e HC 0,48 Ml. Espectro inicial (preto) obtido após 2 horas de irradiação a 365 nm (hemicetal, composto **3**) e sua evolução no escuro até 85h (espectro vermelho, composto **4**); b) Espectros de absorção de hemicetal e composto **5** do mesmo experimento.

Resumindo, Py2 pode adicionar dois novos compostos ao respectivo multiestado, destacando a importância da posição 2 para uma interação intramolecular, conforme mostrado na Figura 3.13. A formação desses dois novos picos depende da concentração de água, que desempenha um papel importante na estabilização de ambas as espécies.

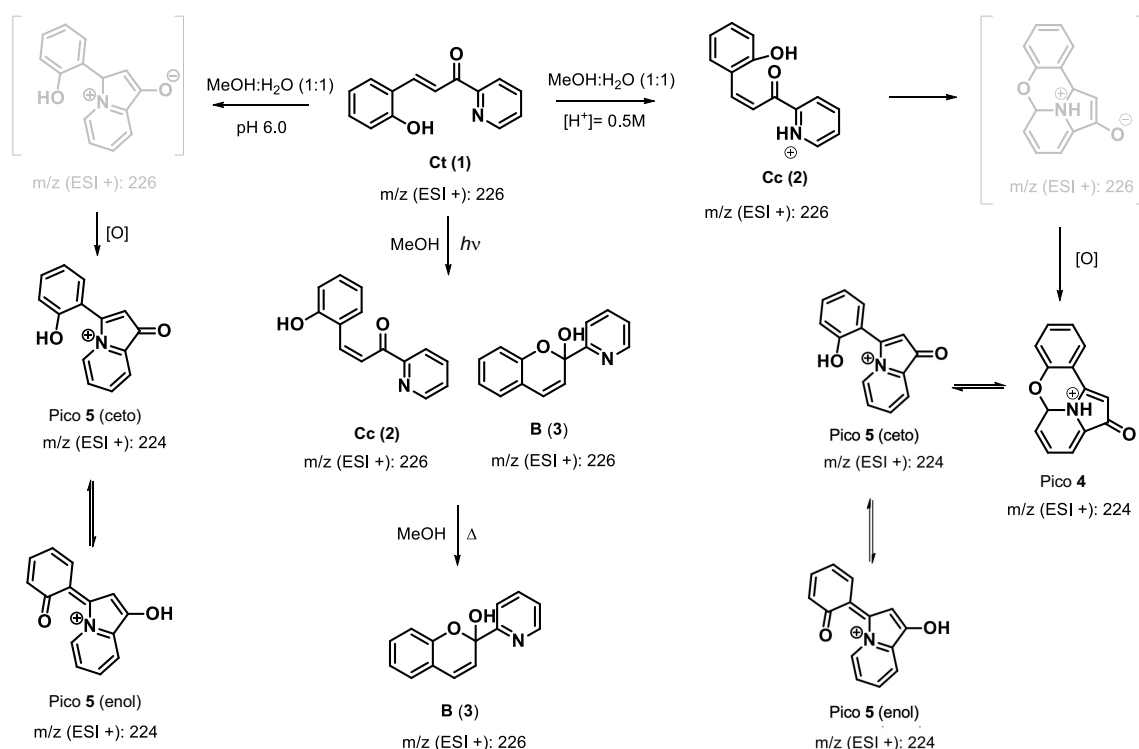


Figura 3.13. Resumo do comportamento do composto **Py2** em misturas de metanol puro e metanol:água (1:1 v/v).

3.3 Sistema multiestados do composto 3'-piridinochalcona (**Py3**)

A Figura 3.14 apresenta a dependência do pH nos espectros de absorção do composto **Py3**, obtidos imediatamente após o salto de pH de soluções recém-preparadas a pH = 6,6. Observa-se que a forma e a posição dos espectros de absorção de **Ct⁺**, **Ct** e **Ct⁻** assemelham-se aos do composto **Py2**, indicando similaridades estruturais e propriedades fotofísicas compartilhadas entre essas espécies. Por meio das curvas de titulação, foram calculadas as constantes de acidez, sendo $pK_{a1}=2,7$ e $pK_{a1}=9,3$.

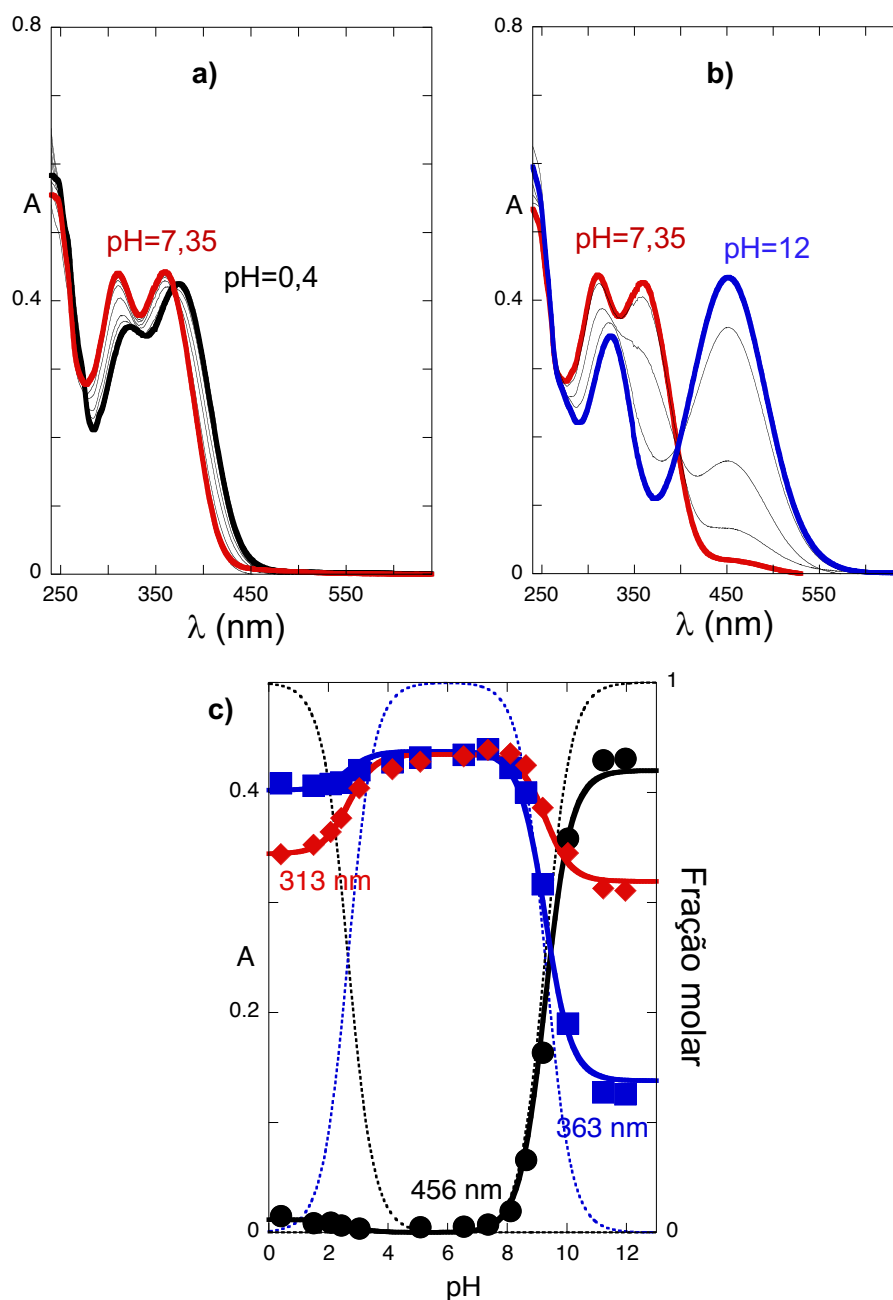


Figura 3.14. a) e b) espectros de absorção dependentes de pH de Py3 ($1,2 \times 10^{-4}$ M, MeOH/H₂O (1:1 v/v)); c) curvas de titulação. O ajuste foi alcançado para $pK_{a1}=2,7$ e $pK_{a1}=9,3$.

Comparando as constantes de acidez de Py2 e Py3, como mostrado nas Figura 3.2 e Figura 3.14, respectivamente, observamos que a segunda constante de acidez correspondente à desprotonação da hidroxila do Py2 e Py3 são semelhantes dentro do erro experimental. No entanto, a protonação do anel de piridina parece ser mais favorável em Py3. Isso se deve à deslocalização mais favorável da carga positiva no anel de piridina em Py3, como ilustrado na Figura 3.15.

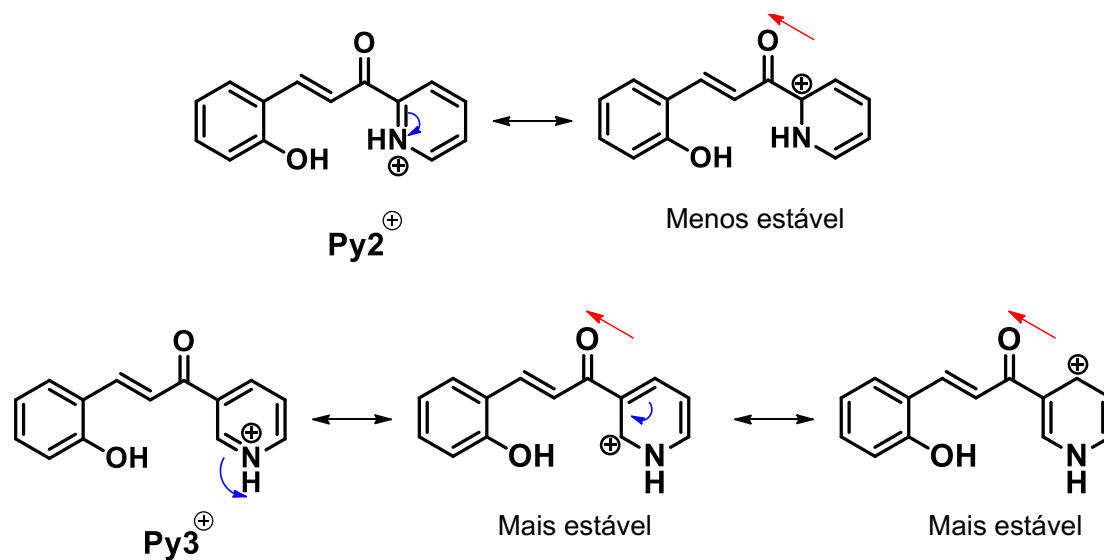


Figura 3.15. Estabilização da carga positiva em Py2 e Py3 protonado.

A estabilidade do Py3 é mostrada na Figura 3.16. O espectro de absorção de Ct após 4 dias não apresenta qualquer modificação a pH neutro. No ambiente ácido a Ct⁺ apresenta uma ligeira diminuição no espectro de absorção.

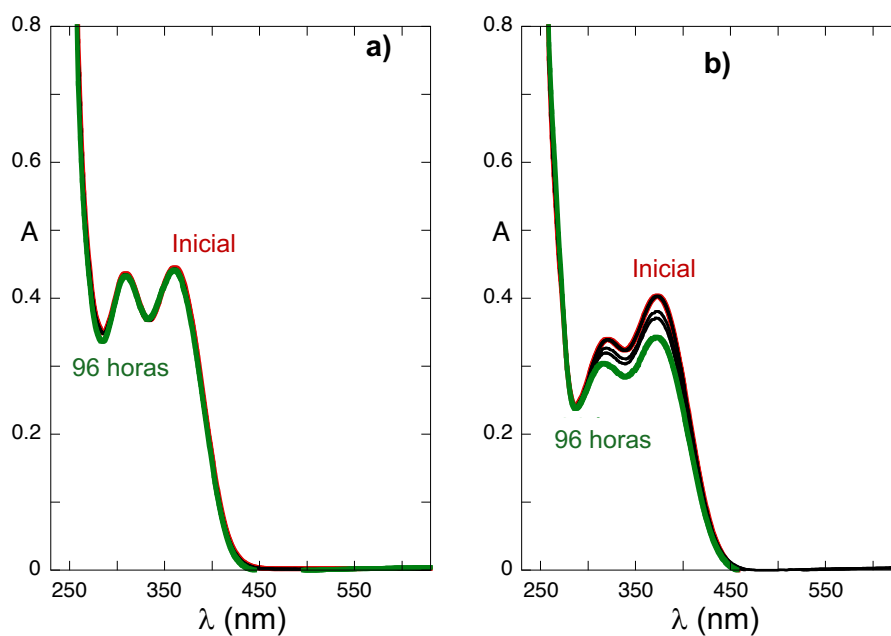


Figura 3.16. Variações espectrais do composto Py3 $1,2 \times 10^{-4}$ M em MeOH/H₂O (1:1 v/v) após 96 horas: a) pH=6,5; b) pH = 1,5.

As informações obtidas por absorção não foram suficientes para esclarecer completamente o comportamento do Py3, portanto, foram realizados mais estudos por ^1H RMN, como mostrado na Figura 3.17.

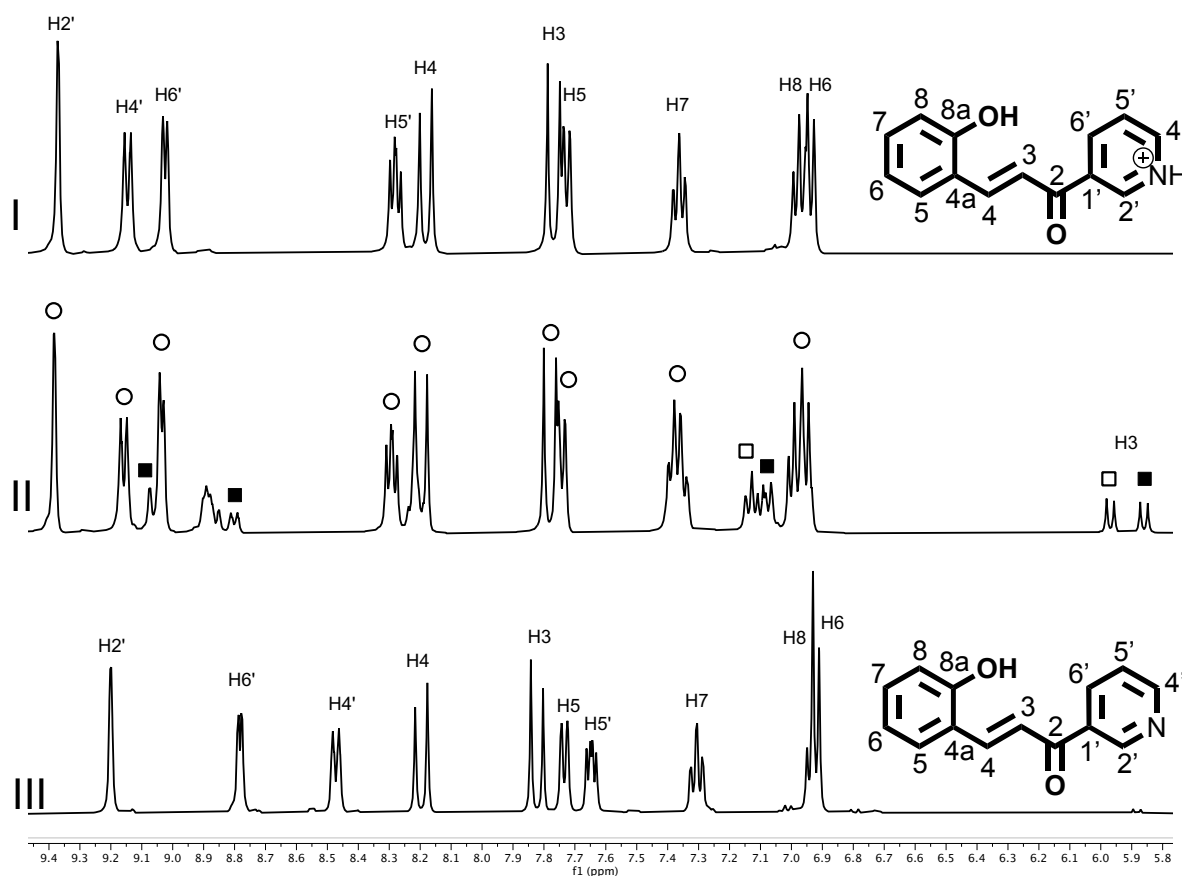


Figura 3.17. Espectros de ^1H RMN de Py3 $1,7 \times 10^{-2}$ M em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v). I) imediatamente após um salto de pH de pH=6,6 para pH=1,0, 100% de Ct^+ ; II) a mesma solução de a) mantida no escuro por 5 dias, 14,5% Cc^+ (□); 14,5% B^+ (■); 71% Ct^+ (O); III) solução a pH = 6,6, Ct (pureza superior a 95%).

Os espectros de ^1H RMN da Figura 3.17 confirmam a estabilidade da espécie Ct a pH = 6,6. Entretanto, em valores de pH ácidos, um equilíbrio é alcançado entre hemiacetal protonado, *cis*-chalcona protonada e *trans*-chalcona protonada. Da mesma forma que Py2, com o Py3 também não foi observado o cátion flavílio.

3.3.1 Fotoquímica

A fotoquímica do Py3 foi explorada em dois ambientes químicos, meio neutro e ácido, respectivamente. As variações espectrais são mostradas na Figura 3.18.

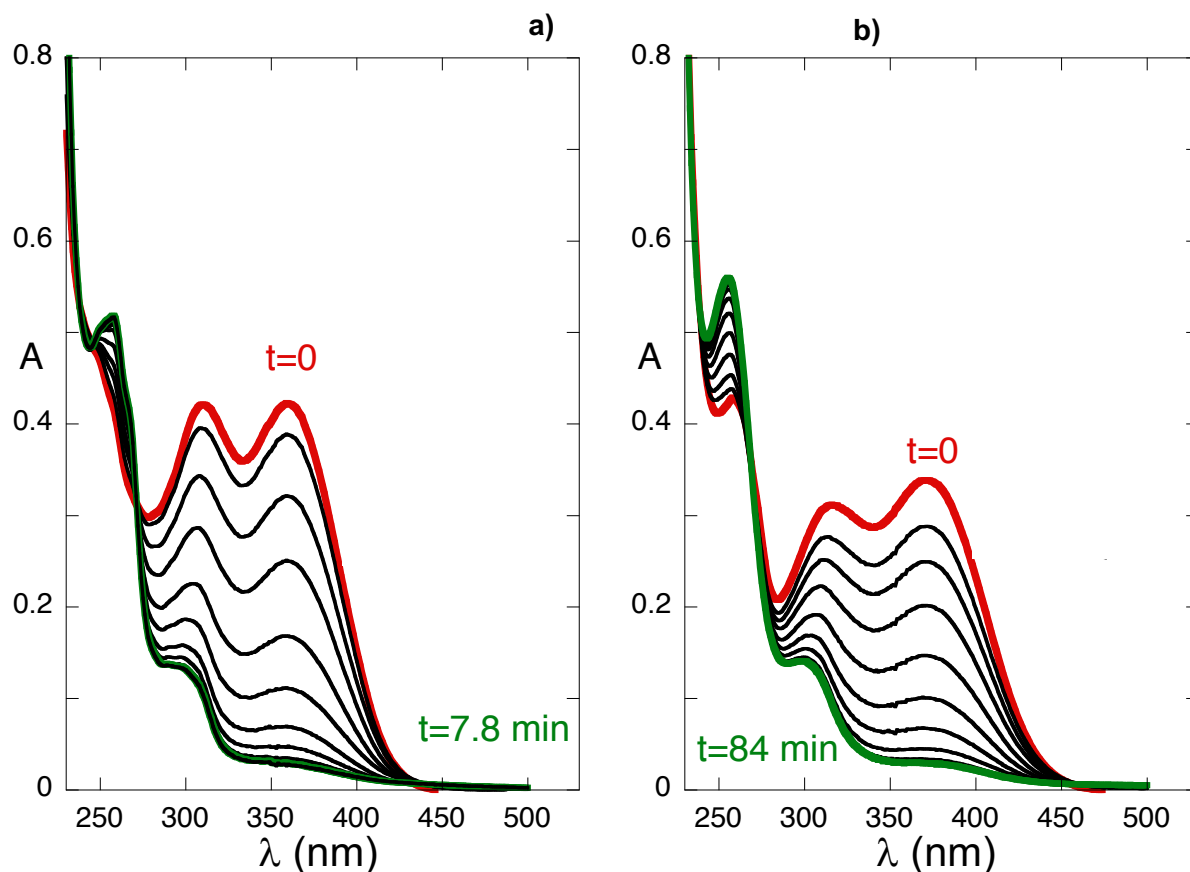


Figura 3.18. Irradiação a 365 nm do composto Py3, $1,2 \times 10^{-4}$ M em metanol:água (1:1 v/v). a) A pH=6,5; b) A pH = 1,5.

Maiores informações sobre o sistema foram obtidas por recuperação termodinâmica monitorizada por ^1H RMN após a irradiação a 365 nm, conforme ilustrado na Figura 3.19. Foi possível os produtos formados e entender as mudanças estruturais que ocorrem durante o processo de recuperação térmica. Como esperado, a irradiação de Ct resulta na formação de Cc. Esta última espécie apresenta duas vias

competitivas para evoluir, as quais dependem do valor relativo das respectivas constantes: i) retornar a Ct e ii) formar B.

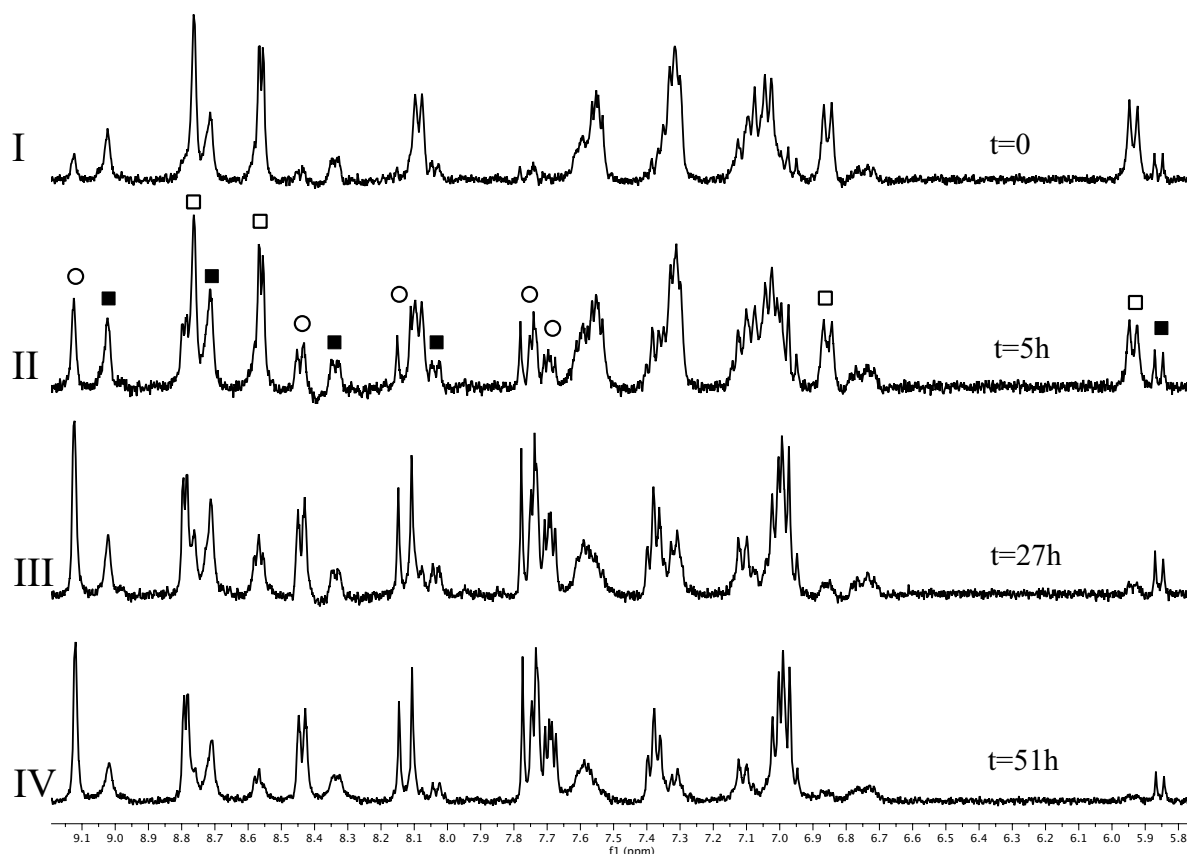


Figura 3.19. Espectros de ^1H RMN, recuperação termodinâmica de Py3 ($1,7 \times 10^{-2}$ M em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a $\text{pH}=6,95$: **I** - espectro inicial após 1 hora de irradiação contínua a 365 nm; **II** – após 5 horas de repouso no escuro, B (■), Cc (□) e Ct (○); **III** – após 27 horas de repouso no escuro; **IV** – após 51 horas de repouso no escuro.

3.3.2 Efeito do solvente

Para avaliar o efeito do solvente, foram conduzidos estudos apenas em metanol. Inicialmente, a irradiação foi realizada em MeOD 100%, e a recuperação térmica foi acompanhada por ^1H RMN. Este processo é consideravelmente mais simples do que numa mistura de água e metanol. A recuperação térmica após 2 horas de irradiação de Ct a 365 nm é mostrada na Figura 3.20.

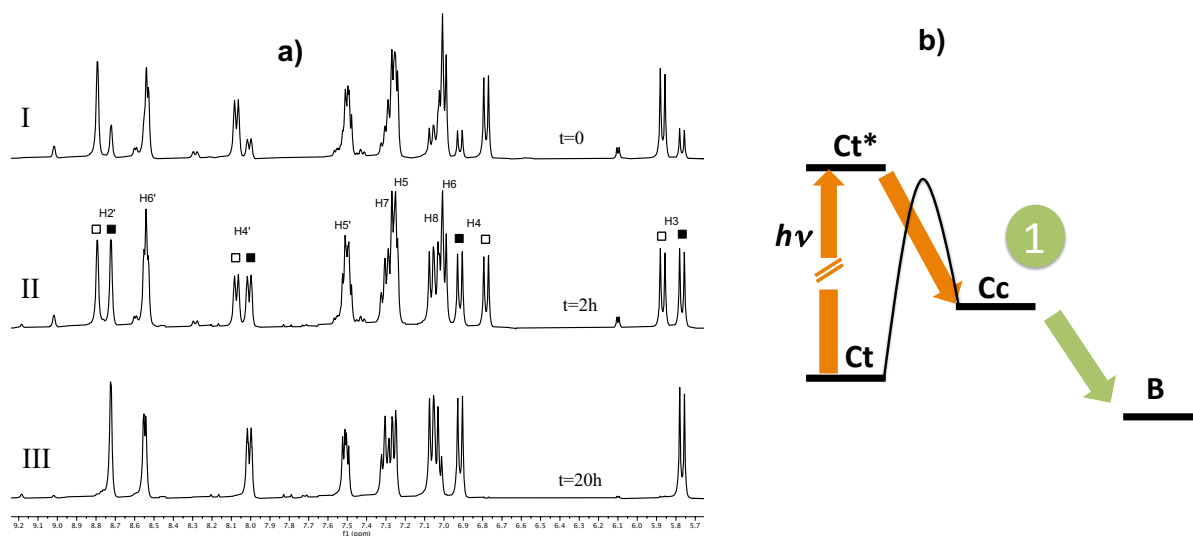


Figura 3.20. a) Espectros de ¹H RMN de Py3 1,7x10⁻² M em CD₃OD: **I** - Após irradiação a 365 nm durante 2 h 75% Cc(□) e 25% B (■); **II** - após equilíbrio no escuro 2h 50% Cc (□) e 50% B (■); **III** - após 20 h 100% B (■). O espectro não muda após 5 dias após a adição de DCl (concentração final de ácido 0,48 M). **b)** Diagrama qualitativo de energia de Py3 em MeOD.

A irradiação de Ct de Py3 em MeOH permite superar facilmente a barreira de isomerização *cis-trans*, e o sistema evolui termodinamicamente para formar o hemicetal, que é o produto termodinâmico mais estável em MeOH. Esses resultados destacam a influência significativa do solvente nas reações fotoquímicas e na estabilidade dos produtos formados.

3.4 7-Dietilamino-4'-piridinochalcona (7NPy4)

Foi conduzida uma série de experimentos por meio de saltos de pH do composto 7NPy4 em solução de metanol/água (1:1 v/v), e as variações espectrais desse composto no equilíbrio, em função do pH, são detalhadas na Figura 3.21.

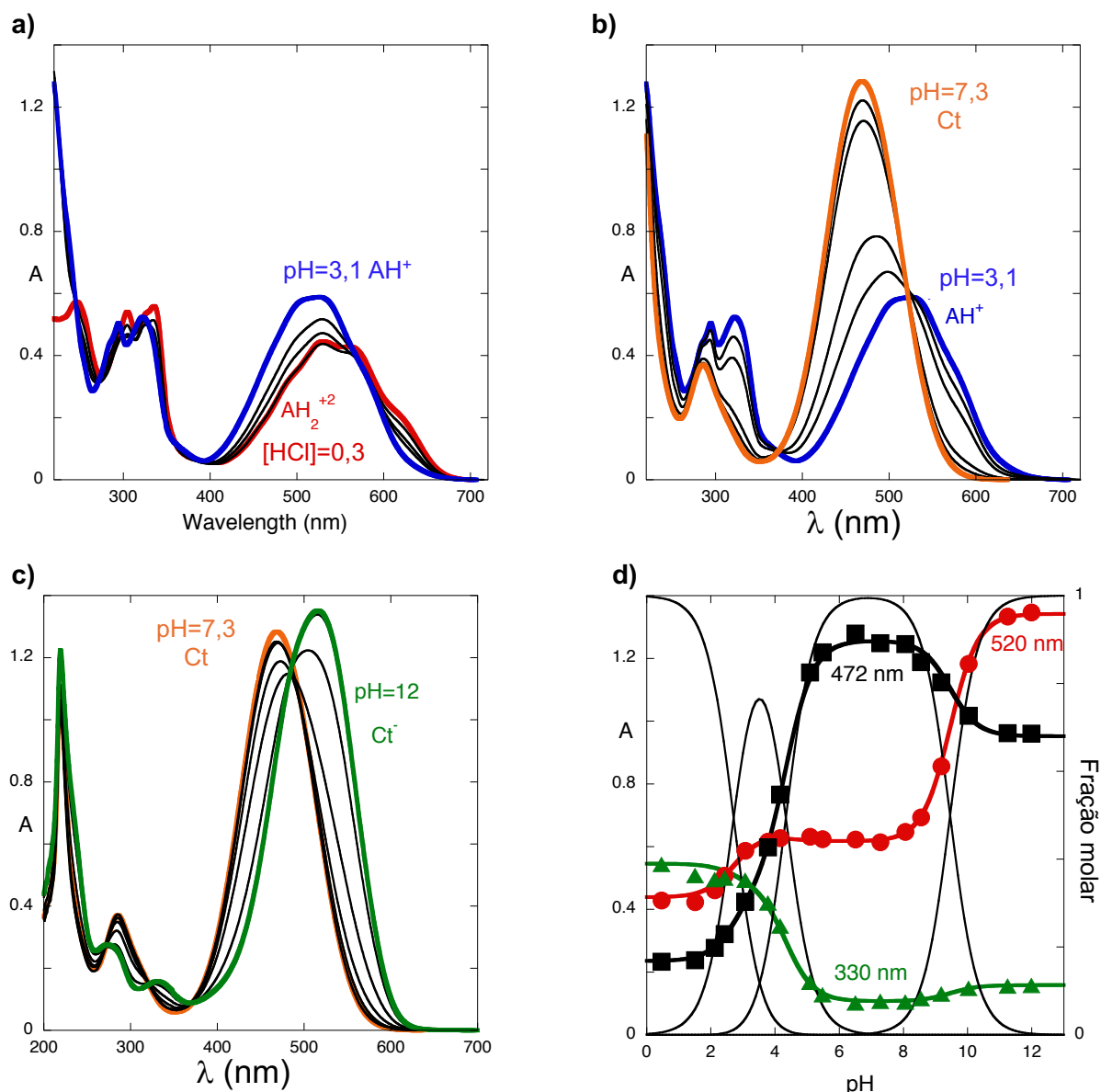


Figura 3.21. Espectros de absorção de soluções equilibradas do composto **7NPy4** após saltos de pH de pH=6,5 *trans*-chalcona neutra, $1,1 \times 10^{-4}$ M em H₂O/MeOH(1:1 v/v) para as seguintes faixas de pH: **a)** $\sim 0,5$ (HCl 0,3 M) < pH < 3,1; **b)** $3,1 < \text{pH} < 7,3$; **c)** $7,3 < \text{pH} < 12$. **d)** O ajuste simultâneo dos dados de absorvância em 330, 472 e 520 nm leva às seguintes constantes globais de acidez: $pK'_a = 2,7$, $pK''_a = 4,3$, $pK'''_a = 9,5$, com a correspondente distribuição da fração molar das espécies.

Em meio muito ácido, o catião flavílio protonado AH_2^{+2} é a espécie principal, em equilíbrio com as espécies duplamente protonadas B^{2+} , Cc^{2+} e Ct^{2+} . Evidências para a existência dessas espécies, bem como para a carga positiva na porção dietilaminobenzopirílio sendo preferencialmente localizada no nitrogénio da amina na posição 7, em vez de no oxigénio do pirílio, são fornecidas abaixo através dos dados de ^1H RMN. O espectro de absorção de AH_2^{+2} (traço vermelho, na Figura 3.21a) é desviado para o vermelho em comparação com o espectro de AH^+ que aparece em valores de pH mais altos (traço

azul, na Figura 3.21b). Isso é semelhante ao observado em bases quinoidais, também deslocadas para o vermelho em relação aos respectivos cátions flavílio, e reflete a deslocalização de carga mais extensa nessas espécies. Em soluções menos ácidas (pH=3,1), o catião falvílio AH^+ está em equilíbrio com a *trans*-chalcona protonada Ct^+ , *cis*-chalcona Cc^+ e hemicetal B^+ . O próximo equilíbrio é ilustrado na Figura 3.21b) e reflete a existência de *trans*-chalcona neutra como única espécie em torno de pH=6,5 (traço laranja). Finalmente, em meio básico a *trans*-chalcona Ct^- desprotonada é a única espécie observada, na Figura 3.21c). A Figura 3.21d apresenta o ajuste dos dados da Figura 3.21a - Figura 3.21c, apresenta a distribuição das frações molares que foram determinadas com três valores de pK_a , $pK'_{a1}=2,7$, $pK''_{a2}=4,3$, $pK'''_{a3}=9,5$. Estes valores de pK_a correspondem aos equilíbrios entre as formas biprotonadas, monoprotionadas, neutras e espécies desprotonadas. Essa informação foi sintetizada e resumida na Figura 3.22, proporcionando uma compreensão clara dos processos de protonação e desprotonação da *trans*-chalcona em diferentes condições de pH, além de todas as espécies envolvidas no equilíbrio.

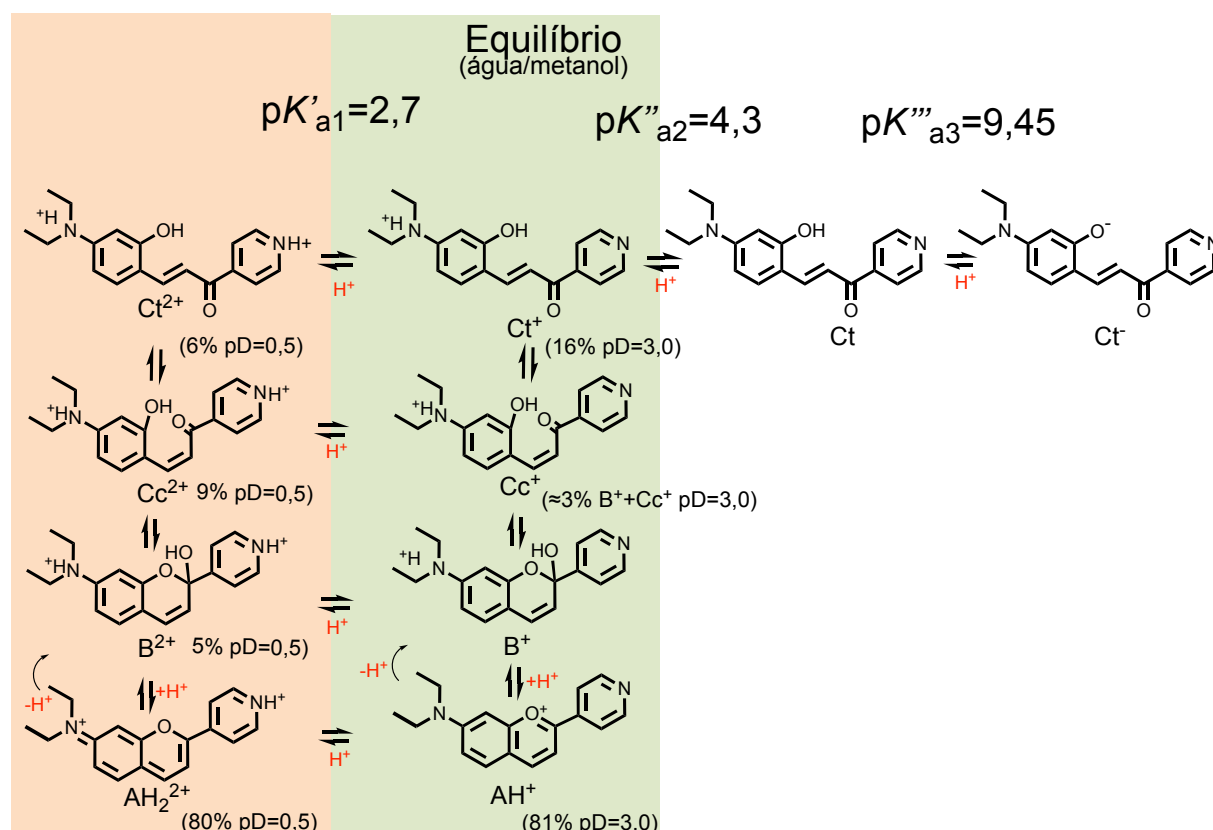


Figura 3.22. O multiestado de espécies observado no composto 7NPy4.

Uma série de experimentos de fluxo interrompido foi realizada para acompanhar a cinética do sistema após saltos de pH específicos. A primeira série consistiu em saltos de pH de uma solução com pH=6,4 contendo apenas Ct para valores de pH mais ácidos. Na Figura 3.23a), as variações espectrais ocorridas após um salto de pH para pH=0,6, onde prevalecem espécies duplamente protonadas,

mostram a existência de dois processos cinéticos. A protonação da Ct ocorre durante o tempo de mistura para formar a Ct^{2+} . A primeira etapa cinética termina após 5 s e deve corresponder ao desaparecimento de Ct^{2+} para dar Cc^{2+} . O processo mais lento é caracterizado pelo surgimento de uma banda de absorção estruturada centrada em 525 nm, indicando a formação do catião flavílio protonado, AH^{2+} . As constantes de velocidade das duas etapas cinéticas $k_1=0,5\text{ s}^{-1}$ e $k_2=0,003\text{ s}^{-1}$ foram obtidas ajustando a absorção em 365 nm, Figura 3.23a). A cinética do mesmo salto de pH também foi monitorizada por um espectrofotômetro comum, Figura 3.23b). As variações espectrais mostram a formação de mais espécies de AH^{2+} com uma constante de velocidade de $0,003\text{ s}^{-1}$, igual ao passo mais lento da Figura 3.23a).

