

# Agradecimentos

A apresentação deste trabalho representa o culminar de uma etapa decisiva da minha vida, que só foi possível com a contribuição de muitas pessoas às quais quero demonstrar o meu profundo agradecimento.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Prof. António Luís Maçanita pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de investigação, pela constante motivação para a discussão científica assim como a disponibilidade sempre demonstrada e confiança depositada em mim ao longo destes meses. Foi um grande privilégio trabalhar a seu lado e espero que este meu trabalho se tenha traduzido em mais um avanço para a compreensão destas tão apreciadas Antocianinas, umas das grandes paixões do professor.

Gostaria também de agradecer o suporte financeiro concedido pela Fundação para a Ciência e Tecnologia/MCTES (PIDDAC), para a realização deste trabalho aqui descrito, sob a forma de uma bolsa de investigação científica integrada no projecto PTDC/QUI/65728/2006, intitulado "Antocianinas como Fotoprotectores Naturais".

Agradeço ao Prof. Sérgio Seixas de Melo e a Prof. Maria João Moreno por todo o apoio que me deram para a apresentação deste trabalho.

Ao Prof. João Carlos Lima (assim como a todo o seu grupo de investigação), pelo apoio na obtenção dos resultados de Fotólise de Relâmpago, mas acima de tudo, pela sua paciência, compreensão e força que sempre me transmitiu.

Ao Dr. Adilson Freitas, pelo seu constante apoio e orientação científica, ao Bruno, a Karina, a Ying e ao Marco pelo companheirismo e amizade criada ao longo destes meses tornando este trabalho ainda mais interessante. Ao Prof. Adelino pela sua constante disponibilidade e preciosos ensinamentos e ao Dr. Roberto Di Paolo, a quem um simples agradecimento será pouco comparado com toda a ajuda e amizade demonstrada ao longo destes meses.

A todos os elementos integrantes do Centro de Química Estrutural (Prof. Sílvia Costa) e Centro de Química Física Molecular (Prof. Prieto, Prof. Martinho e ao Prof. Luis Filipe Vieira) do Instituto

Superior Técnico de Lisboa, assim como a todos os membros do Departamento de Química da Universidade de Coimbra e Universidade Nova de Lisboa (Prof. Fernando Pina, César Laia, Jorge Parola e Dr. Artur).

Ao Prof. Miguel A. Esteso da Faculdade de Farmácia da Universidad de Alcalá, Madrid, pela sua amizade e confiança, assim como a todos os meus carinhosos amigos de Espanha.

A todos os meus AMIGOS e FAMILIARES, pelo apoio, suporte e confiança, onde cada um deles, na sua forma individual, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Quero agradecer em especial aos meus amigos: Xé, Fraga, Lili, Cláudia, Vidinha, Marta, Inês, Andreia, Tânia, Sofia, Maria José, Gonçalo, Luís, Rui e aos Davids.

Aos meus PAIS, irmão e cunhada, ao meu padrinho e a minha tia Olécia, a Sandra, ao Zé Manuel e a Sónia, por tantos anos de carinho, ajuda e compreensão. Sem eles nada disto teria sido possível.

À Diana por de forma incondicional ter estado sempre ao meu lado ao longo de todos estes anos.

# Índice

<b>Índice</b>	<b>i</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>Capítulo 1: Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Histórico	1
1.2. Os Polifenóis	2
1.3. Os Flavonóides	2
1.4. As Antocianinas	5
1.5. Radiação ultravioleta	13
1.6. Mecanismo de Fotoprotecção nas plantas contra a radiação visível e ultravioleta	16
1.7. Antocianinas como fotoprotectores naturais	20
1.8. O hemicetal	21
<b>Capítulo 2: Resultados e Discussão</b>	<b>23</b>
2.1. Espectroscopia de absorção electrónica e fluorescência	23
2.2. Caracterização Fotoquímica	29
2.2.1. Fotoquímica de antocianinas	29
2.2.2. Fotoquímica do hemicetal	30
2.2.3. Irradiação Contínua	33
2.2.4. Emissão de fluorescência	37
2.3. Caracterização fotofísica	44
2.3.1. Rendimentos quânticos de fluorescência	44
2.3.2. Tempos de vida de fluorescência	45
2.3.3. Fotólise de relâmpago	49
<b>Capítulo 3: Conclusões</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo 4: Experimental</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo 5: Bibliografia</b>	<b>65</b>



# Abreviaturas

A	Base quinonoidal
Abs	Absorvância
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
B	Hemicetal
Car	Carotenóides
Chl	Clorofilas
C <sub>cis</sub>	Chalcona Cis
C <sub>trans</sub>	Chalcona Trans
E <sub>T</sub>	Energia do estado tripleto
HA <sup>+</sup>	Catião flavílio
HOMO	Orbital molecular ocupada de mais alta energia
I <sub>0</sub>	Intensidade de luz incidente
K	Graus Kelvin
K <sub>a</sub>	Constante de equilíbrio da reacção de desprotonação
K <sub>h</sub>	Constante de equilíbrio da reacção de acidez (hidratação)
K <sub>i</sub>	Constante de equilíbrio da reacção de isomerização
K <sub>t</sub>	Constante de equilíbrio da reacção de tautomerização
k <sub>d</sub>	Constante de velocidade de desprotonação
k <sub>h</sub>	Constante de velocidade de hidratação do catião flavílio
k <sub>-h</sub>	Constante de velocidade de desidratação do hemicetal
k <sub>-i</sub>	Constante de velocidade de isomerização da chalcona <i>trans</i>
k <sub>i</sub>	Constante de velocidade de isomerização da chalcona <i>cis</i>
k <sub>ic</sub>	Constante de velocidade da conversão interna
k <sub>isc</sub>	Constante de velocidade do cruzamento intersistemas
k <sub>nr</sub>	Constante de velocidade do processo não radiativo
k <sub>obs</sub>	Constante de velocidade observada
k <sub>p</sub>	Constante de velocidade de protonação
k <sub>ph</sub>	Constante de velocidade de fosforescência
LUMO	Orbital molecular vazio de mais baixa energia
M	Espécie atómica ou molecular
M*	Espécie excitada
N <sub>abs</sub>	Número de fótons absorvidos
N <sub>em</sub>	Número de fótons emitidos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
PAR	Radiação fotossintética activa
PSA	Aparelho fotossintético
PS I	Fotossistema I
PS II	Fotossistema II
Phe	Compostos fenólicos
ROS	Espécies reactivas com o oxigénio
S <sub>0</sub>	Estado singuleto fundamental
S <sub>1</sub>	Primeiro estado singuleto excitado
S <sub>2</sub>	Segundo estado singuleto excitado
S <sub>nv</sub>	Transição de um estado singuleto n para um estado vibracional v

$T_1$	Primeiro estado tripleto excitado
$T_2$	Segundo estado tripleto excitado
UV-A	Região de ultravioleta A
UV-B	Região de ultravioleta B
UV-C	Região de ultravioleta C
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
$n_{S_1}$	Número de partículas excitadas num dado instante
$n, \sigma^*$	Transição entre orbitais moleculares não-ligante e sigma antiligante
$n, \pi^*$	Transição entre orbitais moleculares não-ligante e pi anti-ligante
$\epsilon$	Coefficiente de absorvidade molar
$\pi$	Orbital pi
$\pi, \pi^*$	Transição entre orbitais moleculares pi e pi anti-ligante
$\sigma$	Orbital sigma
$\sigma, \sigma^*$	Transição entre orbitais moleculares sigma e sigma anti-ligante
$\tau$	Tempo de vida de uma espécie
$\tau_{S_1}, \tau_{fl}$	Tempo de vida do estado $S_1$ ; Tempo de vida de fluorescência
$\phi_{fl}$	Rendimento quântico de fluorescência
$\phi$	Intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_{0-0}$	Comprimento de onda da transição 0-0
$\lambda_{em}$	Comprimento de onda de emissão de fluorescência
$\lambda_{exc}$	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{max}$	Comprimento de onda de absorção electrónica máxima
$\lambda_1, \lambda_2 \text{ e } \lambda_3$	Constantes de velocidade

# Resumo

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonóides e estão amplamente distribuídas na natureza estando relacionadas com importantes actividades biológicas. Constituem uma fracção não energética da dieta do ser humano e estão relacionadas com importantes actividades biológicas. O estudo de corantes naturais, tais como as antocianinas, é uma ampla e activa área de investigação, devido às particulares características destas moléculas. A absorção da luz por estes compostos, responsáveis pelas cores vermelha, azul e roxa da maioria das frutas, flores e folhas, é produto da combinação de vários factores tais como: o número de substituintes, a presença ou não de outras moléculas capazes de estabilizar a cor (“co-pigmentos”), o pH local do meio e a natureza do microambiente em que a antocianina se encontra.

Neste trabalho, procedeu-se ao estudo aprofundado da fotoquímica e fotofísica da forma hemiacetal B de três antocianinas naturais: Pelargonina, Cianina e Malvina.