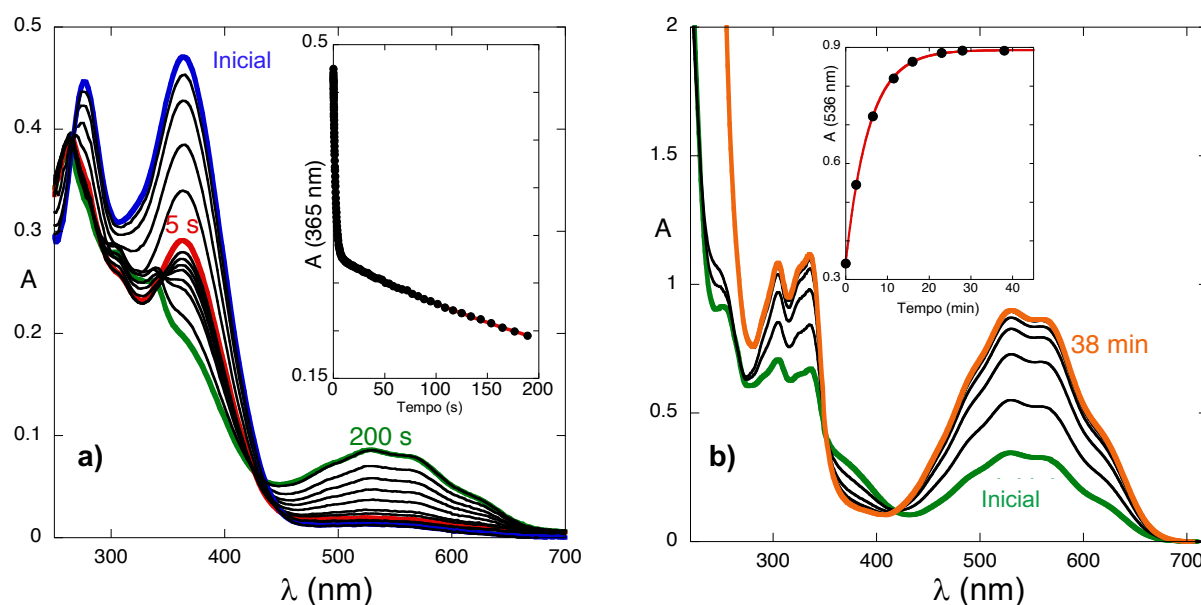


Figura 3.23. Variações espectrais depois de um salto de pH de uma solução de 7NPy4 a pH=6,4 em $H_2O/MeOH(1:1\text{ v/v})$, para pH=0,6, **a)** monitorizado por fluxo interrompido, $[7NPy4]=9,0\times 10^{-5}\text{ M}$; inserção: o ajuste foi obtido com uma equação bi-exponencial com constantes de velocidade de $0,5\text{ s}^{-1}$ e $0,003\text{ s}^{-1}$; **b)** monitorizado por espectrofotômetro comum, $[7NPy4]=1,8\times 10^{-4}\text{ M}$; inserção: o ajuste foi obtido com uma equação mono-exponencial com constante de velocidade de $0,003\text{ s}^{-1}$.

Dado o comportamento observado das antocianinas e compostos relacionados, o processo mais lento, com uma constante de velocidade de $0,003\text{ s}^{-1}$, poderia ser explicado por uma rápida tautomerização seguida por uma hidratação mais lenta, que controlaria cineticamente esta etapa. No entanto, outra explicação viável seria o controle cinético pela tautomerização, seguido por uma reação de hidratação mais rápida. Os resultados do salto de pH de soluções equilibradas em valores de pH ácidos para pH=6,4 são apresentados na Figura 3.24. Estes resultados, juntamente com os dados de RMN (relatados abaixo), sugerem que o segundo cenário discutido anteriormente é o caso neste composto.

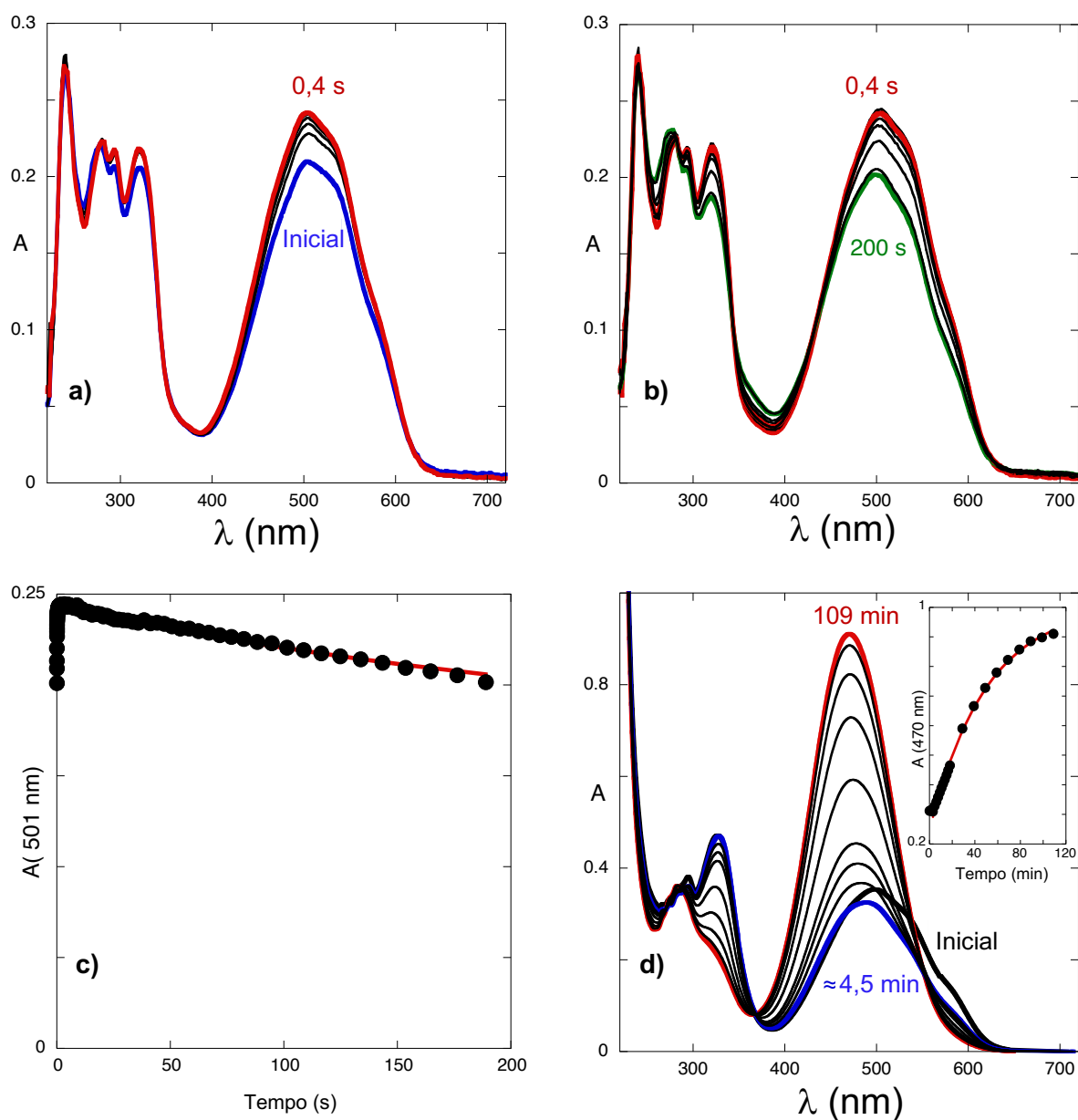


Figura 3.24. Variações espectrais após um salto de pH de uma solução equilibrada de 7NPy4 ($9,0 \times 10^{-5}$ M em água/metanol (1:1 v/v) a pH=0,6) para pH=6,4 (seguido de fluxo interrompido: **a**) durante os primeiros 0,4 segundos; **b**) entre 0,4 s e 200 s; **c**) absorvância em 501 nm ajustada com uma equação bi-exponencial com constantes de velocidade de $9,9 \text{ s}^{-1}$ e $0,004 \text{ s}^{-1}$. **d**) O mesmo salto de pH seguido de um espectrofotômetro comum, $[7\text{NPy4}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ M}$; o ajuste foi obtido com uma equação mono-exponencial com $k_{\text{obs}} = 3,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Ao realizar o salto de pH de soluções equilibradas a pH=0,6 para pH=6,4, foram observadas três etapas cinéticas distintas, com constantes de velocidade de $9,9 \text{ s}^{-1}$, $4,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $3,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Além disso, a absorvância no visível aumenta na primeira etapa, diminui na segunda e aumenta novamente na terceira. Imediatamente após o salto de pH, todas as espécies que estavam presentes a pH=0,6 ficam

desprotonadas, “congeladas” em suas frações molares no pH inicial do salto de pH. Consequentemente, os espectros iniciais a pH=6,4 correspondem às absorções de Ct, Cc, B e AH^+ nas frações molares de Ct^{2+} , Cc^{2+} , B^{2+} e AH^{2+} inicialmente presentes a pH=0,6. Considerando que em soluções equilibradas a pH=6,4 Ct é a única espécie, todas as outras devem evoluir para Ct. O comportamento peculiar é a diminuição da absorvância no visível na segunda etapa. A formação sequencial de Ct a partir da conversão de Cc, então B (via Cc) e AH^+ (via B e Cc) não é observada. Tal processo daria origem a um aumento gradual na absorção de Ct. Nossa interpretação é que a primeira etapa cinética é a conversão de Cc em Ct. A próxima etapa cinética é a hidratação de AH^+ para dar B, com a correspondente diminuição da absorvância no visível. A etapa cinética mais lenta é atribuída à conversão de B em Ct (via Cc), afirmando a reação de tautomerização como etapa limitante da velocidade. Na Figura 3.25 é apresentado o resultado do salto de pH de pH=6,4 para pH=3,4.

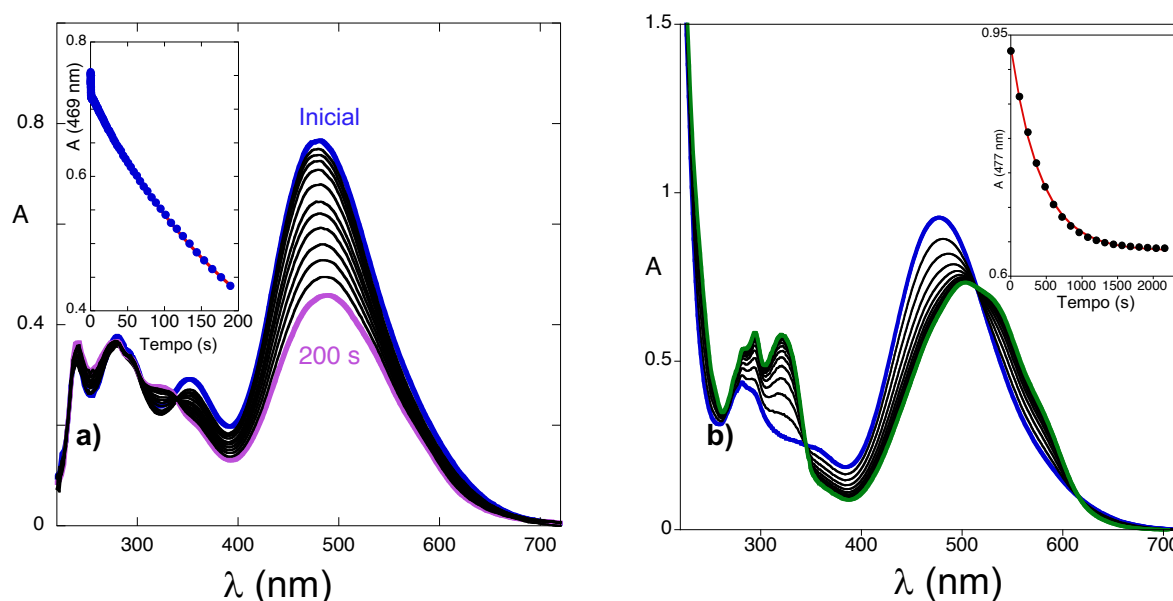


Figura 3.25. Variações espectrais após um salto de pH de uma solução equilibrada de 7NPy4 ($9,0 \times 10^{-5}$ M em água/metanol (1:1 v/v) a pH=6,4) para pH=3,4 seguido por: **a)** fluxo interrompido; inserção: dois processos foram observados com constantes de velocidade $0,9 \text{ s}^{-1}$ (pequena amplitude) e $0,003 \text{ s}^{-1}$; **b)** espectrofotômetro, $[7NPy4]=1,8 \times 10^{-4} \text{ M}$; inserção: ajuste com equação mono-exponencial com constante de velocidade $0,003 \text{ s}^{-1}$.

Os resultados apresentados na figura anterior são qualitativamente semelhantes aos apresentados na Figura 3.23 e as respectivas constantes de velocidade são $0,9 \text{ s}^{-1}$ e $0,003 \text{ s}^{-1}$, a amplitude do primeiro processo, aquele que corresponde à formação de Cc^+ a partir de Ct^+ , é muito pequena indicando que o equilíbrio entre essas duas espécies é deslocado para o isômero *trans*. A última etapa corresponde à formação do catião flavílio via Cc^+ e B^+ , o que foi confirmado pelo próximo conjunto de saltos de pH apresentado na Figura 3.26.

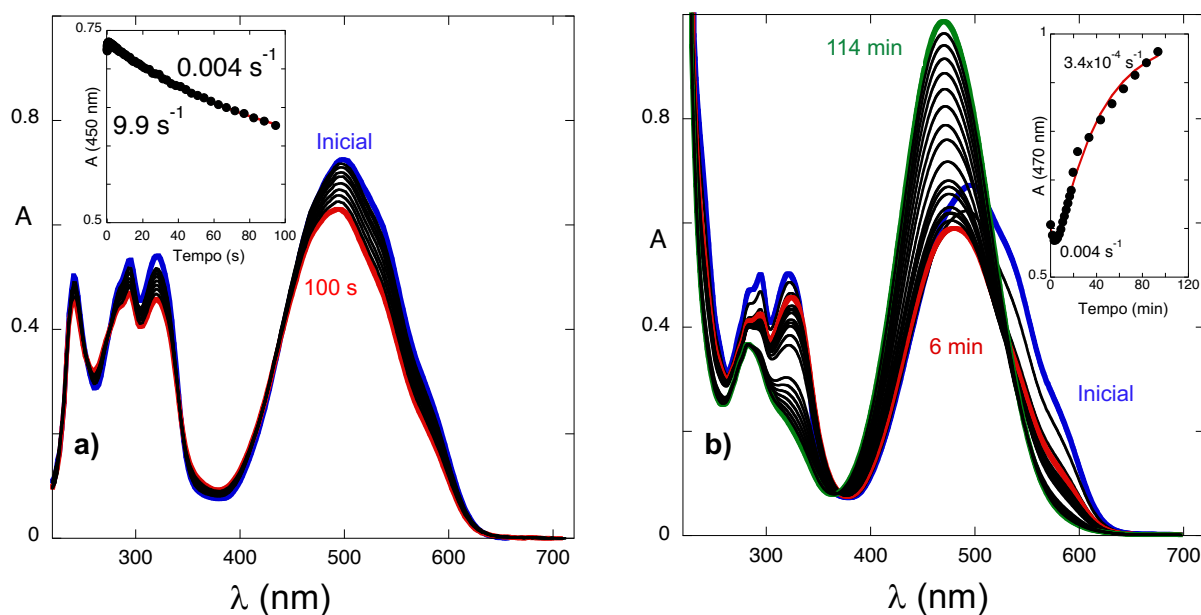


Figura 3.26. Variações espectrais após um salto de pH de uma solução equilibrada de 7NPy4 ($9,0 \times 10^{-5}$ M em água/metanol (1:1 v/v) a pH=3,4) para pH=6,4; **a)** os dois primeiros passos cinéticos, seguidos de fluxo interrompido; **b)** o processo mais lento, seguido por um espectrofotômetro.

Foi realizado um conjunto de saltos de pH de soluções equilibradas de 7NPy4 a pH = 3,4 para pH = 6,4. O salto de pH monitorizado por fluxo interrompido mostra a existência de dois processos com constantes de velocidade $9,9 \text{ s}^{-1}$ e $0,004 \text{ s}^{-1}$, Figura 3.26a. O mesmo experimento seguido por um espectrofotômetro mostra um único processo com constante de velocidade $3,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, Figura 3.26b que é idêntico ao mais lento observado no conjunto anterior de saltos de pH, Figura 3.24d. No entanto, a amplitude das curvas é diferente. A amplitude do primeiro processo no salto de pH de 0,6 a 6,4 (Figura 3.24c) é maior do que no salto de pH de 3,4 a 6,4 (Figura 3.26a). Isso significa que há mais Cc^{2+} no equilíbrio a pH=0,6 do que Cc^{+} a pH=3,4, conforme corroborado por ^1H -RMN (ver abaixo, Figura 3.29). O resumo dos conjuntos de saltos diretos de pHs e inversos é apresentado na Figura 3.27, descreve as velocidades de conversão e a composição do multiestado em valores de pH 0,6, 3,4 e 6,4.

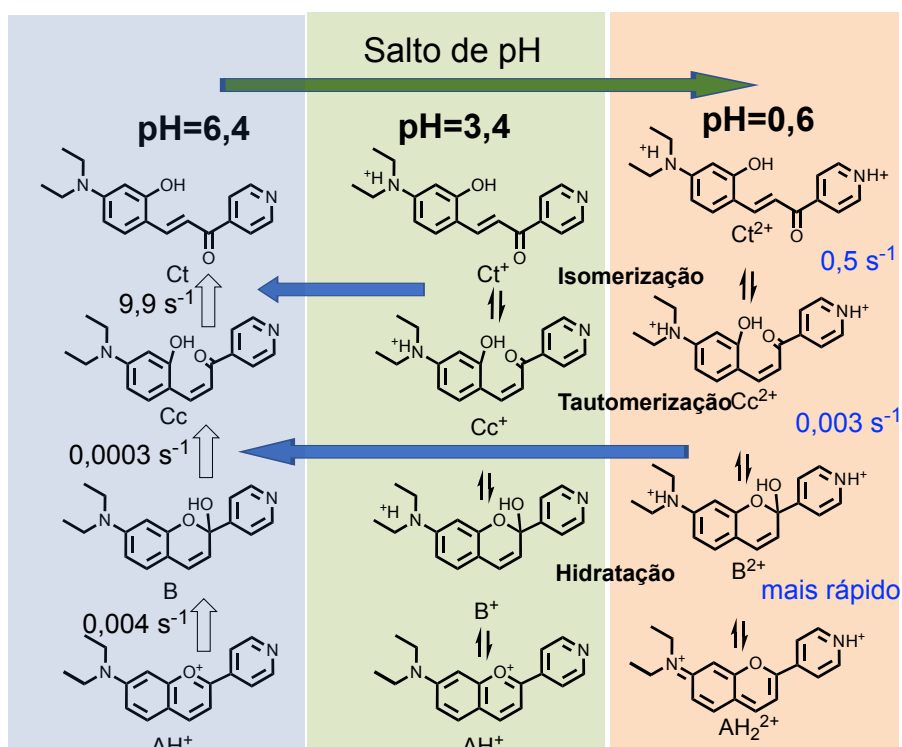


Figura 3.27. Resumo da composição multiestado de 7NPy4 e taxas de conversão a pH 0,6, 3,4 e 6,4.

Estendendo os saltos de pH de pH = 6,4 para outros valores de pH mais baixos leva a resultados semelhantes aos da Figura 3.23 e Figura 3.25. As duas constantes de velocidade resultantes dos respectivos ajustes são representadas na Figura 3.28. O processo mais rápido, atribuído a isomerização *cis-trans*, diminui na ordem $Ct \approx Ct^+ > Ct^{2+}$. Com relação ao processo mais lento, atribuído à reação de tautomerização, as espécies mono e diprotonadas de B e Cc tautomerizam com a mesma constante de velocidade dentro do erro experimental. No entanto, a velocidade do processo de tautomerização para as espécies neutras, avaliada a partir de saltos de pH ácidos para pH=6,4, é significativamente mais lenta (Figura 3.28b). A determinação das constantes de acidez das *trans*-chalconas protonadas nos nitrogénios de amina e piridina foi realizada por fluxo interrompido para obter $pK_{Ct^{2+}/Ct^+} = 2,2$ e $pK_{Ct^+/Ct} = 3,8$ (apêndices, figura C3-1). A constante de acidez para a desprotonação do fenol em Ct, $pK_{Ct/Ct^-} = 9,5$, é obtida da Figura 3.21c.

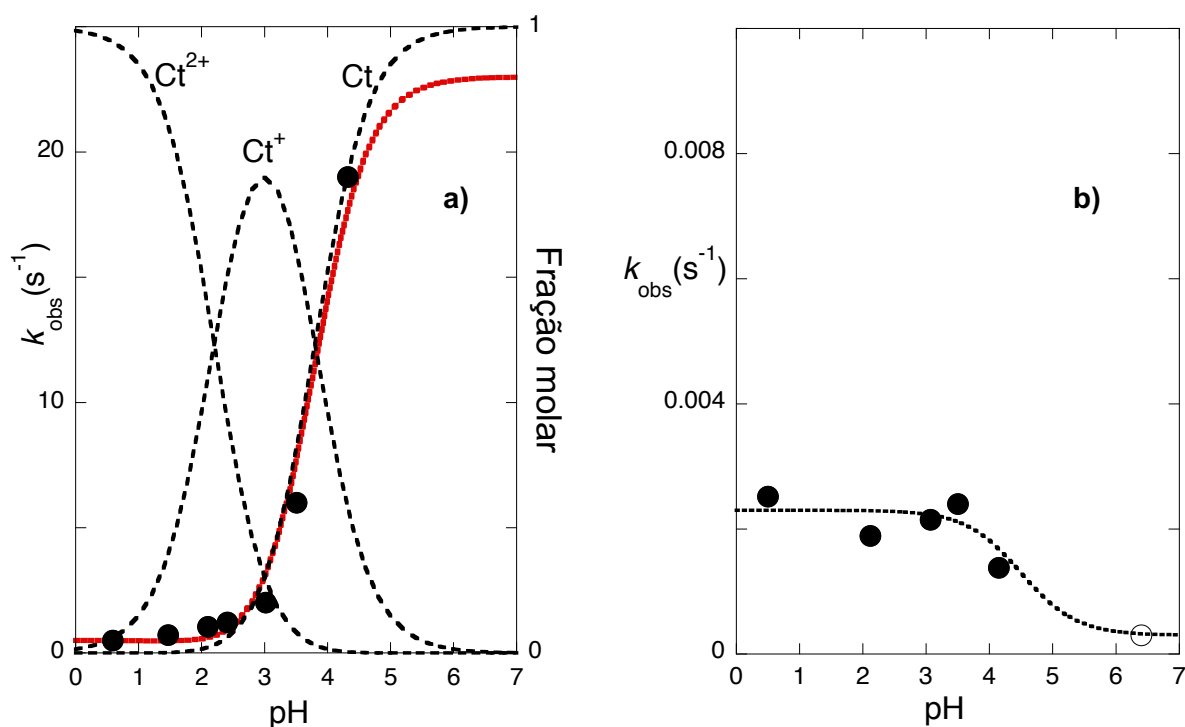


Figura 3.28. a) Dependência do pH das constantes de velocidade do processo mais rápido após o pH saltar de pH=6,4 para valores de pH mais baixos. O ajuste foi obtido com constantes de isomerização de $0,5 \text{ s}^{-1}$, $0,3 \text{ s}^{-1}$ e 23 s^{-1} para Ct^{2+} , Ct^+ e Ct , respectivamente, levando em consideração os valores de pK_a $pK_{\text{Ct}^{2+}/\text{Ct}^+}=2,2$ e $pK_{\text{Ct}^+/\text{Ct}}=3,8$. O erro associado a essas constantes de taxa é de aproximadamente 30%. b) Constantes de velocidade do processo mais lento em função do pH; (●) salto de pH=6,4 para pH mais baixos; (○) O pH salta de pH=3,4 (ou 0,6) para 6,4.

A Figura 3.29 mostra os espectros de ^1H RMN de soluções equilibradas em três valores de pD representativos, o menor (pD = 0,5) correspondendo a espécies diprotonadas, o médio a espécies monoprotônicas e o maior a espécies neutras.

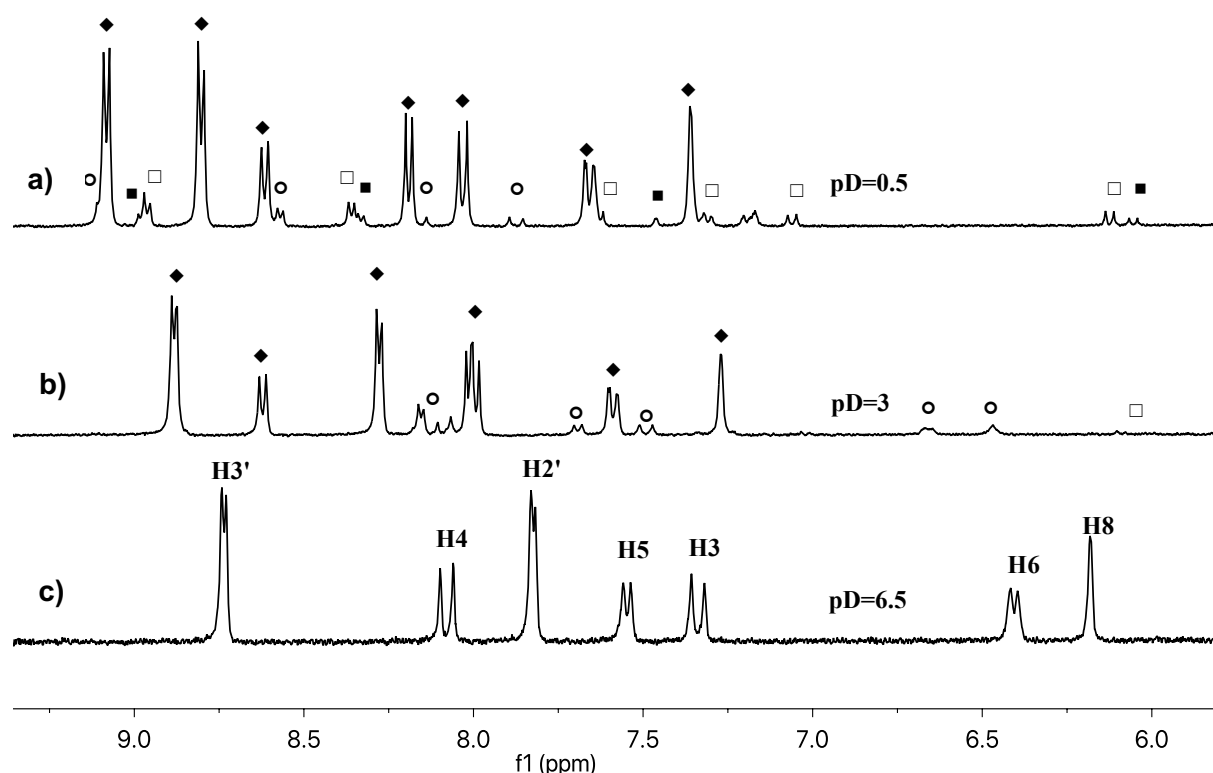


Figura 3.29. Zona aromática do espectro de ^1H -RMN de soluções de 7NPy4 ($1,7 \times 10^{-3}$ M, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v)) equilibrado no escuro: **a)** pD = 0,5; 80% AH^{2+} (◆); 6% Ct^{2+} (○); 9% Cc^{2+} (□); 5% B^{2+} (■); **b)** pD = 3; 81% AH^+ (◆), 16% Ct^+ (○), ~ 3% $\text{B}^+ + \text{Cc}^+$ (□); **c)** pD = 6,5; o sistema não evolui neste pH (100% Ct).

Em pD = 6,5, a única espécie em solução é a forma *trans*-chalcona de 7NPy4, conforme revelado pelo espectro c) na Figura 3.29 (consulte IS para atribuição completa de Ct, AH^+ e AH^{2+} , Tabelas C3-1, C3-2 e C3-3, respectivamente). A pD = 3, a presença de Ct^+ (16%) é indicada pela grande constante de acoplamento (15,3 Hz) dos prótons 3 e 4 em equilíbrio com uma espécie majoritária, atribuída ao catião flavílio AH^+ . As espécies intermediárias Cc^+ e B^+ representam ca. 3%. No valor de pD mais ácido (0,5), o sistema multiestado é novamente dominado por uma espécie de flavílio, AH^{2+} (80%), em equilíbrio com as espécies diprotonadas Ct^{2+} , Cc^{2+} e B^{2+} . A espécie AH^{2+} é protonada no nitrogénio da piridina, conforme revelado pelo deslocamento químico de baixo campo dos prótons do anel de piridina (Figura 3.29a). Além disso, a multiplicidade dos grupos metileno e metil da porção dietilamino observada no espectro ^1H RMN de AH^{2+} , Figura 3.30, mostra que os dois grupos etil são magneticamente não equivalentes. Isso indica que a carga positiva na porção de benzopirílio, impulsionada pela carga positiva do grupo piridínio, está localizada principalmente no nitrogénio da amina e não no oxigénio do pirílio. Essa divisão de sinal dos picos de dietilamino não é tão evidente para a espécie AH^+ (pD = 3), sugerindo que a carga positiva nesta espécie está muito mais localizada no oxigénio do pirílio. Isso implica que a formação de AH^+ a partir de B^+ envolve um processo prototrópico rearranjo onde o próton amónio é transferido para o grupo hidroxilo hemiacetal em B^+ seguido de desidratação.

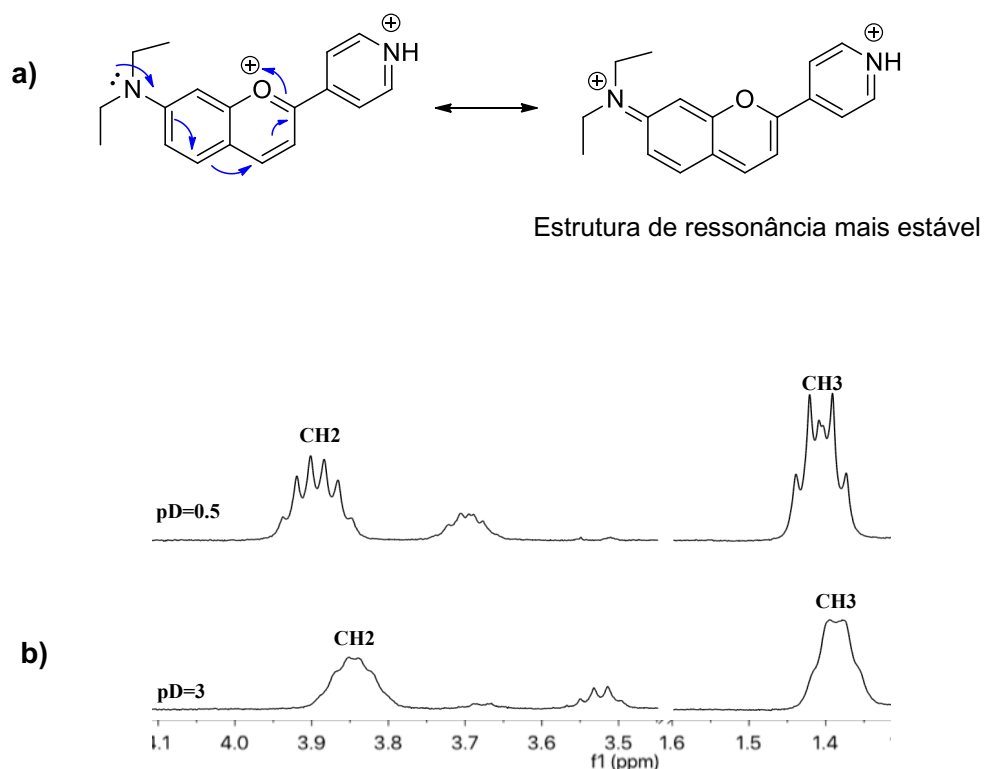


Figura 3.30. a) Deslocalização de carga positiva na porção benzopirílio da espécie AH^{2+} de 7NPy4; b) detalhe dos espectros de 1H RMN cobrindo os picos de dietilamino.

Para cada salto de pH, os espectros de 1H RMN foram adquiridos ao longo do tempo até que o equilíbrio fosse estabelecido (apêndice C, Figura C3.6 e C3.11). A integração de picos selecionados permite traçar curvas cinéticas para cada espécie, conforme mostrado na Figura 3.31.

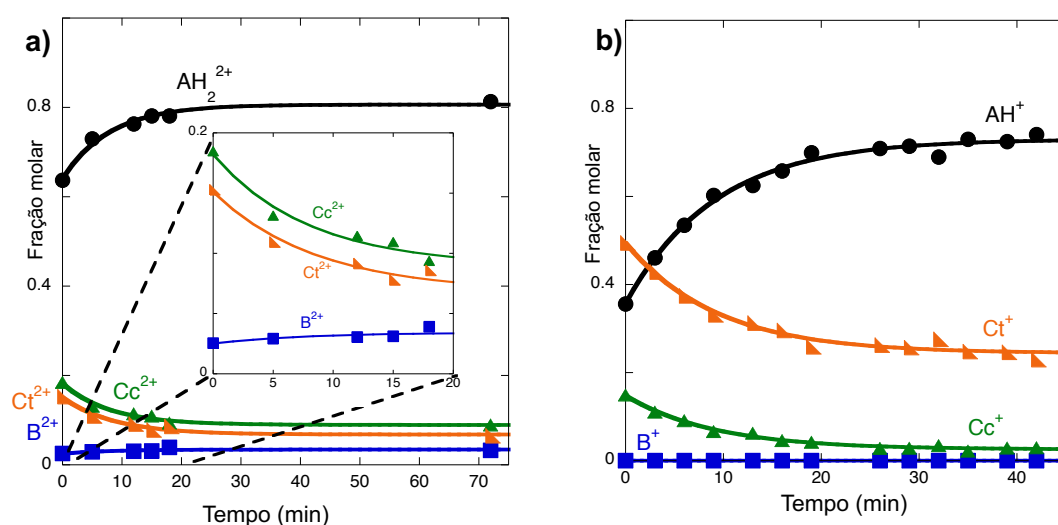
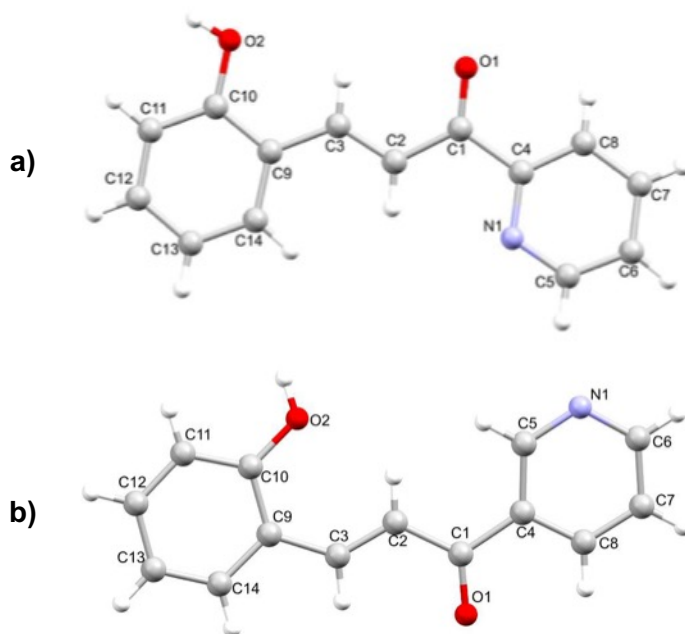


Figura 3.31. Evolução temporal da distribuição da fração molar da espécie durante a etapa cinética mais lenta após um salto de pD de pD=6,4 (100 % Ct) para: a) pD =0,5; b) pD =3,0; dados obtidos por integração dos picos de 1H RMN ($[7NPy4]=1,7 \times 10^{-3}$ M, $CD_3OD/D_2O(1:1$ v/v)).

O espectro ^1H RMN mostrado na Figura 3.31 corrobora a interpretação dada a partir dos dados de UV-vis acima relatados. Como o primeiro espectro de ^1H RMN termina 10-15 min após o salto de pH e a primeira etapa cinética leva apenas alguns segundos (ver Figura 3.23a e Figura 3.25a), as curvas cinéticas na Figura 3.31 descrevem o processo mais lento, após ocorreu a isomerização inicial das chalconas. Com efeito, a $\text{pD} = 0,5$, estas duas espécies mantêm-se desde o início em equilíbrio com uma relação $[\text{Ct}^{2+}]/[\text{Cc}^{2+}] = 0,7 = K_{\text{t}}^{2+}$. Da mesma forma, AH^{2+} e B^{2+} evoluem simultaneamente e mantêm uma relação constante $[\text{B}^{2+}]/[\text{AH}^{2+}] = 0,05$. Ao contrário, a relação $[\text{Cc}^{2+}]/[\text{B}^{2+}]$ diminui até atingir o equilíbrio com $[\text{Cc}^{2+}]/[\text{B}^{2+}] = 1,8 = K_{\text{t}2}^{2+}$. Esses dados conduzem o processo de tautomerização como a etapa limitante da constante de velocidade, conforme antecipado acima a partir dos dados de absorção UV-Vis. Vale ressaltar que, neste caso, as constantes de velocidade $k_{\text{t}}^{2+} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $k_{-\text{t}}^{2+} = 1,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ podem ser calculadas a partir de $k_{\text{t}}^{2+} + k_{-\text{t}}^{2+} = 0,003 \text{ s}^{-1}$ e $K_{\text{t}}^{2+} = 1,8$; da mesma forma, $k_{\text{t}}^{2+} = 0,21 \text{ s}^{-1}$ e $k_{-\text{t}}^{2+} = 0,29 \text{ s}^{-1}$ podem ser calculados a partir de $k_{\text{t}}^{2+} + k_{-\text{t}}^{2+} = 0,5 \text{ s}^{-1}$ e $K_{\text{t}}^{2+} = 0,7$.

3.5 Estudos de difração de raios X

Os compostos Py2, Py3, Py4 e 7NPy4 foram cristalizados a partir de MeOH, MeOH/Et2O (2:1), MeOH/Et2O (1:1) e MeOH/Et2O (2:1), respectivamente. Esses cristais foram observados como placas verdes (Py2), amarelas (Py3 e Py4) e roxo-castanho (7NPy4), sendo adequados para difração de raios X de cristal único. Suas estruturas moleculares foram inequivocamente estabelecidas por meio dessa técnica. Um diagrama de Mercúrio das unidades assimétricas está representado na Figura 3.32.



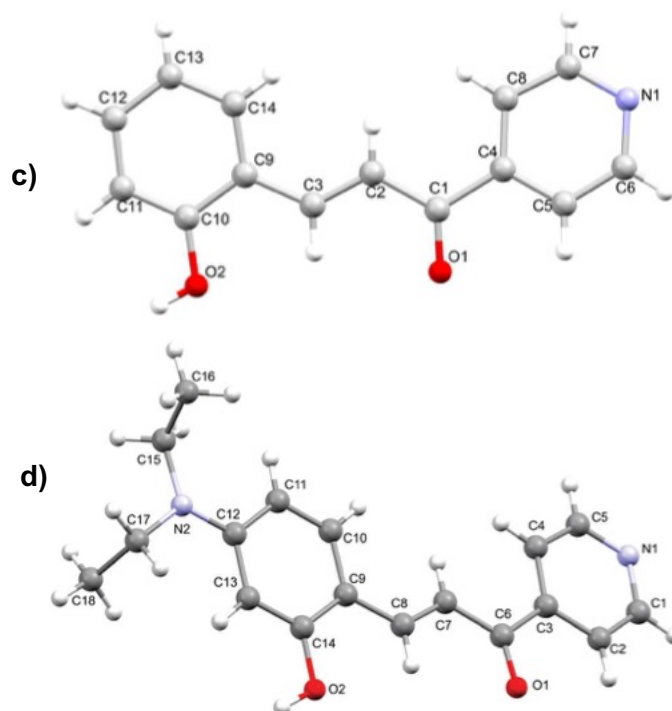


Figura 3.32. Desenhos de Mercúrio das estruturas moleculares dos compostos **a)** Py2, **b)** Py3, **c)** Py4; **d)** 7NPy4.

3.6 Conclusões

Quando o anel fenilo na posição 2 é substituído por uma piridina, nenhum catião flavílio é observado devido à protonação da piridina. A introdução de um substituinte dietilamino na posição 7 da piridinochalcona, que é facilmente protonado quando comparado à piridina, permite o surgimento de uma nova família de derivados de piridinoflavílio.

Neste sistema específico, não apenas a piridinoflavílio é formada entre pH 2 e 4, mas também uma espécie duplamente carregada positivamente, protonada nos grupos amino e piridina, é formada para pH menor que 1.

A caracterização completa da cinética e termodinâmica desse sistema multiestado mostra que, diferentemente das antocianinas e compostos relacionados, a reação de abertura e fecho do anel entre hemicetal e *cis*-chalcona torna-se muito mais lenta do que a isomerização *cis-trans* da chalcona.

A posição do átomo de nitrogénio no anel B é crucial para a reatividade do multiestado. Um átomo de nitrogénio na posição 3' ou 4' das piridinochalconas permite alcançar um multiestado comum de espécies em que os compostos esperados B, Cc e Ct estão presentes. No entanto, se o átomo de nitrogénio estiver na posição 2', dois novos compostos de um processo irreversível aparecem no multiestado.

3.7 Metodologia experimental

3.7.1 Materiais e métodos

Os solventes e produtos químicos utilizados para a síntese e preparação das amostras foram de grau analítico e utilizados como obtidos do fornecedor; água grau Millipore foi utilizada. Todos os reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e eram de grau analítico ($\geq 97\%$), incluindo aqueles utilizados na preparação das soluções tampão.

A purificação por cromatografia flash foi realizada com gel de sílica Carlo Erba de 40-60 μm , 60 Å.

As análises elementares (AE) foram realizadas utilizando um instrumento da série Thermofinnigan Flash EA 1112, com um erro de $\pm 0,4\%$. Os espectros de massa foram obtidos num Orbitrap XLTM LTL (ESI-MS) controlado por LTQ Tune Plus 2.5.5 e Xcalibur 2.1.0.

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrômetro Bruker Advance III 400 (400 MHz para ^1H , 100 MHz para ^{13}C) a 298 K. As atribuições de RMN foram realizadas com base nos espectros de RMN 1D (^1H , ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada num instrumento Merck-Hitachi equipado com um detector de matriz de diodos (DAD), faixa de varrimento: 200–800 nm (Detector de Matriz de Diodos Merck-Hitachi L-4500) e operando a 25 °C. As análises HPLC analíticas foram realizadas por uma coluna analítica de fase reversa (RPHPLC, coluna Purosphere® Star, 250 mm $\times$ 3 mm i.d., 5 μm). As amostras foram preparadas em MeOH e o volume de injeção foi de 20 μL . A melhor separação de picos foi obtida com $\text{H}_2\text{O}:\text{HClO}_4$, 99,7:0,3, v/v (solvente A) e MeOH puro (solvente B) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min: 7% B por 2 min; gradiente linear de 7% para 15% B por 6 min; gradiente linear de 15% para 75% B por 17 min; gradiente linear de 75% para 80% B por 2 min; gradiente linear de 80% para 100% B por mais 2 min; 100% B por 11 min e 5 min para retornar à condição inicial. O tempo total de execução, excluindo a equilibrção, foi de 40 min. As análises HPLC semipreparativa foram realizadas numa coluna analítica de fase reversa (Phenomenex® Onyx Monolithic C18, 100 mm $\times$ 10 mm). As amostras foram preparadas em MeOH e o volume de injeção foi de 200 μL . A melhor separação de picos foi obtida com $\text{H}_2\text{O}:\text{HClO}_4$, 99,7:0,3, v/v (solvente A) e MeOH puro (solvente B) a uma taxa de fluxo de 4 mL/min usando o mesmo gradiente de eluição descrito anteriormente. As análises de HPLC/MS foram realizadas num equipamento da Série 1200 da Agilent acoplado a um detetor de quadrupolo único Agilent 6130B com fonte API-ES. As análises elementares foram realizadas usando um instrumento da série Thermofinnigan Flash EA 1112 com um erro de $\pm 0,4\%$. Os espectros de massa foram obtidos num Orbitrap XLTM LTL (ESI-MS) controlado pelo LTQ Tune Plus 2.5.5 e Xcalibur 2.1.0.

3.7.2 Estudos termodinâmicos e cinéticos

Os saltos de pH foram realizados adicionando uma solução estoque de *trans*-chalcona: para Py2 e Py3 (1 mL em metanol/água(1:1 v/v) a pH 5,9 (Py2) e 6,5 (Py3)) a uma cuvette de quartzo de 3 mL contendo metanol (1 mL) e tampão universal de Theorell e Stenhagen (1 mL) no pH final desejado, e para 7NPy4

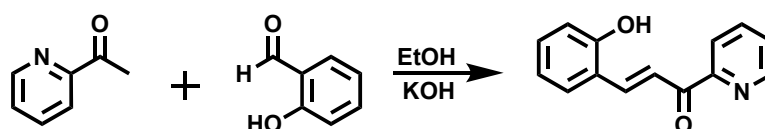
a solução estoque de *trans*-chalcona em MeOH (1.5 mL) a uma cuvete de quartzo de 3 mL contendo 1.5 mL de tampão universal de Theorell e Stenhagen (1.5 mL) no pH final desejado. O pH final das soluções foi medido num medidor de pH básico Crison 20+. Medidas espectroscópicas foram realizadas usando água Milli-Q e metanol grau HPLC, com temperatura constante de 20 ± 1 °C, com espectrofotômetros Varian-Cary 100 Bio ou Varian-Cary 5000. Os experimentos de fluxo interrompido foram realizados num espectrômetro de fluxo interrompido Applied Photophysics SX20 fornecido com um detector de matriz de fotodiodo PDA.1/UV.

3.7.3 Estudos fotoquímicos

Os estudos fotoquímicos foram realizados com irradiação a 365 nm, seguidos por RMN e UV-Vis. Soluções de *trans*-chalcona (Py2 ou Py3) com concentrações de $1,7 \times 10^{-2}$ M e $4,0 \times 10^{-5}$ M em misturas de MeOH ou MeOH/H₂O (1:1 v/v) foram preparadas para RMN e UV-Vis, respectivamente. As irradiações foram feitas em cubetas de quartzo de 3 mL com 1 cm de percurso ótico. As soluções foram irradiadas a 365 nm com uma lâmpada de xenônio e mercúrio de 200 W, controlada por uma unidade Newport 69,907, e usando um filtro de passagem de banda Semrock-MaxLampTM para isolar o comprimento de onda de 365 nm, até que o estado fotossaturado fosse alcançado. A recuperação termodinâmica no escuro foi acompanhada por RMN e UV-Vis.

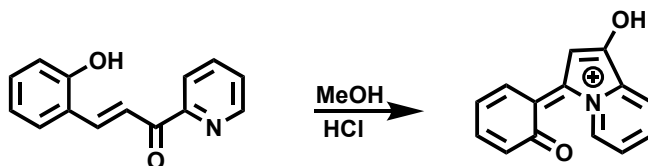
3.7.4 Síntese

Síntese de (E)-3-(2-hidroxifenil)-1-(piridin-2-il)prop-2-en-1-ona (Py2)



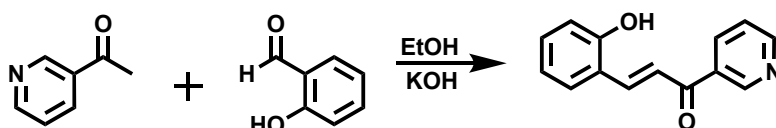
A síntese do composto Py2 foi realizada de acordo com o procedimento experimental previamente descrito na síntese do Py4.[71] Uma solução de 1,1 mL de 2-acetilpiridina (10 mmol) e 1 mL de salicilaldeído (10 mmol) em 15 mL de etanol foi desgaseificada. Em seguida, 1 mL de uma solução aquosa de KOH (1 g mL^{-1}) foi adicionada gota a gota à temperatura ambiente, sob nitrogênio. A mistura reacional foi desgaseificada novamente e agitada à temperatura ambiente durante a noite, sob atmosfera inerte. A solução foi neutralizada e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um resíduo bruto, que foi primeiro purificado por cromatografia em coluna flash (DCM/Et₂O, 8:2, v/v) e depois recristalizado em MeOH aquecido para fornecer cristais verdes (0,788 g, 3,5 mmol, 35%). ¹H RMN (400 MHz, MeOD-d₄) δ 8,76 (ov, 1H, H-6'), 8,29 (t, J = 16 Hz, 2H, H-3 e H-4), 8,16 (d, J = 7,8, 1H, H-3'), 8,01 (td, J = 7,7 Hz, 1H, H-4'), 7,72 (ov, 1H, H-5), 7,62 (ddd, J = 7,6 Hz, 1H, H-5'), 7,28 (td, J = 7,8 Hz, 1H, H-7), 6,91 (dd, J = 8,1, 6,7 Hz, 1H, H-6 e H-8); RMN de ¹³C (100 MHz, MeOD-d₄) δ 190,1 (C-2), 157,6 (C-9), 154,3 (C-1'), 148,7 (C-6'), 140,8 (C-4), 137,3 (C-4'), 131,8 (C-7), 128,6 (C-5), 127,0 (C-5'), 122,5 (C-3'), 121,9 (C-10), 119,9 (C-3), 119,5 (C-6), 115,7 (C-8). MS (ESI-MS, modo positivo): m/z calculado para [M + H]⁺ 226,086; encontrado [C₁₄H₁₂NO₂]⁺ 226,100. AE calculada para C₁₄H₁₁NO₂: % C 74,65; % H 4,92; % N 6,22; encontrado: % C 74,46, % H 5,09, % N 6,19.

Síntese de (Z)-1-hidroxi-3-(6-oxociclohexa-2,4-dien-1-ilideno)-3H-indolizin-4-ium (5)



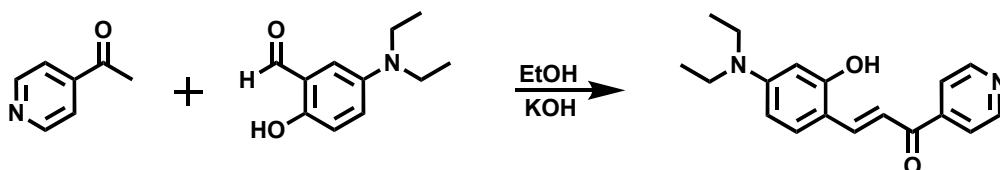
O composto Py2 (33 mg, 0,146 mmol) foi dissolvido em 50 mL de metanol e então 50 mL de solução aquosa de HCl 0,2 M foram adicionados gota a gota à temperatura ambiente. A reação foi monitorizada por HPLC. Após 60 dias, o composto 5 era o composto majoritário e foi purificado por HPLC semipreparativo, resultando no composto 5 como um pó branco (10 mg; 0,045 mmol, 31%). ^1H RMN (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8,87 (br d, J = 5,7 Hz, 1H), 8,67 (ov, 1H), 8,65 (ov, 1H), 8,19 (ov, 1H), 8,17 (br d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,01 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,94 (br d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,70 (ov, 1H), 7,61 (s, 1H). RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) δ 180,8, 157,3, 157,1, 148,6, 143,7, 140,3, 139,4, 130,8, 128,8, 127,0, 125,3, 120,1, 119,0, 108,7. HPLC-MS (ESI-MS, modo positivo): m/z calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$ 224,070; encontrado $[\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2]^+$ 224,100.

Síntese de (E)-3-(2-hidroxifenil)-1-(piridin-3-il)prop-2-en-1-ona (Py3)



A síntese do composto Py3 foi realizada de acordo com o procedimento experimental previamente descrito na síntese do Py4.[71] Uma solução de 0,5 mL de 3-acetilpiridina (4,5 mmol) e 0,45 mL de salicilaldeído (4,5 mmol) em 7,5 mL de etanol foi desgaseificada. Em seguida, 0,5 mL de uma solução aquosa de KOH (1 g mL $^{-1}$) foi adicionada gota a gota à temperatura ambiente, sob nitrogênio. A mistura reacional foi desgaseificada novamente e agitada à temperatura ambiente durante a noite sob atmosfera inerte. A solução foi neutralizada e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um resíduo bruto, que foi primeiro purificado por cromatografia em coluna flash (DCM/Et $_2$ O, 8:2, v/v) e depois recristalizado em MeOH/Et $_2$ O (2:1, v/v) para fornecer cristais verdes (0,48 g, 2,11 mmol, 47%). RMN de ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) δ 9,19 (s, J = 2,3 Hz, 1H, H-2'), 8,77 (dd, J = 4,9, 1,7 Hz, 1H, H-6'), 8,46 (dt, J = 8,0, 2,0 Hz, 1H, H-4'), 8,18 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H-4), 7,81 (d, J = 15,7 Hz, 1H, H-3), 7,72 (dd, J = 8,0, 1,7 Hz, 1H, H-5), 7,63 (dd, J = 8,0, 4,9 Hz, 1H, H-5'), 7,28 (dd, J = 7,8, 1,7 Hz, 1H, H-7), 6,92 (t, J = 7,7 Hz, 2H, H-8 e H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) δ = 189,80 (C-2), 157,72 (C-9), 152,03 (C-6'), 148,80 (C-2'), 142,23 (C-4), 136,42 (C-4'), 134,16 (C-1'), 132,08 (C-7), 129,26 (C-5), 124,00 (C-5'), 121,45 (C-10), 120,66 (C-3), 119,51 (C-6), 115,75 (C-8). MS (ESI-MS, modo positivo): m/z calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$ 226,086; encontrado $[\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{NO}_2]^+$ 226,100. AE calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2$: %C 74,6; %H 4,6; %N 6,2; encontrado: %C 74,75, %H 5,40, %N 6,21.

Síntese e caracterização de (E)-3-(4-(dietilamino)-2-hidroxifenil)-1-(piridin-4-il)prop-2-en-1-ona (7NPy4)



Uma solução de 0,55 mL de 4-acetilpiridina (5 mmol) e 0,984 g de 4-dietilaminossalicialdeído (5,1 mmol) em 7,5 mL de etanol foi degasificada. Em seguida, 0,45 mL de uma solução aquosa de KOH (1 g mL⁻¹) foi adicionada gota a gota à temperatura ambiente, sob nitrogénio. A mistura reacional foi degasificada novamente e agitada à temperatura ambiente durante a noite, sob atmosfera inerte. A solução foi neutralizada e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um resíduo bruto, que foi primeiramente purificado por cromatografia em coluna flash (DCM/EtOAc, 8:2, v/v) e depois recristalizado em MeOH/Et₂O (2:1 v/v) para fornecer cristais marrons-arroxeados (0,100 g, 14%). ¹H RMN (400 MHz, acetona-d₆) δ 9,02 (s, 1H, OH), 8,80 (d, 2H, H₃₀ + H₅₀), 8,18 (d, J = 16 Hz, 1H, H₄), 7,86 (D, J = 8,9 Hz, 1H, H₅), 7,53 (d, J = 16 Hz, 1H, H₃), 6,37 (dd, J = 8,9, 2,5 Hz, 1H, 1,44 (t, J = 7,0 Hz, 6H, 2CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, acetona-d₆) δ 188,3 (C₂), 157,6 (C₁₀), 151,7 (C₉), 150,5 (C₃₀ + C₅₀), 145,7 (C₁₀), 142,6 (C₄), 131,1 (C₅), 121,3 (C₂₀ + C₆₀), 114,4 (C₃), 110,0 (C₇), 104,8 (C₆), 97,5 (C₈), 44,2 (2 CH₂), 12,0 (2 CH₃). MS (ESI-MS, modo positivo): m/z calculado para [M + H]⁺ 297,159; encontrado [C₁₈H₂₁N₂O₂]⁺ 297,160. AE calculada para C₁₈H₂₀N₂O₂: % C 72,95; % H 6,80; % N 9,45; encontrado: % C 72,97, % H 6,49, % N 9,52.

3.7.5 Difração de raios X de monocristal

Cristais adequados para análise de difração de raios-X de monocristal dos compostos Py2, Py3, Py4 e 7NPy4 foram selecionados e cobertos com Fomblin (óleo de polifluoreto de éter) e montados num laço de nylon. Os dados foram coletados à temperatura ambiente num difratômetro Bruker D8 Venture equipado com um detector Photon 100, utilizando radiação Mo-Kα monocromatizada por grafite (λ = 0,71073 Å). Os dados foram processados utilizando o pacote de software APEX2, que inclui integração e escalonamento (SAINT), correções de absorção (SADABS) e determinação do grupo espacial (XPREP). A solução da estrutura e a refinamento foram realizados usando métodos diretos com os programas SHELXT 2014/5 e SHELXL (versão 2018/3), embutidos nos pacotes de software APEX e WinGX-Versão 2018. Todos os átomos não hidrogénio foram refinados anisotropicamente. Exceto para o OH em Py3 e 7NPy4, todos os átomos de hidrogénio foram inseridos em posições idealizadas e permitidos para refinamento sobre o átomo de carbono ou oxigénio original, com distâncias C–H de 0.93 Å, 0.96 Å e 0.97 Å, para átomos de hidrogénio aromáticos, metil e metileno, respectivamente, e distância O–H de 0.82 Å. Os diagramas moleculares foram desenhados com ORTEP-3 (versão 2014.1) e Mercury incluídos no pacote de software. Os dados foram depositados no CCDC sob os números de depósito 2,207,218 para Py2; 2,207,219 para Py3; 2,207,220 para Py4 e 1920050 para 7NPy4

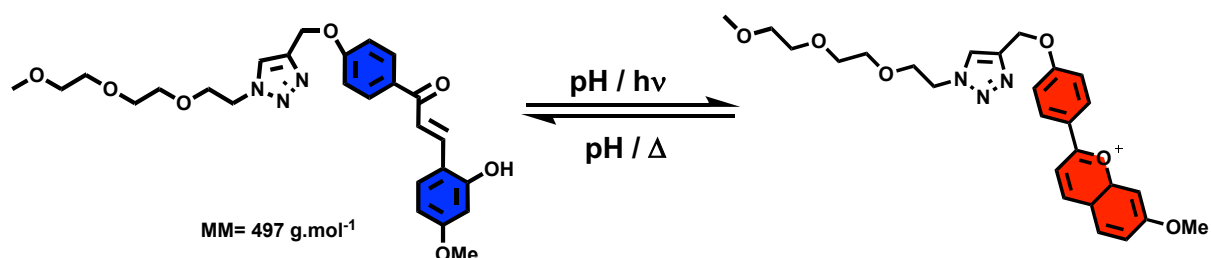
FLUIDOS FOTOREOLÓGICOS SUPRAMOLECULARES

As propriedades fotoquímicas de um sistema multiestado 2-fenil-1-benzopirílio foram utilizadas na preparação de um fluido fotoreológico, que permite controlar a viscosidade de soluções aquosas através da luz e/ou o pH. O sistema fotocromico de tetra(*trans*-chalcona 7-metoxi-4'-O-metileno-triazol-PEG) e o seu respetivo catião flavílio (produto fotoquímico), na presença de cucurbit[8]urilo (CB[8]) pode formar complexos supramoleculares homoternários numa proporção molar de 1:2 CB[8]/flavílio. Estes complexos servem para interligar as cadeias poliméricas através de ligações cruzadas supramoleculares, levando a um aumento significativo da viscosidade.

Neste capítulo, será apresentado em detalhe o processo de síntese das unidades estruturais fotoresponsivas, juntamente com a metodologia para a preparação de hidrogéis controláveis pela luz. Além disso, serão analisadas as propriedades reológicas desses hidrogéis, tanto antes quanto após a irradiação, oferecendo uma compreensão abrangente de como a luz afeta a viscosidade e o comportamento mecânico do material.

4.1 Definição do método matemático (composto modelo)

Para a construção do sistema fotoreológico, foi projetado um sistema supramolecular no qual o substrato interage com a luz, formando a espécie que, na presença do recetor (CB[8]), forma um complexo homoternário para realizar interligações cruzadas. Espera-se que, à medida que ocorrem as interligações cruzadas, as cadeias supramoleculares cresçam, resultando num aumento da viscosidade do sistema. Antes de avançarmos para o composto polimérico selecionado como substrato (apresentado na Figura 4.3), optou-se por iniciar a pesquisa com um composto modelo (ET3G-Ct, Esquema 4.1). O composto modelo utilizado para elaboração do método de cálculo da constante de complexação foi o trietilenoglicol(*trans*-chalcona 7-metoxi-4'-O-metileno-triazol), semelhante ao substrato principal em estrutura terminal e propriedades químicas.



Esquema 4.1. Processo reversível do composto modelo controlado por estímulos externos.

Na Figura 4.1, são apresentados os espectros de absorção do composto ET3G-Ct que variam em função do pH. Essa análise tem como objetivo determinar o pK_a e identificar a faixa de pH na qual ocorre a formação do catião flavílio, que é a espécie preferencial para a formação do complexo com o CB[8].

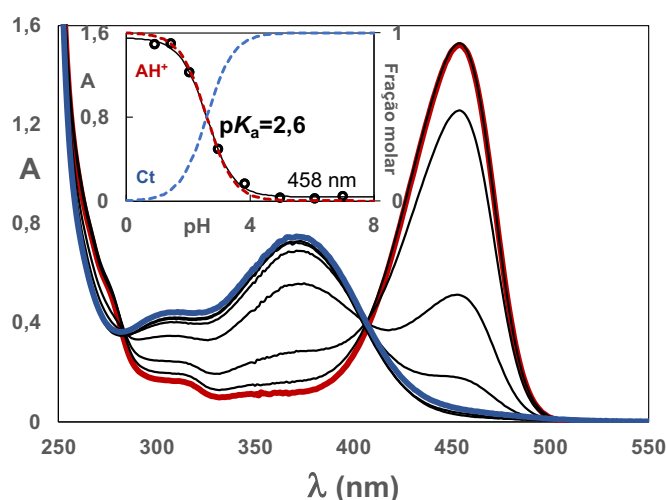


Figura 4.1. Variação dos espectros de absorção da solução aquosa de ET3G-Ct ($5,4 \times 10^{-5} \text{ M}$) com tampão citrato (0,1 M) em função do pH.

Sabendo a faixa de pH em que o flavílio predomina, as constantes de complexação para o ET3G-Ct foram determinadas a pH=1, como apresentado na Figura 4.2. Nessa figura, é mostrada a variação dos espectros de emissão em função da concentração de CB[8] a pH=1.

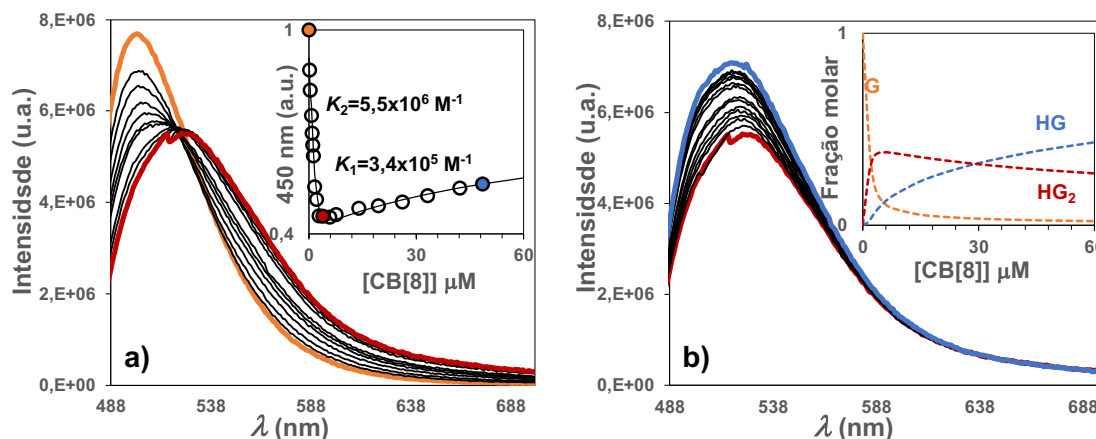


Figura 4.2. Espectros de emissão do composto ET3G-Ct ($5,3 \times 10^{-6}$ M, pH=1, irradiado a 478 nm), em função da concentração de CB[8]: **a)** [CB[8]] varia de 0 – 5,8 μ M; **b)** [CB[8]] varia de 5,8 - 60 μ M.

As interações entre o recetor e o substrato em proporções conhecidas, como 1:1 e 1:2, podem ser analisadas em função da variação da intensidade de emissão, conforme mostrado na Figura 4.2. Observamos que a formação do complexo com estequiometria 1:2 de recetor/substrato é favorecida pelo excesso de substrato, como identificado pela variação espectral apresentada na Figura 4.2a. Por outro lado, o excesso de recetor favorece a formação do complexo com estequiometria 1:1 de recetor/substrato, como identificado pela variação espectral apresentada na Figura 4.2b. Estes dados facilitaram validação do método matemático que é apresentado no apêndice D, que foi utilizado no tratamento de dados do sistema supramolecular fotoreológico estudado a seguir. Como se pode observar, a constante de associação para a formação do complexo 1:2 apresenta um valor ($K_1K_2 = 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) cerca de 5 ordens de grandeza superior ao obtido para o complexo 1:1 ($K_1 = 3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), demonstrando que a formação do complexo homoternário ocorre através de um processo cooperativo. De forma especulativa, a natureza cooperativa deste fenómeno pode ser racionalizada através da existência de interações atrativas entre as duas moléculas de flavílio dentro da cavidade do CB[8].

4.2 Composto fotoresponsivo

Foram necessárias cinco etapas para a síntese do composto fotoresponsivo apresentado na Figura 4.3, um processo que demandou uma série de reações químicas cuidadosamente planejadas. Os

produtos foram alcançados com rendimentos relativamente elevados, como detalhado na seção experimental.

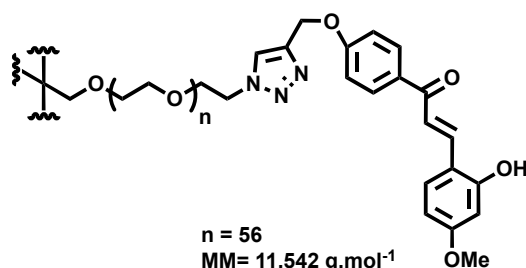
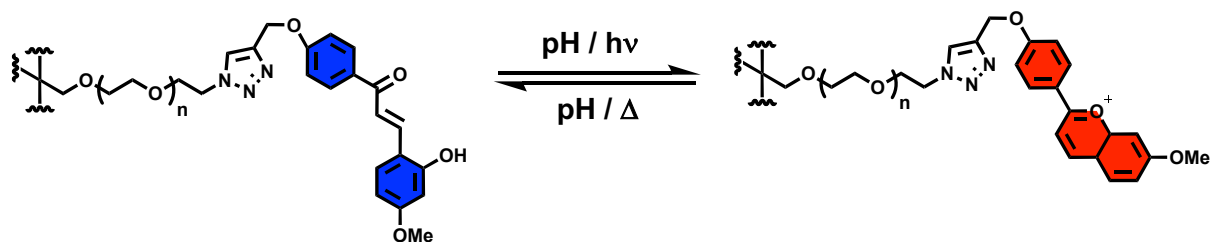


Figura 4.3. Tetra(*trans*-chalcona 7-metoxi-4'-O-metileno-triazol-PEG (4-armPEG-Ct).

A escolha da unidade terminal do tetraedro, a *trans*-chalcona, foi estratégica devido à sua capacidade de formar um sistema multiestado com duas espécies estáveis, que podem ser ativadas tanto pela luz quanto por alterações de pH, alternando entre a forma de chalcona e o catião flavílio. Notavelmente, este último demonstrou uma alta afinidade para o CB[8], resultando na formação de complexos com uma constante de associação significativa. Tal como se demonstrou anteriormente para o composto modelo, cada unidade de CB[8] pode acoplar duas unidades do catião flavílio na sua cavidade, facilitando a formação de complexos homoternários. O tetrapolietileno glicol (4-armPEG) assume um papel central na estruturação do sistema, funcionando como o elemento coeso que assegura a ligação das unidades terminais. À medida que ocorre a formação dos complexos homoternários, o 4-armPEG desempenha um papel crucial ao permitir o crescimento controlado da rede. Essa capacidade de estruturação proporciona um mecanismo robusto para ajustar as propriedades do material em resposta a estímulos externos.

4.3 Estudos termodinâmicos e fotoquímicos

O processo de interconversão reversível entre a *trans*-chalcona e o catião flavílio é alcançado mediante estímulos externos, como variações de pH e luz, como apresentado no Esquema 4.2. Para estudar as propriedades termodinâmicas desse sistema dinâmico, uma série de titulações e irradiações foram conduzidas. Essas titulações foram realizadas com o propósito de determinar as constantes de acidez do composto em solução, tanto na presença quanto na ausência do CB[8]. Além disso, foram realizadas titulações adicionais para determinar as constantes de associação entre o composto e o CB[8], fornecendo uma compreensão abrangente das interações supramoleculares presentes no sistema.



Esquema 4.2. Processo reversível Ct/AH⁺.

A conversão da *trans*-chalcona em catião flavílio pode ser alcançada de diversas maneiras. Inicialmente, esse processo pode ser desencadeado por um salto de pH neutro para ácido, induzindo a transição da chalcona para o catião flavílio. Alternativamente, a irradiação a 365 nm também é capaz de promover essa conversão fotoquímica. Por outro lado, o processo inverso, ou seja, a conversão do catião flavílio de volta para a *trans*-chalcona, pode ser alcançado por um salto direto de pH, ou a recuperação termodinâmica também pode induzir essa conversão reversível, permitindo que o sistema retorne ao seu estado inicial.

4.3.1 Constantes de acidez

Para determinar as constantes de equilíbrio ácido-base, a titulação foi monitorizada por espectroscopia UV-vis, com os espectros apresentados na Figura 4.4. O experimento teve início com a preparação da solução mãe a um pH inicialmente ≤ 1 . A partir desse ponto de partida, foram realizados saltos diretos de pH até que a solução atingisse a faixa moderadamente básica.

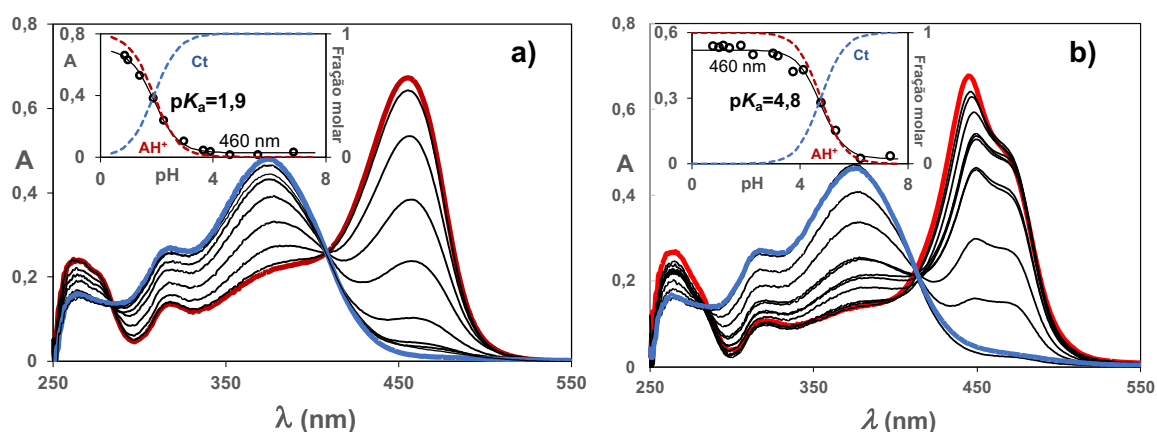


Figura 4.4. Variação dos espectros de absorção da solução aquosa de 4-armPEG-Ct ($4,38 \times 10^{-6}$ M) com tampão citrato (10 mM): **a)** na ausência de CB[8]; **b)** com o CB[8] ($2,2 \times 10^{-6}$ M).

O sistema reversível apresentado na Figura 4.4 está definido na permuta AH⁺/Ct. No entanto, a rede multiestado que envolve a interconversão entre a *trans*-chalcona e o catião flavílio inclui outras espécies

intermediárias cruciais, como Cc e B, que desempenham papéis significativos nas etapas de isomerização, tautomerização e hidratação. Saltos diretos de pH, de $\text{pH} \leq 1$ para valores mais altos, levam à formação de Ct através da hidratação do AH^+ para formar B, que posteriormente sofre tautomerização (abertura do anel) para se transformar em Cc, que por sua vez isomeriza em Ct. Na Figura 4.4b, observamos o aumento do pK_a na presença de CB[8], o que indica a estabilização do catião flavílio no complexo. Isso resulta numa fração molar maior de AH^+ em uma faixa de pH alargada em comparação com o composto isolado, por exemplo, 50% a $\text{pH}=1,9$ quando isolado e a mesma percentagem a $\text{pH}=4,8$ no complexo. Esse fenômeno destaca o papel do CB[8] como recetor na estabilização do AH^+ , que ocorre devido às interações ião-dipolo, inclusão da cavidade hidrofóbica e formações de ligações de hidrogénio dentro do complexo $\text{AH}^+/\text{CB}[8]$.

4.3.2 Constantes de associação

As constantes de associação para os complexos recetor-substrato foram determinadas por meio de titulações, mantendo uma concentração constante de substrato (G, 4-armPEG-Ct) enquanto variava a concentração do recetor (H, CB[8]). A análise dessas titulações, monitorizada por espectroscopia de absorção, está representada na Figura 7.

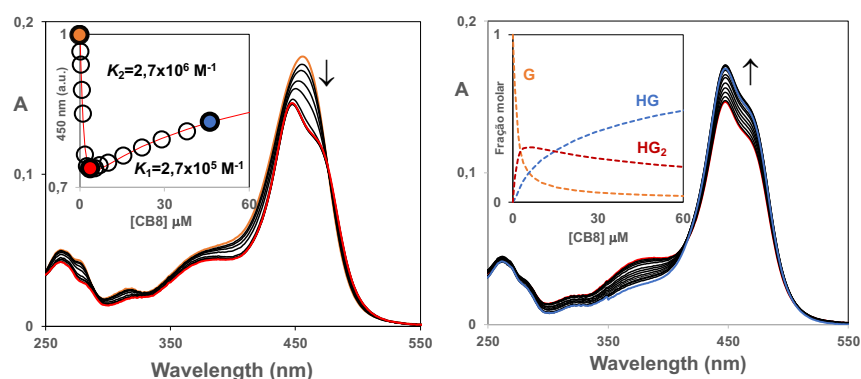


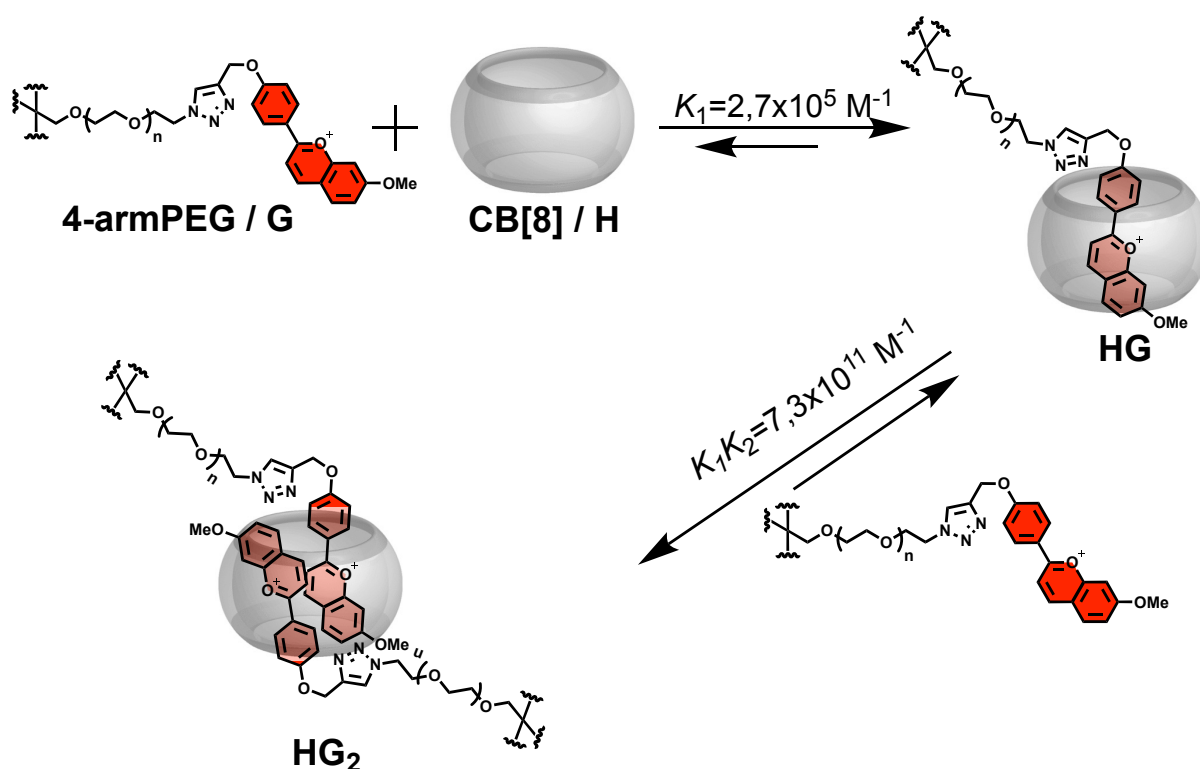
Figura 4.5. Espectros de absorção do composto 4-armPEG-AH⁺ ($1,1 \times 10^{-6}$ M, $\text{pH}=1$), traçados com o aumento da concentração de CB[8]: **a)** [CB[8]] varia de 0 - 3,7 μM; **b)** [CB[8]] varia de 3,7 - 60 μM.