O catião flavílio ( $AH^+$ ), estrutura básica das antocianinas, em solução aquosa, sofre um ataque nucleofílico por parte da água, a pH moderadamente ácido ( $pH \approx 4.5$  - reacção de hidratação) dando origem ao hemiacetal B (que absorve na região do ultravioleta), que irá sofrer uma tautomerização seguida de uma isomerização originando as chalconas *cis* ( $C_{cis}$ ) e *trans* ( $C_{trans}$ ). Paralelamente ao processo de hidratação poderá ocorrer um processo de transferência de protão para o solvente, originando a base quinoidal A, termodinamicamente menos estável. A irradiação de B (um cromeno) induz a abertura do anel levando a  $C_{cis}$  e  $C_{trans}$ . Os decaimentos de fluorescência de B são multi-exponencial revelando que a abertura do anel ocorre em aproximadamente 14-16 picosegundos, onde se verificou haver reversibilidade do sistema - presença de componentes mais longas nos factores pré-exponenciais. Os espectros de absorção transiente confirmam o desaparecimento desta espécie na zona do UV, originando outras fotoquimicamente estáveis, não se verificando formação de estados tripletos ou espécies reactivas.

Porque B é a principal forma das antocianinas a pH dos vacúolos das células das plantas, os resultados indicam que a tautomerização do estado excitado de B pode ser um mecanismo importante para proteger as plantas contra a radiação UV.



# Abstract

Anthocyanins are components of the group of flavonoids and they are widely distributed in nature. The study of natural pigments, such as anthocyanins, is a large active area of research due the particular features of these molecules. The absorption of light by these compounds, responsible for the colors red, blue and purple of most fruits, flowers and leaves, is the product of combinations of various factors, such as the number of substituents, the presence or absence of other molecules able to stabilize the color ("co-pigments"), the local pH of the medium and the nature of the microenvironment of anthocyanin.

In this work, we preceded the study of the photochemistry and photophysics of the hemiketal B from of three natural anthocyanins: Pelargonin, Cyanin and Malvin.

The flavylum cation ( $AH^+$ ), the basic structure of anthocyanins, in aqueous solution undergoes nucleophilic attack by water, at moderately acid pH ( $pH \approx 4.5$  - hydration reaction) to give the hemiketal form B (which absorbs in the UV region) which will suffer a tautomerization followed by an isomerization resulting the *cis* ( $C_{cis}$ ) and *trans* ( $C_{trans}$ ) chalcones. Parallel to the hydration process, can occur a proton transfer process to the solvent, yielding the quinonoidal base A, thermodynamically less stable. The irradiation of B (a chromene) promotes the ring opening, leading the  $C_{cis}$  and  $C_{trans}$  forms. The fluorescence decay of B is multi-exponential and showing the ring opening occurs at approximately 14-16 picoseconds and there is reversibility - presence of the longer components in the pre-exponential constants. The transiente absorption spectra confirm the disappearance of this species in the UV region, resulting other stable photochemical products and there were no triplet state formation or reactive species.

Because B is the primary form at pH in the cells vacuoles plants of anthocyanins, the results indicate that tautomerization of the excited state of B, may be an important mechanism for protecting plants against UV radiation.



# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Histórico

O termo antocianina, derivado das palavras gregas *anthos* (flor) e *kyanos* (azul), foi introduzido em 1835 por Ludwig Clamor Marquart, em seu livro *Die Farben der Blüten*, para designar substâncias azuis extraídas de algumas flores [1,2]. Actualmente, o termo é usado para indicar genericamente toda esta família de pigmentos naturais, independentemente da coloração que possam apresentar. O estudo sistemático de antocianinas começou na metade do século XIX. A cianina, uma das antocianinas mais abundantes, foi isolada em 1854, mas a sua fórmula molecular só foi estabelecida em 1913 [3-5].

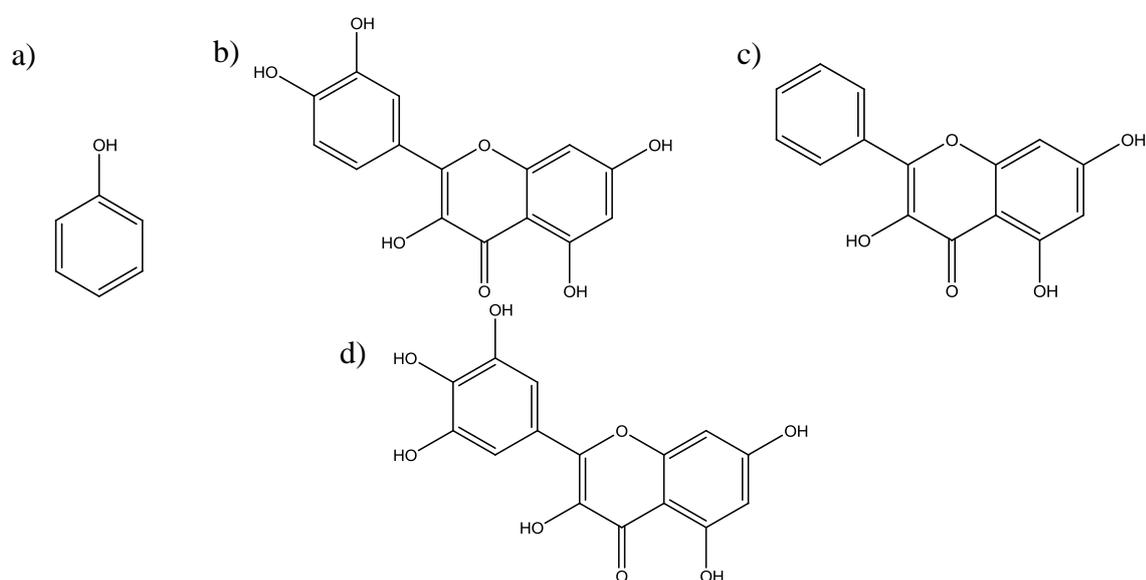
Os trabalhos genéticos de Mendel sobre a ligação entre hereditariedade e coloração de ervilhas despertaram o interesse na busca de relações entre a estrutura química de antocianinas e a evolução das espécies vegetais. As flores de pétalas azuis atraem especialmente as abelhas, favorecendo a polinização. Em regiões de clima temperado, onde a polinização é um factor dominante, as espécies vegetais aparentemente evoluíram na direcção do azul. Gottlieb (1982) mostrou que as flores de coloração azul, cuja pigmentação é resultado da presença de derivados da delphinidina, estão restritas às famílias mais evoluídas de angiospermas [6], enquanto que as plantas mais primitivas possuem floração vermelha/rosa, baseada na cianidina [7]. Em geral, não se encontra antocianinas em plantas menos evoluídas como hepáticas, algas, entre outras.

Existe uma evidência crescente de que as antocianinas, particularmente quando elas estão localizadas na superfície superior da folha ou nas células da epiderme, têm um papel importante na sobrevivência fisiológica de plantas. Tem sido descrito que esta acumulação foliar das antocianinas na folhagem das plantas mais jovens, vai sofrendo uma expansão chegando ao outono, em espécies de folha caduca, em resposta à deficiência de nutrientes, mudanças de temperatura ou exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV), assim como em associação na defesa contra herbívoros ou infecções fúngicas patogénicas. As funções das antocianinas, neste contexto, têm sido hipoteticamente sugeridas como um soluto compatível contribuindo para o ajuste osmótico dentro das células, fortes reguladores contra stresses ambientais tais como a seca ou baixas temperaturas, poderosos antioxidantes, e excelentes protectores contra o excesso de UV e luz visível [8-11].

## 1.2 Os Polifenóis

Os compostos estudados ao longo deste trabalho, as antocianinas, pertencem à extensa família dos polifenóis. Os polifenóis são substâncias caracterizadas por possuírem um ou mais grupos hidroxilos (-OH), ligados a um ou vários anéis aromáticos (Figura 1). Esta denominação agrupa todas as moléculas fenólicas, como por exemplo os derivados do ácido cinâmico ou do ácido gálico, assim como a família dos flavonóides.

Os polifenóis têm uma multiplicidade de funções no mundo vegetal, estando presentes em muitos vegetais e frutos comestíveis tais como por exemplo: uvas, maçãs, cerejas, tomates, ervas aromáticas, frutos secos entre muitos outros. [12].

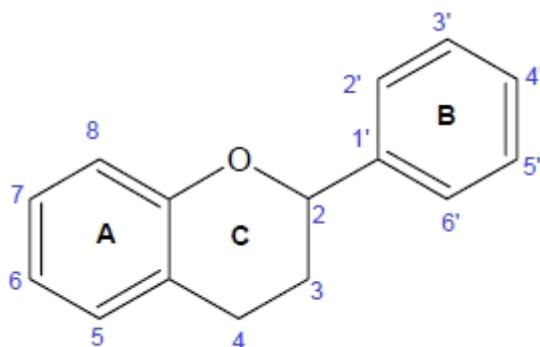


**Figura 1.** Estrutura química do fenol (a) e de alguns polifenóis presentes em alimentos e plantas – Quercetina (b); galangina (c); Miricetina (d).