O comportamento da absorvância observado na Figura 4.5 com o aumento da concentração de CB[8] sugere uma preferência pela formação do complexo HG₂ indicado pela curva inicial, Figura 4.5a. À medida que a concentração de CB[8] aumenta, a absorvância diminui, destacando o menor coeficiente de extinção molar do complexo HG₂ em comparação com G livre. O ligeiro aumento subsequente da absorvância com o aumento da concentração de H, Figura 4.5b, indica a presença de mais complexos HG. No entanto, este aumento da absorvância de HG não alcança a absorvância do G livre, revelando a ordem de absorvância molar relativa a 450 nm como $G > HG > \text{HG}_2$. O equilíbrio entre os complexos é determinado pelas Eq. 4.1 e Eq. 4.2.

$$K_1 = \frac{[HG]}{[H][G]} \quad \text{Eq. 4.1}$$

$$K_2 = \frac{[HG_2]}{[HG][G]} \quad \text{Eq. 4.2}$$

O valor alto de $K_1=2,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ indica uma forte tendência para a formação do complexo HG devido à interação entre H e G. Por outro lado, uma maior constante de estabilidade K_2 ($2,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) comparado a K_1 sugere uma maior estabilidade do complexo HG_2 em relação ao HG. É importante destacar que até 4 equivalentes de H, a fração molar de HG_2 tem um aumento maior em relação a fração molar de HG. Porém, com um maior excesso de H, a fração molar de HG aumenta enquanto a de HG_2 diminui (as deduções dos cálculos encontram-se nos apêndices D), evidenciando o equilíbrio dinâmico entre os dois complexos, conforme apresentado no Esquema 4.3.

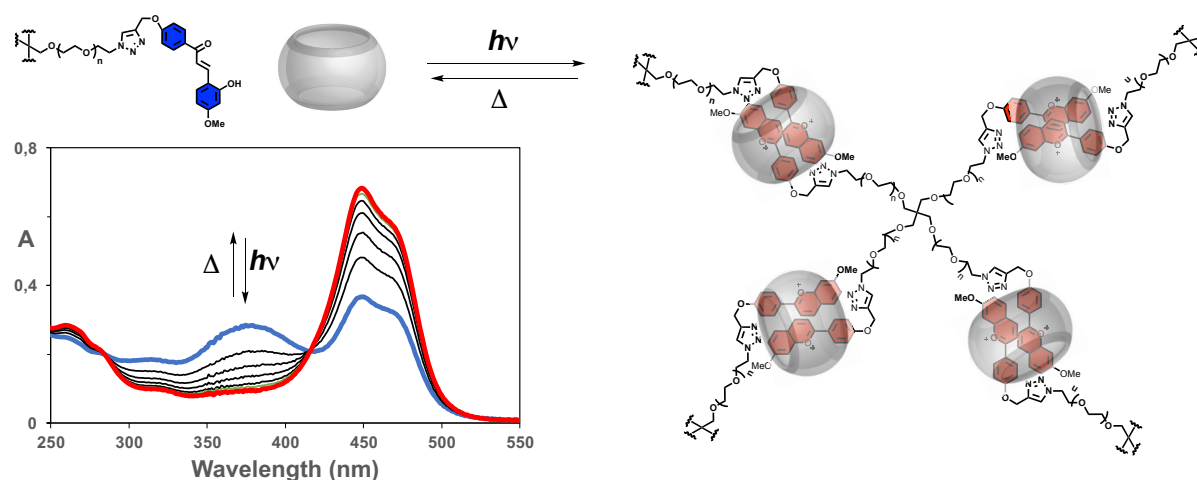


Esquema 4.3. Mecanismo de complexação do composto 4-armPEG-AH⁺ com o CB[8].

A estequiometria final do complexo é de 1 recetor para 2 substratos (1:2). No entanto, considerando que cada mol de 4-armPEG-AH⁺ corresponde a 4 unidades terminais (Ct/AH⁺), no final, temos uma relação de 1 mol de 4-armPEG-AH⁺ para 2 moles de CB[8].

4.3.3 Reatividade fotoquímica do complexo

O Esquema 4.4 apresenta os espectros e o esquema de resposta à irradiação a 365 nm de uma solução aquosa contendo uma mistura de 4-armPEG-Ct e CB[8] (na proporção 1:4) a pH= 4,8 equivalente ao valor de pK_a . Sob esta condição de equilíbrio, 50% do composto é convertido em catião flavílio disponível para formar o complexo, enquanto a outra metade permanece na forma de *trans*-chalcona. Por irradiação, a *trans*-chalcona é convertida em catião flavílio, obtendo-se assim mais substrato para a formação do complexo.



Esquema 4.4. Fotoindução supramolecular H-G (1:2) da mistura 4-armPEG-Ct ($7,3 \times 10^{-6}$ M) e CB[8] ($2,7 \times 10^{-5}$ M) a pH=4,8 irradiado a 365 nm.

Os espectros de absorção da mistura em diferentes tempos de irradiação revelam um aumento progressivo na quantidade de complexo formado ao longo do tempo. Quando uma mistura de Ct e AH^+ numa proporção de 50-50% é irradiada, observa-se a formação de um excesso de AH^+ . Em presença de CB[8], esse excesso de AH^+ favorece a formação de mais complexo, ampliando ainda mais a proporção de complexo em relação ao composto não complexado na solução. Em soluções mais concentradas a fotoindução supramolecular pode ser observada macroscopicamente através da variação da viscosidade da solução. A Figura 4.6 apresenta o controle da viscosidade pela irradiação da mistura 4-arm PEG-CT/CB[8] (na proporção de 1:4, com uma concentração de 4% (m/m) em água a pH =4,7), que foi irradiada a 365 nm por um período de 1 hora, seguido por um período de recuperação térmica de 3 dias no escuro.

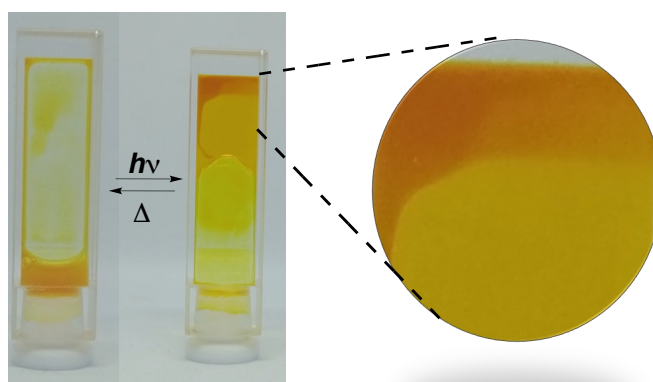


Figura 4.6. Controlo da viscosidade pela irradiação da mistura 4-arm PEG-CT/CB[8] (1:4, 4% m/m, pH 4,7) irradiado a 365 nm durante 1 hora. Ampliação do fundo da célula mostrando a formação de duas fases, com a cor mais intensa resultante da presença do substrato não dissolvido

Esse fenômeno ocorre devido ao crescimento das cadeias supramoleculares. Com a irradiação, a viscosidade aumenta porque há uma maior disponibilidade de catião flavílio para complexar, a rede de complexos homoternários cresce, o que causa uma reorganização dos compostos em solução, aumentando a viscosidade, o que pode ser observado macroscopicamente e medido por reologia.

4.4 Viscoelasticidade

Para o estudo reológico, o hidrogel foi preparado a pH=1, conforme mostrado na Figura 4.7. A ideia inicial era preparar uma suspensão de chalcona e CB[8] em água com pH igual ao pK_a , de modo que a fração molar da chalcona e do flavílio fosse semelhante, e a irradiação levasse a um excesso de flavílio e consequentemente a um aumento da viscosidade, que no escuro voltaria termicamente ao estado inicial. No entanto, a baixa solubilidade da chalcona e a diferença de pK_a entre o composto livre ($pK_a=1,9$) e o complexo ($pK_a=4,8$) dificultaram a formação do hidrogel fotoreológico.

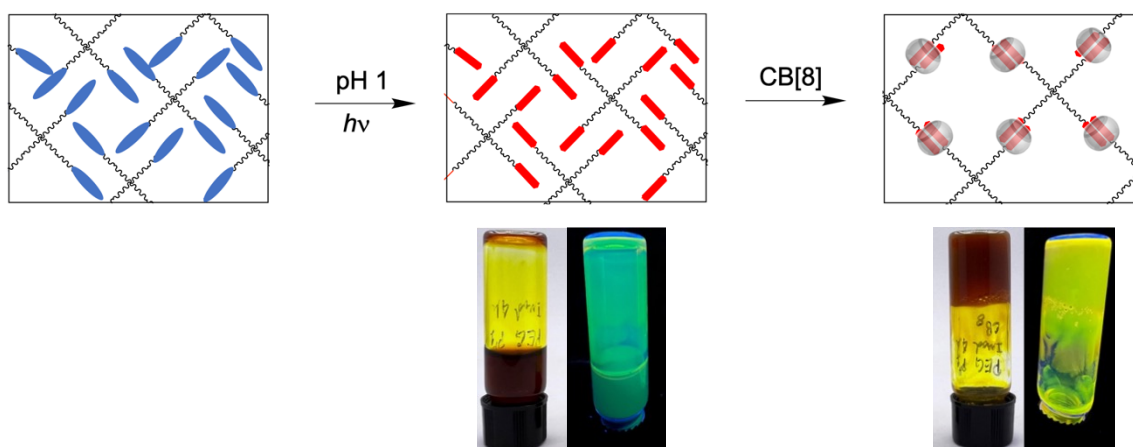


Figura 4.7. Preparação do hidrogel a pH=1 de 4-arm PEG/CB[8] (1:4, 4% w/w).

Nessas condições, foi possível realizar medições do fluido tanto sem o CB[8] quanto com o CB[8] (que forma o hidrogel), obtendo os valores dos extremos (menor e maior viscosidade). No entanto, não foi possível acompanhar a formação do complexo nem a recuperação térmica da chalcona por reologia.

4.4.1 Curvas de viscosidade em função da taxa de corte e da tensão de corte

Relativamente às medidas oscilatórias, para baixos valores de frequência angular os $G'' > G'$, o que indica que o composto tem um comportamento do tipo líquido viscoelástico. Porém, para maiores valores de frequência angular há um cruzamento entre os módulos e a partir desse ponto de cruzamento, composto apresenta um comportamento relativamente comum a um sólido viscoelástico (ou seja, a um gel), uma vez que com o aumento da frequência angular o $G' > G''$. Em baixas frequências angulares, quando G' é menor que G'' , o composto se comporta como um líquido viscoelástico. Porém, em frequências mais altas, ocorre um ponto de cruzamento onde G' ultrapassa G'' , indicando uma transição para um sólido viscoelástico ou comportamento semelhante a gel.

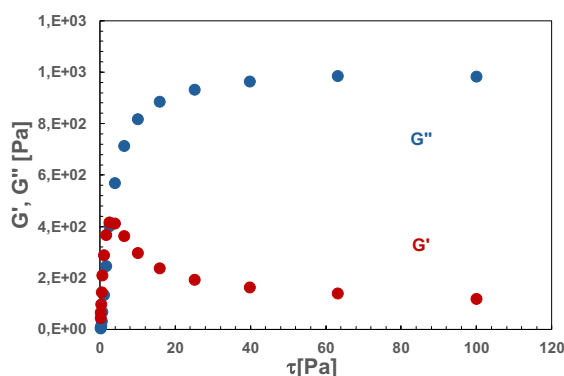


Figura 4.8. Varrimento de tensão do hidrogel (4% m/m) a 25°C com razão molar 1:4 (4-armPEG-AH⁺/CB[8]).

As medições de viscosidade mostram uma diminuição com o aumento da taxa de cisalhamento, o que indica alterações estruturais que podem ser entendidas com uma variação da estequiometria do complexo, Figura 4.9b. Sob maior tensão de cisalhamento, as partículas se reorganizam, criando espaços maiores para o fluxo, levando ao aumento da viscosidade e da resistência ao fluxo, Figura 4.9a. Para o substrato isolado (Figuras 4.9c e 4.9d), não foi observado o mesmo comportamento, o que demonstra claramente que a adição de CB[8] e a consequente formação do sistema supramolecular que permite o controle das propriedades reológicas. Isso sugere que a presença do CB8 induz a reorganização das partículas e a formação de uma estrutura que modifica significativamente a viscosidade e a resistência ao fluxo do sistema.

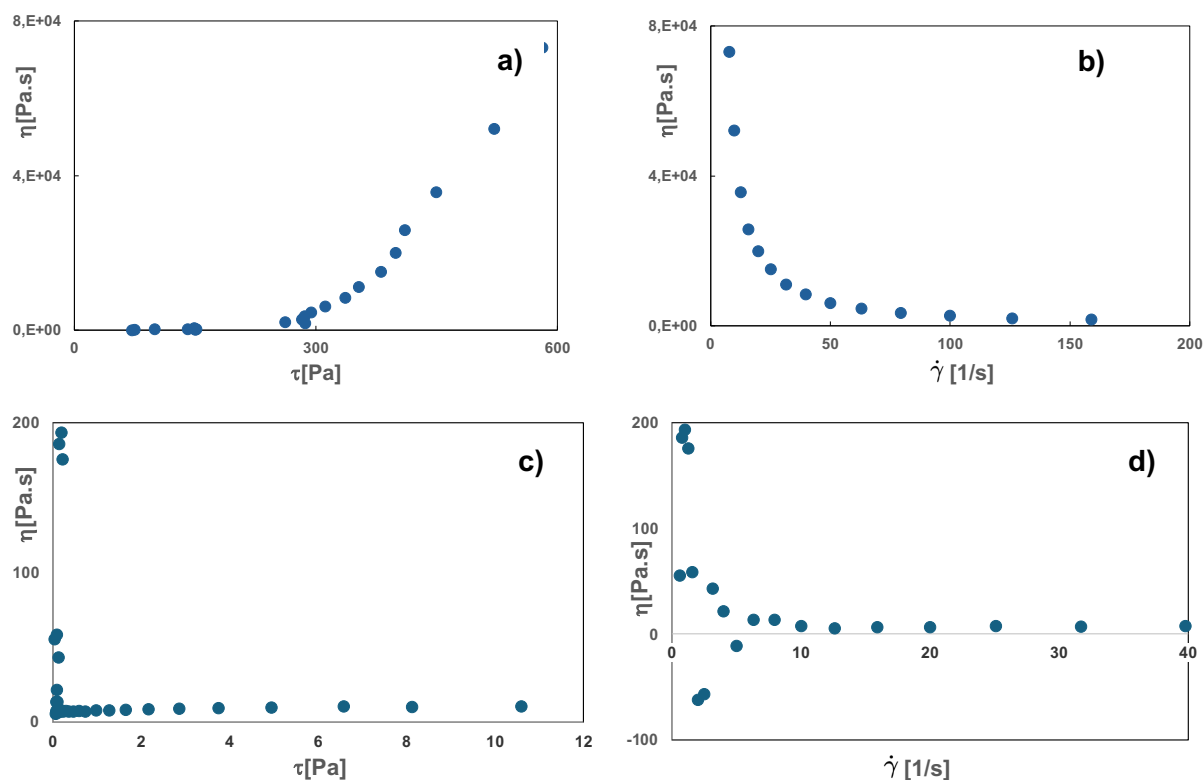


Figura 4.9. Curva de escoamento a 25°C: **a e b)** Do hidrogel (4% m/m) com razão molar 1:4 (4-armPEG-AH⁺/CB[8]): **a)** Viscosidade versus tensão. **b)** viscosidade versus deformação. **c e d)** Do substrato isolado a pH=1 (4-armPEG-AH⁺): **c)** Viscosidade versus tensão. **d)** viscosidade versus deformação.

4.5 Conclusões

Este estudo demonstrou a viabilidade de controlar as propriedades reológicas de um fluido usando estímulos de luz num sistema fotoreológico supramolecular. A síntese meticulosa do composto fotoresponsivo, juntamente com a análise termodinâmica e fotoquímica detalhada, revelou uma interação estável entre os componentes. Embora desafios tenham sido enfrentados na formação do hidrogel fotoreológico devido à baixa solubilidade da chalcona e diferenças de pKa, as medidas reológicas destacaram a capacidade do composto de exibir comportamento viscoelástico de um gel em resposta a diferentes estímulos.

4.6 Metodologia experimental

Os solventes e produtos químicos utilizados para a síntese e preparação das amostras foram de grau analítico e utilizados como obtidos do fornecedor; água grau Millipore foi utilizada. Todos os reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e eram de grau analítico ($\geq 97\%$), incluindo aqueles utilizados na preparação das soluções tampão.

A purificação por cromatografia flash foi realizada com gel de sílica Carlo Erba de 40-60 μm , 60 Å. As análises elementares foram realizadas utilizando um instrumento da série Thermofinnigan Flash EA 1112, com um erro de $\pm 0,4\%$. Os espectros de massa foram obtidos num Orbitrap XLTM LTL (ESI-MS) controlado por LTQ Tune Plus 2.5.5 e Xcalibur 2.1.0.

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrômetro Bruker Advance III 400 (400 MHz para ^1H , 100 MHz para ^{13}C) a 298 K. As atribuições de RMN foram realizadas com base nos espectros de RMN 1D (^1H , ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC).

4.6.1 Estudos termodinâmicos

Os saltos de pH foram realizados adicionando 1 mL da solução aquosa estoque a $\text{pH} \leq 1$ a uma cuvette de quartzo de 3 mL contendo tampão universal de Theorell e Stenhagen (1 mL) no pH final desejado. O pH final das soluções foi medido num medidor de pH básico Crison 20+. Medidas espectroscópicas foram realizadas usando água Milli-Q e metanol grau HPLC, com temperatura constante de 20 ± 1 °C, com espectrofotômetros Varian-Cary 100 Bio ou Varian-Cary 5000. Os experimentos de fluxo interrompido foram realizados num espectrômetro de fluxo interrompido Applied Photophysics SX20 fornecido com um detector de matriz de fotodiodo PDA.1/UV.

4.6.2 Estudos fotoquímicos

Os estudos fotoquímicos foram realizados com irradiação a 365 nm, seguidos por UV-Vis. Da mistura aquosa mistura 4-armPEG-Ct ($7,3 \times 10^{-6}$ M) e CB[8] ($2,7 \times 10^{-5}$ M) em água a $\text{pH}=4,8$. As irradiações foram feitas em cuvetes de quartzo de 3 mL com 1 cm de percurso ótico. As soluções foram irradiadas a 365 nm com uma lâmpada de xenônio e mercúrio de 200 W, controlada por uma unidade Newport 69,907, e usando um filtro de passagem de banda Semrock-MaxLampTM para isolar o comprimento de onda de 365 nm, até que o estado fotossaturado fosse alcançado. A recuperação termodinâmica no escuro foi acompanhada UV-Vis.

4.6.3 Síntese do tetra(*trans*-chalcona 7-metoxi-4'-O-metileno-triazol)PEG (4-armPEG-Ct)

A rota sintética apresentada na Figura 4.10 foi adaptado de Zou e Webber[77] e Han[78]. **Primeira etapa**, num balão de fundo redondo equipado com um agitador magnético foi adicionado 1 eq de 4-armPEG-OH e 39 eq de TEA foram dissolvidos em DCM, a solução foi arrefecida a 0°C num banho de gelo. De seguida foi adicionado 39 eq de MsCl . A mistura de reação foi agitada durante 48 horas à temperatura ambiente. Depois deste tempo, a mistura reacional foi diluída em DCM e lavada com salmoura três vezes. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada em baixa pressão. Depois de concentrada a solução foi precipitada em éter etílico arrefecido. Filtrou-se um pó branco (4-armPEG-OMs; 74% de rendimento). **Segunda etapa**, 1 eq de 4-armPEG-OMs e 42 eq de NaN_3 foram dissolvidos em DMF. A mistura reacional foi agitada durante 72 horas. Depois deste tempo foi

diluída em DCM e lavada com salmoura três vezes. A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro e concentrada, depois fez-se precipitar em éter dietílico frio. Depois de filtrado e seco obteve-se um pó branco (4-armPEG- N_3 ; rendimento de 85%). **Terceira etapa**, 1 eq de 4-hidroxiacetofenona e 1 eq de K_2CO_3 foram dissolvidos em DMF, de seguida foi adicionado 1,6 eq de propargilbrometo. Deixou-se a reagir durante a noite, de seguida a mistura reacional foi dissolvida em água e filtrou-se um pó esbranquiçado (propargilacetofenona; 83% de rendimento). **Quarta etapa**, em meio ácido ($\text{HOAc}/\text{H}_2\text{SO}_4$; 8:2), 1 eq de propargilacetofenona e 1 eq de 4-metoxisalicilaldeído foram dissolvidos e deixou-se a mistura reacional durante a noite em agitação a temperatura ambiente. Depois foi adicionado éter etílico para precipitar o catião flavílio (94% de rendimento). Em solução aquosa com pH c.a. de 4 o catião flavílio foi convertido em chalcona. De seguida foi feita a extração do produto com AcOEt (3 x 100mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio. A purificação foi conseguida por cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com uma mistura de n-hexano/AcOEt na proporção de 6/4. Após a concentração e secagem das frações, obteve-se um pó amarelo (propargil-chalcona, 40% de rendimento). **Etapa final**, condensação de de 4-armPEG- N_3 com propargil-chalcona por uma reação clique. Foram dissolvidos 1 eq de 4-armPEG- N_3 , 6 eq de propargil-chalcona, 0,4 eq de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 6 eq PMDETA em DMF. Depois da adição de DMF foram feitos 3 ciclos de vácuo/nitrogénio e por fim 4 eq de ascorbato de sódio foram adicionados. A mistura de reação foi agitada por 72 horas a 55°C . Depois deste tempo, a mistura reacional foi diluída em diclorometano e purificada numa pequena coluna Al_2O_3 neutra eluída com diclorometano. As frações recolhidas foram comncentradas e o DMF foi removido por destilação sob vácuo. O resíduo obtido foi dissolvido em diclorometano e precipitado com éter etílico em banho de nitrogénio líquido, foi filtrado um pó amarelo-esverdeado (4armPEG-Ct; 50% de rendimento).

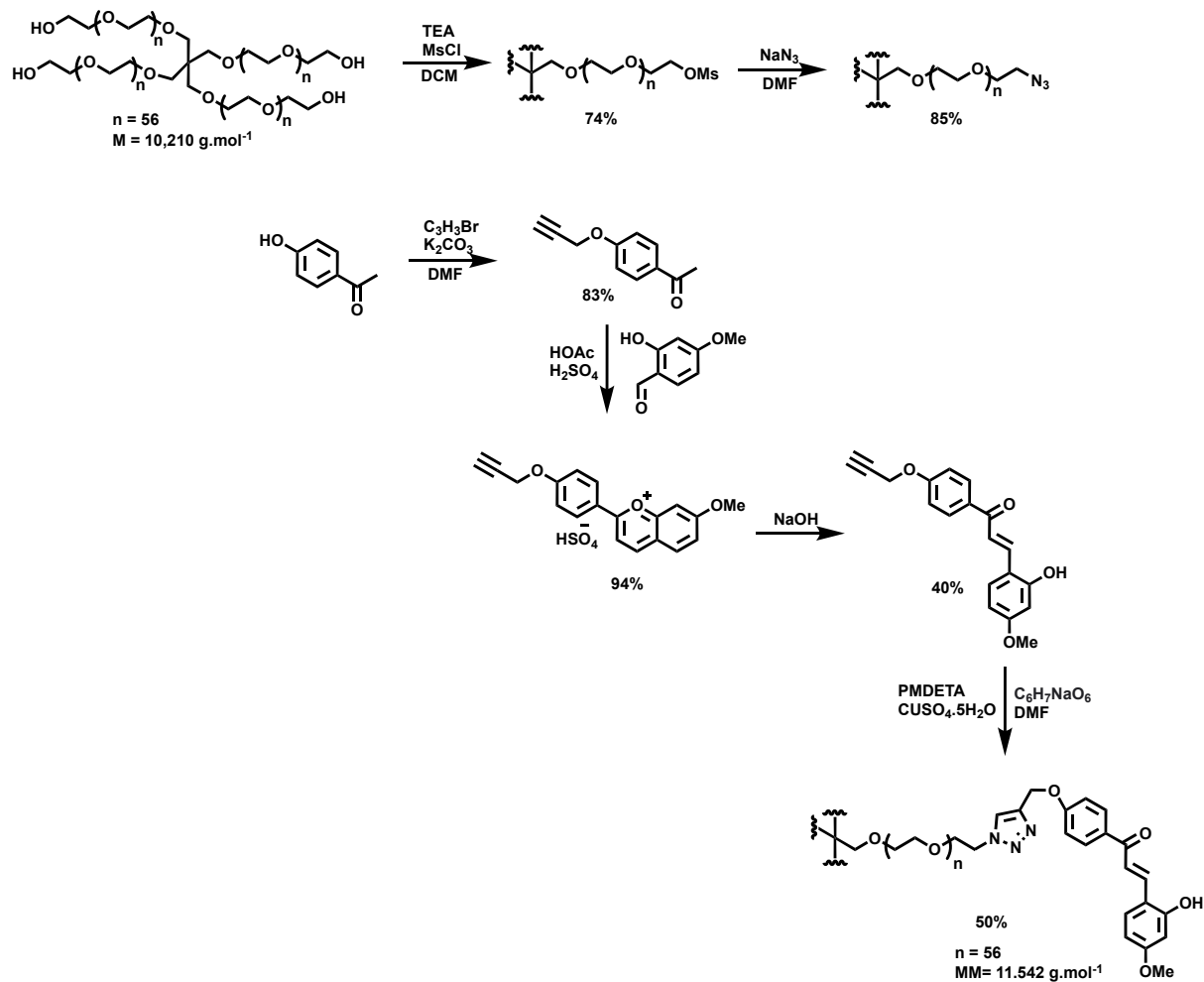


Figura 4.10. Rota seguida para a derivatização de 4armPEG-OH.

4.6.4 Viscoelasticidade

As medições reológicas foram realizadas num reómetro controlado por tensão TA Instruments AR500, usando uma geometria padrão de placa-placa, com diâmetro de 20 mm, gap de 500 μm , frequência de 1 Hz e a temperatura de 25°C.

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos cinéticos e termodinâmicos da rede de equilíbrio de espécies dependentes do pH geradas por três tipos de derivados de 2-fenil-1-benzopirílio levaram as seguintes conclusões gerais. Em primeiro lugar, a glicosilação da malvidina mostrou que existe uma gama de pH em que o equilíbrio não chega a ser alcançado porque a velocidade de degradação é superior à velocidade com que se atingiria o equilíbrio. Com uma taxa de degradação relativa aglicona>diglucósido>monoglucósido. Conhecimento importante para o desenvolvimento de estratégias de proteção que visem estabilizar as antocianinas em solução aquosa. Para estudos futuros, é sugerido explorar o efeito da posição da glucose na molécula para entender melhor como o substituinte influencia a estabilidade e o equilíbrio das espécies. Essa análise mais detalhada fornecer uma percepção valiosa para o desenvolvimento de métodos mais eficazes de estabilização de antocianinas, tanto para aplicações industriais quanto para potencial aplicação em saúde e nutrição.

Os estudos sobre os derivados de 2-piridil-1-benzopirílio (a substituição do grupo fenilo pela piridina na posição 2) resulta na ausência do catião flavílio mesmo em soluções superácidas devido à protonação da piridina. Esta barreira de formação do catião flavílio nas piridinochalconas é superada com a introdução do substituinte dietilamino na posição 7 da piridinochalcona. A posição do átomo de nitrogénio no anel B é um fator crucial para a reatividade do multiestado. A presença de um átomo de nitrogénio nas posições 3' ou 4' das piridinochalconas permitiu a obtenção de um multiestado comum das antocianinas composto pelas espécies esperadas B, Cc e Ct e respectivas formas protonadas. No entanto, a presença do átomo de nitrogénio na posição 2' resulta na formação de dois novos compostos. Os derivados de 2-piridil-1-benzopirílio que não formam o catião flavílio apresentam uma estabilidade do hemiacetal (espécie quiral) em sistemas fotocromicos (em solução alcoólica). Este conhecimento abre novas perspectivas para a exploração de química assimétrica, permitindo um controle seletivo de suas propriedades por meio da irradiação. Assim, este tipo de investigação contribui não apenas para o avanço do conhecimento fundamental, mas também para o desenvolvimento de aplicações práticas em áreas como a medicina e a química orgânica.

O estudo sobre fotoreologia começou com a síntese de um composto fotoresponsivo, seguido por uma análise detalhada de suas propriedades termodinâmicas e fotoquímicas. Esta análise revelou uma interação supramolecular reversível entre os compostos envolvidos no sistema supramolecular (um complexo homoternário constituído por 2 flavílios e 1 CB[8]), permitindo a preparação de um hidrogel.

As medidas reológicas demonstraram o comportamento viscoelástico característico de um hidrogel. Essa abordagem promissora abre novas perspectivas para o desenvolvimento de fluidos fotoreológicos, baseados neste tipo de corantes e recetores. Para estudos futuros, a primeira sugestão é aprimorar a solubilidade do substrato em soluções concentradas, sem comprometer sua afinidade com o recetor. Além disso, é importante obter medidas reológicas durante a irradiação para a formação do hidrogel e durante a recuperação térmica. Essas medidas adicionais podem fornecer uma compreensão mais completa do comportamento do sistema e ajudar a otimizar as condições de preparação e uso dos hidrogéis fotoreológicos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Cruz, N. Basílio, N. Mateus, V. de Freitas, and F. Pina, 'Natural and Synthetic Flavylum-Based Dyes: The Chemistry Behind the Color', *Chem Rev*, pp. 1416–1481, 2022, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00399.
- [2] R. L. Jackman, R. Y. Yada, M. A. Tung, and R. A. Speers, 'Anthocyanins as food colorants – A review', *J Food Biochem*, pp. 201–247, 1987, doi: 10.1111/j.1745-4514.1987.tb00123.x.
- [3] F. Pina, M. J. Melo, C. A. T. Laia, A. J. Parola, and J. C. Lima, 'Chemistry and applications of flavylum compounds: A handful of colours', *Chem Soc Rev*, pp. 869–908, 2012, doi: 10.1039/c1cs15126f.
- [4] F. Pina, M. Maestri, and V. Balzani, 'Photochromic flavylum compounds as multistate/multifunction molecular-level systems', *Chemical Communications*, pp. 107–114, 1999, doi: 10.1039/a805522j.
- [5] R. Gavara, V. Petrov, and F. Pina, 'Characterization of the 4'-hydroxynaphthoflavylum network of chemical reactions', *Photochemical and Photobiological Sciences*, pp. 298–303, 2010, doi: 10.1039/b9pp00035f.
- [6] P. Bridle and C. F. Timberlake, 'Anthocyanins as natural food colours—selected aspects', *Food Chem*, pp. 103–109, 1997, doi: 10.1016/S0308-8146(96)00222-1.
- [7] F. Pina, M. J. Melo, M. Maestri, P. Passaniti, N. Camaioni, and V. Balzani, 'Photo- and pH-induced transformations of flavylum cation: "Write-lock- read-unlock-erase" cycles', *European J Org Chem*, pp. 3199–3207, 1999, doi: 10.1002/(sici)1099-0690(199911)1999:11<3199::aid-ejoc3199>3.0.co;2-x.
- [8] J. Mendoza, N. Basílio, V. De Freitas, and F. Pina, 'New Procedure to Calculate All Equilibrium Constants in Flavylum Compounds: Application to the Copigmentation of Anthocyanins', *ACS Omega*, pp. 12058–12070, 2019, doi: 10.1021/acsomega.9b01066.
- [9] R. Brouillard and J.-E. Dubois, 'Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media', *J Am Chem Soc*, pp. 1359–1364, 1977, doi: 10.1021/ja00447a012.
- [10] A. L. Maçanita, P. F. Moreira, J. C. Lima, F. H. Quina, C. Yihwa, and C. Vautier-Giongo, 'Proton transfer in anthocyanins and related flavylum salts. Determination of ground-state rate constants with nanosecond laser flash photolysis', *Journal of Physical Chemistry A*, pp. 1248–1255, 2002, doi: 10.1021/jp0140421.
- [11] D. Sousa, N. Basílio, J. Oliveira, V. de Freitas, and F. Pina, 'A New Insight into the Degradation of Anthocyanins: Reversible versus the Irreversible Chemical Processes', *J Agric Food Chem*, pp. 656–668, 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.1c06521.

- [12] A. Seco *et al.*, 'Intermolecular Copigmentation between Delphinidin 3- O-Glucoside and Chlorogenic Acid: Taking into Account the Existence of Neutral and Negatively Charged Forms of the Copigment', *J Agric Food Chem*, pp. 11391–11400, 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.2c03879.
- [13] A. Camuenho, A. Seco, A. J. Parola, N. Basílio, and F. Pina, 'Intermolecular Copigmentation of Malvidin-3- O -glucoside with Caffeine in Water: The Effect of the Copigment on the pH-Dependent Reversible and Irreversible Processes', *ACS Omega*, pp. 25502–25509, 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c02571.
- [14] C. Bulow and H. Wagner, 'On derivatives of 1,4-benzopyranol, the parent substance of a new class of dyes. II.', *Ber. Dtsh. Chem. Ges.*, pp. 1782–1804, 1901, doi: 10.1002/cber.19010340277.
- [15] R. Willstätter and A. E. Everest, 'Studies on the Anthocyanins', *Justus liebig's Ann. Chem*, pp. 189–232, 1913, doi: 10.1002/jlac.19134010205.
- [16] A. Robertson and R. Robinson, 'CCXXV.—Experiments on the synthesis of anthocyanins. Part I', *J. Chem. Soc.*, pp. 1713–1720, 1926, doi: 10.1039/JR9262901713.
- [17] D. D. Pratt and R. Robinson, 'CLXXXVIII.—A synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type', *J. Chem. Soc., Trans.*, pp. 1577–1585, 1922, doi: 10.1039/CT9222101577.
- [18] D. W. Hill, 'The Synthesis and Structure of Benzopyrylium (Chromylium) Salts.', *Chem Rev*, pp. 27–54, 1936, doi: 10.1021/cr60062a002.
- [19] L. Jurd, 'Anthocyanins and Related Compounds. I. Structural Transformations of Flavylum Salts in Acidic Solutions', *J Org Chem*, pp. 987–991, 1963, doi: 10.1021/jo01039a027.
- [20] V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo, and J. F. Stoddart, 'Artificial Molecular Machines', *Angewandte Chemie*, pp. 3348–3391, 2000, doi: 10.1002/1521-3773(20001002)39:19<3348::AID-ANIE3348>3.0.CO;2-X.
- [21] C. L. Bird and A. T. Kuhn, 'Electrochemistry of the viologens', *Chem Soc Rev*, p. 49, 1981, doi: 10.1039/cs9811000049.
- [22] H. Cruz, N. Jordão, P. Amorim, M. Dionísio, and L. C. Branco, 'Deep Eutectic Solvents as Suitable Electrolytes for Electrochromic Devices', *ACS Sustain Chem Eng*, pp. 2240–2249, 2018, doi: 10.1021/acssuschemeng.7b03684.
- [23] N. Jordão, H. Cruz, A. Branco, F. Pina, and L. C. Branco, 'Bis(bipyridinium) Salts as Multicolored Electrochromic Devices', *Chempluschem*, pp. 1211–1217, 2017, doi: 10.1002/cplu.201700229.
- [24] C. A. Nijhuis, B. J. Ravoo, J. Huskens, and D. N. Reinhoudt, 'Electrochemically controlled supramolecular systems', *Coord Chem Rev*, pp. 1761–1780, 2007, doi: 10.1016/j.ccr.2007.02.001.
- [25] A. Salmon and P. Jutzi, 'Water soluble ferrocenyl and polyferrocenyl compounds: synthesis and electrochemistry', *J Organomet Chem*, pp. 595–608, 2001, doi: 10.1016/S0022-328X(01)00959-7.

- [26] Y. Hirshberg, 'Reversible Formation and Eradication of Colors by Irradiation at Low Temperatures. A Photochemical Memory Model', *J Am Chem Soc*, pp. 2304–2312, 1956, doi: 10.1021/ja01591a075.
- [27] H. Bouas-Laurent and H. Dürr, 'Organic photochromism (IUPAC Technical Report)', 2001.
- [28] A. L. Pinto *et al.*, 'Dye-sensitized solar cells based on dimethylamino- π -bridge-pyranoanthocyanin dyes', *Solar Energy*, pp. 188–199, 2020, doi: 10.1016/j.solener.2020.05.101.
- [29] X. Zhang, Y. Liu, H. Yong, Y. Qin, J. Liu, and J. Liu, 'Development of multifunctional food packaging films based on chitosan, TiO₂ nanoparticles and anthocyanin-rich black plum peel extract', *Food Hydrocoll*, pp. 80–92, 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.03.009.
- [30] H. Yong, X. Wang, X. Zhang, Y. Liu, Y. Qin, and J. Liu, 'Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film', *Food Hydrocoll*, pp. 93–104, 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.03.012.
- [31] D. Amić, D. Davidović-Amić, D. Bešlo, B. Lučić, and N. Trinajstić, 'QSAR of Flavylium Salts as Inhibitors of Xanthine Oxidase', *J Chem Inf Comput Sci*, pp. 815–818, 1998, doi: 10.1021/ci980002r.
- [32] J. Avó, 'Photochemical Control of Rheology', *Thesis*, 2014, https://run.unl.pt/bitstream/10362/14065/1/Avo_2014.pdf
- [33] F. Galindo, J. C. Lima, S. V. Luis, M. J. Melo, A. J. Parola, and F. Pina, 'Water/humidity and ammonia sensor, based on a polymer hydrogel matrix containing a fluorescent flavylium compound', *J Mater Chem*, p. 2840, 2005, doi: 10.1039/b500512d.
- [34] F. Pina and T. A. Hatton, 'Photochromic soft materials: Flavylium compounds incorporated into pluronic F-127 hydrogel matrixes', *Langmuir*, pp. 2356–2364, 2008, doi: 10.1021/la702733d.
- [35] J. Avó, L. Cunha-Silva, J. C. Lima, and A. Jorge Parola, 'Design and synthesis of photoactive ionic liquids', *Org Lett*, pp. 2582–2585, 2014, doi: 10.1021/ol501111d.
- [36] P. Ferreira *et al.*, 'A Visible–Near-Infrared Light-Responsive Host–Guest Pair with Nanomolar Affinity in Water', *Chemistry - A European Journal*, pp. 3477–3482, 2019, doi: 10.1002/chem.201806105.
- [37] S. Gago, N. Basílio, A. Fernandes, V. Freitas, A. Quintas, and F. Pina, 'Photochromism of the complex between 4'-(2-hydroxyethoxy)-7-hydroxyflavylium and β -cyclodextrin, studied by ¹H NMR, UV-Vis, continuous irradiation and circular dichroism', *Dyes and Pigments*, pp. 106–112, 2014, doi: 10.1016/j.dyepig.2014.04.038.
- [38] M. C. Moncada *et al.*, 'Multistate properties of 7-(N,N-diethylamino)-4'-hydroxyflavylium. An example of an unidirectional reaction cycle driven by pH.', *Org Biomol Chem*, pp. 2802–2808, 2004, doi: 10.1039/B409260K.
- [39] A. Camuenho *et al.*, 'A model compound for pyridinechalcone-based multistate systems. Ring opening-closure as the slowest kinetic step of the multistate', *New Journal of Chemistry*, pp. 18229–18239, 2019, doi: 10.1039/c9nj04776j.