## 1.3 Os Flavonóides

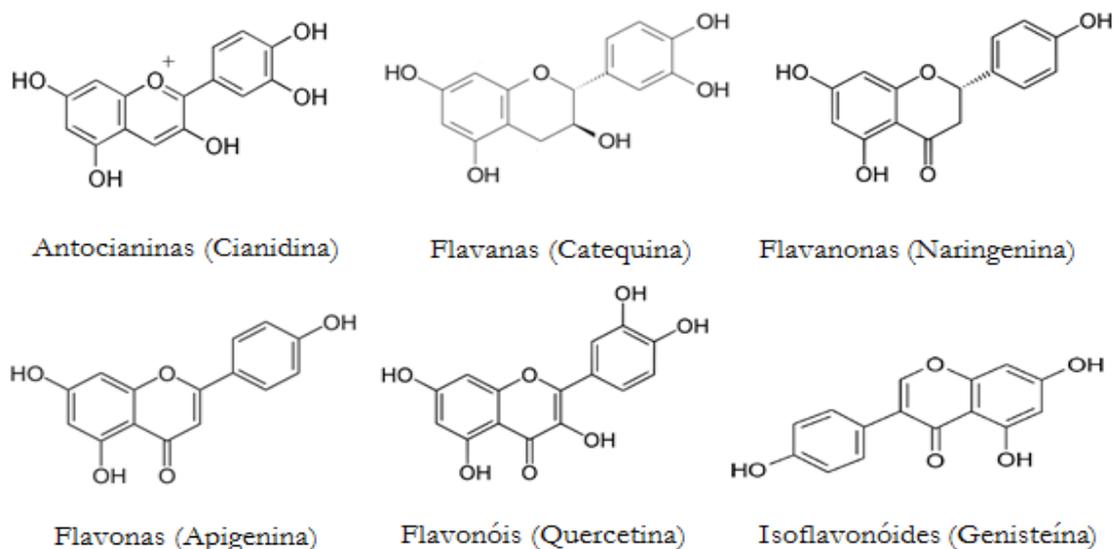
Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas [13]. São os responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores, podendo estar presentes noutras partes das plantas. Segundo Beecher (2003) já foram identificados mais de 8000 componentes da família dos flavonóides [14]. Este grande número de compostos surge da ampla variação de combinações de grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) e hidroxilo (-OH) como substituintes na estrutura química básica dos flavonóides [15].

Devido a esta grande diversidade, muitos investigadores e grande parte da indústria alimentar têm vindo a demonstrar, nos últimos dez anos, bastante interesse no estudo de tais estruturas e respectivas funções e aplicações. Os flavonóides têm uma estrutura química que consiste em 15 átomos de carbono distribuídos em 3 anéis aromáticos (A e B e C da figura 2), que podem ser divididos em classes baseadas na sua estrutura molecular (compostos fenólicos) [16-18].



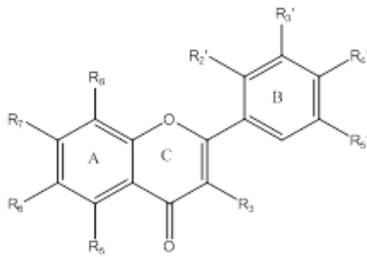
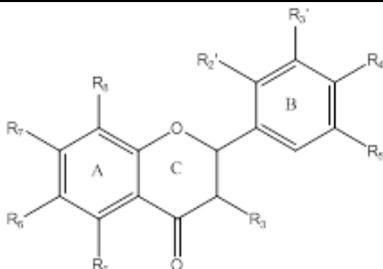
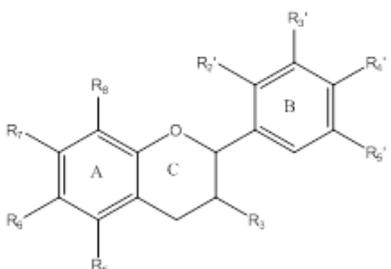
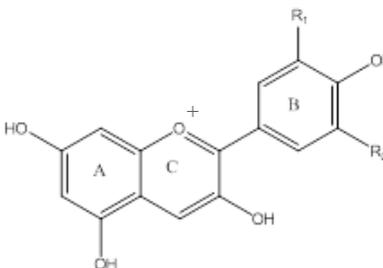
**Figura 2.** Estrutura básica dos flavonóides [16].

Conforme o estado de oxidação da cadeia heterocíclica do pirano, obtêm-se diferentes classes de flavonóides: antocianinas, flavanas, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonas ou isoflavonóides [15]. Os quatro maiores grupos de flavonóides conjuntamente com as suas fontes alimentares são mostrados na Tabela 1. A estrutura molecular de cada grupo pode ser vista na Tabela 1.



**Figura 3.** Estrutura molecular das diferentes classes dos flavonóides [17, 17<sup>a</sup>].

**Tabela 1.** Grupos de flavonóides, seus componentes individuais e fontes alimentares [18].

Grupos	Componentes	Fonte alimentar
 <p><b>Flavonas</b></p>	Apigenina	Cascas de maçãs
	Chrisina	Cerejas
	Kaempferol	Bróculos
	Luteolina	Peles de frutas
	Miricetina	Mirtilhos
	Rutina	Uvas
	Sibelina	Alfaces
	Quercetina	Azeitonas
 <p><b>Flavanonas</b></p>	Fisetina	
	Hesperetina	Citrinos
	Narigina	Peles de frutas de citrinos
	Naringenina	
	Taxifolina	
 <p><b>Catequinas</b></p>	Catequina	
	Epicatequina	Vinho tinto
	Epigallocatequina galate	Chá
 <p><b>Antocianinas</b></p>	Cianidina	Uvas
	Delfinidina	Framboesas
	Malvidina	Uvas vermelhas
	Pelargonidina	Morangos
	Peonidina	Chá
	Petunidina	Peles de frutas com pigmentos escuros

Os polifenóis são efectivos dadores de hidrogénio e essa capacidade antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilos (-OH) e da sua conjugação [19]. As antocianinas também possuem uma estrutura química adequada para a acção antioxidante, sendo

capaz de doar electrões ou átomos de hidrogénio para radicais livres [20]. Uma óptima actividade antioxidante está relacionada com a presença de grupos hidroxilos na posição 3 e 4 do anel B, os quais conferem uma elevada estabilidade ao radical formado (Tabela 1). Os grupos hidroxilos livres na posição 3 do anel C e 5 do anel A, junto com o grupo carbonilo na posição 4 são dadores de electrões. Além disso, a presença de açúcares na molécula reduz a actividade oxidante [19].

Nos últimos anos, devido a várias razões, houve um crescente interesse na investigação das funções dos flavonóides nas plantas. Primeiro, os avanços na biologia molecular, juntamente com um melhor conhecimento da via para a biossíntese de flavonóide, levaram-se à produção de mutantes de plantas que são deficientes ou superabundantes em um ou mais pigmentos de flavonóides.

Em segundo lugar, as melhorias nas técnicas analíticas (por exemplo, cromatografia líquida de alta performance, espectrometria de massa, e espectroscopia de ressonância magnética nuclear) para os compostos de flavonóides têm estimulado a pesquisa de novos compostos úteis para a manipulação da cor na flor. Estes, por sua vez, levaram à descoberta de funções até agora desconhecidas dos flavonóides na reprodução das plantas.

Em terceiro lugar, preocupações com o buraco do ozono e conseqüente aumento da exposição da bio-vegetação, aos raios ultravioleta (UV), levaram à investigação de potenciais protectores solares e como conseqüência ao conhecimento de que alguns flavonóides desempenham um importante papel na protecção das plantas contra prejudiciais raios UV-B.

Em quarto lugar, tem havido um crescente interesse em flavonóides, particularmente as antocianinas, como potenciais suplementos nutricionais para os seres humanos. Isso contribuiu para a descoberta do seu poder antioxidantes *in planta*. As propriedades das antocianinas para absorver a luz verde, por exemplo, proporcionam capacidades únicas, tais como a protecção dos cloroplastos contra os efeitos prejudiciais da forte irradiação solar. Flavonóis e Flavonas (Figura 3), por outro lado, não afectam directamente a fotossíntese, mas eles podem actuar como sinais químicos ou guias de UV para atrair ou dissuadir insectos, e são filtros UV altamente eficazes [21].

Com base nestes aspectos, a compreensão destes mecanismos conjuntos na fotoprotecção das plantas terá grande impacto no estudo das antocianinas neste trabalho.

## 1.4 As Antocianinas

O termo antocianina é de origem grega (anthos, uma flor, e kyanos, azul escuro). Após a clorofila, as antocianinas são o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal [22]. Compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são encontradas em maior quantidade nas angiospermas (figura 4 e 5). Diferentemente das clorofilas (Chl) e dos carotenóides (Car), a absorção electrónica das antocianinas está distribuída por toda a região UV e

visível do espectro electrónico (200 nm – 700 nm). Além de serem responsáveis pelas fantásticas cores, vermelha, azul e roxa da maioria das frutas e flores de uma enorme diversidade de plantas [23-25], as mais de 450 antocianinas já isoladas e caracterizadas também estão presentes em folhas, raízes, bolbos, tubérculos, sementes, caules, cereais e legumes.



**Figura 4.** Cores típicas das antocianinas em frutos.

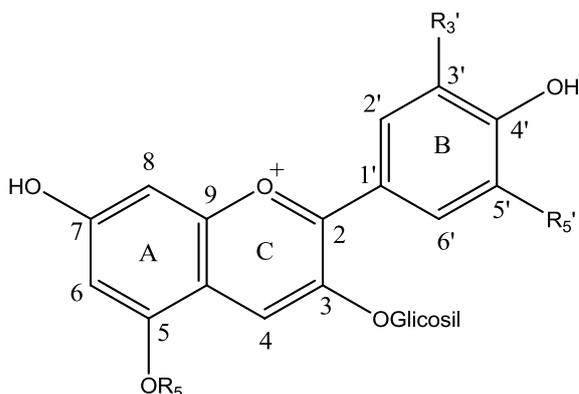
As moléculas das antocianinas são encontradas nas plantas no interior dos vacúolos de células epidérmicas (ver secção 1.6 Figura 11), tanto na forma de cristais como dissolvidas, dando origem a iões com carga positiva, o catião flavílio, que pode desprotonar e formar uma estrutura electricamente neutra, denominada base quinonoidal A, ou hemiacetal em solução aquosa.



**Figura 5.** Cores típicas das antocianinas em caules, flores, folhas, raízes, bolbos, tubérculos e legumes.

A estrutura central das antocianinas, também chamada de aglicona, tem como cromóforo básico o 2-fenilbenzopirílio, também conhecido como catião flavílio, representada na Figura 6. O cromóforo é formado por 15 átomos de carbono e 1 de oxigênio como heteroátomo, todos em hibridização sp<sup>2</sup> [26].

As antocianinas são classificadas de acordo com o número de moléculas de hidratos de carbono (ou glicosídeos) ligadas ao cromóforo em monoglicosiladas, diglicosiladas e triglicosiladas.



Antocianina	Substituição
<b>Pelargonina</b>	R <sub>3'</sub> ;R <sub>5'</sub> =H; R <sub>5</sub> =Glicosil
<b>Cianina</b>	R <sub>3'</sub> =OH; R <sub>5'</sub> =H; R <sub>5</sub> =Glicosil
<b>Malvina</b>	R <sub>3'</sub> ;R <sub>5'</sub> =OCH <sub>3</sub> ; R <sub>5</sub> =Glicosil
<b>Oenina</b>	R <sub>3'</sub> ;R <sub>5'</sub> =OCH <sub>3</sub> ; R <sub>5</sub> =H
<b>Peonina</b>	R <sub>3'</sub> ;R <sub>5'</sub> =H; R <sub>5</sub> =Glicosil
<b>Delfinina</b>	R <sub>3'</sub> ;R <sub>5'</sub> =OH; R <sub>5</sub> =Glicosil

**Figura 6.** Cromóforo básico das antocianinas e exemplos de antocianinas monoglicosídeas e diglicosídeas [26<sup>a</sup>].

Em geral, esta glicosilação está situada na posição C3 ou então simultaneamente em C3 e C5 (Figura 6), mas são conhecidos casos de antocianinas com unidades de hidratos de carbono nas posições C7, C3', C4' e C5' [27].

Quando as antocianinas em meio ácido são sujeitas a um aumento de temperatura, ocorre a hidrólise das unidades de hidratos de carbono ligados ao cromóforo. Esta aglicona livre dos segmentos glicosídeos é conhecida como antocianidina e também é encontrada eventualmente em alguns tecidos vegetais. Na Tabela 2 estão descritas as 6 antocianidinas mais comuns desta classe de pigmentos, entre as mais de 25 conhecidas.

A infinidade de cores observadas nas antocianinas e antocianidinas é produto de combinações de vários factores, como o número de substituintes, a presença ou não de outras moléculas capazes de estabilizar a cor (“co-pigmentos”), a associação com outros flavonóides, a complexação, a autoassociação, o pH local do meio e a natureza do microambiente em que a antocianina se encontra [24,25,28-33,].

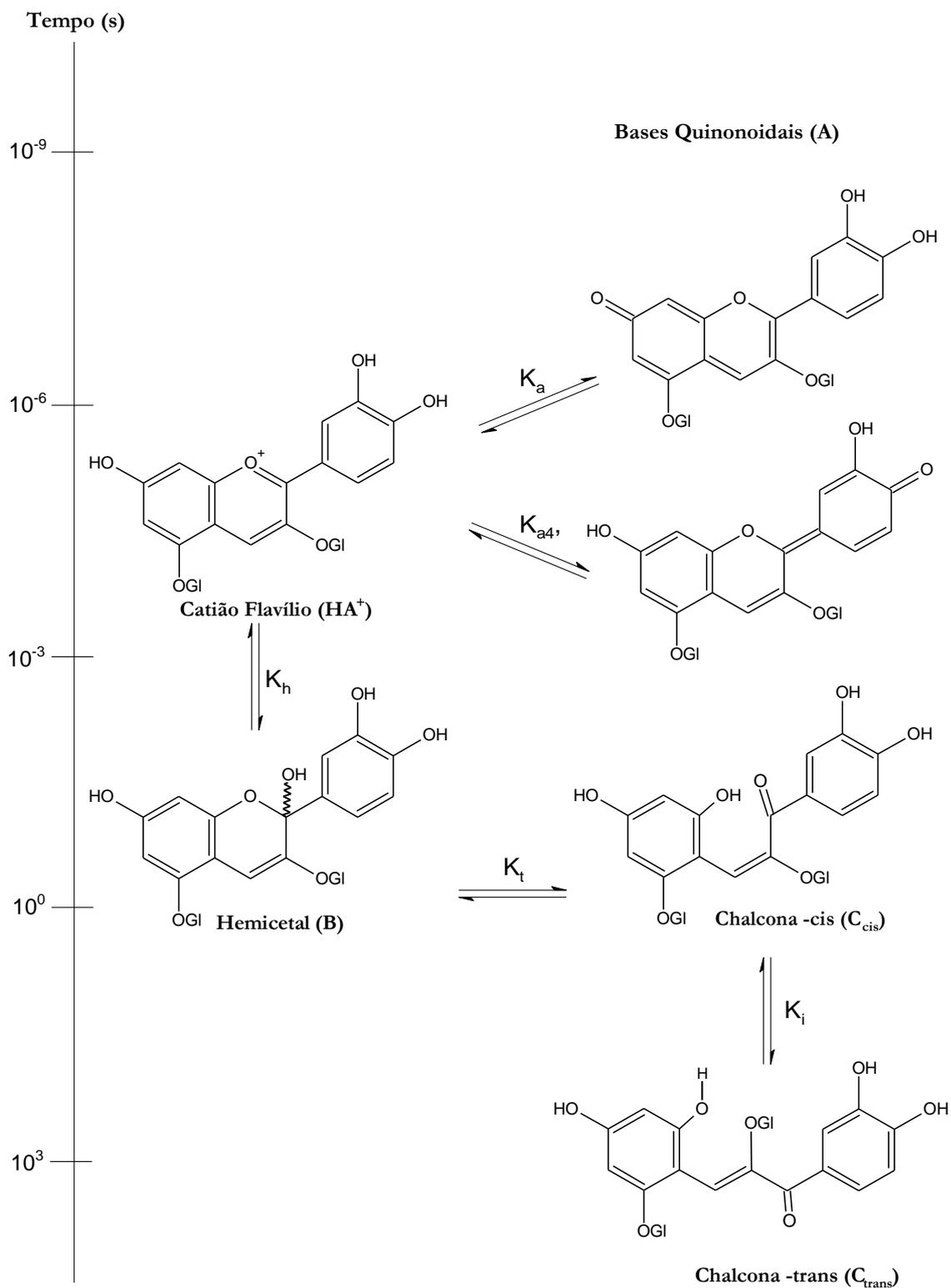
**Tabela 2.** Estrutura das seis antocianidinas maioritárias encontradas na natureza. Todas estas antocianidinas possuem grupos OH nas posições C3, C5, C7 e C4'.

Antocianidina	C3'	C5'	Cores
Delfinidina	OH	OH	Azul e roxo
Cianidina	OH	H	Vermelho e carmim
Pelargonidina	H	H	Laranja e salmão
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	Roxo
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	Vermelho
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Vermelho