- [40] A. Roque, F. Pina, S. Alves, R. Ballardini, M. Maestri, and V. Balzani, 'Micelle effect on the "write-lock-read-unlock-erase" cycle of 4'-hydroxyflavylium ion', *J. Mater. Chem.*, pp. 2265–2269, 1999, doi: 10.1039/A902805F.
- [41] F. Pina, M. J. Melo, M. Maestri, R. Ballardini, and V. Balzani, 'Photochromism of 4'-Methoxyflavylium Perchlorate. A "Write-Lock-Read-Unlock-Erase" Molecular Switching System', *J. Am. Chem. Soc.*, pp. 5556–5561, 1997, doi: 10.1021/ja9704646.
- [42] N. Mishima and K. Ishii, 'Robustness evaluation of a miniaturized machine tool', in *Proceedings of the ASME Design Engineering Technical Conference*, American Society of Mechanical Engineers (ASME), pp. 503–510, 1999, doi: 10.1115/DETC99/DAC-8579.
- [43] A. B. Frazier, R. O. Warrington, and C. Friedrich, 'The miniaturization technologies: past, present, and future', *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, pp. 423–430, 1995, doi: 10.1109/41.464603.
- [44] V. Balzani, 'Photochemical molecular devices', *Photochemical & Photobiological Sciences*, pp. 459–476, 2003, doi: 10.1039/b300075n.
- [45] J.-M. Lehn, 'Supramolecular chemistry', *Science*, pp. 1762–1783, 1993, doi: 10.1126/science.8511582.
- [46] J.-M. Lehn, *Química supramolecular : conceitos e perspectivas*. IST Press, 2007.
- [47] J. M. Lehn, 'Supramolecular chemistry: From molecular information towards self-organization and complex matter', *Reports on Progress in Physics*, pp. 249–265, 2004, doi: 10.1088/0034-4885/67/3/R02.
- [48] J. W. S. Steed and J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, 3rd ed. Wiley, 2000.
- [49] X. Zhang and D. G. Whitten, 'Preface to the Supramolecular Chemistry at Interfaces Special Issue', *Langmuir*, pp. 1245–1245, 2011, doi: 10.1021/la104879j.
- [50] T. F. A. de Greef and E. W. Meijer, 'Supramolecular polymers', *Nature*, pp. 171–173, 2008, doi: 10.1038/453171a.
- [51] I. V. Kolesnichenko and E. V. Anslyn, 'Practical applications of supramolecular chemistry', *Chem Soc Rev*, pp. 2385–2390, 2017, doi: 10.1039/C7CS00078B.
- [52] R. Ballardini, V. Balzani, A. Credi, M. T. Gandolfi, and M. Venturi, 'Artificial molecular-level machines with [Ru(bpy)₃]²⁺ as a "light-fueled motor"', *International Journal of Photoenergy*, pp. 63–77, 2001, doi: 10.1155/S1110662X01000083.
- [53] T. F. A. De Greef, M. M. J. Smulders, M. Wolffs, A. P. H. J. Schenning, R. P. Sijbesma, and E. W. Meijer, 'Supramolecular Polymerization', *Chem Rev*, pp. 5687–5754, 2009, doi: 10.1021/cr900181u.
- [54] L. Brunsveld, B. J. B. Folmer, E. W. Meijer, and R. P. Sijbesma, 'Supramolecular Polymers', *Chem Rev*, pp. 4071–4098, 2001, doi: 10.1021/cr990125q.
- [55] M. A. Romero, R. J. Fernandes, A. J. Moro, N. Basílio, and U. Pischel, 'Light-induced cargo release from a cucurbit[8]uril host by means of a sequential logic operation', *Chemical Communications*, pp. 13335–13338, 2018, doi: 10.1039/c8cc07404f.

- [56] H. Yang, B. Yuan, X. Zhang, and O. A. Scherman, 'Supramolecular chemistry at interfaces: Host-guest interactions for fabricating multifunctional biointerfaces', *Angew. Chem. Int.*, pp. 2106–2115, 2014, doi: 10.1021/ar500105t.
- [57] N. Basílio, A. Fernandes, V. de Freitas, S. Gago, and F. Pina, 'Effect of β -cyclodextrin on the chemistry of 3',4',7-trihydroxyflavylium', *New Journal of Chemistry*, p. 3166, 2013, doi: 10.1039/c3nj00588g.
- [58] S. Gago, N. Basílio, A. Quintas, and F. Pina, 'Effect of β -Cyclodextrin on the Multistate Species Distribution of 3-Methoxy-4',7-dihydroxyflavylium. Discrimination of the Two Hemiketal Enantiomers', *J Agric Food Chem*, pp. 6346–6358, 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.6b04892.
- [59] M. J. Webber, 'Reversible hydrogel dynamics by physical – chemical crosslink photoswitching using a supramolecular macrocycle template †', *Chemical Communications*, pp. 9931–9934, 2019, doi: 10.1039/C9CC04748D.
- [60] Z. Duan and S. Hou, 'Rheological properties of fresh recycled concrete', *Multi-functional Concrete with Recycled Aggregates*, pp. 59–83, 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-89838-6.00011-6.
- [61] A. H. Barnes, J. F. Hutton, and K. Walters, *An Introduction to Rheology*. Elsevier, 1989.
- [62] P. K. Kundu, I. M. Cohen, and D. R. Dowling, *Fluid mechanics*, 6th ed. Academic Press, 2015.
- [63] H. Herrada-Manchón, M. A. Fernández, and E. Aguilar, 'Essential Guide to Hydrogel Rheology in Extrusion 3D Printing: How to Measure It and Why It Matters?', *Gels*, p. 517, 2023, doi: 10.3390/gels9070517.
- [64] G. Zeng, Y. Zhu, and W. Chen, 'A Brief Review of Micro-Particle Slurry Rheological Behavior in Grinding and Flotation for Enhancing Fine Mineral Processing Efficiency', *Minerals*, p. 792, 2023, doi: 10.3390/min13060792.
- [65] A. M. Ketner, R. Kumar, T. S. Davies, P. W. Elder, and S. R. Raghavan, 'A simple class of photorheological fluids: Surfactant solutions with viscosity tunable by light', *J Am Chem Soc*, pp. 1553–1559, 2007, doi: 10.1021/ja065053g.
- [66] Y. Guo *et al.*, 'Additives-induced smart micelles and photorheological response in the cationic surfactant solutions', *J Mol Struct*, pp. 662–670, 2019, doi: 10.1016/j.molstruc.2018.08.089.
- [67] V. Testa *et al.*, 'Effect of Surfactants on the Binding Properties of a Molecularly Imprinted Polymer', *Polymers*, pp. 5210, 2022, doi: 10.3390/polym14235210.
- [68] S. Aikawa *et al.*, 'Photorheological response of aqueous wormlike micelles with photocleavable surfactant', *Langmuir*, pp. 5668–5676, 2013, doi: 10.1021/la4001939.
- [69] S. L. Gilat, S. H. Kawai, and J.-M. Lehn, 'Light-triggered electrical and optical switching devices', *J Chem Soc Chem Commun*, p. 1439, 1993, doi: 10.1039/c39930001439.
- [70] S. M. Mantooth, B. G. Munoz-Robles, and M. J. Webber, 'Dynamic Hydrogels from Host–Guest Supramolecular Interactions', *Macromol Biosci*, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1002/mabi.201800281.

- [71] Y. Leydet, A. Jorge Parola, and F. Pina, 'Hydroxypyridinechromene and pyridinechalcone: Two coupled photochrom systems', *Chemistry - A European Journal*, pp. 545–555, 2010, doi: 10.1002/chem.200901884.
- [72] F. Pina, 'Thermodynamics and Kinetics of Flavylum Salts - Malvin Revisited', *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, pp. 2109–2116, 1998, doi: 10.1039/A802602E.
- [73] F. Pina, 'Anthocyanins and related compounds. Detecting the change of regime between rate control by hydration or by tautomerization', *Dyes and Pigments*, pp. 308–314, 2014, doi: 10.1016/j.dyepig.2013.10.033.
- [74] R. A. McClelland and S. Gedge, 'Hydration of the flavylum ion', *J Am Chem Soc*, pp. 5838–5848, 1980, doi: 10.1021/ja00538a024.
- [75] R. A. McClelland and G. H. McGall, 'Hydration of the flavylum ion. 2. The 4'-hydroxyflavylum ion', *J Org Chem*, pp. 3730–3736, 1982, doi: 10.1021/jo00140a027.
- [76] A. Camuenho, A. Jorge Parola, A. Alejo-Armijo, C. S. B. Gomes, C. A. T. Laia, and F. Pina, 'Thermal and photochemical reactions of n-pyridinebenzopyrylium multistate of species (n = 2',3',4'). Exploring the synthetic potentialities from the unique reactivity of position 2'', *J Photochem Photobiol A Chem*, p. 114658, 2023, doi: 10.1016/j.jphotochem.2023.114658.
- [77] L. Zou and M. J. Webber, 'Reversible hydrogel dynamics by physical–chemical crosslink photoswitching using a supramolecular macrocycle template', *Chemical Communications*, pp. 9931–9934, 2019, doi: 10.1039/C9CC04748D.
- [78] R. H. Hans *et al.*, 'Synthesis, antimalarial and antitubercular activity of acetylenic chalcones', *Bioorg Med Chem Lett*, pp. 942–944, 2010, doi: 10.1016/j.bmcl.2009.12.062.

APÊNDICE A

CONSTANTES ÁCIDAS

A.1 Deduções das constantes de equilíbrio

$$AH^+ + H_2O \rightleftharpoons A + H_3O^+ \quad K_a = \frac{[A][H_3O^+]}{[AH^+]} \quad \text{Eq. A1}$$

$$AH^+ + H_2O \rightleftharpoons B + H_3O^+ \quad K_h = \frac{[B][H_3O^+]}{[AH^+]} \quad \text{Eq. A2}$$

$$B \rightleftharpoons Cc \quad K_t = \frac{[Cc]}{[B]} \quad \text{Eq. A3}$$

$$Cc \rightleftharpoons Ct \quad K_i = \frac{[Ct]}{[Cc]} \quad \text{Eq. A4}$$

$$AH^+ + H_2O \rightleftharpoons CB + H_3O^+ \quad K'a = \frac{[CB][H_3O^+]}{[AH^+]} \quad \text{Eq. A5}$$

$$[CB] = [A] + [B] + [Cc] + [Ct]$$

$$K'a = \frac{([A] + [B] + [Cc] + [Ct])[H_3O^+]}{[AH^+]} \quad \text{Eq. A6}$$

$$K'a = \left(\frac{[A]}{[AH^+]} + \frac{[B]}{[AH^+]} + \frac{[Cc]}{[AH^+]} + \frac{[Ct]}{[AH^+]} \right) [H_3O^+] \quad \text{Eq. A7}$$

$$K'a = \left(\frac{K_a}{[H_3O^+]} + \frac{K_h}{[H_3O^+]} + \frac{K_h K_t}{[H_3O^+]} + \frac{K_h K_t K_i}{[H_3O^+]} \right) [H_3O^+] \quad \text{Eq. A8}$$

$$K'a = K_a + K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i \quad \text{Eq. A9}$$

A.2 Contantes no pseudoequilíbrio

$$[CB] = \frac{K'a[AH^+]}{[H_3O^+]} \quad \text{Eq. A10}$$

$$C_0 = [AH^+] + \frac{K'_a[AH^+]}{[H_3O^+]} \quad \text{Eq. A11}$$

$$C_0 = [AH^+](1 + \frac{K'_a}{[H_3O^+]}) \quad \text{Eq. A12}$$

$$\frac{C_0}{[AH^+]} = 1 + \frac{K'_a}{[H_3O^+]} \quad \text{Eq. A13}$$

$$\frac{[AH^+]}{C_0} = \frac{1}{1 + \frac{K'_a}{[H_3O^+]}} \quad \text{Eq. A14}$$

$$\frac{[AH^+]}{C_0} = \frac{[H_3O^+]}{[H_3O^+] + K'_a} \quad \text{Eq. A15}$$

$$X_{AH+} = \frac{[H_3O^+]}{[H_3O^+] + K'_a} \quad \text{Eq. A16}$$

$$X_{CB} = \frac{[CB]}{C_0} \quad \text{Eq. A17}$$

$$X_{CB} = \frac{\frac{K'_a[AH^+]}{[H_3O^+]}}{C_0} \quad \text{Eq. A18}$$

$$X_{CB} = \frac{K'_a}{[H_3O^+]} \frac{[AH^+]}{C_0} \quad \text{Eq. A19}$$

$$X_{CB} = \frac{K'_a}{[H_3O^+]} \frac{[H_3O^+]}{[H_3O^+] + K'_a} \quad \text{Eq. A20}$$

$$X_{CB} = \frac{K'_a}{[H_3O^+] + K'_a} \quad \text{Eq. A21}$$

EFEITO DA GLICOSILAÇÃO

Nota 1

A Eq. (1) é válida quando se considera o equilíbrio com as espécies monoaniônicas e a ausência de B⁻ conforme observado nos saltos inversos de pHs monitorizados por fluxo interrompido. No entanto, o domínio de pH de Cc⁻ tem uma sobreposição com a faixa de pH onde as bases quinoidais aniônicas são as únicas espécies reversíveis e, portanto, não é alcançado. Além disso, a representação da Eq. 1 versus pH usando valores hipotéticos $7 < pK_{Cc/Cc^-} < 9$ coincide com a Eq. 2.2 do texto principal em menos de 1%, justificando seu uso.

$$k_{hydration} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_a[H^+] + K_a K_{A/A^-}} k_h + \frac{[H^+]}{(1 + K_t)[H^+] + K_t K_{Cc/Cc^-}} k_{-h} [H^+] \quad \text{Eq. B1}$$

B.1 Assinaturas cinéticas e determinação das frações molares de todas as espécies em duas dimensões, pH e tempo.

Os saltos inversos de pHs monitorizados por fluxo interrompido permitem a definição das assinaturas cinéticas do hemicetal e da *cis*-chalcona, realizando saltos inversos de pHs a partir de soluções equilibradas ou pseudo-equilibradas em valores de pH mais altos de volta ao pH do catião flavílio ≤ 1 . A assinatura cinética da *trans*-chalcona requer o uso de um espectrofotômetro.

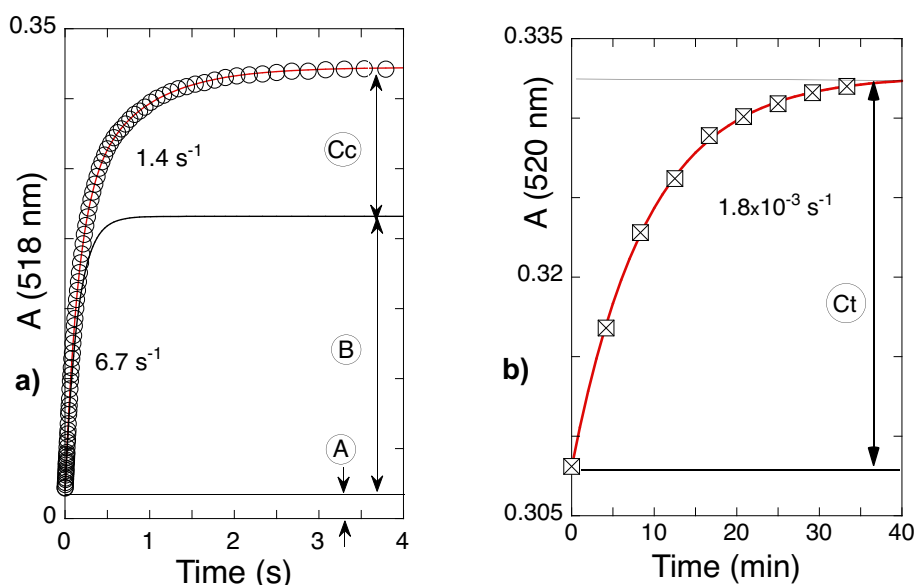


Figura B1.1. a) Traços de um salto inverso de pH de OENINA de pH=5.7 para pH=0.9; b) o mesmo seguido por um espectrofotômetro. Erro estimado de 10%.

Um salto inverso de pH de OENINA de pH=5,1 para pH=0,9 é mostrado na Figura A1. A assinatura cinética para esta concentração de ácido é de $6,6 \text{ s}^{-1}$ e $1,4 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, para a conversão de hemicetal e *cis*-chalcona em catião flavílio. Outro salto inverso de pH a partir do mesmo pH inicial foi monitorizado por um espectrofotômetro. A amplitude inicial corresponde a toda a base quinoidal, hemicetal e *cis*-chalcona presentes a pH=5,7 antes do salto inverso de pH, e a amplitude do traço corresponde à fração de *trans*-chalcona e a assinatura cinética é de $1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Este procedimento poderia ser estendido a toda a faixa de pH e poderia fornecer a fração molar de todas as espécies em duas dimensões, pH e tempo (realizando os saltos inversos de pHs várias vezes).

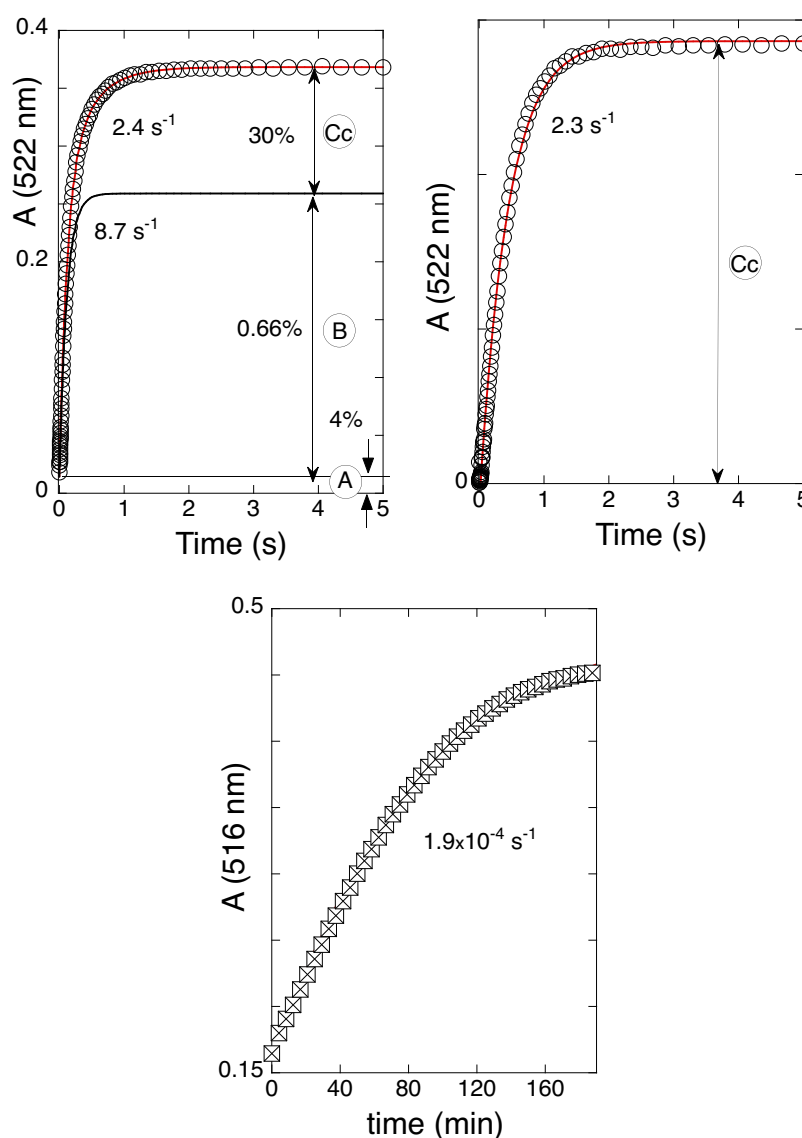


Figura B1.2. a) Saltos inversos de pHs a partir de soluções pseudo-equilibradas a pH=4,2 para [HCl]=0,5 M, monitorizados por fluxo interrompido; b) o mesmo de pH=12,8; c) salto inverso de pH a partir de soluções equilibradas a pH=12,8 monitorizadas por um espectrofotômetro. Erro estimado de 10%.

Na Figura B2a, as curvas cinéticas de um salto inverso de pH de uma solução pseudo-equilibrada a pH=4,2 de volta ao catião flavílio [HCl]=0,5 M, e de pH=12 são mostrados. A assinatura cinética do hemicetal nessas condições é de 8.7 s^{-1} , enquanto a *cis*-chalcona é de 2.3 s^{-1} . Vale ressaltar a falta de assinatura de hemicetal quando o pH inicial do salto inverso de pH é 12,8, indicando a falta de hemicetal aniônico a pH=12,8. As assinaturas cinéticas da *trans*-chalcona requerem o uso de um espectrofotômetro, Figura B2c.

Uma observação final sobre a precisão do cálculo do pK_a a partir de medidas reversas monitorizadas por fluxo interrompido. É difícil calcular com precisão a absorvância no tempo inicial. A melhor estratégia é calcular a absorvância no pseudo-equilíbrio e no equilíbrio a partir de saltos diretos de pHs

monitorizados por um espectrofotômetro e corrigir nos dados de fluxo interrompido a absorvância inicial em $t=0$.

B.2 Cálculo das constantes de acidez das bases quinoidais.

Embora não seja possível acompanhar a cinética da transferência de prótons por fluxo interrompido, as respectivas constantes de acidez podem ser calculadas coletando os espectros de absorção 10 ms após a mistura.

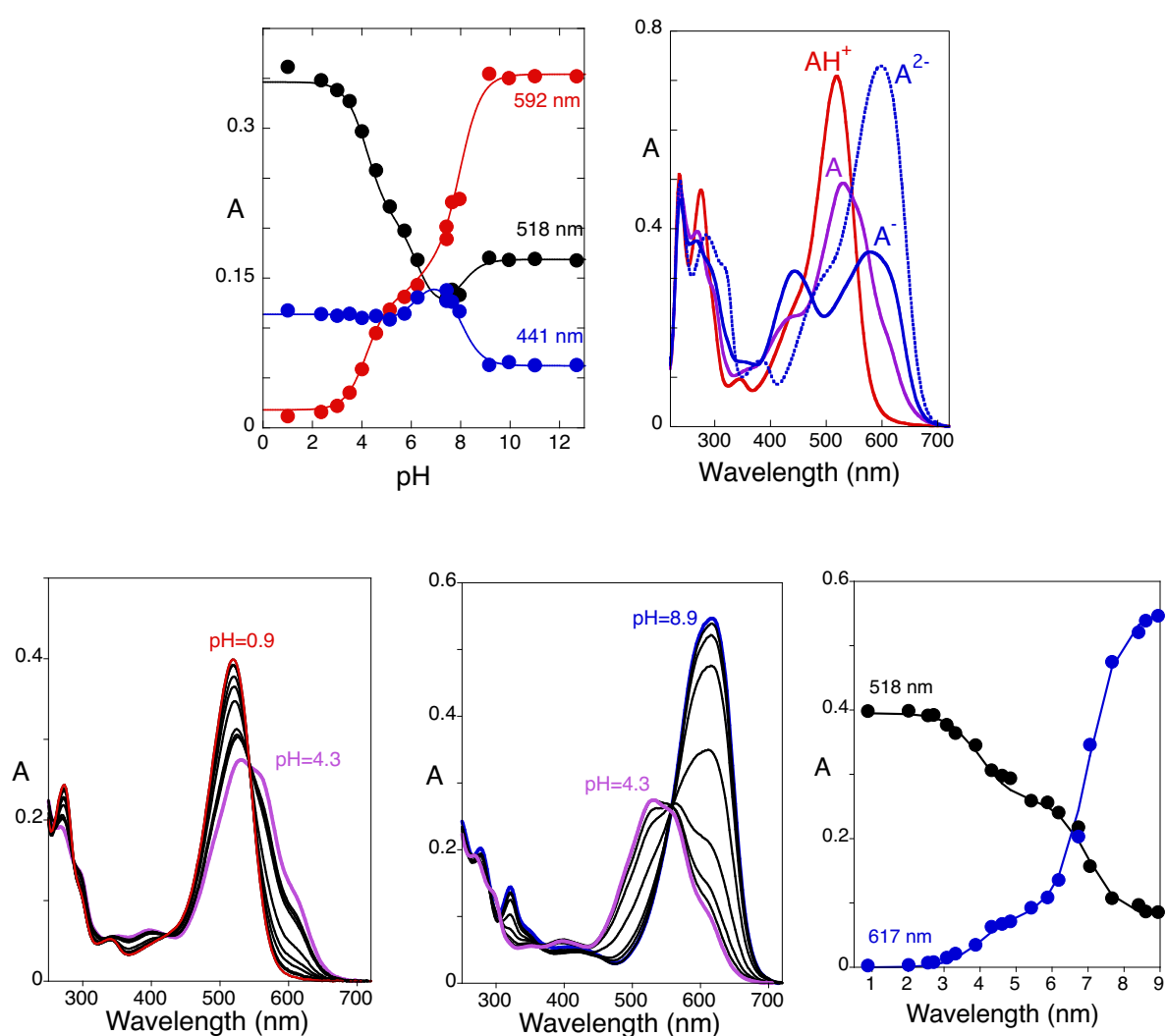


Figura B2.1. a) Curvas de titulação da oenina, $1,2 \times 10^{-5}$ M, obtidas a partir dos espectros de absorção coletados 10 ms após um conjunto de saltos diretos de pHs monitorizados por fluxo interrompido. Ajuste foi obtido para $pK_a=3,8$, $pK_{A/A^-}=6,3$ e $pK_{A^-/A^{2-}}=8,1$; b) deconvolução dos espectros de absorção usando as constantes de ácido-base calculadas em a); c) variações espectrais da malvina, $7,3 \times 10^{-6}$ M, obtidas 10 ms após um salto direto de pH monitorizado por fluxo interrompido para $0,9 < pH < 4,3$; d) o mesmo para $4,3 < pH < 8,9$; e) Curvas de titulação em 518 nm e 617 nm. Ajuste foi obtido para $pK_a=3,8$ e $pK_{A/A^-}=7,0$. Erro estimado $\pm 0,1$.

Na Figura B2.1a, as curvas de titulação de são apresentadas, assim como a deconvolução para calcular os espectros de absorção de cada espécie, Figura B2.1b. O ajuste foi obtido para $pK_a = 3,8$ (para dar base quinoidal), $pK_{A/A^-} = 6,3$ (para dar base quinoidal aniônica) e $pK_{A^-/A2^-} = 8,5$ (para dar base quinoidal dianiônica). No caso da malvina, apenas duas bases quinoidais podem ser formadas, a neutra e a aniônica, e é possível separar os espectros de absorção em dois conjuntos exibindo pontos isobésticos, Figura B2.1c e Figura B2.1d, a deconvolução não é necessária para obter os espectros de absorção dessas espécies. O ajuste da Figura B2.1e permite a determinação de $pK_a=3,8$ e $pK_{A/A^-}=7,0$, consulte a Tabela B2.1.

Tabela B2.1. (1º passo). Constantes ácido-base da oenina e malvina.
Erro estimado 10%.

	pK_a	pK_{A/A^-}	$pK_{A^-/A2^-}$
Oenina	3,8	6,3	8,1
Malvina	3,8	7,0	-

B.3 Detalhes nas medições de fluxo interrompido.

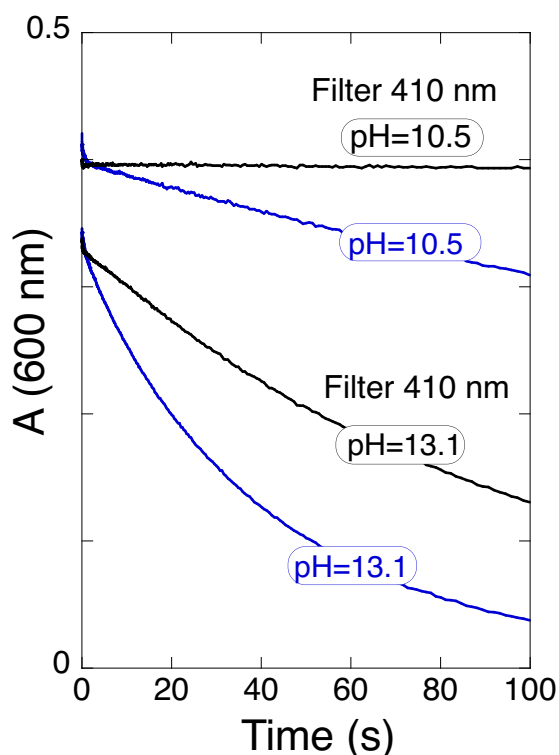


Figura B3.1. Curvas cinéticas de fluxo interrompido após saltos diretos de pHs da oenina com e sem um filtro de comprimento de onda de 410 nm em dois valores representativos de pH básico.

O nosso aparelho de fluxo interrompido possui uma lâmpada analítica de alta intensidade e é necessário usar filtros de corte de comprimento de onda curto para evitar reações fotoinduzidas que podem ocorrer a partir da isomerização *cis-trans* ou tautomerização. A comparação dos traços de fluxo interrompido com e sem um filtro de corte (410 nm) em dois valores de pH básico representativos é mostrada na Figura C1. Em ambos os casos (na ausência do filtro de corte), é evidente a existência de uma reação fotoinduzida que consome A^{2-} . No entanto, o traço obtido a pH=10,5 na presença do filtro de corte de 410 nm indica que A^{2-} não é responsável pela fotoquímica (porque A^{2-} ainda absorve luz com este filtro de corte e sua absorvância não muda). A intensidade muito baixa da lâmpada de um espectrofotômetro torna a interferência da reação fotoquímica negligenciável.

B.4 Variações espectrais da oenina e malvina a pH fisiológico

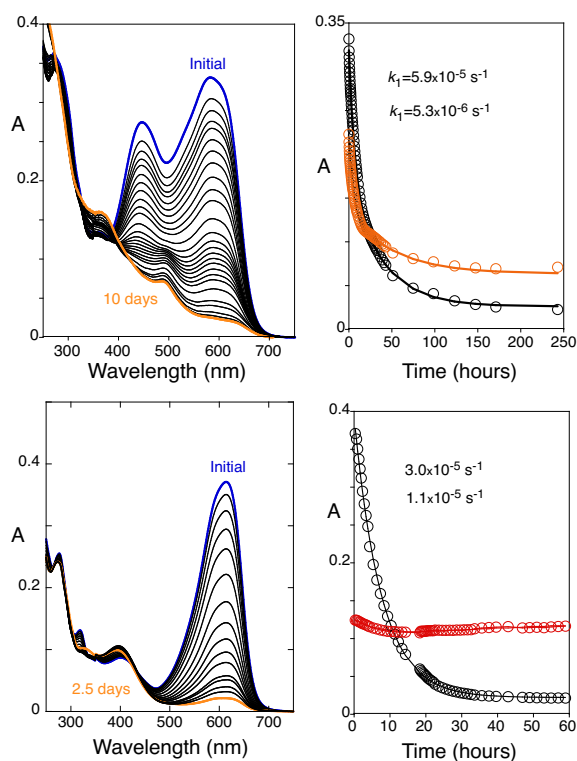


Figura B4.1. a) Variações espectrais da oenina após um salto direto de pH do catião flavílio para pH=7,4; b) traços de a) em 580 nm (○) e 495 nm (○); c) variações espectrais da malvina após um salto direto de pH do catião flavílio para pH=7,4; d) traços de c) em 615 nm (○) e 307 nm (○).

A degradação de oenina no pH fisiológico mostra o aparecimento de uma nova banda de absorção no visível que pode ser atribuída aos oligômeros detetados por HPLC e 1H RMN, Fig.B4.2.

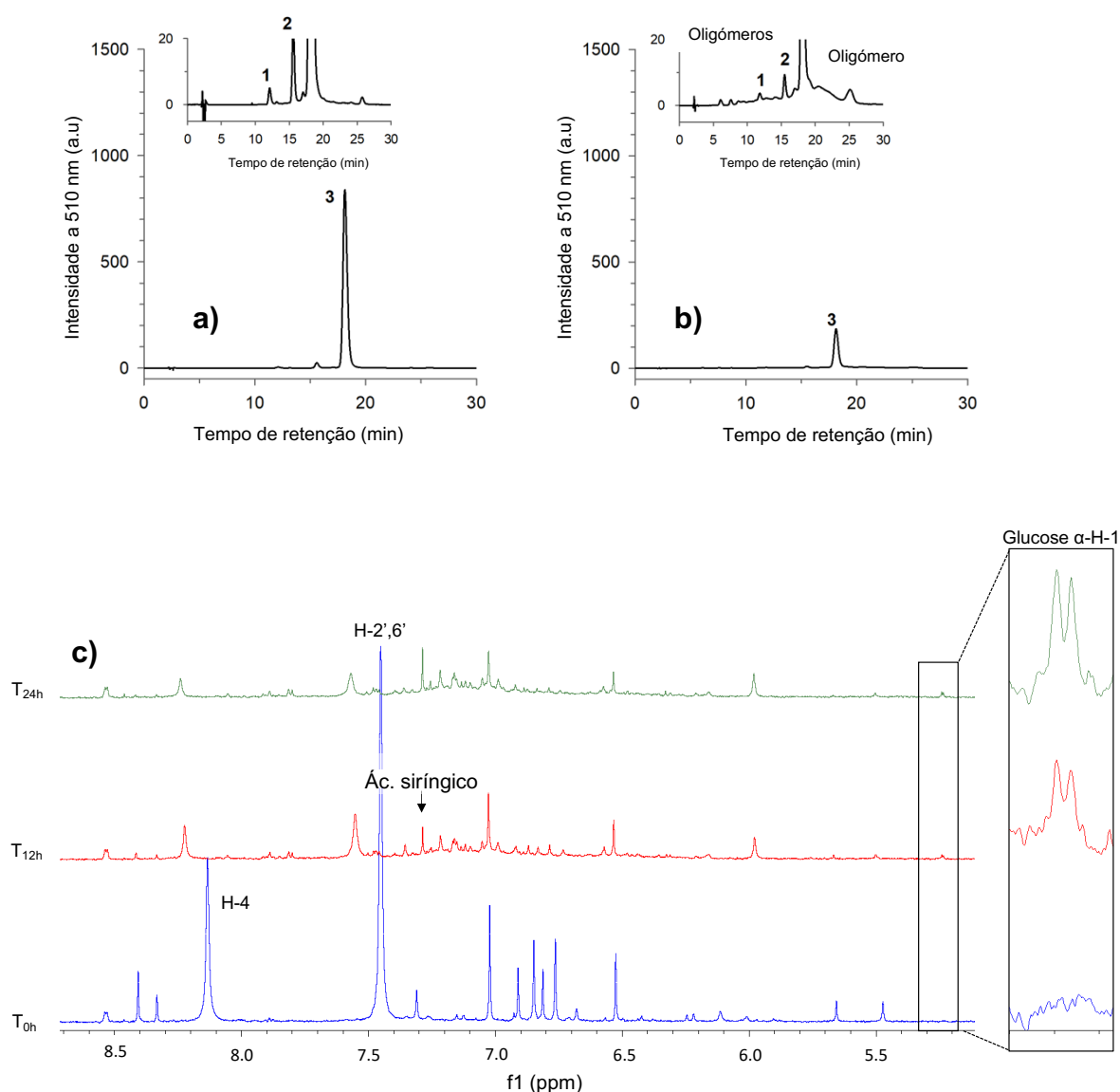


Figura B4.2. a) Cromatogramas de HPLC para pHs de transição representativos de: (a) solução de oenina ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$, pH 8,1) depois de 2 horas; b) 24 horas. O pico 1 corresponde ao dímero de malvidina-3-O-glucosídeo, o pico 2 corresponde a petunidina-3-O-glucosídeo já presente no padrão de oenina, e o pico 3 corresponde a malvidina-3-O-glucosídeo; c) espectros de ^1H RMN na região aromática de oenina a $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, pH 8,1 ao longo do tempo. Os espectros foram adquiridos a 25°C .

A degradação pode ser ajustada com uma bi-exponencial com constantes de taxa de $5,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e $5,3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. A degradação de malvina segue um padrão diferente. O desaparecimento da mistura de bases quinoidais aniônicas pode ser explicado por uma bi-exponencial de $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e $1,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

A comparação das velocidades de desaparecimento de ambos os compostos indica que o diglucósido desaparece muito mais rápido. Uma possível explicação é o fato de que a degradação da malvina ocorre também a partir de espécies aniônicas B4^{2-} .

APÊNDICE C

PIRIDINOCHALCONAS

C.1 Espectros de RMN e atribuição dos picos das espécies do multiestado de Py2

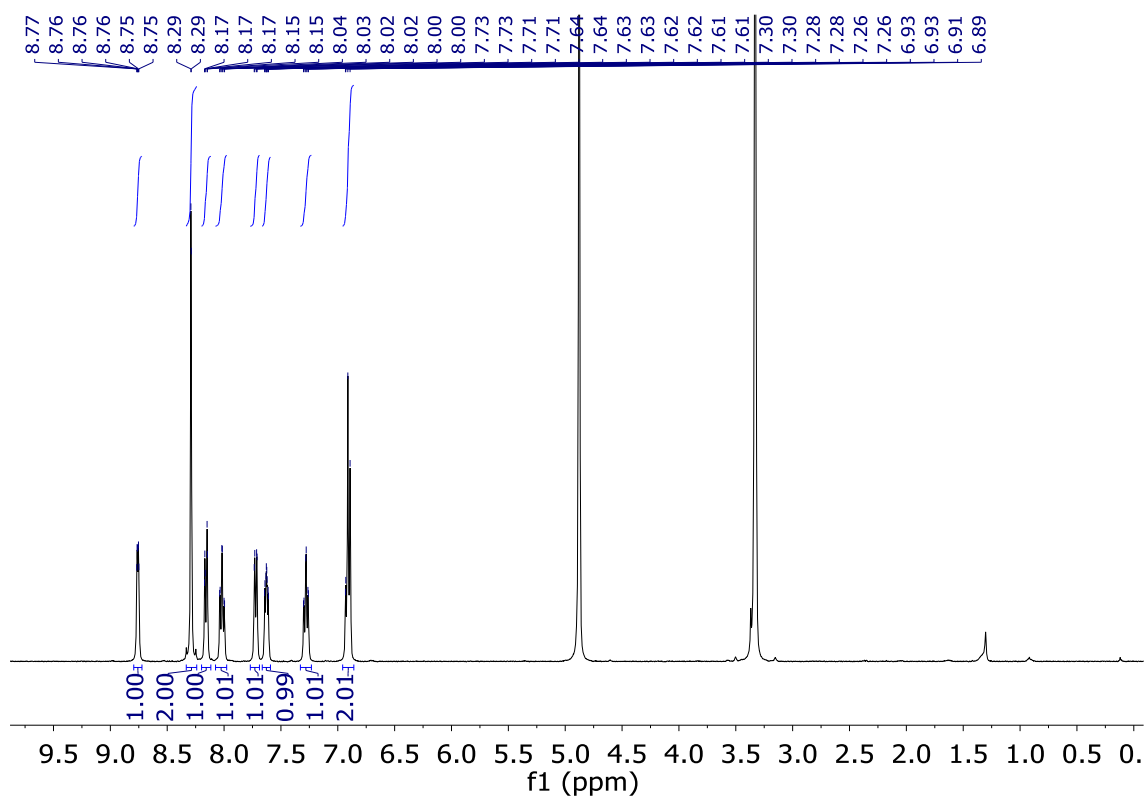


Figura C1.1. ^1H RMN do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD (espécie Ct).