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

Em meios moderadamente ácidos é observada a hidratação do catião flavílio. A carga positiva do catião está deslocalizada por todo o anel pirílio (anéis A e C), mas as posições C2 e C4 são as que apresentam a maior densidade de carga positiva, tornando-as susceptíveis a um ataque nucleofílico pela molécula de água [34]. Entretanto, o aducto cineticamente formado pela adição nucleofílica em C4 é convertido via catião flavílio no produto de hidratação na posição C2, dando origem a dois hemicetais enantioméricos (B2 e B4) [35]. Os hemicetais formados absorvem em torno dos 260 nm, resultado da diminuição no tamanho do sistema  $\pi$  conjugado com o ataque da água ao carbono C2. Através da abertura do anel pirílio os hemicetais estão em equilíbrio tautomérico com a espécie chalcona, que existe em solução como isómeros *cis* e *trans*. A *trans*-chalcona absorve entre 320 nm e 360 nm, enquanto que o máximo de absorção da forma *cis* situa-se ao redor de 300 nm, pois sua conformação não é planar [35]. A diferenciação de ambos os isómeros através de absorção electrónica é dificultada pela sobreposição espectral das espécies. Adicionalmente, em meios básicos ocorre a ionização do hemicetal, dos dois isómeros da chalcona e de bases quinoidais que eventualmente tenham vários grupos OH. No estado excitado, são observados processos de transferência de próton ultra-rápida no estado singleto do catião flavílio [36], fotocromismo *trans*-chalcona/*cis*-chalcona [37-47] e degradação fotoquímica do catião. Em geral, as antocianinas naturais não fluorescem ou são muito pouco fluorescentes, possuindo

rendimentos quânticos de fluorescência,  $\Phi_F$ , na ordem dos  $4 \times 10^{-3}$  (ver tabela 4, secção 2.3.1) [47,48]. Cada um dos processos químicos e fotoquímicos descritos acima ocorre em faixas de tempo distintas. As transferências de próton nos estados excitado e fundamental são os processos mais rápidos observados para as antocianinas, demorando alguns picossegundos no primeiro caso e microsegundos no estado fundamental. A hidratação do catião pode demorar de alguns milissegundos a minutos e a isomerização das chalconas dura de minutos a horas. Esta amplitude na escala temporal das reacções torna necessário o uso de diversas técnicas para se estudar as transformações químicas das antocianinas. A transferência de próton, por exemplo, no estado excitado, é examinada por fluorescência resolvida no tempo gerada com pulso de laser de picossegundos e a transferência de prótons no estado fundamental é acompanhada por fotólise de laser com pulso de nanossegundos [49-52]. As reacções de hidratação do catião flavílio e tautomerização do hemiacetal são estudadas por salto de pH, salto de temperatura e por fotólise de relâmpago convencional [53]. Os processos mais lentos como a formação da chalcona *trans* podem ser seguidos pela variação dos espectros de absorção electrónica e por ressonância magnética nuclear em função do tempo [54].



**Esquema 1.** Transformações químicas das antocianinas em solução aquosa numa escala temporal em segundos, representadas para a cianidina-3,5-di-O-glucosídeo (Cianina).

O catião flavílio das antocianinas, entretanto, só é termodinamicamente estável em soluções fortemente ácidas, com  $\text{pH} < 2$ . Em soluções com menor concentração de  $\text{H}^+$ , a coloração tende a desaparecer em função do tempo, com a conversão do catião em hemicetal e posterior formação das chalconas.

Macroscopicamente, quando o  $\text{pH}$  de uma solução ácida de antocianina é deslocado rapidamente para próximo da neutralidade, a cor da solução passa de vermelha para violeta/azul, pois ocorre a desprotonação do catião e formação da base quinoidal como produto cinético. Após atingir o equilíbrio termodinâmico, as soluções de antocianinas são incolores ou apresentam um amarelo pálido muito ténue. A faixa de  $\text{pH}$  encontrada nos vacúolos celulares das plantas não é favorável termodinamicamente à presença do catião flavílio, o que levou a natureza a empregar várias técnicas para estabilizar as espécies responsáveis pela coloração das antocianinas. Em pétalas de rosas e no tecido epidérmico de uvas, por exemplo, o  $\text{pH}$  vacuolar situa-se entre 3,70 – 4,15 e 2,6 – 3,2 respectivamente [55]. Um dos casos mais ilustrativos é o da hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), cujo pigmento encontrado tanto nas flores azuis como nas rosas é a delfinidina 3-glicosídeo. Nas plantas de floração azul, o máximo de absorção situa-se em 589 nm e o  $\text{pH}$  dos vacúolos celulares é 4,1. Já nas hortênsias de pétalas rosas, a absorção máxima é em 537 nm e o  $\text{pH}$  vacuolar é 3,3.

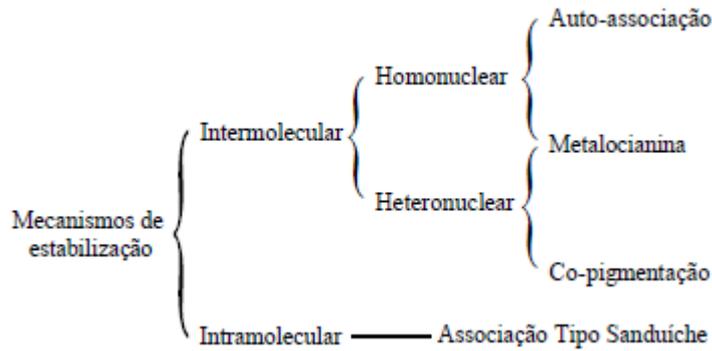
Os factores que explicam a existência do catião flavílio em  $\text{pH}$ s tão elevados e a diferença de cores para a mesma antocianina devem-se à actuação de outros polifenóis como co-pigmentos e à concentração de iões de  $\text{Al}_3^+$  nos vacúolos. A co-pigmentação de antocianinas é conhecida desde 1916 e é um dos factores mais importantes na variedade e estabilidade de cores no reino vegetal. O fenómeno é o resultado da associação do catião flavílio e da base quinoidal com outros metabólitos presentes no meio celular, denominados co-pigmentos. Os co-pigmentos são geralmente polifenóis e flavonóides que não absorvem na região visível, mas ao interagirem com a antocianina provocam um desvio da absorção para comprimentos de onda maiores (efeito batocrómico) e uma diminuição do coeficiente de extinção molar (intensidade da cor) da antocianina (efeito hipsocrómico), resultado das interações  $\pi$ - $\pi$  entre os orbitais moleculares do co-pigmento e das espécies coradas das antocianinas [56]. A presença do co-pigmento diminui consideravelmente a constante de hidratação  $K_h$  do catião flavílio, protegendo os sítios mais propensos ao ataque nucleofílico pela água e tornando possível a existência da espécie em meios próximos da neutralidade. Os principais factores que influenciam a co-pigmentação são a temperatura, o solvente, a concentração salina, o  $\text{pH}$  e as concentrações do co-pigmento e da antocianina. A controvérsia sobre qual é a força motriz por trás da estabilização dos complexos antocianina/co-pigmento é proporcional à grande quantidade de artigos publicados sobre o assunto, mas as principais candidatas são o efeito hidrofóbico da antocianina e do co-pigmento, as ligações de hidrogénio entre o co-pigmento e a antocianina e a transferência de carga do co-pigmento para o catião flavílio [57,58].

Recentemente, foi observado que a excitação electrónica dos complexos induz a transferência de electrões do co-pigmento para o catião flavílio, resultando numa total supressão da fluorescência do complexo [59]. Adicionalmente, propriedades redox de antocianinas e co-pigmentos determinadas experimentalmente (potenciais de ionização e afinidades electrónicas) e cálculos computacionais para alguns complexos mostraram que o primeiro estado excitado tem um carácter de transferência de carga (transição pouco intensa e muito deslocada para o vermelho), resultando da transição da orbital ocupada de maior energia (HOMO) do co-pigmento para a orbital vazia de menor energia (LUMO) do catião flavílio [60]. Estes factos indicam que a transferência de cargas exerce um papel central no fenómeno de co-pigmentação entre antocianinas e polifenóis.

Em soluções de antocianinas com concentrações maiores que  $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , a absorção electrónica apresenta um desvio em relação à lei de Beer-Lambert, e as moléculas tendem a agregarem-se através de empilhamento vertical, resultado das interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos. Este fenómeno, conhecido como auto-associação, é observado para os catiões flavílios e bases quinoidais, pois a estrutura planar de ambas as espécies favorece este tipo de interação, e provoca uma intensificação da absorção, além de diminuir a hidratação da forma catiónica. Foi observado também que em concentrações elevadas de oenina ocorre a associação do catião flavílio com a espécie chalcona *trans*. Além da co-pigmentação intermolecular e da auto-associação, alguns catiões flavílios de antocianinas cujas unidades de hidratos de carbono são aciladas apresentam uma excepcional resistência à hidrólise em pH neutro, mesmo em soluções diluídas e na ausência de outras moléculas que possam actuar como co-pigmentos. Uma das explicações possíveis para este efeito de estabilização é a interação dos grupos acilantes com o cromóforo central, formando uma estrutura empacotada do tipo sanduíche, onde o anel pirílio, fica cercado pelos substituintes e protegido da hidratação. A remoção dos grupos acilantes ligados aos hidratos de carbono torna a antocianina susceptível à hidrólise [61,62].

Os flavonóides e outros polifenóis formam complexos com todas as antocianinas. Um outro tipo de complexação observado, apenas nas antocianinas que possuem grupos OH simultaneamente nas posições C3' e C4', é a formação de quelatos com iões metálicos como potássio, magnésio, ferro e alumínio. Estas metalocianinas apresentam um desvio batocrómico no espectro de absorção e, em alguns casos, formam complexos com polifenóis e flavonóides ou estão coordenados com vários iões metálicos. Uma das possíveis aplicações de quelatos de cianidina-3-glicosídeo (cianina) e delphinidina com  $\text{TiO}_2$  é na construção de células foto-electroquímicas, que convertem a luz solar em corrente eléctrica.

No Esquema 2 estão reunidos os diferentes processos de associação que a natureza encontrou para promover a diversificação e estabilização de cores das antocianinas [61].



**Esquema 2** Mecanismos de estabilização de antocianinas [61].

## 1.5 Radiação ultravioleta

As diferentes gamas de comprimento de onda da radiação ultravioleta, divididas em ultravioleta A (UV-A), B (UV-B) e C (UV-C) apresentam diferentes actividades sobre os organismos vivos, sendo que algumas destas actividades são benéficas e outras, não. A fim de evitar os malefícios causados por estas radiações, existem produtos denominados fotoprotectores. Uma vez que os flavonóides são considerados um factor importante na protecção contra a radiação ultravioleta, alguns estudos concentram-se na avaliação da actividade fotoprotectora que algumas plantas, compostas por flavonóides, possam apresentar.

As radiações ultravioletas (UV), extremamente energéticas, são divididas em radiações ultravioleta A (UV-A) longas, ultravioleta B (UV-B) medianas, e ultravioleta C (UV-C) curtas. A radiação UV-A, menos energética, estende-se de 320 a 400 nm e ocorre durante todo o dia, provocando danos mais leves, caracteriza-se por não produzir irritação, por apresentar fraca acção bactericida e por ser pigmentogénica. e por ser responsável pelo bronzeamento imediato e de curta duração da pele. Já a radiação UV-B, de 290 a 320 nm, é predominante entre as 10 e as 14 horas diárias, causa danos agudos (queimaduras), promove o bronzeamento tardio e de longa duração e é responsável pela transformação do ergosterol em vitamina D. No entanto, a radiação UV-C (mais energética), que se estende de 100 a 290 nm, é absorvida pela atmosfera, através da camada de ozono [63].

Os extractos de plantas que contêm flavonóides (como, por exemplo, *Achillea millefolium*, *Hamamelis virginiana*, *Matricaria chamomilla*, *Mentha piperita* e *Salvia officinalis*), além do própolis, são capazes de absorver a luz ultravioleta, sendo que o espectro de absorção ultravioleta de um flavonóide mostra, em geral, dois picos máximos de absorção, um entre 240-280 nm e outro a

300 e 550 nm, o que mostra a possibilidade de uso destes extractos como filtros solares em preparações fotoprotectoras.

De acordo com a literatura, o teor de flavonóides produzidos por uma planta é considerado como um factor importante de protecção para as plantas contra a radiação ultravioleta. Por exemplo, o anel B de orto-dihydroxiflavonas, como a luteolina, em relação ao anel B de mono-hydroxiflavonas, como a apigenina, pode ser mais eficaz em anular os efeitos potencialmente nocivos de radicais livres produzidos no tecido pela radiação ultravioleta. Esses mesmos autores mostram que os flavonóides também actuam dissipando a energia UV absorvida de uma maneira inofensiva [64].

## **1.6 Mecanismo de Fotoprotecção nas plantas contra a radiação visível e ultravioleta.**

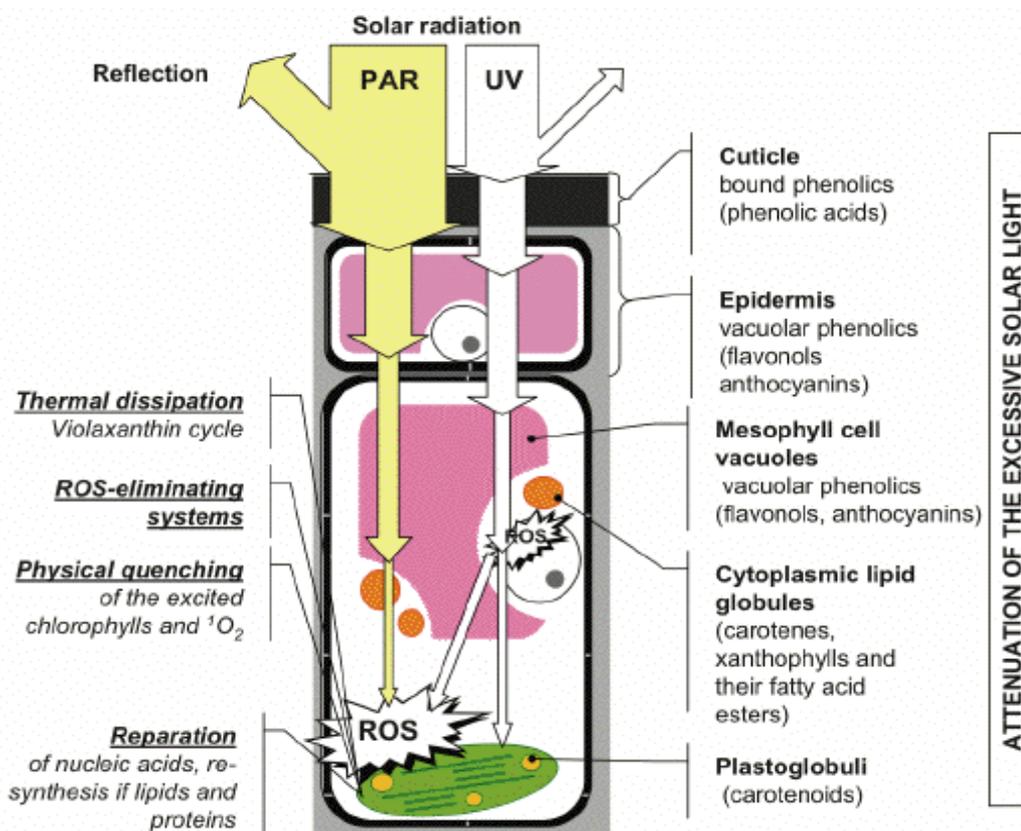
A existência de plantas como organismos fotoautotróficos é caracterizada pela dependência da absorção e utilização de energia de radiação solar em reacções fotossintéticas. Os principais pigmentos localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, capturam eficientemente a luz e transferem a sua energia para outros componentes do aparelho fotossintético (PSA) promovendo a síntese de ATP e NADPH, a fixação de CO<sub>2</sub>, etc. [65,66]. Por outro lado, a fotossíntese apenas pode ser otimizada dentro de um estreito intervalo de irradiação solar. Por conseguinte, a energia luminosa absorvida pelo PSA não pode ser utilizada completamente no decurso das reacções fotoquímicas, mesmo em fluxos de luz relativamente baixos, devido ao desequilíbrio entre a quantidade de energia da luz absorvida e a capacidade da planta para a sua utilização, assim como aos elevados fluxos de radiação solar, temperaturas extremas, seca, deficiências nutricionais minerais, entre outras. Em plantas jovens, o equilíbrio do PSA é muitas vezes prejudicado, tornando-o menos eficiente na utilização da luz absorvida e, portanto, propicio a foto-danos [67-69]. Como consequência, estas situações são acompanhadas por um aumento da produção de espécies reactivas com o oxigénio (ROS), causando danos foto-oxidativos às plantas e, eventualmente, a sua morte [70].

Além disso, a célula da planta contém, para além de clorofilas (Chl), um grande número de fotossensibilizadores endógenos, tais como porfirinas, proteínas presentes nas mitocôndrias, Fe-S, Flavinas e Pterinas facilitando, após a absorção de luz, a formação de ROS [71].

Para além da irradiação excessiva na zona de radiação fotossintética activa (PAR), fotodanos nas plantas podem ser induzidos por cerca de 7-9% da energia total da radiação solar que atinge a superfície terrestre. Ondas UV curtas (UV-C, comprimentos de onda inferiores a 280 nm) são absorvidas quase completamente pela camada de ozono da atmosfera, contudo as mais longas, UV-B (280-315 nm) e UV-A (315-400 nm), constituem cerca de 5 e 90% do total de radiação solar no UV, respectivamente. As radiações UV-B de alta energia, são capazes de danificar as células vegetais

directamente, ao passo que os efeitos das de menor energia UV-A são geralmente controladas por ROS [72,73].

A essencial necessidade das plantas na protecção contra a radiação solar levou ao desenvolvimento de certos sistemas adaptativos incluindo os mecanismos de regulação e fotoprotecção (Fig. 8) [66,74,75]. Uma vez que os primeiros organismos foto-autotróficos na Terra foram expostos a fluxos mais elevados de radiação UV, em comparação com as espécies contemporâneas, os sistemas de reparação enzimáticos dos danos induzidos por UV em ácidos nucleicos e importantes proteínas do PSA, foi descoberto como o primeiro mecanismo fotoprotector na evolução das plantas. Além disso, os sistemas de ROS-desintoxicação, tanto enzimáticos como não enzimáticos, estão presentes e são fundamentais para a prevenção de danos oxidativos às plantas [76].