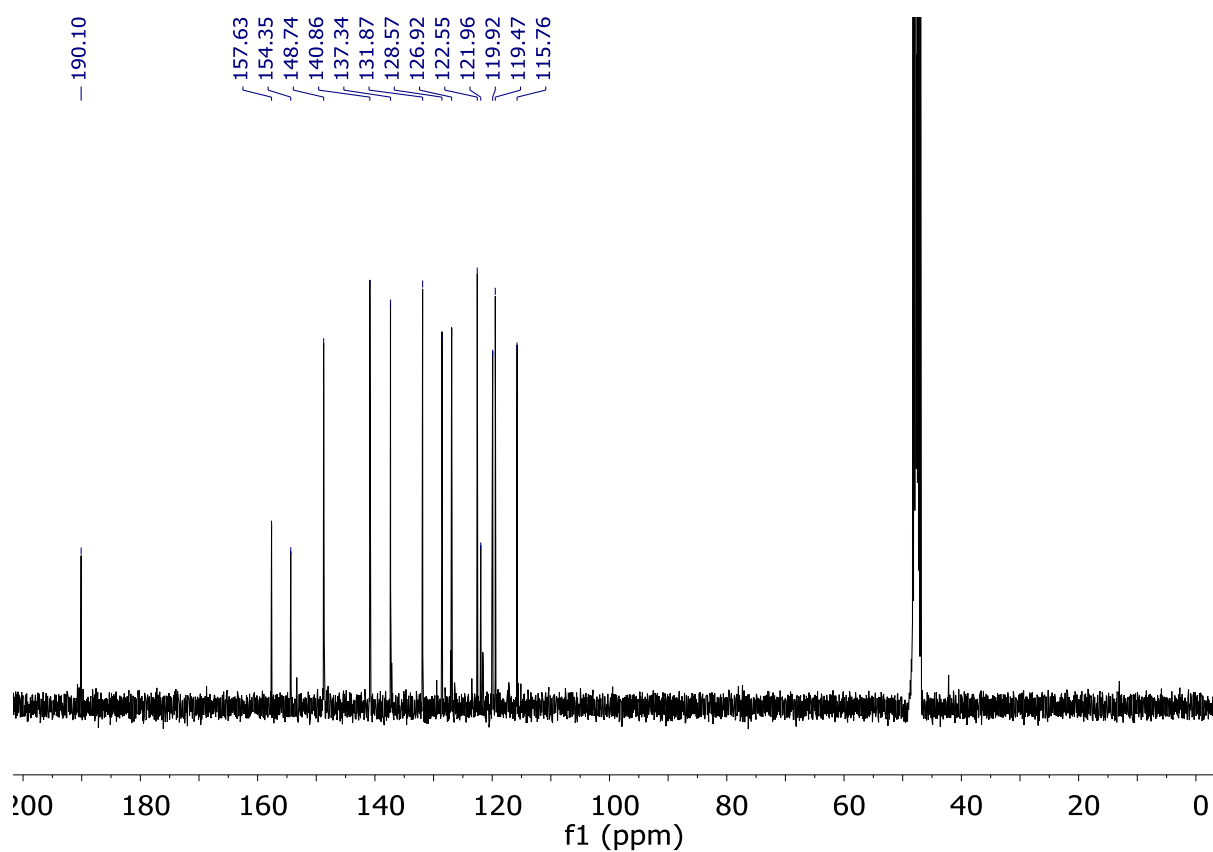


Figura C1.2. ^{13}C RMN do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD (espécie Ct).

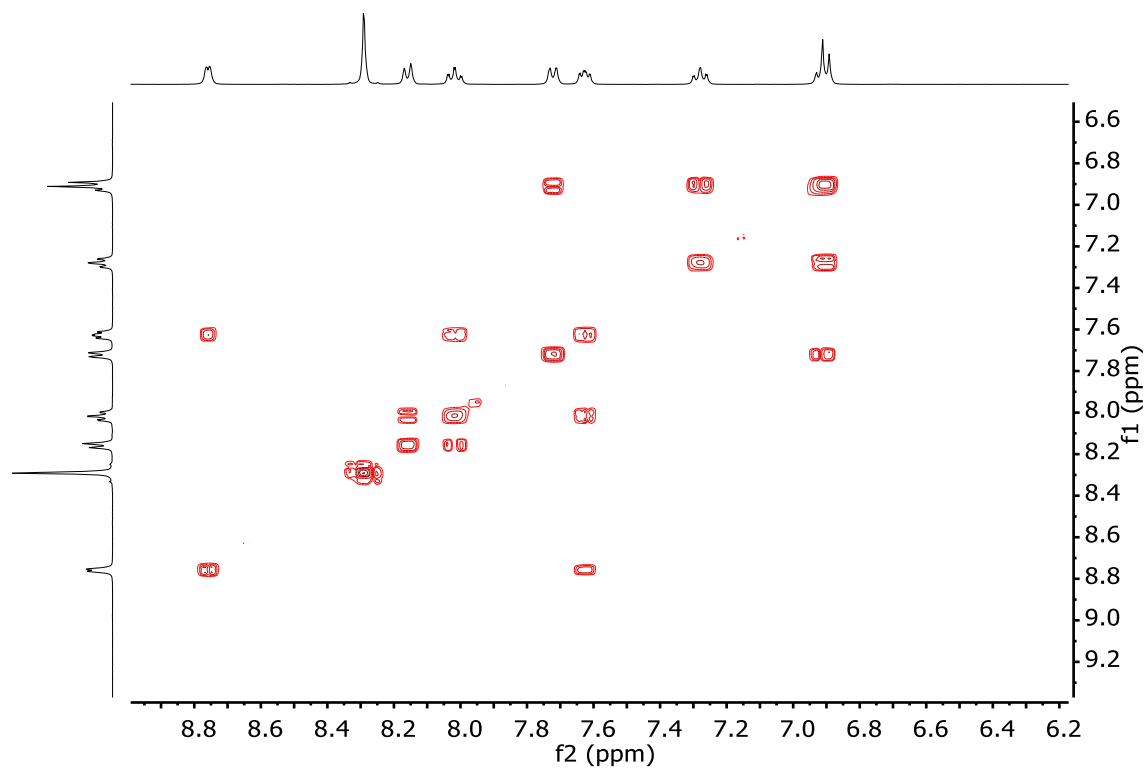


Figura C1.3. ^1H - ^1H -COSY do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD (espécie Ct).

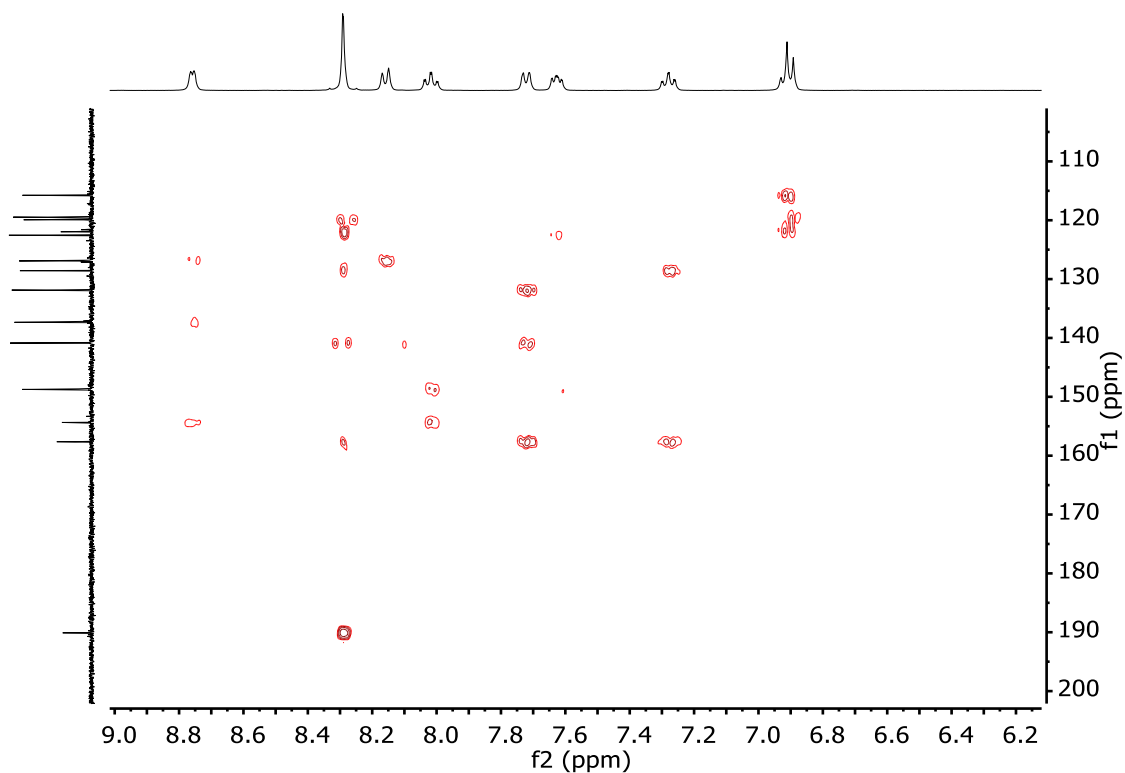
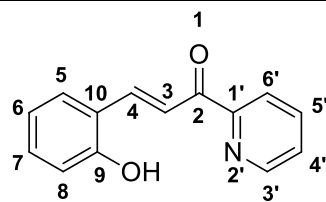


Figura C1.4. ^1H - ^{13}C -HMBC do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD (espécie Ct)

Tabela C1.1 – Atribuição completa de picos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD (espécie Ct)

				
Posição ^a	^1H δ/ppm (J/Hz) MeOD	^{13}C δ/ppm MeOD	HMBC MeOD	COSY MeOD
1	-	-	-	-
2	-	190.1	3, 4	-
3	8.29 (<i>d</i> , 16.0)	119.9	4, 8	4
4	8.29 (<i>d</i> , 16.0)	140.8	3, 5	3
5	7.72 (<i>d</i>)	128.6	3, 4, 7	6
6	6.91 (<i>dd</i> , 8.1)	119.5	3, 4, 8	5, 7

7	7.28 (<i>td</i> , 7.8)	131.8	5	6, 8
8	6.91 (<i>dd</i> , 6.7)	115.7	6	7
9	-	157.6	3, 4, 5, 7	-
10	-	121.9	3, 4, 6	-
1'	-	154.3	4', 6'	-
2'	-	-	-	-
3'	8.16 (<i>d</i> , 7.8)	122.5	5'	4'
4'	8.01 (<i>td</i> , 7.7)	137.3	6'	3', 5'
5'	7.62 (<i>ddd</i> , 7.6)	127.0	3', 6'	4', 6'
6'	8.76 (<i>d</i> , 8.0)	148.7	4'	5'

^aEsta numeração foi feita de acordo com a estrutura do catião flavílio.

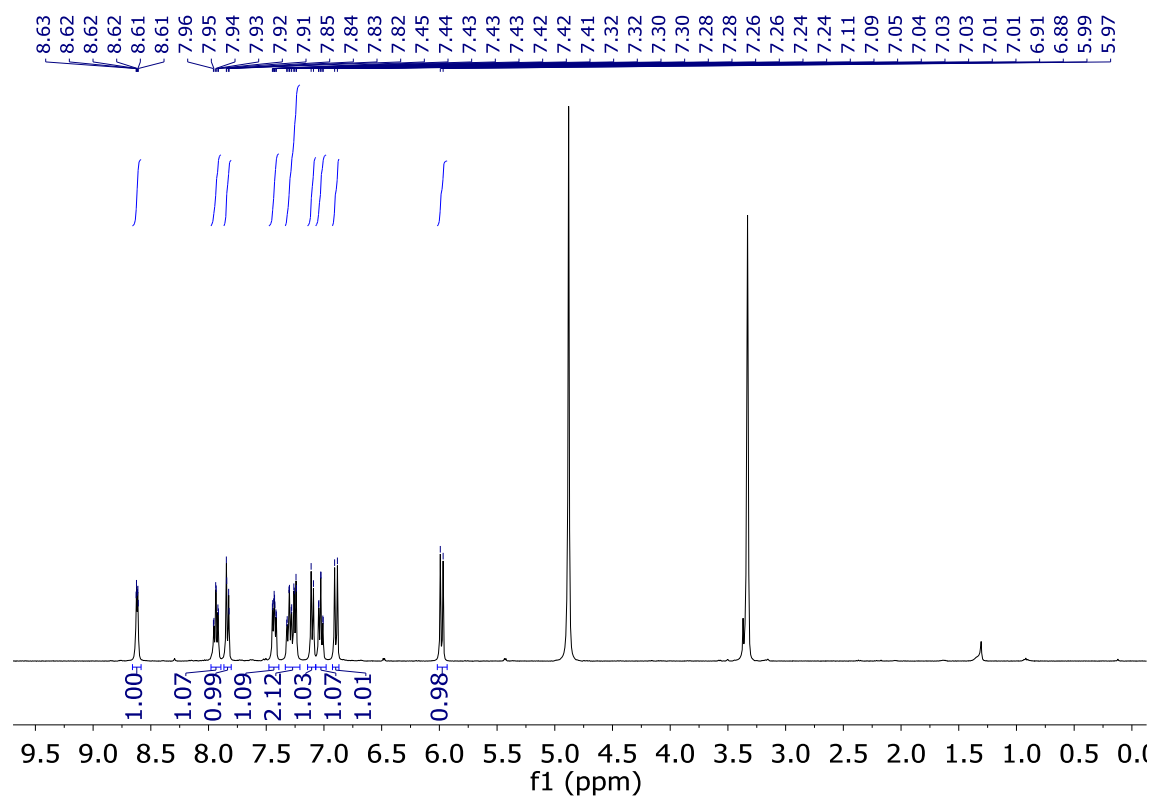


Figura C1.5. ¹H RMN do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD, irradiado 1h a 365 nm e recuperação no escuro por 24h (espécie hemiacetal, 3)

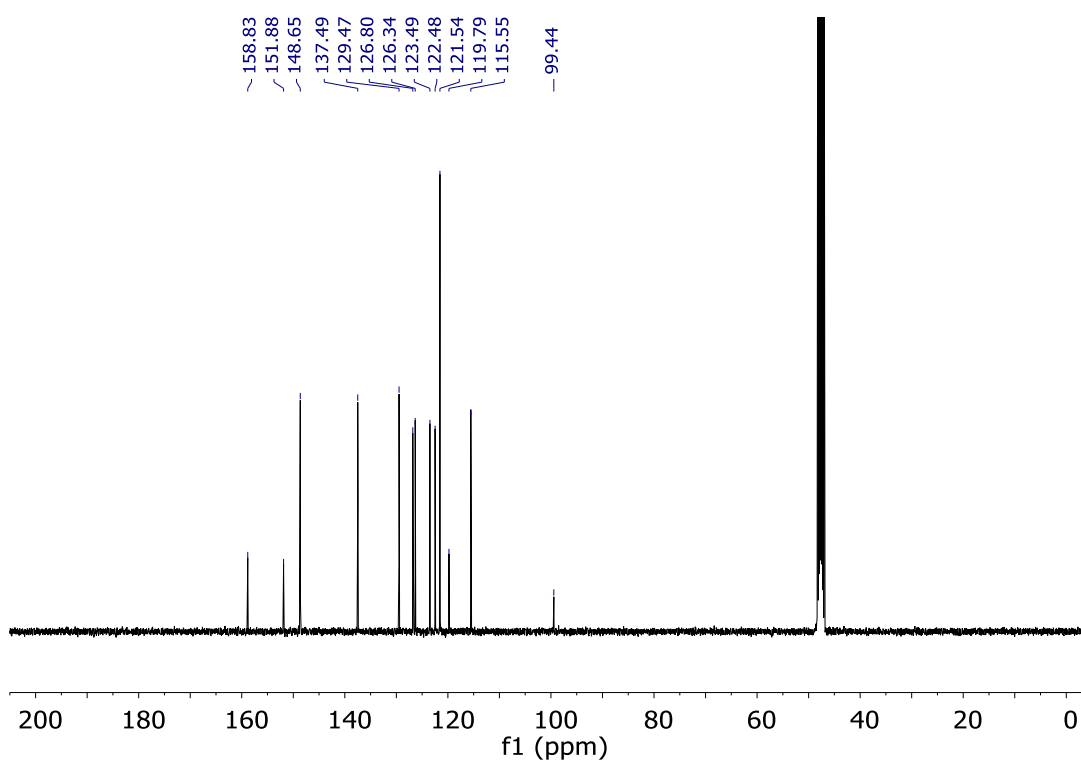


Figura C1.6. ^{13}C RMN do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD, irradiado 1h a 365 nm e recuperação no escuro por 24h (espécie hemiacetal, 3).

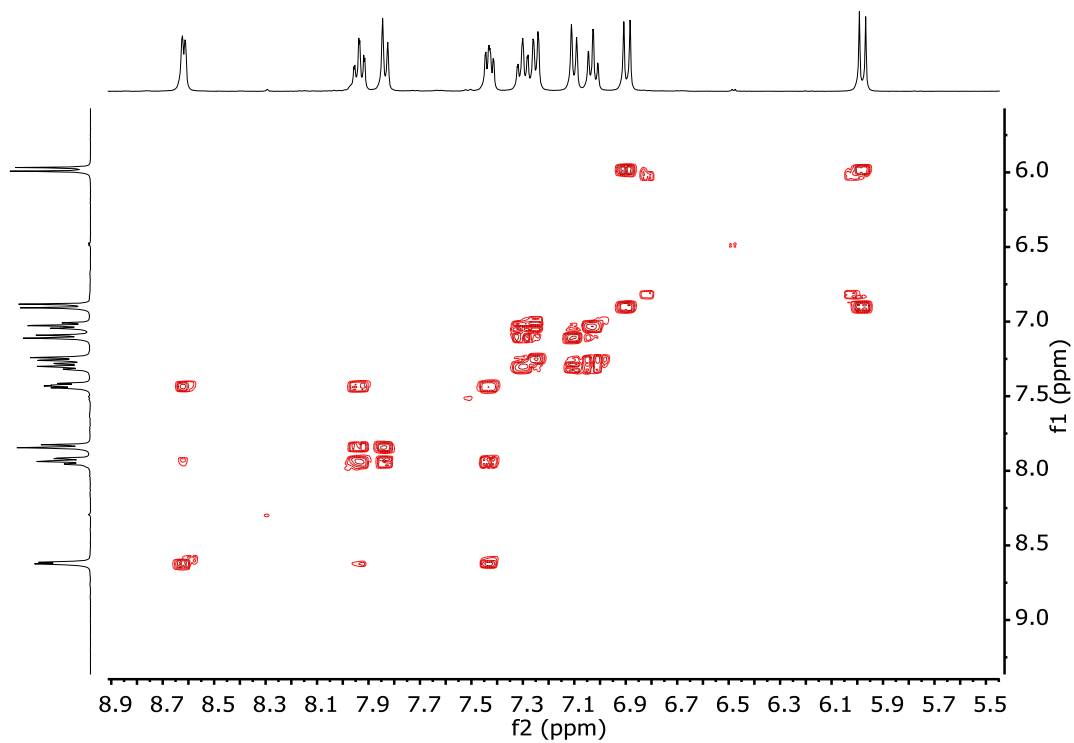


Figura C1.7. ^1H - ^1H -COSY do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD, irradiado 1h a 365 nm e recuperação no escuro por 24h (espécie hemiacetal, 3).

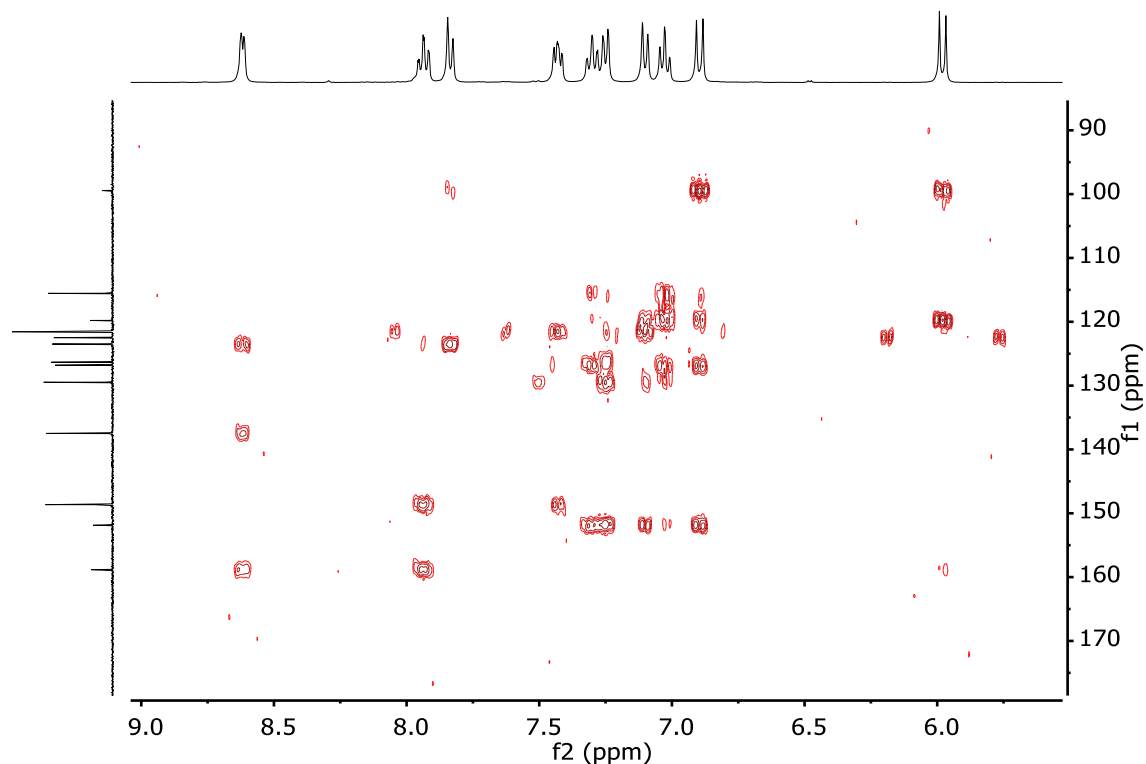
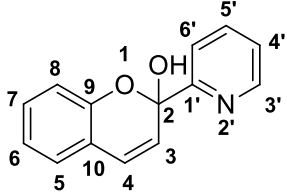


Figura C1.8. ^1H - ^{13}C -HMBC do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD, irradiado 1h a 365 nm e recuperação no escuro por 24h (espécie hemiacetal, 3).

Tabela C1.2 – Atribuição completa dos picos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M a pH=6,5 em MeOD irradiado 1h a 365 nm e recuperação no escuro por 24h (espécie hemiacetal, 3).

				
Posição ^a	^1H δ/ppm (J/Hz) MeOD	^{13}C δ/ppm MeOD	HMBC MeOD	COSY MeOD
1	-	-	-	-
2	-	99.5	3, 4	-
3	5.98 (<i>d</i> , 9.8)	122.4	-	4
4	6.90 (<i>d</i> , 9.7)	126.3	5	3
5	7.25 (<i>dd</i> , 7.5, 1.6)	126.8	4, 6, 7	6
6	7.03 (<i>td</i> , 7.4, 1.1)	129.6	5	5, 7
7	7.30 (<i>td</i> , 7.8, 1.7)	121.5	8	6, 8

8	7.10 (d, 8.1)	115.6	6, 7	8
9	-	152.3	4, 5, 7, 8	-
10	-	119.8	3, 4, 6, 8	-
1'	-	158.9	3', 5'	-
2'	-	-	-	-
3'	8.65 (d, 4.88)	148.7	4', 5'	4'
4'	7.43 (ov)	123.5	3', 6'	3', 5'
5'	7.94 (ov)	137.5	3'	4', 6'
6'	7.84 (dt, 8.0, 1.2)	121.5	4'	5'

^aEsta numeração foi feita com base na estrutura do catião flavílio.

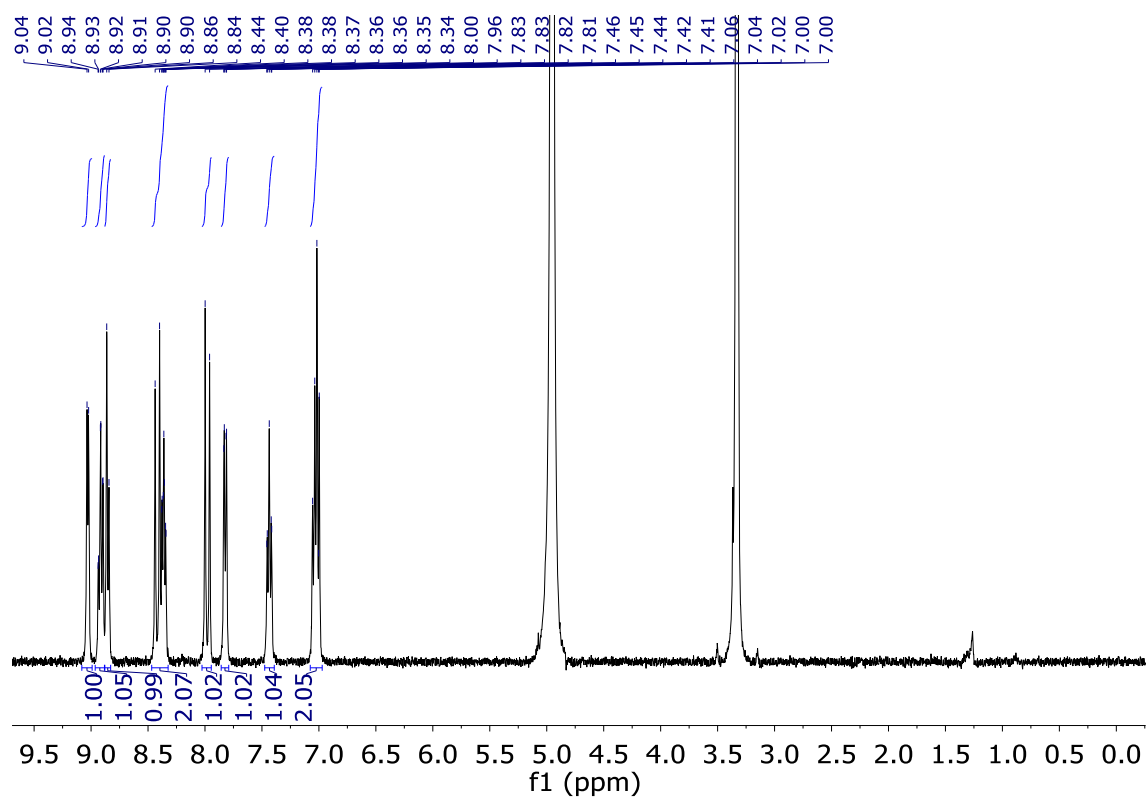
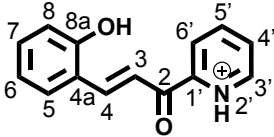


Figura C1.9. ¹H RMN do composto Py2 1,7x10⁻³ M em MeOD com 0,24M DCl (espécie Ct⁺)

Tabela C1.3 – Atribuição completa dos picos de ^1H -RMN do Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M em MeOD com 0,24M DCl (espécie Ct^+)

	
posição ^a	^1H δ/ppm (J/Hz) MeOD
1	-
2	-
3	7.98 (<i>d</i> , 15.6)
4	8.42 (<i>d</i> , 15.6)
5	7.82 (<i>dd</i> , 7.8, 1.4)
6	6.97 (<i>ov</i>)
7	7.44 (<i>dd</i> , 8.3, 1.7)
8	6.97 (<i>ov</i>)
8a	-
4a	-
1'	-
2'	-
3'	9.03 (<i>d</i> , 5.6)
4'	8.92 (<i>dd</i> , 8.0, 1.5)
5'	8.36 (<i>dt</i> , 8.0, 1.5)
6'	8.85 (<i>d</i> , 8.0)

^aEsta numeração foi feita de acordo a estrutura do catião flavílio.

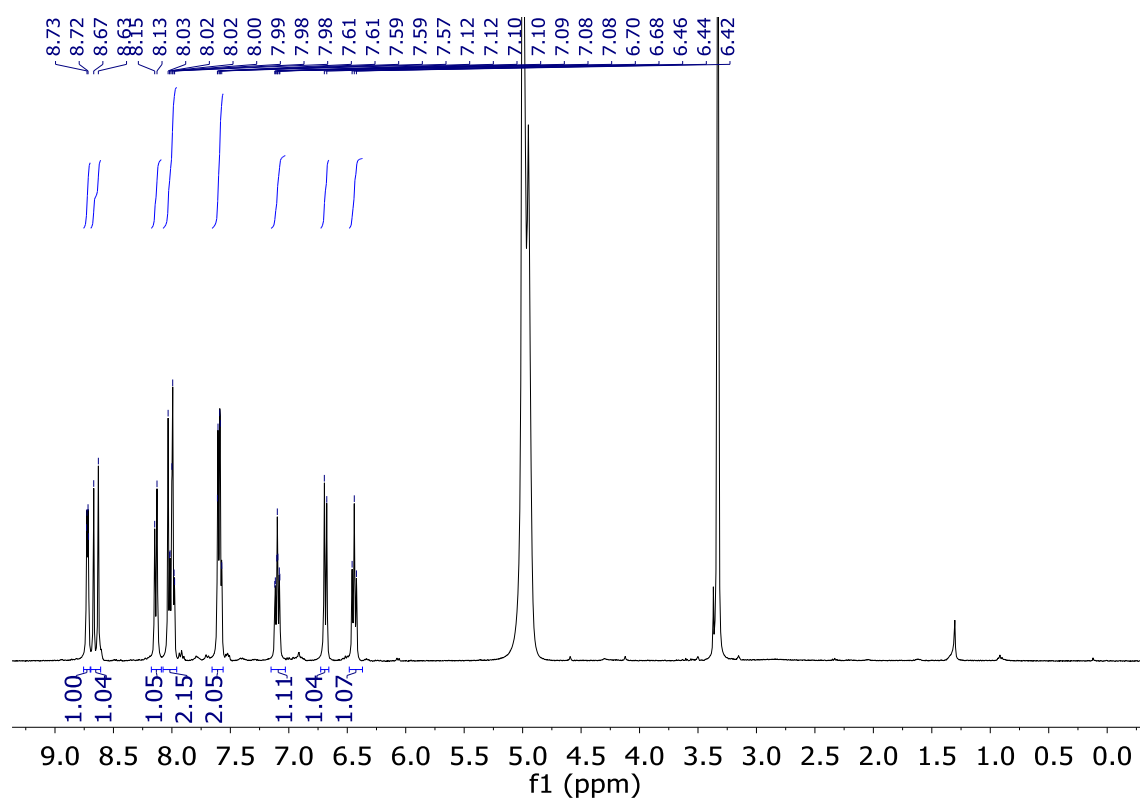
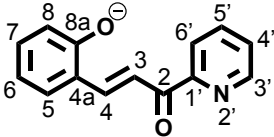


Figura C1.10. ^1H RMN do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M em MeOD com 0,1M NaOD (espécie Ct).

Tabela C1.4 – Atribuição completa dos picos de ^1H RMN do composto Py2 $1,7 \times 10^{-3}$ M em MeOD com 0,1M NaOD (espécie Ct⁻).

	
Posição ^a	^1H δ/ppm (J/Hz) MeOD
1	-
2	-
3	8.07-7.93 (ov)
4	8.65 (<i>d</i> , 15.9)
5	7.67-7.52 (ov)
6	6.44 (<i>d</i> , 7.0)
7	7.10 (<i>ddd</i> , 8.6, 7.0, 1.9)
8	6.69 (<i>d</i> , 8.6)
8a	-
4a	-
1'	-
2'	-
3'	8.14 (<i>d</i> , 7.9)
4'	8.07-7.93 (ov)
5'	7.67-7.52 (ov)
6'	8.72 (<i>dd</i> , 5.3, 1.7)

^aEsta numeração foi feita com base na estrutura do catião flavílio.

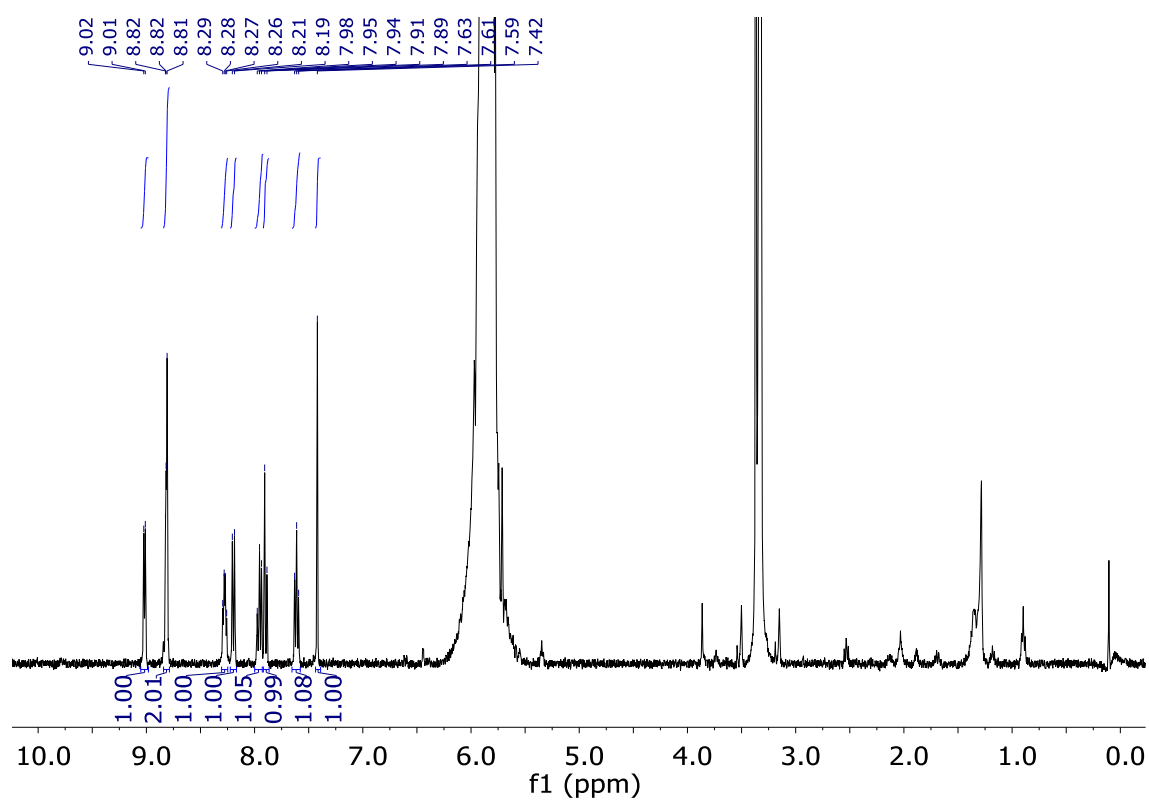


Figura C1.11. ^1H RMN do composto 5 purificado em MeOD.

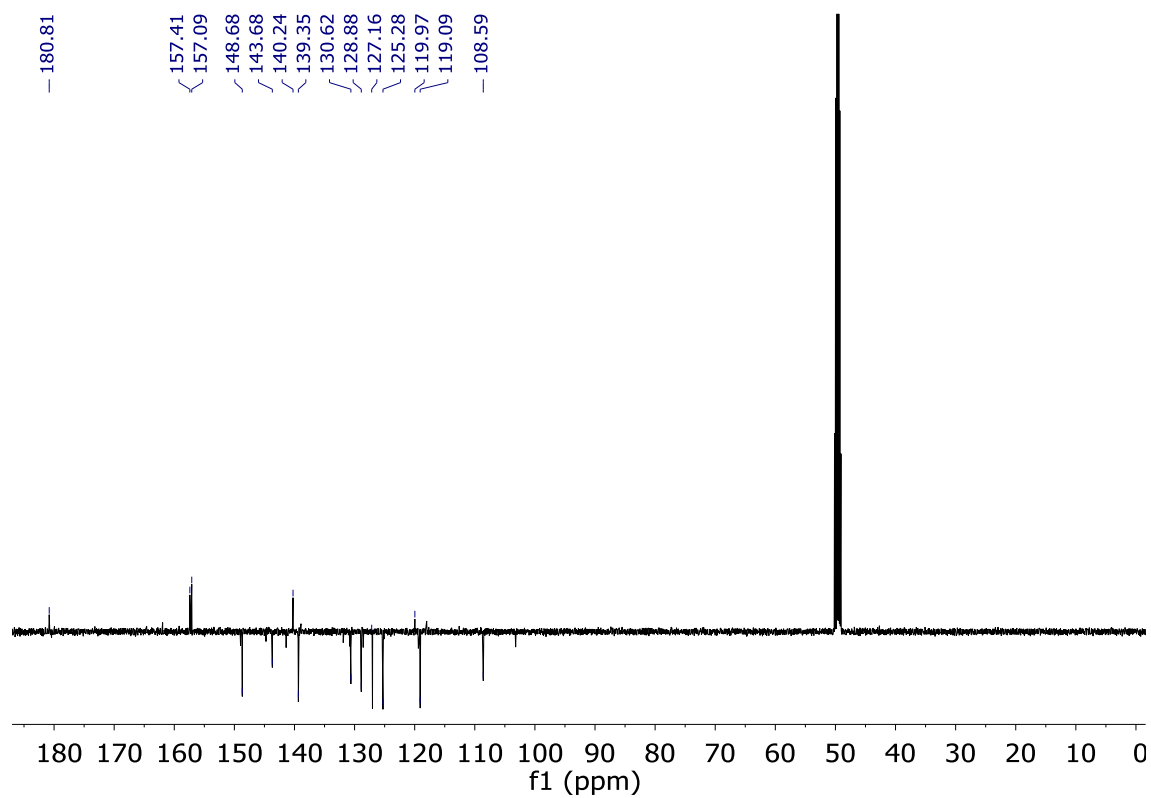


Figura C1.12. ^{13}C -APT RMN do composto 5 em MeOD.

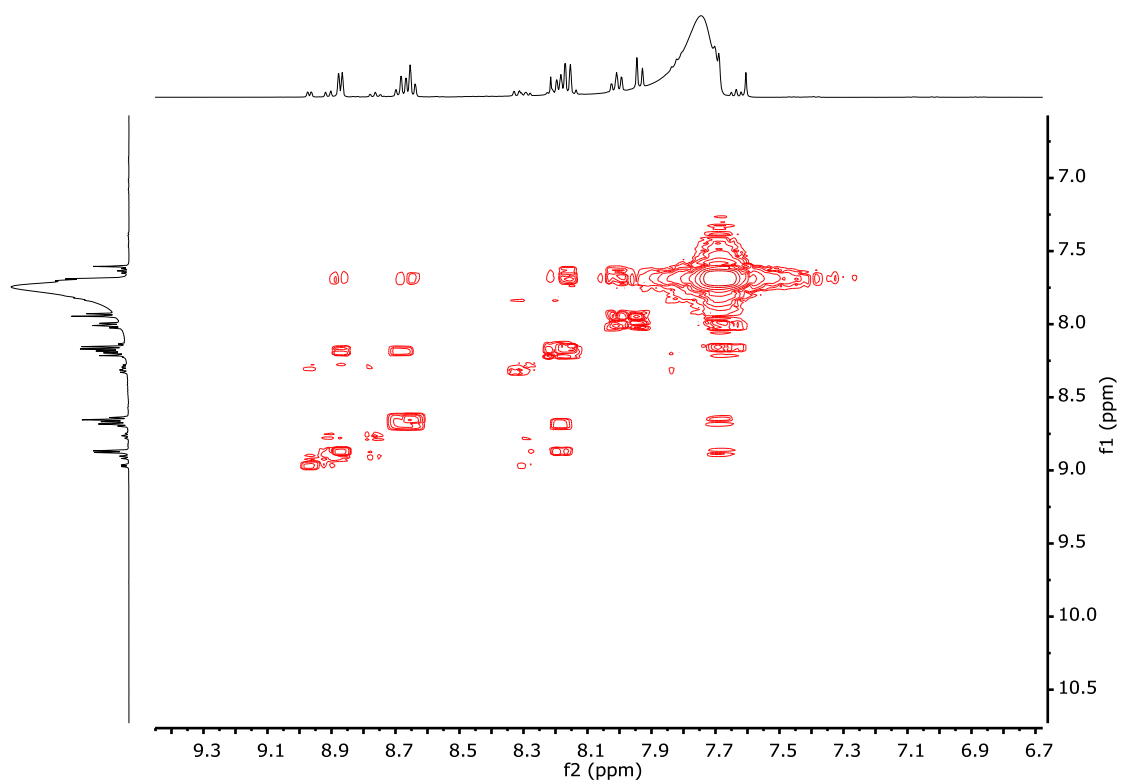


Figura C1.13. ^1H - ^1H -COSY do composto 5 em MeOD.

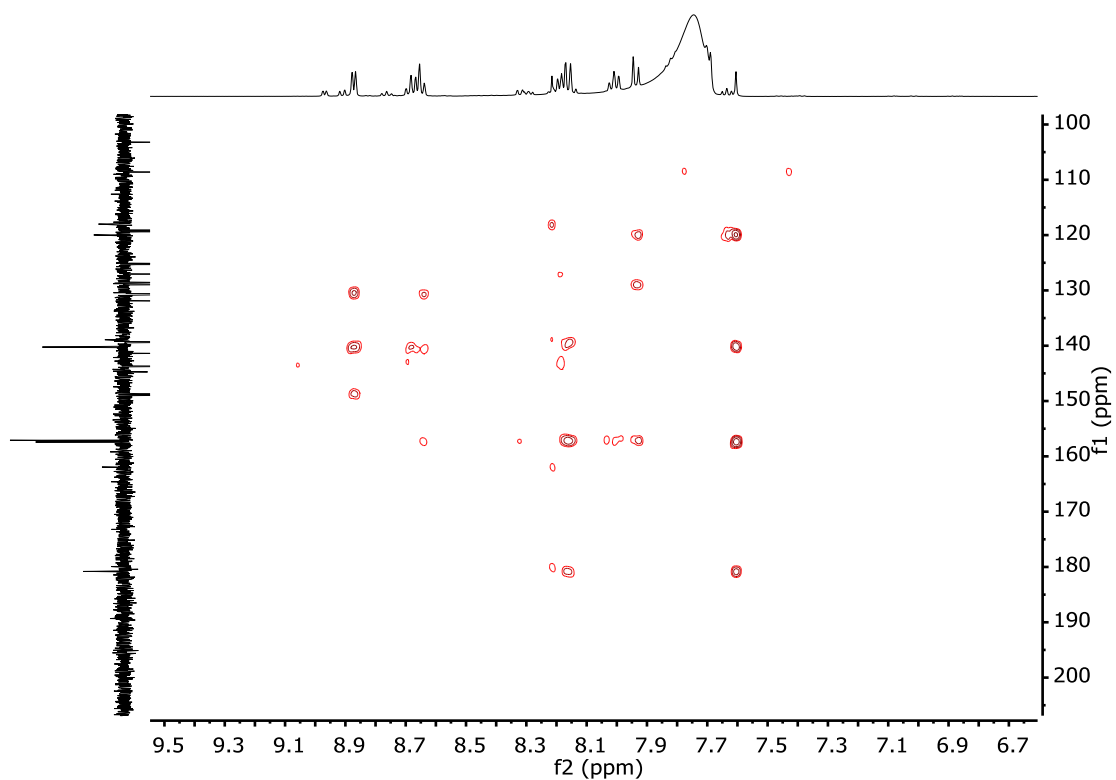
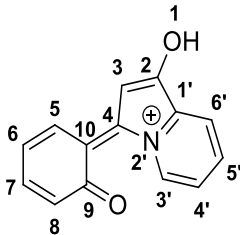


Figura C1.14. ^1H - ^{13}C -HMBC do composto 5 em MeOD.

Tabela C1.5 – Atribuição completa dos picos ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do composto 5 em MeOD.

				
Posição ^a	^1H δ/ppm (J/Hz) MeOD	^{13}C δ/ppm MeOD	HMBC MeOD	COSY MeOD
1	-	-	-	-
2	-	140.3	3, 6'	-
3	7.42 (s)*	108.7	1', 2, 4, 9, 10	-
4	-	157.1	3, 5	-
5	8.20 (br d, 8.1)	125.3	4, 7, 9	6, 7
6	7.61 (t, 7.5)	128.8	8	5, 7, 8
7	7.96 (t, 7.9)	139.4	5	5, 6, 8
8	7.90 (br d, 8.5)	119.0	6, 9	6, 7
9	-	180.8	3, 5, 8	-
10	-	120.1	3	-
1'	-	157.3	3, 3', 6'	-
2'	-	-	-	-
3'	8.82 (ov)	127.0	1', 2, 4', 5'	4', 5'
4'	8.81 (ov)	148.6	3', 5', 6'	3', 5', 6'
5'	8.28 (q, 5.3)	130.8	3', 4', 6'	3', 4', 6'
6'	9.01 (br d, 5.8)	143.7	2, 4', 5'	4', 5'

^a Esta numeração foi feita de acordo com a estrutura do flavílio. *Este próton foi parcialmente trocado por deutério.

C.2 Espectros de RMN e atribuição dos picos das espécies do multiestado de Py3

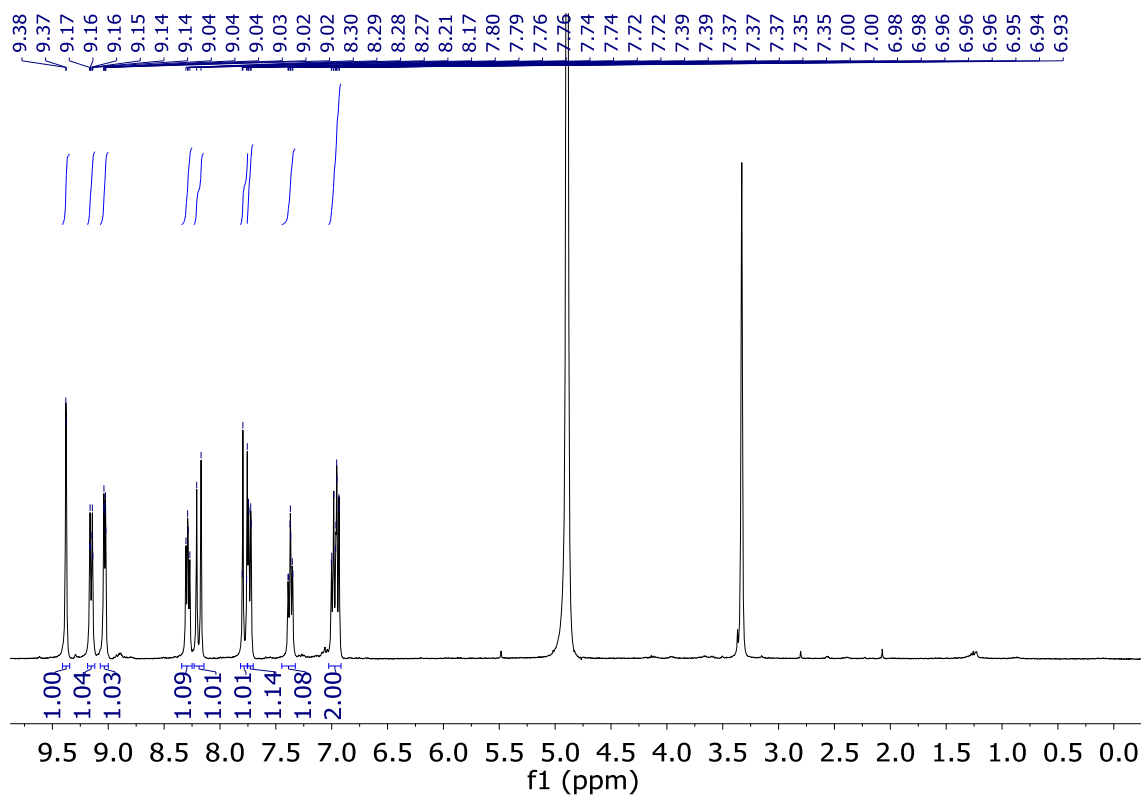


Figura C2.1. Espectro ^1H RMN do composto Py3 em MeOD a pH=1 (espécie Ct^+).

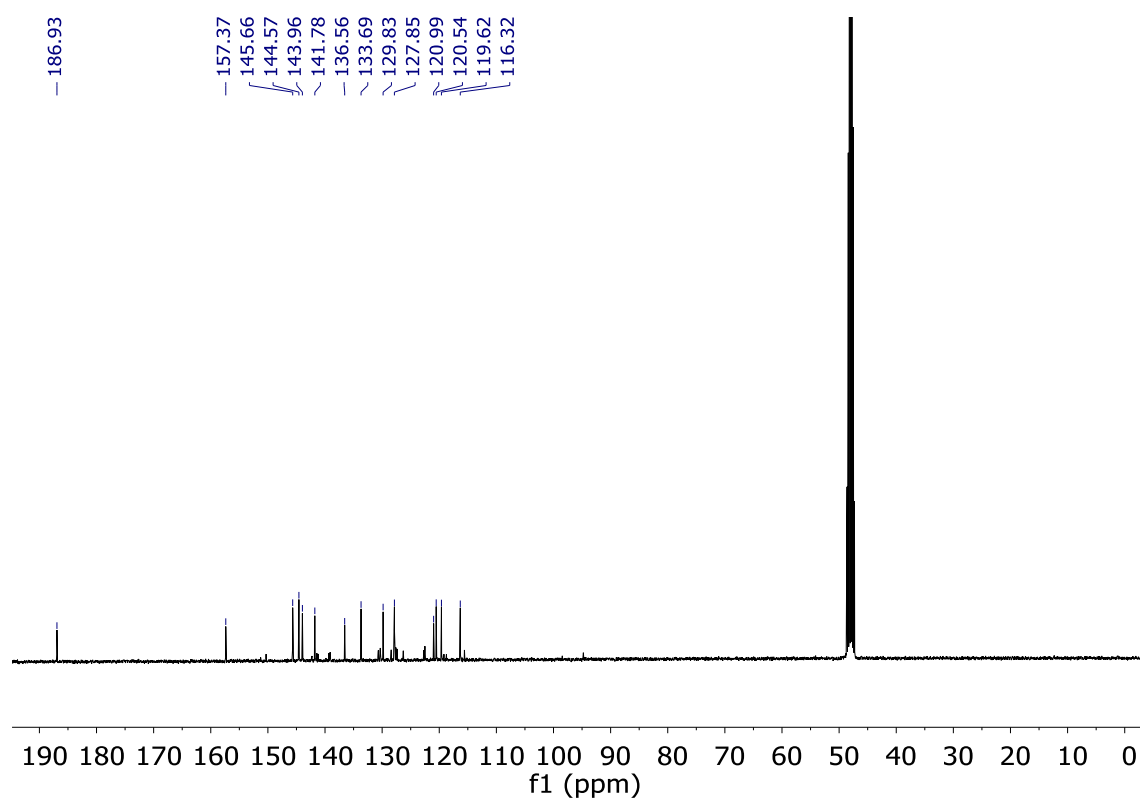
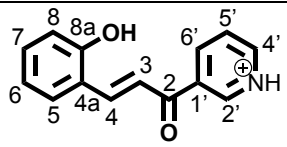


Figura C2.2. ^{13}C RMN do composto Py3 em MeOD a $\text{pD}=1$ (espécie Ct^+).

Tabela C2.1 – Atribuição dos picos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do composto Py3 em MeOD a $\text{pD}=1$ (espécie Ct^+).

				
Posição ^a	^1H δ/ppm (J/Hz) MeOD ($\text{pD} = 1$)	^{13}C δ/ppm MeOD ($\text{pD} = 1$)	HMBC MeOD ($\text{pD} = 1$)	COSY MeOD ($\text{pD} = 1$)
1	-	-	-	-
2	-	186.9	3, 4, 2', 6'	-
3	7.78 (<i>d</i> , 15.7)	119.6	1', 2, 4, 9, 10	4
4	8.19 (<i>d</i> , 15.7)	144.6	3, 5, 9	3
5	7.73 (<i>dd</i> , 7.9, 1.7)	129.8	4, 7, 9	6, 7
6	7.00-6.94 (<i>ov</i>)	120.5*	8, 10	5, 6, 7, 8
7	7.37 (<i>m</i>)	133.7	5, 9	5, 6, 8
8	7.00-6.94 (<i>ov</i>)	116.3*	6, 10	5, 6, 7, 8
8a	-	157.4	4, 5, 7	-
4a	-	121.0	3, 6, 8	-

1'	-	136.6	3, 5'	-
2'	9.38 (<i>d</i> , 2.0)	141.8	2, 6'	6'
3'	-	-	-	-
4'	9.04 (<i>m</i>)	144.0	6'	5', 6'
5'	8.30 (<i>dd</i> , 8.2, 5.8)	127.8	1''	4', 6'
6'	9.15 (<i>dt</i> , 8.2, 1.8)	145.7	2, 2', 4'	2', 4', 5'

^aEsta numeração foi feita de acordo com a estrutura do catião flavílio. *estes sinais podem ser intercambiáveis.

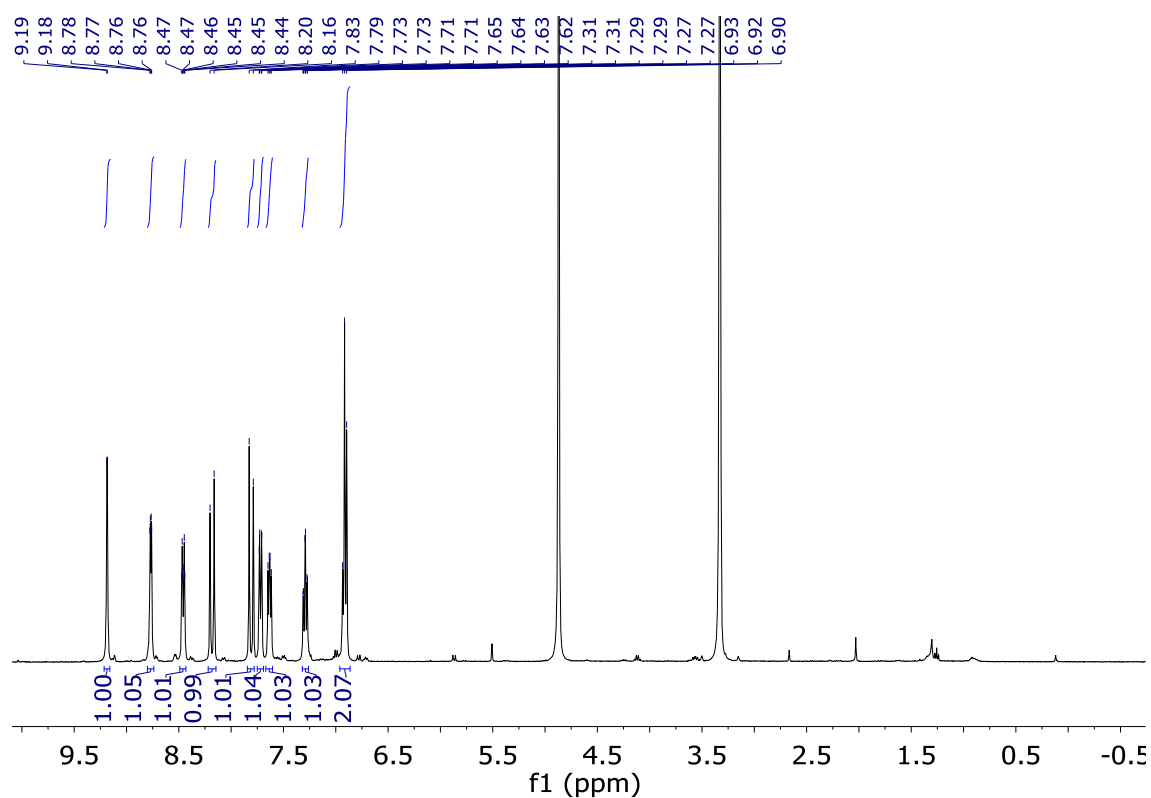


Figura C2.3. Espectro ¹H RMN do composto Py3 em MeOH a pH=7 (espécie Ct).

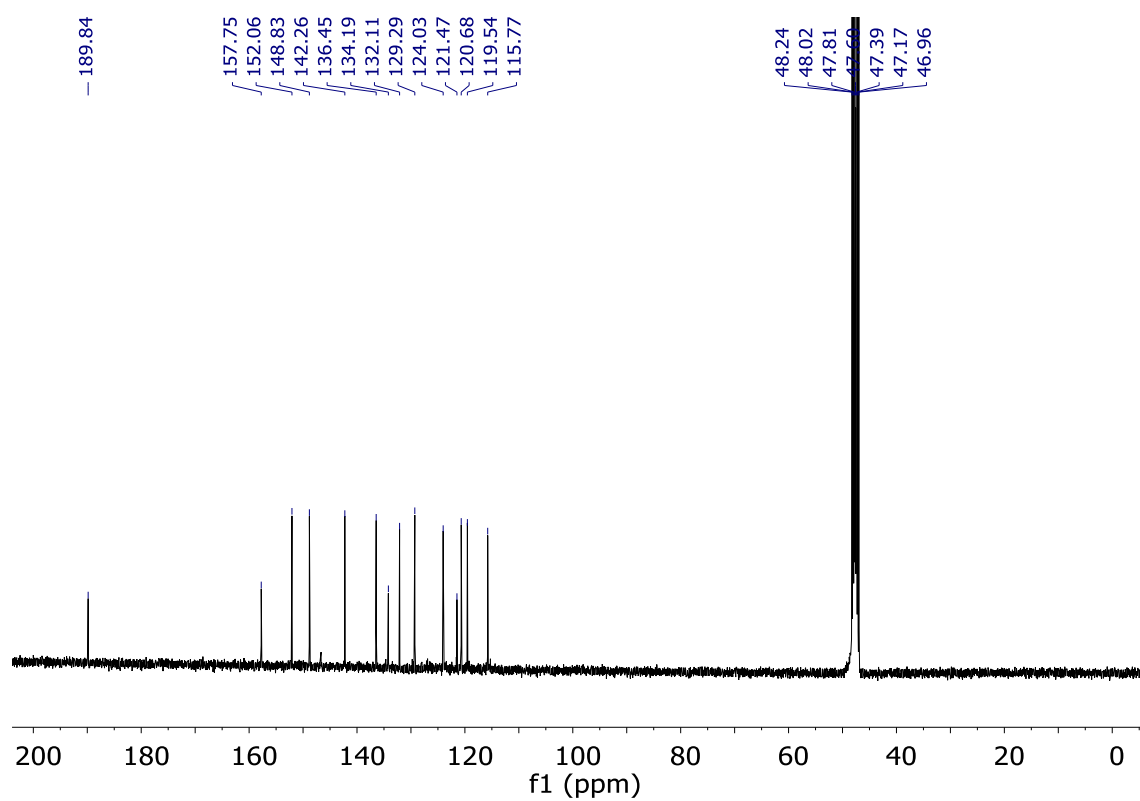


Figura C2.4. Espectro ^{13}C RMN do composto Py3 em MeOH a $\text{pD}=7$ (espécie Ct).

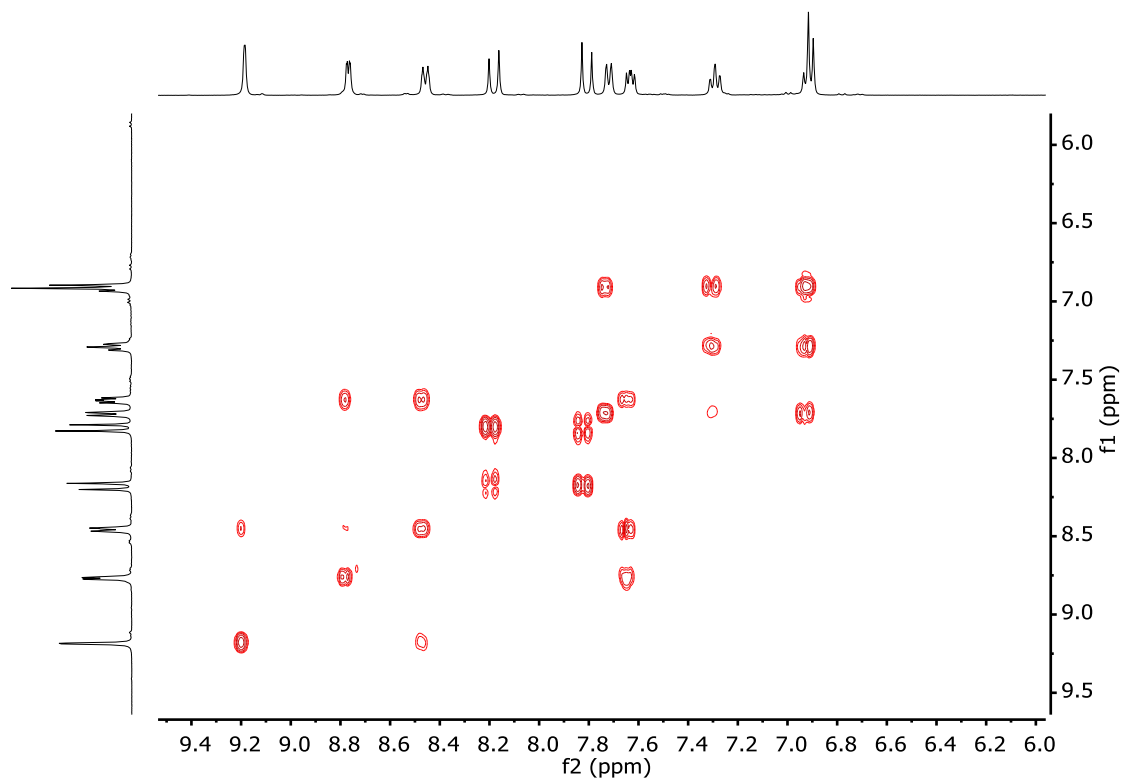


Figura C2.5. ^1H - ^1H -COSY do composto Py3 em MeOH a $\text{pD}=7$ (espécie Ct).

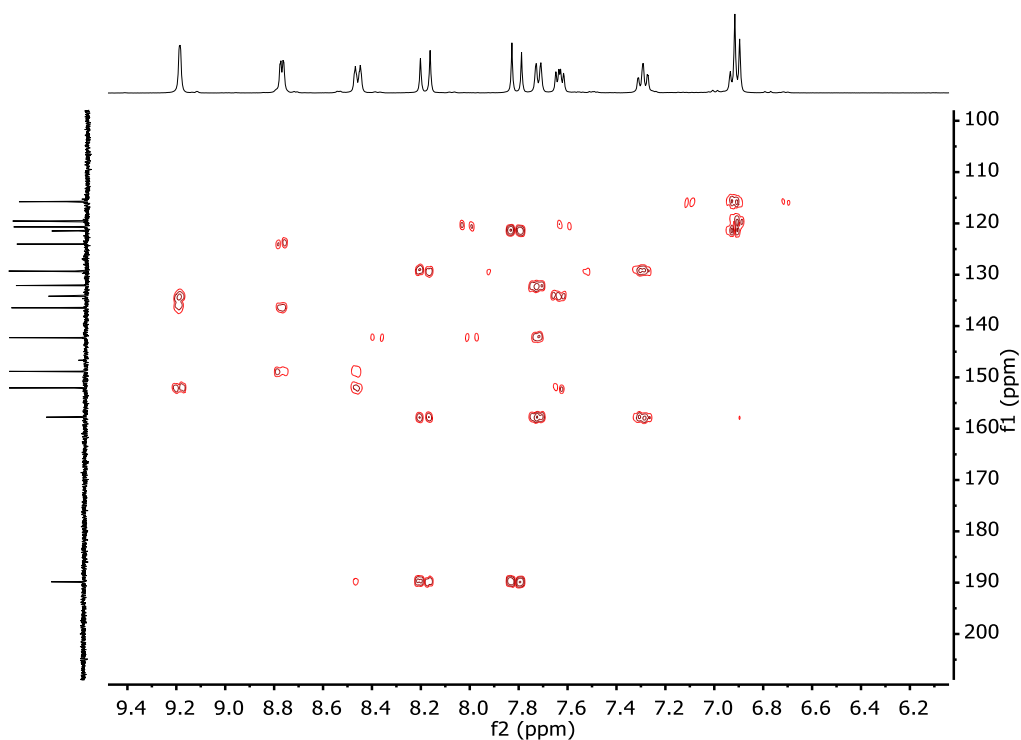
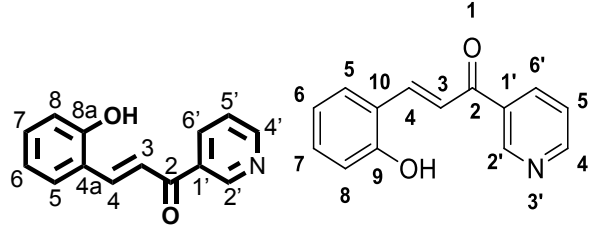


Figura C2.6. ^1H - ^{13}C -HMBC do composto Py3 em MeOH a $\text{pD}=7$ (espécie Ct).

Tabela C2.2 – Atribuição completa dos picos ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do composto Py3 em MeOH a $\text{pD}=7$ (espécie Ct).

				
Posição ^a	^1H δ/ppm (J/Hz) MeOD ($\text{pD} = 7$)	^{13}C δ/ppm MeOD ($\text{pD} = 7$)	HMBC MeOD ($\text{pD} = 7$)	COSY MeOD ($\text{pD} = 7$)
1	-	-	-	-
2	-	189.8	3, 4, 2', 6'	-
3	7.81 (<i>d</i> , 15.8)	120.8	1', 2, 4, 9, 10	4
4	8.18 (<i>d</i> , 15.8)	142.3	3, 5, 9	3
5	7.72 (<i>dd</i> , 8.1, 1.7)	129.3	4, 7, 9	6, 7
6	6.93-6.89 (<i>ov</i>)	119.5*	8, 10	5, 6, 7, 8
7	7.29 (<i>td</i> , 7.7, 1.7)	132.2	5, 9	5, 6, 8
8	6.93-6.89 (<i>ov</i>)	115.8*	6, 10	5, 6, 7, 8

8a	-	157.7	4, 5, 7	-
4a	-	121.6	3, 6, 8	-
1'	-	134.2	3, 5'	-
2'	9.19 (<i>d</i> , 2.3)	148.8	2, 6'	6'
3'	-	-	-	-
4'	8.77 (<i>dd</i> , 5.0, 1.8)	152.2	6'	5', 6'
5'	7.63 (<i>dd</i> , 8.0, 5.0)	124.1	1''	4', 6'
6'	8.46 (<i>dt</i> , 8.0, 2.0)	136.6	2, 2', 4'	2', 4', 5'

^aEsta numeração foi feita de acordo com a estrutura do catião flavílio. *estes sinais podem ser intercambiáveis.

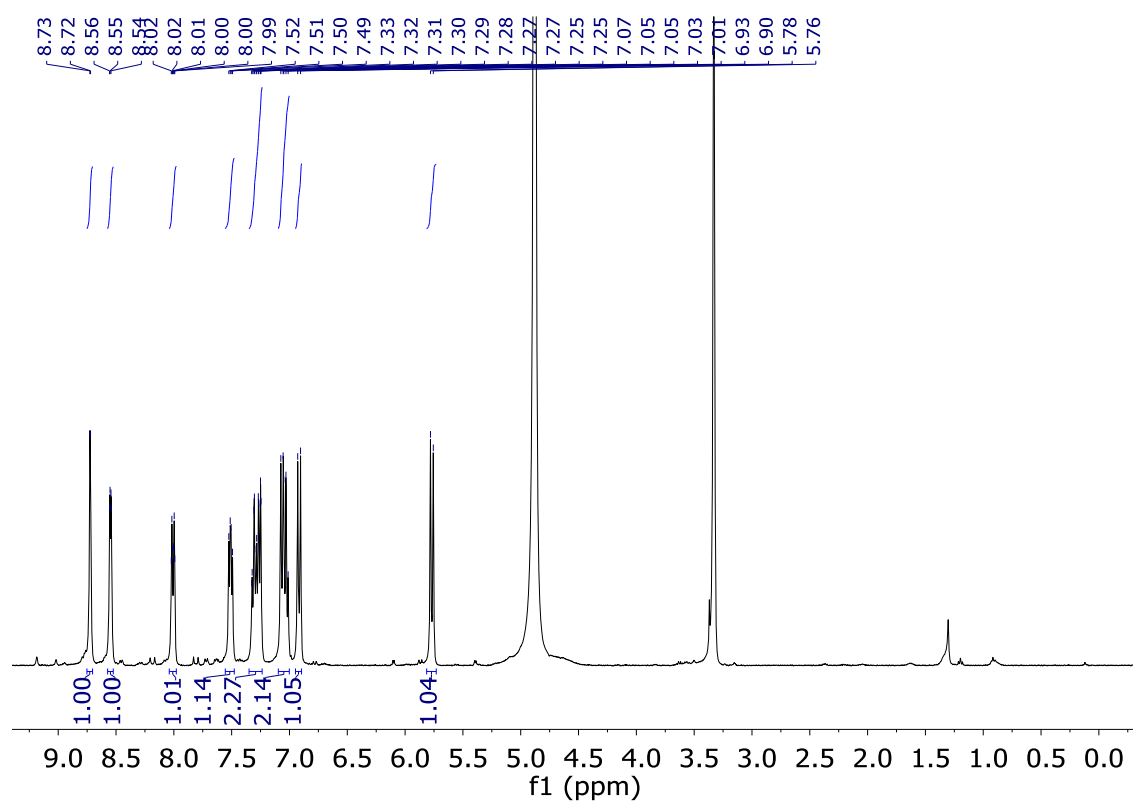
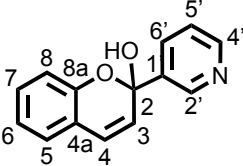


Figura C2.7. ¹H RMN da espécie **B** em MeOD (pD = 7). Esta espécie é formada através da irradiação da Ct a 365 nm durante 2h em MeOD e 20h de recuperação térmica no escuro.

Tabela C2.3 – Atribuição completa dos picos de ^1H -RMN da espécie **B.**

	
Posição ^a	^1H $\delta/\text{ppm (J/Hz)}$ MeOD
1	-
2	-
3	5.77 (<i>d</i> , 9.8)
4	6.92 (<i>d</i> , 9.8)
5	7.35-7.24 (<i>ov</i>)
6	7.10-7.00 (<i>ov</i>)
7	7.36-7.22 (<i>ov</i>)
8	7.10-7.00 (<i>ov</i>)
8a	-
4a	-
1'	-
2'	8.72 (<i>d</i> , 2.4)
3'	-
4'	8.01 (<i>dt</i> , 8.0, 2.1)
5'	7.51 (<i>dd</i> , 8.0, 4.8)
6'	8.72 (<i>d</i> , 2.4)

^aEsta numeração foi feita de acordo com a estrutura do catião flavílio.

C.3 Espectros de RMN e atribuição completa dos picos das espécies do multiestado de 7NPy4

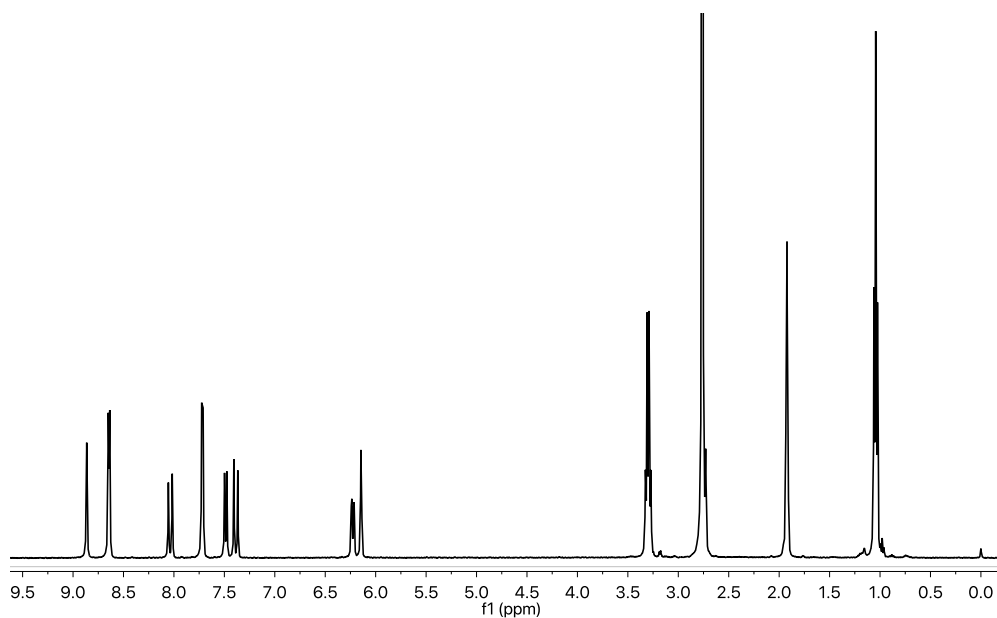


Figura C3.2. ^1H RMN do composto 7Npy4 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ em $\text{pD}=6,5$ (espécie Ct).

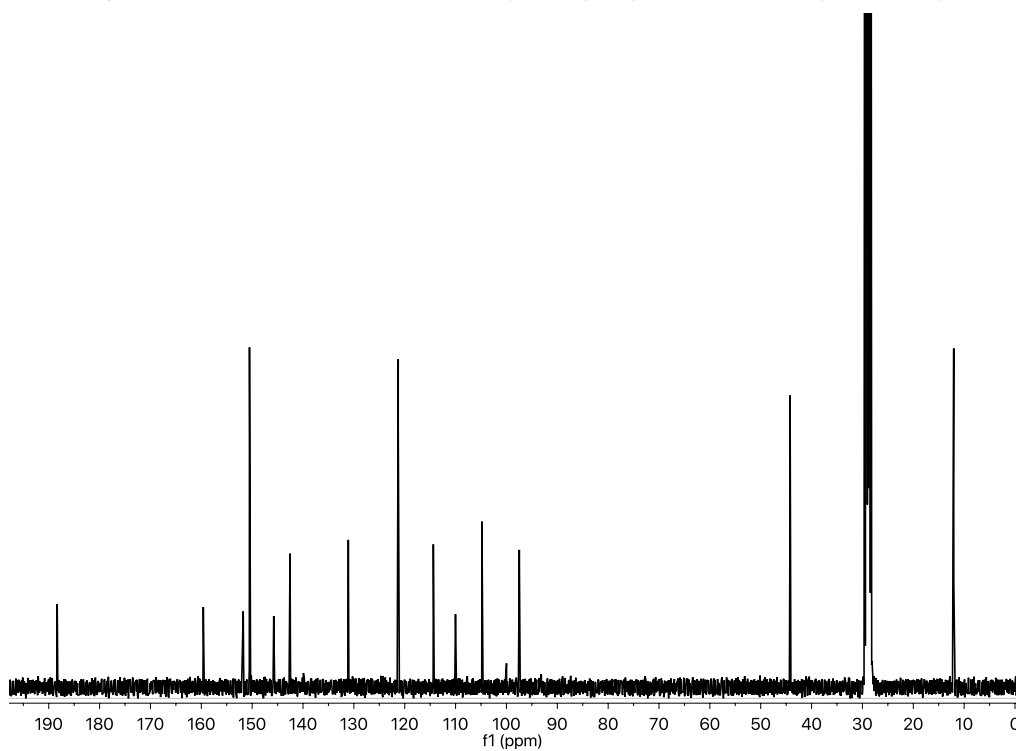


Figura C3.3. ^{13}C RMN do composto 7Npy4 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ em $\text{pD}=6,5$ (espécie Ct).

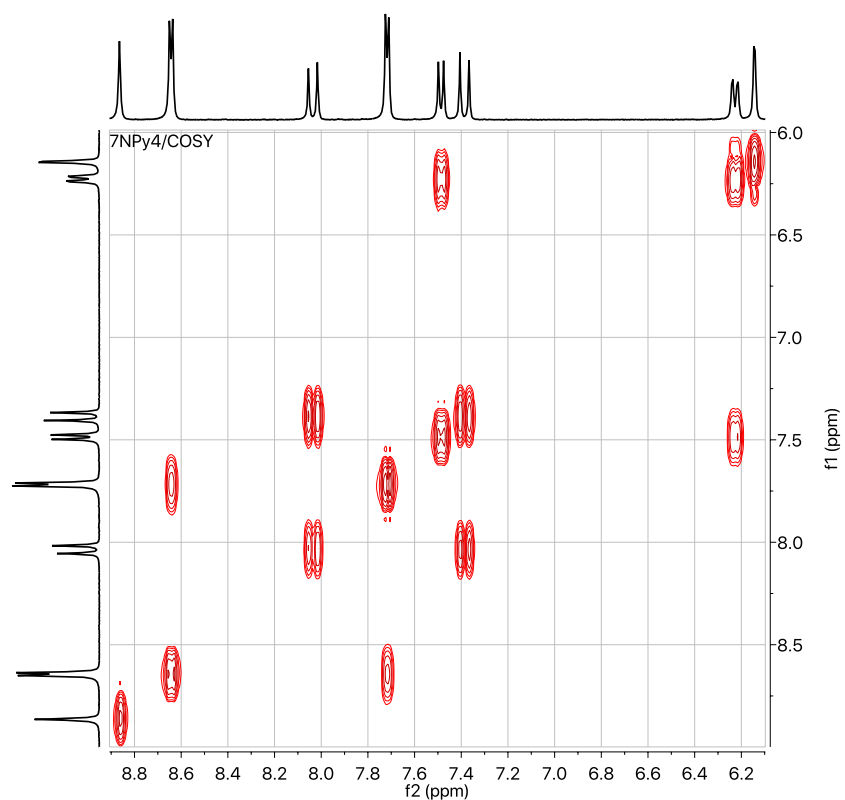


Figura C3.4. ^1H - ^1H - do composto 7Npy4 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ em pD=6,5 (espécie Ct).

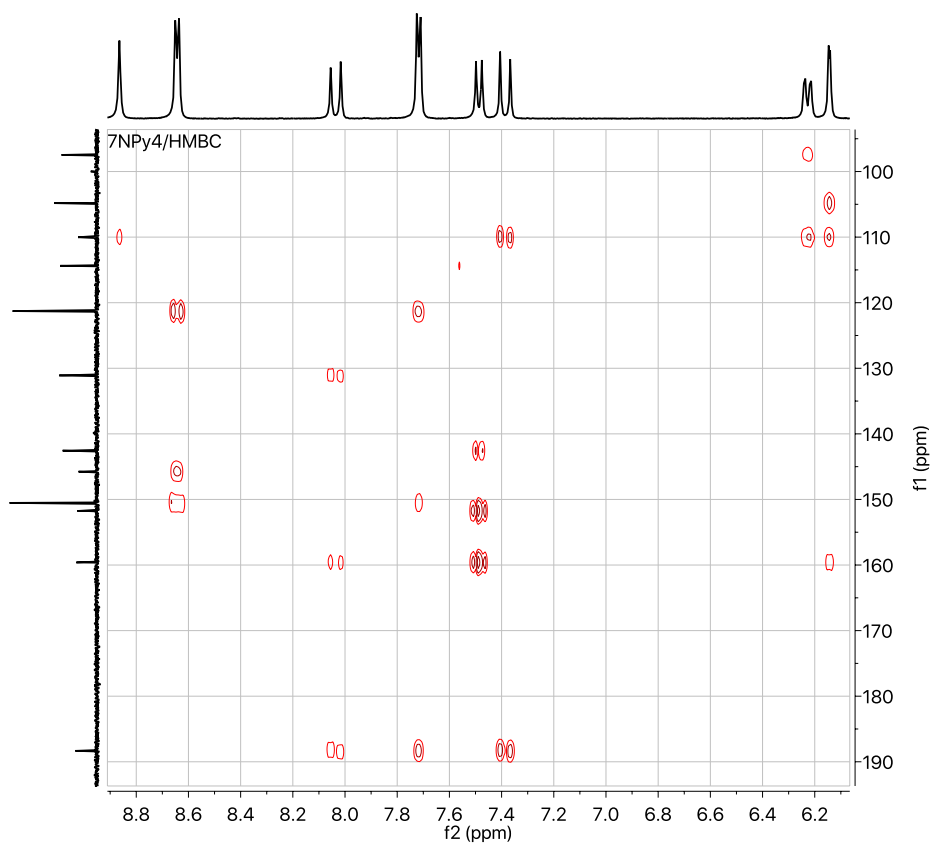


Figura C3.5. ^1H - ^{13}C -HMBNMR do composto 7Npy4 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ em pD=6,5 (espécie Ct).