**Figura 8.** Os mais importantes mecanismos de foto-dano e fotoprotecção em plantas [66].

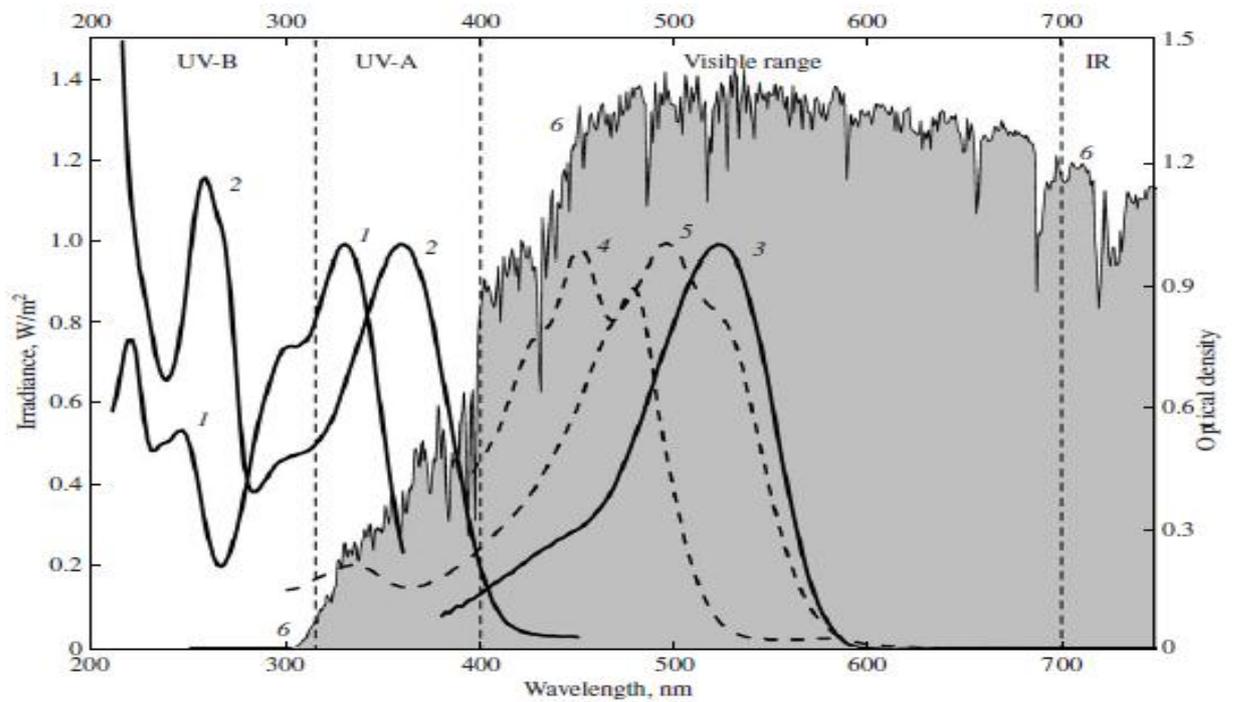
Sob condições ambientais desfavoráveis e em situações em que a regulação da fotossíntese é prejudicada, grandes fluxos de radiação solar induzem a produção directa ou indirecta de ROS provocando danos nas plantas. Certos mecanismos são os responsáveis pela diminuição dos níveis

de ROS na célula e lidam com as consequências dos foto-danos causados pela excessiva radiação. Os pigmentos protectores atenuam a radiação incidente, removendo assim, a uma extensão considerável, a causa do foto-dano (raios UV nocivos e quantidades excessivamente absorvidas no visível).

Obviamente, outros mecanismos responsáveis pela manutenção da eficiente fotossíntese na ampla gama de comprimentos de onda de radiação e fluxos surgiram em fases posteriores. Estes mecanismos incluem transferência de energia entre os fotossistemas (PS) I e II, ajustamento da estequiometria dos componentes antenais e dissipação térmica (processo não radiativo) da energia do estado excitado da Chl [91<sup>a</sup>]. Assim, um papel importante na fotoprotecção pertence à supressão do estado (triplete) excitado da Chl ou a produção de oxigénio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) realizadas principalmente pelos carotenóides (Car) [66,74].

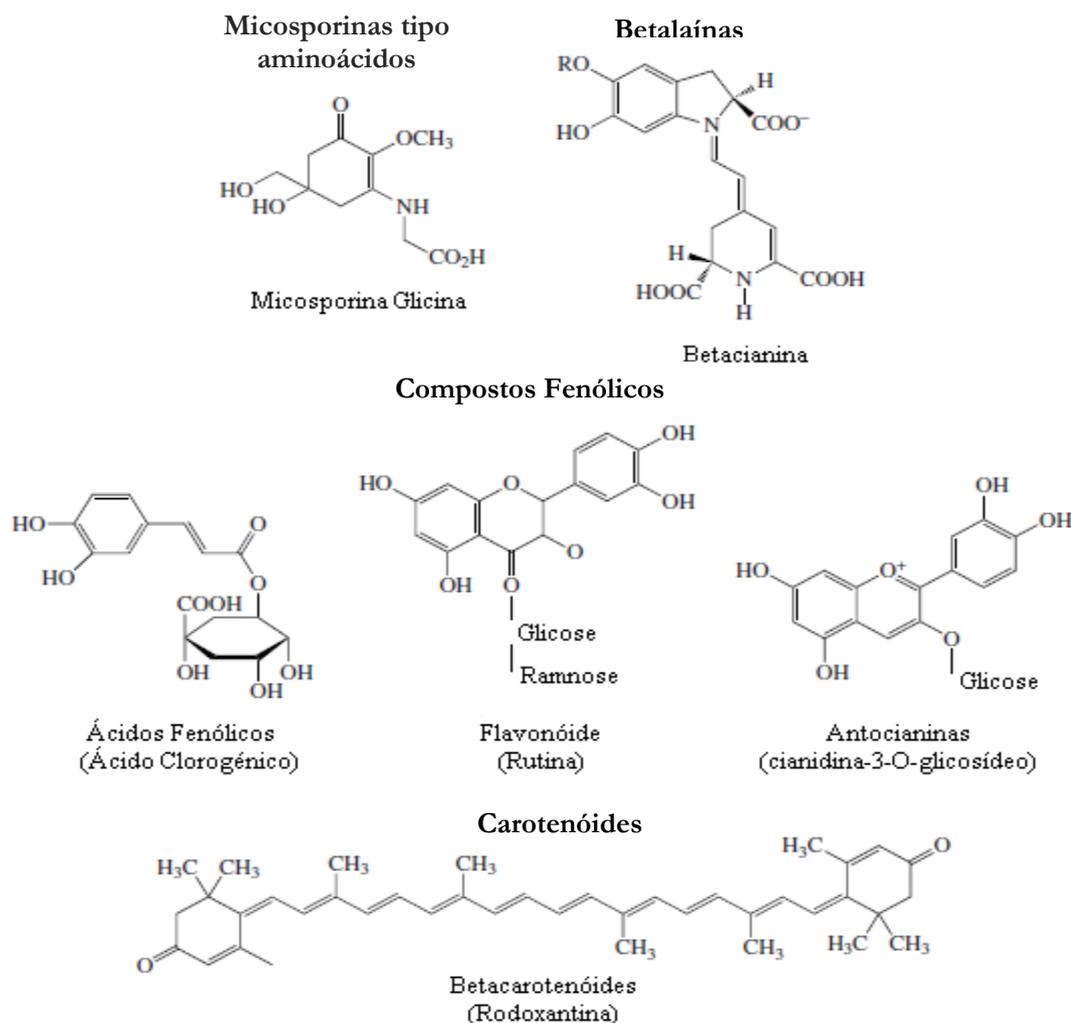
Os mecanismos fotoprotectores anteriormente mencionados têm certos aspectos em comum. Em primeiro lugar, todos eles lidam com as consequências dos efeitos nocivos da radiação UV e PAR: reparação de macromoléculas danificadas, eliminação de ROS e produtos reactivos formados na célula (Fig. 8) [70]. Em segundo lugar, a operação eficiente destes mecanismos requer níveis suficientemente elevados de compostos ricos em energia e equivalentes redutores, que são necessários para a reparação do ADN, re-síntese da membrana lipídica e proteica, bem como para a regeneração dos importantes antioxidantes de baixo peso molecular, os flavonóides, incluindo a glutathiona reduzida e o ascorbato.

Recentemente, diferentes mecanismos fotoprotectores, com base na atenuação da radiação nociva UV e do excessivo PAR, têm sido descritos na literatura [76,77]. Estes mecanismos são baseados na capacidade que as plantas possuem para responder a forte irradiação através de síntese e acumulação de compostos, no interior dos diferentes compartimentos celulares e estruturas de tecidos, seleccionando a absorção no UV ou a parte visível do espectro (Fig. 9).