Tabela C3.1 – Atribuição completa dos picos de ^1H - RMN e ^{13}C - RMN do composto 7Npy4 em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ em pD=6,5 (espécie Ct).

Posição ^a	^1H δ/ppm (J/Hz) (CD_3) ₂ CO	^{13}C δ/ppm (CD_3) ₂ CO	HMBC (CD_3) ₂ CO
OH	8.86 (s, 1H)	-	-
2	-	188.3	4, 3, 2'
3	7.39 (d, 16.0)	114.4	
4	8.04 (d, 16.0)	142.6	5
5	7.49 (d, 8.9)	131.1	
6	6.23 (dd, 8.9, 2.5)	104.8	8
7	-	151.7	5, CH ₂
8	6.14 (d, 2.6)	97.5	6
8a	-	159.6	4, 5, 6
4a	-	110.0	3, 6, 8
1'	-	145.7	3'
2'	7.73 (d, 7.0)	121.3	2', 3'
3'	8.64 (d, 7.0)	150.5	3', 2'
7-N-(CH ₂ -CH ₃) ₂	3.30 (q, 7.0)	44.2	CH ₂ , CH ₃
7-N-(CH ₂ -CH ₃) ₂	1.04 (t, 7.0)	12.0	CH ₂

^aEsta numeração foi feita de acordo com a numeração da estrutura do catião flavílio.

¹H-RMN (400 MHz, Acetone-*d*₆) 3.30 (q, *J* = 7.0 Hz, 5H), 1.04 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

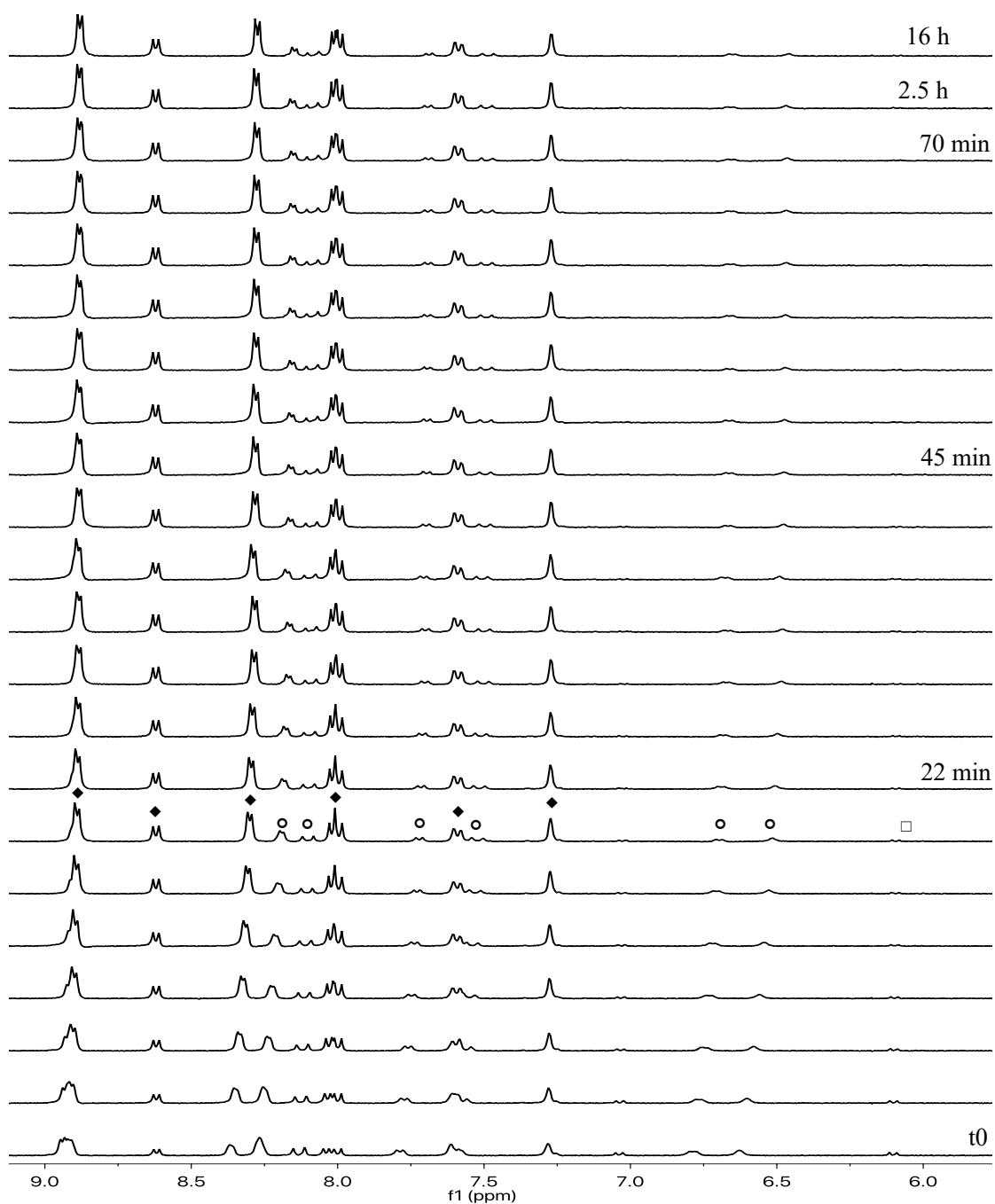


Figura C3.6 – Variação espectral ^1H RMN do compost 7Npy4 após um salto de $\text{pD}=6,5$ para $\text{pD}=3$ em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v).

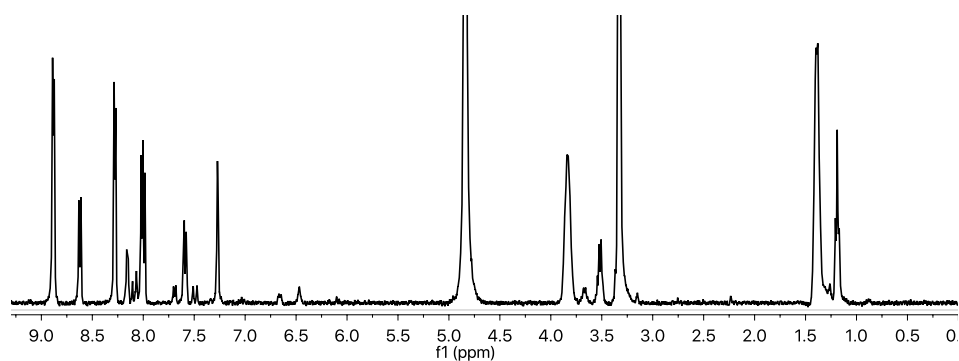


Figura C3.7. ^1H RMN de 7NPy4 em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v) a $\text{pD}=3.0$ (espécie AH^+).

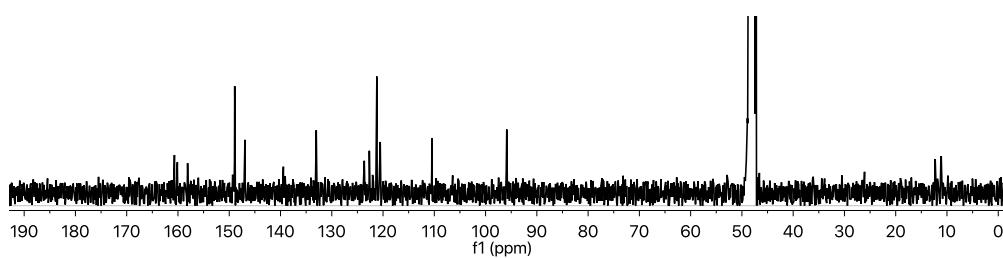


Figura C3.8. ^{13}C RMN de 7NPy4 em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v) a $\text{pD}=3.0$ (espécie AH^+).

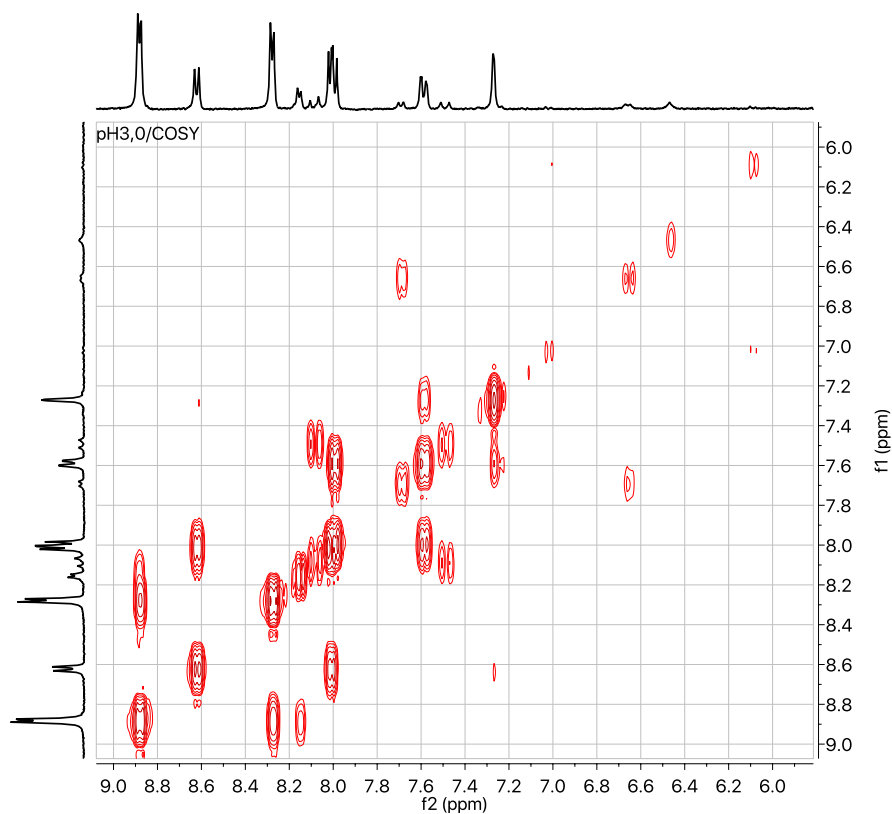


Figura C3.9. ^1H - ^1H -COSY de 7NPy4 em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v) a $\text{pD}=3.0$ (espécie AH^+).

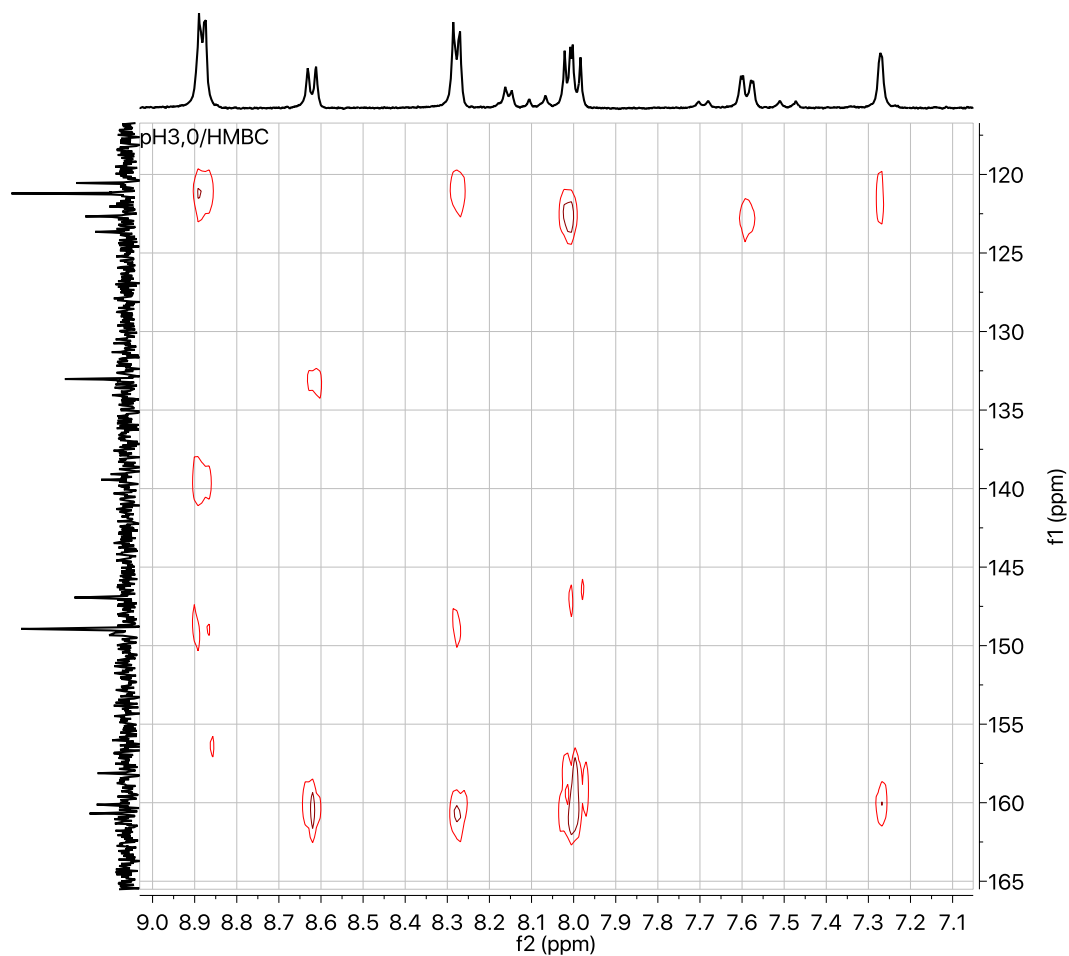
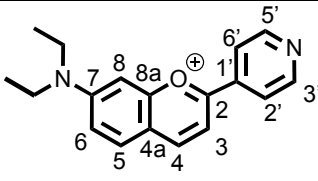


Figura C3.10. ^1H - ^{13}C -HMBC de 7NPy4 em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v) a $\text{pD}=3.0$ (espécie AH^+).

Tabela C3-2 – Atribuição completa dos picos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 7NPy4 em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v) a $\text{pD}=3.0$ (espécie AH^+). Composto maioritário (75.8%)

Posição			
	^1H δ/ppm (J/Hz) MeOD:D ₂ O (1:1)	^{13}C δ/ppm MeOD:D ₂ O (1:1)	HMBC MeOD:D ₂ O (1:1)
1	-	-	-
2	-	160.7	4, 2'

3	8.00 (<i>d</i> , ov, 7.5)	132.9	4
4	8.62 (<i>d</i> , 8.9)	146.9	5
5	8.00 (<i>d</i> , ov, 7.5)	110.5	
6	7.59 (<i>dd</i> , 8.9, 2.3)	120.6	8
7	-	160.1	5, 8, CH ₂
8	7.27 (<i>d</i> , 2.3)	95.9	6
8a	-	158.14	5
4a	-	122.7	3, 6
1'	-	139.4	3', 3
2'	8.28 (<i>m</i>)	121.2	3', 2'
3'	8.84 (<i>m</i>)	149.0	2', 3'
7-N-(<u>CH</u> ₂ -CH ₃) ₂	3.84 (<i>m</i>)	46.9	-
7-N-(CH ₂ - <u>CH</u> ₃) ₂	1.39 (<i>m</i>)	11.8	-

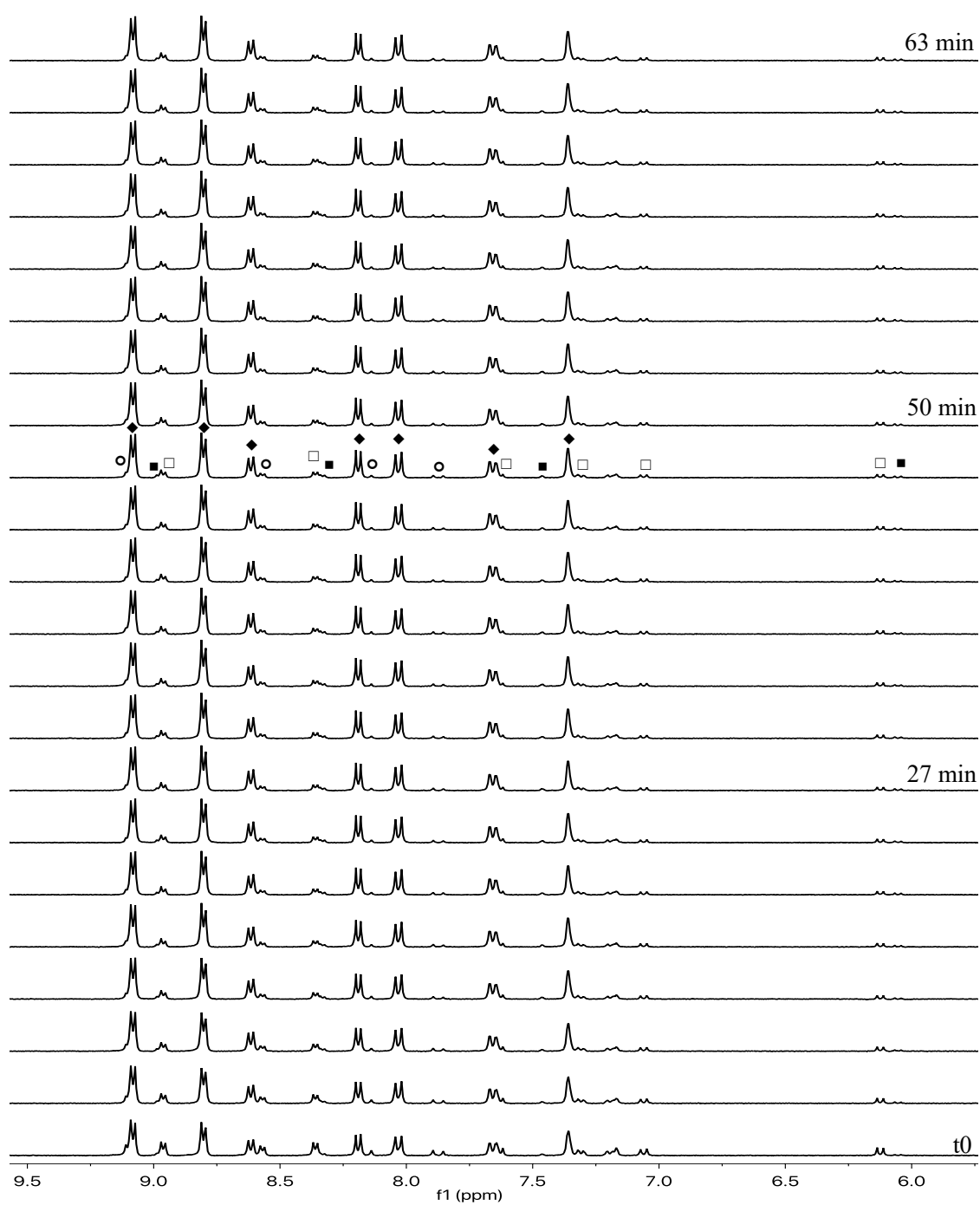


Figura C3.11 – Variação espectral ^1H RMN do composto 7NPy4 após um salto de $\text{pD}=6,5$ para $\text{pD}=0,5$ em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v).

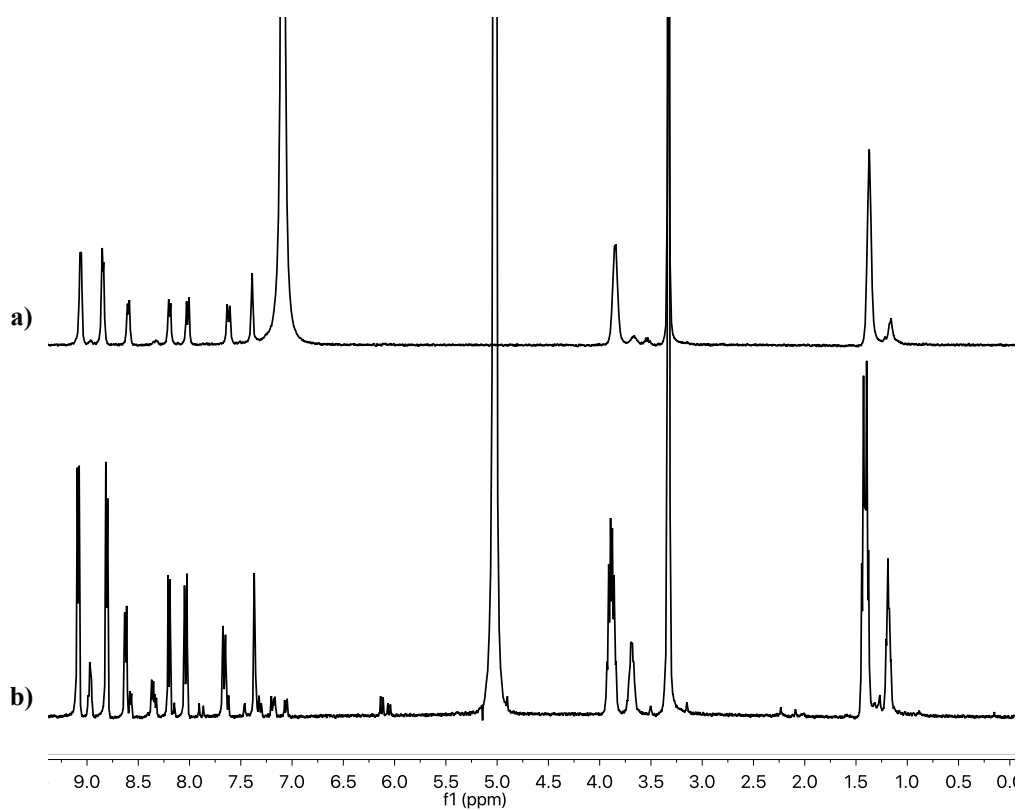


Figura C3.12. a) ^1H RMN do composto 7NPy4 em DCl a $\text{pD}=-1$ (AH^{2+}); b) ^1H -RMN do composto 7NPy4 em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v) a $\text{pD}=0,5$ (AH^{2+} espécie maioritária 78.1%).

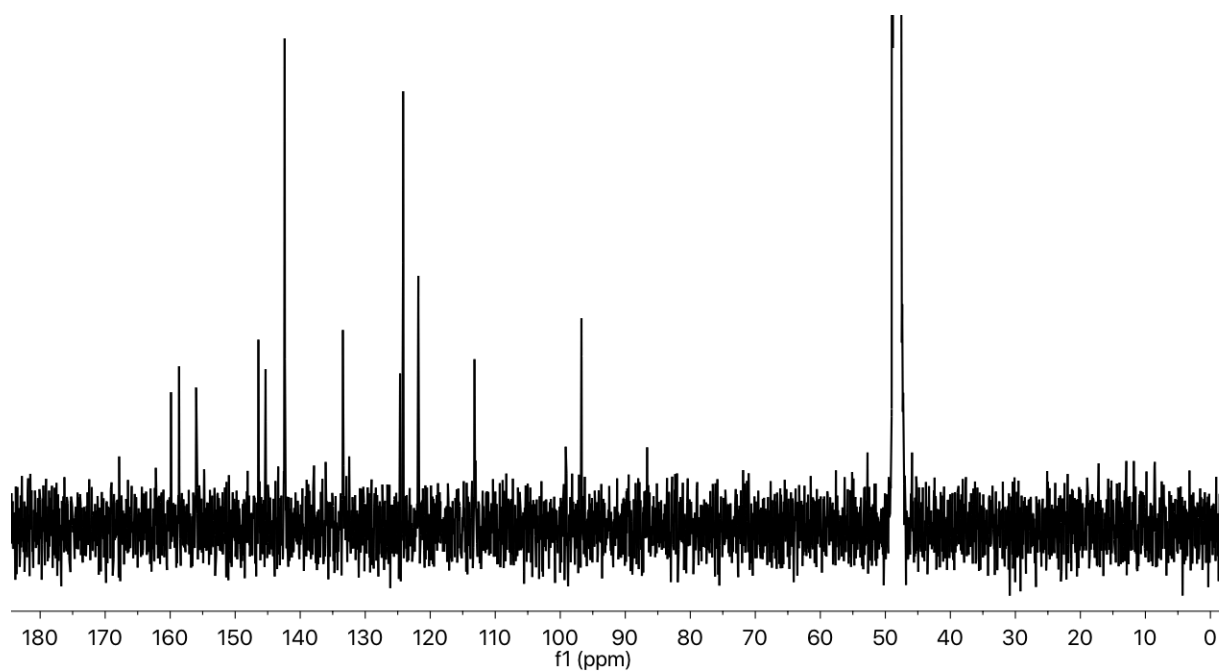


Figura C3.13. ^{13}C RMN do composto 7NPy4 em $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1 v/v) a $\text{pD}=-1$ (AH^{2+}).

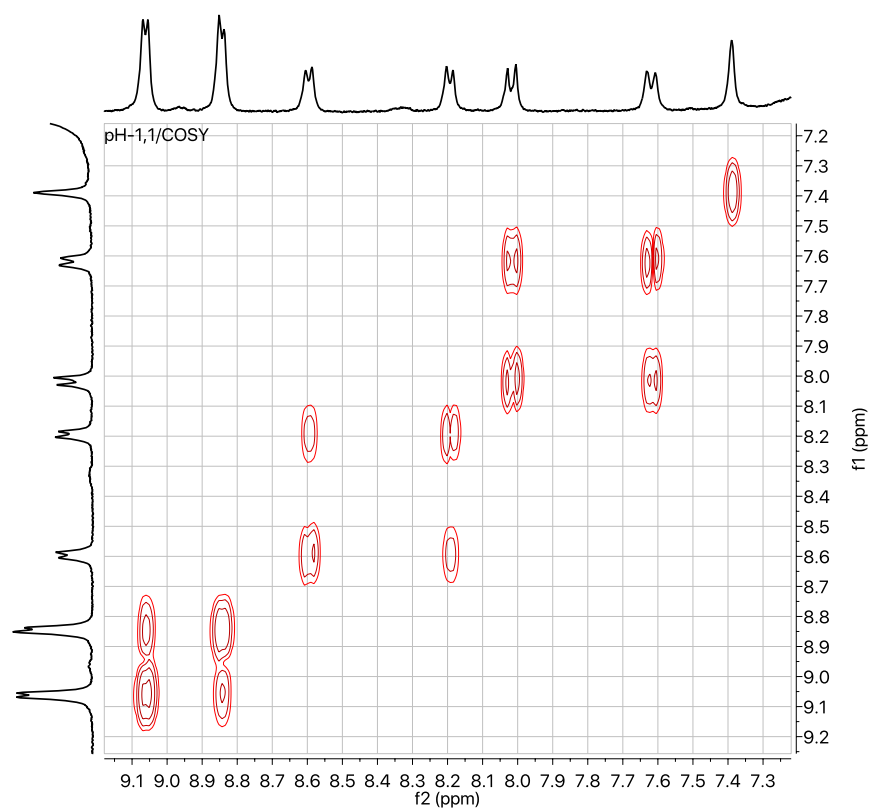
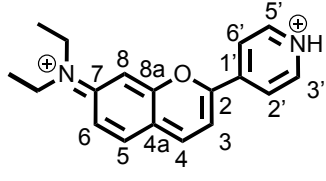


Figura C3.14. ^1H - ^1H -COSY do composto 7NPy4 em DCl at $\text{pD}=-1$ (AH^{2+}).

Tabela C3.3 – Atribuição completa dos picos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 7NPy4 em DCl at $\text{pD}=-1$ (AH^{2+})

Posição		
	^1H δ/ppm (J/Hz) DCI	^{13}C δ/ppm DCI
1	-	
2	-	159.8*
3	8.02 (dd, 9.5, 4.2)	133.3 [#]
4	8.60 (d, 7.5)	145.4
5	8.19 (d, 7.5)	113.2 [#]
6	7.62 (d, 9.6)	121.8 [#]
7	-	158.5*
8	7.39 (s,)	96.8

8a	-	155.8*
4a	-	124.6 [§]
1'	-	146.4 [§]
2'	8.84 (d, 6.1)	
3'	9.06 (d, 5.9)	142.5
7-N-(<u>CH</u> ₂ -CH ₃) ₂	3.85 ((<i>br m</i>)	48.0
7-N-(CH ₂ - <u>CH</u> ₃) ₂	1.38 ((<i>br m</i>)	12.0

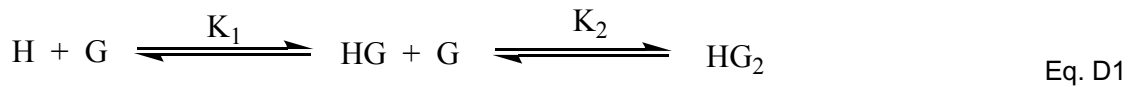
[§], *, # Estes sinais podem ser intercambiáveis

APÊNDICE D

FOTOREOLOGIA

D.1 Deduções matemáticas dos processos envolvidos na complexação

Equilíbrio



$$K_1 = \frac{[HG]}{[H][G]} \quad K_2 = \frac{[HG_2]}{[HG][G]} \quad \text{Eq. D2}$$

Balanço de massas

$$[H]_0 = [H] + K_1[H][G] + K_1K_2[H][G]^2 \quad \text{Eq. D3}$$

$$[G]_0 = [G] + K_1[H][G] + 2K_1K_2[H][G]^2 \quad \text{Eq. D4}$$

$$[H] = \frac{[H]_0}{1 + K_1[G] + K_1K_2[G]^2} \quad \text{Eq. D5}$$

$$[G]_0 = [G] + K_1[G] \frac{[H]_0}{1 + K_1[G] + K_1K_2[G]^2} + 2K_1K_2[G]^2 \frac{[H]_0}{1 + K_1[G] + K_1K_2[G]^2} \quad \text{Eq. D6}$$

$$[G]_0 = \frac{[G] + K_1[G]^2 + K_1K_2[G]^3 + K_1[G][H]_0 + 2K_1K_2[G]^2[H]_0}{1 + K_1[G] + K_1K_2[G]^2} \quad \text{Eq. D7}$$

Onde, $K_1K_2 = a$ vem:

$$[G]_0 = \frac{[G] + K_1[G]^2 + a[G]^3 + K_1[G][H]_0 + 2a[G]^2[H]_0}{1 + K_1[G] + a[G]^2} \quad \text{Eq. D8}$$

$$[G]_0 \cdot (1 + K_1[G] + a[G]^2) = [G] + K_1[G]^2 + a[G]^3 + K_1[G][H]_0 + 2a[G]^2[H]_0 \quad \text{Eq. D9}$$

$$[G] + K_1[G]^2 + a[G]^3 + K_1[G][H]_0 + 2a[G]^2[H]_0 - [G]_0 \cdot (1 + K_1[G] + a[G]^2) = 0 \quad \text{Eq. D10}$$

$$a[G]^3 + (K_1 + 2a[H]_0 - a[G]_0)[G]^2 + (1 + K_1[H]_0 - K_1[G]_0)[G] - [G]_0 = 0 \quad \text{Eq. D11}$$

$$\mathbf{x} = [G]; \mathbf{a} = K_1K_2; \mathbf{b} = K_1 + 2K_1K_2[H]_0 - K_1K_2[G]_0; \quad \text{Eq. D12}$$

$$\mathbf{c} = 1 + K_1[H]_0 - K_1[G]_0; \mathbf{d} = -[G]_0 \quad \text{Eq. D13}$$

$$\mathbf{ax}^3 + \mathbf{bx}^2 + \mathbf{cx} + \mathbf{d} = 0 \quad \text{Eq. D14}$$

Os valores de $\mathbf{x}$ são determinados pelo método numérico de Newton:

$$x_{n+1} = x_n - \frac{f(x_n)}{f'(x_n)} \quad \text{Eq. D15}$$

Onde x_0 é uma aproximação inicial atribuída aleatoriamente " $x_0 = [G]_0$ ", n indica a n ésima interação do algoritmo, $f'(x_n)$ é a derivada da função f no ponto x_n e $f'(x_n)$ é a equação do terceiro grau.

Conhecendo o valor de x ($x=[G]$), são determinadas as concentrações de todas espécies no equilíbrio.

$$[H] = \frac{[H]_0}{1 + K_1[G] + K_1K_2[G]^2} \quad \text{Eq. D16}$$

$$[HG] = K_1[H][G] \quad \text{Eq. D17}$$

$$[HG_2] = K_1[HG][G] \quad \text{Eq. D18}$$

Frações molares

$$X_{[H]} = \frac{[H]}{[H]_0} \quad \text{Eq. D19}$$

$$X_{[HG]} = \frac{[HG]}{[G]_0} \quad \text{Eq. D20}$$

$$X_{[HG_2]} = \frac{[HG_2]}{[G]_0} \quad \text{Eq. D21}$$

$$X_{[G]} = \frac{[G]}{[G]_0} \quad \text{Eq. D22}$$

D.2 Elucidação estrutural do composto fotoresponsivo

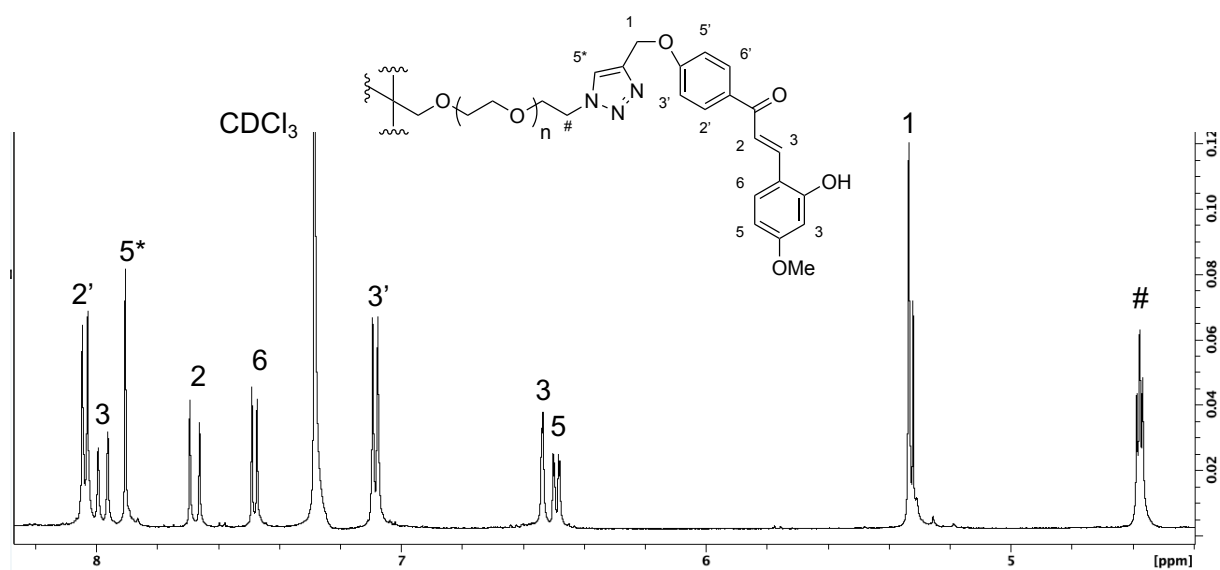


Figura D2.1. Espectro ^1H RMN da zona aromática do composto 4-armPEG-Ct em CDCl_3 .

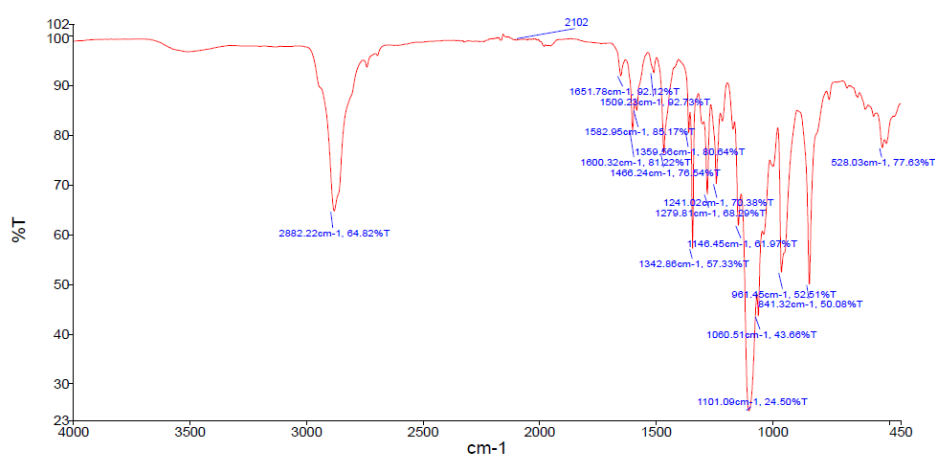


Figura D3.2. FTIR-ATR do composto 4-armPEG-Ct.

D.3 Viscoelasticidade do 4-armPEG-AH⁺ isolado a pH=1

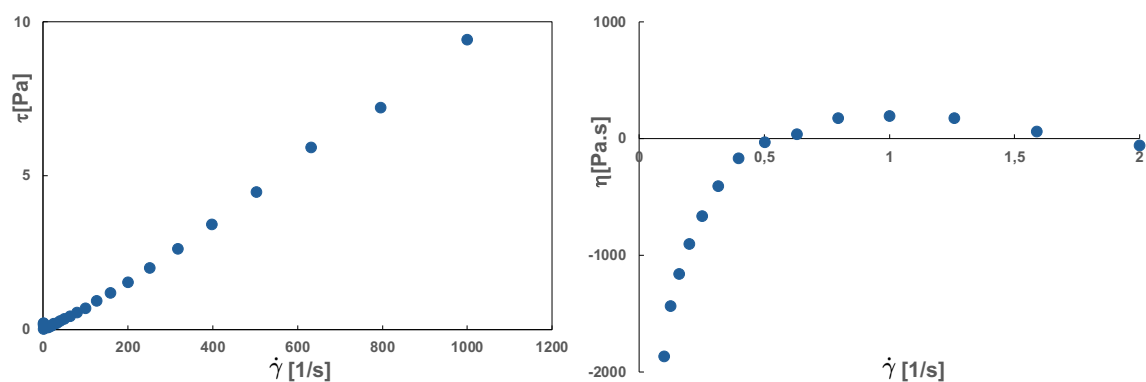


Figura D3.1. Curva de escoamento do hidrogel: **a)** tensão versus tensão. **b)** viscosidade versus deformação



2024

AMBRÓSIO CAMUENHO

ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS CONTROLADAS POR pH, LUZ E/OU
INTERAÇÕES INTERMOLECULARES EM SISTEMAS MULTIESTADO BASEADOS
EM DERIVADOS DE 2-FENIL-1-BENZOPIRÍLIO.