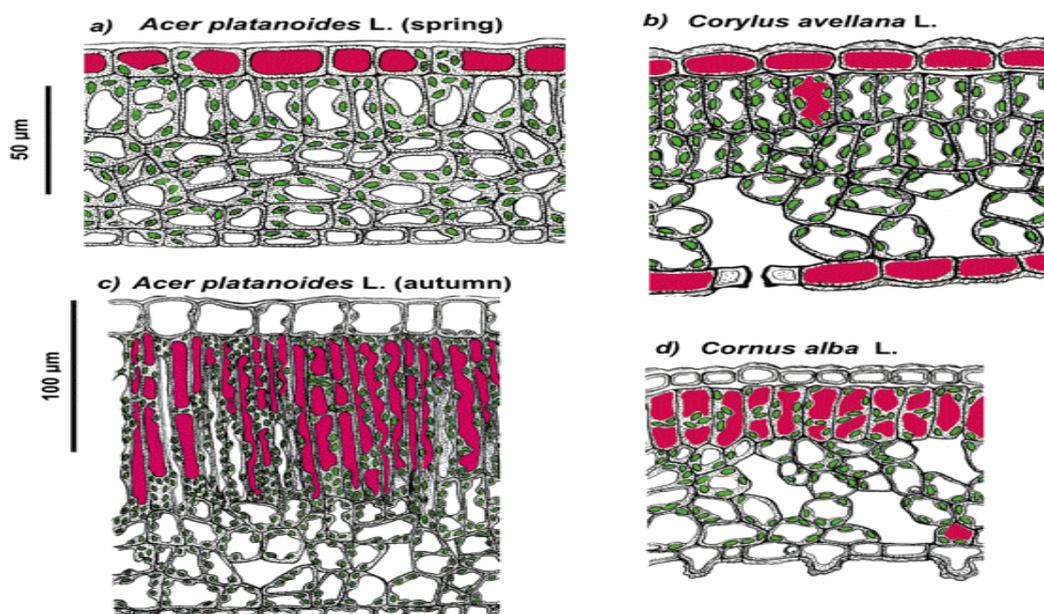
**Figura 9.** Espectro de absorção (em solução) dos principais fenóis e carotenóides presentes nas plantas [73].

(1) Ácidos fenólicos, (2) flavonóis, (3) antocianinas; (4) carotenóides; (5) hemi-carotenóides (rhodoxanthin). A absorção máxima da maioria dos compostos fenólicos está localizada na região do UV-B e UV-A (1, 2); as antocianinas possuem um comprimento de onda máximo na região do verde quando se encontram sob a forma de catião flavílio (3), deslocando a sua banda de absorção para comprimentos de onda mais baixos sob a forma de hemiacetal ou chalconas (1). O máximo de energia do espectro solar encontra-se próximo da banda de absorção das antocianinas (6). Os carotenóides fotoprotectores (4, 5) absorvem na região do azul-verde. Ambos os espectros foram normalizados no seu máximo de absorção.

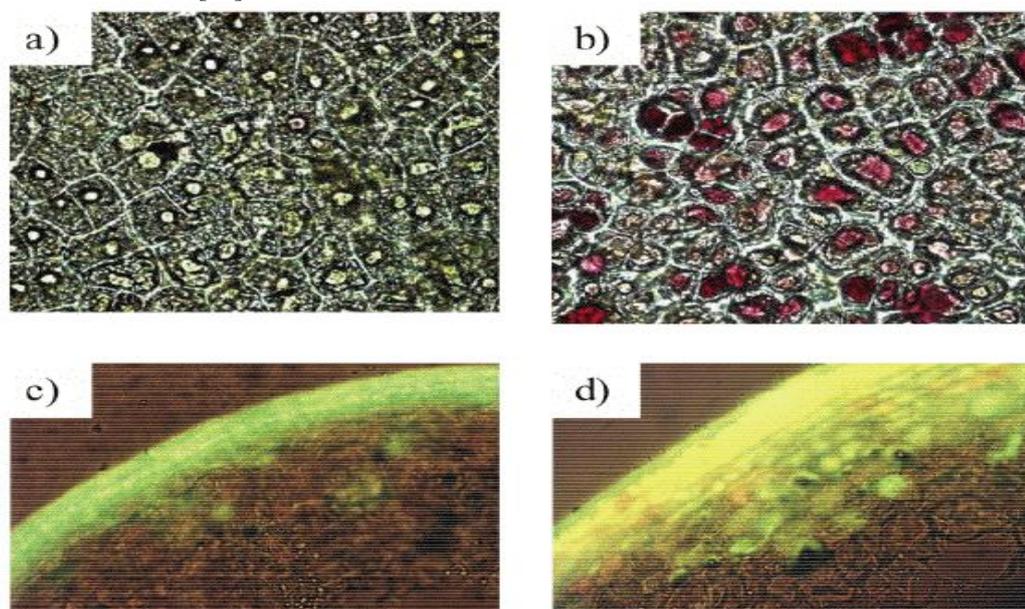


**Figura 10.** Principais classes dos pigmentos fotoprotectores e respectivas estruturas moleculares (adaptado de [80]).

Em plantas superiores, estes compostos estão concentrados nas estruturas superficiais, tais como cutícula ou epiderme e distribuídos dentro das células e tecidos (Fig. 10). Juntamente com os carotenóides, a função fotoprotectora em plantas é complementada por um grande número de compostos fenólicos (Phe) e determinados alcalóides (principalmente betalaínas). Classes diferentes, mas complementares, de pigmentos fotoprotectores diferem na estrutura química, propriedades espectrais e localização, por exemplo os Phe e os Car ou os Phe e as betalaínas, presentes simultaneamente em muitas espécies de plantas. De acordo com o conhecimento actual, pigmentos fotoprotectores possuem uma foto-estabilidade elevada. Portanto, o "filtro fotoprotector", uma vez formado, poderá ser mantido com um gasto mínimo de valiosos metabolitos e energia [78,79], proporcionando uma protecção a longo prazo contra o foto-envelhecimento.



**Figura 11.** Representação esquemática da anatomia das folhas na primavera (a, b) e outono (c, d) de algumas plantas contendo antocianinas. Os cloroplastos e as antocianinas contidos nos vacúolos estão representados a verde e vermelho, respectivamente. É de notar que nas folhas jovens, as antocianinas encontram-se acumuladas na células epidérmicas dos vacúolos, enquanto que nas folhas de outono estes pigmentos estão localizados predominantemente na parte mesofílica [80].



**Figura 12.** Microfotografia dos tecidos da maçã (*Malus x domestica* Borkh) adaptados a uma situação de fraca (a, c) e alta (b, d) exposição solar. A microscopia de “Bright-field” (x400), mostra a presença de antocianinas vermelhas no vacúolo das células dos tecidos expostos a radiação solar (b) e ausência destas nas células que não foram expostas (a). A microscopia de fluorescência (c, d; x200;  $\lambda$ excitação: 365 nm,  $\lambda$ emissão: 450-600 nm) demonstrou um aumento de flavonóis nos vacúolos das células iluminadas (parte amarela brilhante) (d) contrariamente às não iluminadas (c) [80].

A eficiência desse mecanismo é menos afectada por stresses ambientais (tais como temperaturas extremas), que dificultam a capacidade dos sistemas enzimáticos em fornecer um nível adequado de protecção. Ao mesmo tempo, a formação inicial de compostos fotoprotectores exige uma considerável quantidade de foto-assimiladores e energia, levando a indução da síntese e acumulação dos pigmentos em quantidades suficientes para realizar a sua função fotoprotectora, relativamente lenta. Devido a essas circunstâncias, os mecanismos básicos de selecção são baseados principalmente sob a acção prolongada de um determinado factor de stress, sendo estes pigmentos de grande importância para adaptação das plantas a longo prazo [81,82].

Algumas classes de pigmentos fotoprotectores foram encontradas em quase todas as espécies de plantas conhecidas. Em muitos casos, a sua capacidade para fornecer protecção contra o foto-envelhecimento das células foi provado e documentado. Um conjunto considerável de evidências foi obtido sobre o funcionamento e as propriedades espectrais *in vivo* de um grande número de compostos foto-protectores. Entre eles, as substâncias protectoras de UV foram investigados de forma mais exhaustiva [83]. Os pigmentos fotoprotectores continuam ainda a ser pouco estudados. Apesar do aumento considerável no número de publicações em antocianinas, durante os últimos 15 anos, ainda existe muito para descobrir sobre as potencialidades e aplicações destas pequenas moléculas no mundo dos humanos.

## 1.7 Antocianinas como fotoprotectores naturais

Como já referido anteriormente, as antocianinas desempenham um papel muito importante na fisiologia das plantas, como fotoprotectores solares, que as protegem de danos induzidos por excesso de radiação solar, nomeadamente no ultra violeta. [84]

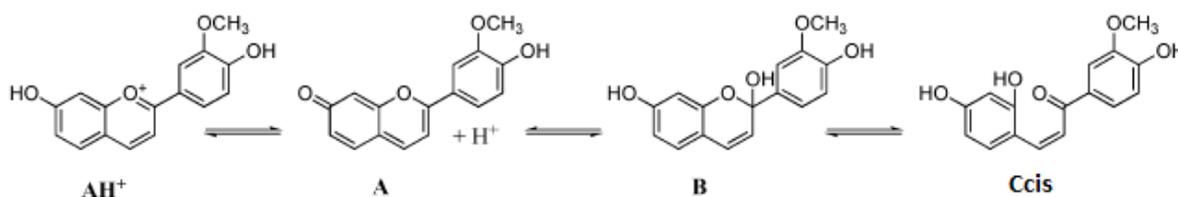
A exposição prolongada das plantas para fluxos elevados de radiação solar, bem como a outros factores ambientais perturba o equilíbrio entre a energia da luz absorvida e a capacidade da sua utilização fotoquímica resultando em foto-inibição e/ou, eventualmente, em severos danos para as plantas. Sob tais circunstâncias, a limitação da absorção de luz pelo aparelho fotossintético de forma eficaz, aumenta os mecanismos gerais fotoprotectores das células das plantas, tais como a reparação de macromoléculas, a eliminação de espécies reactivas com o oxigénio molecular, e dissipação térmica da excessiva energia luminosa absorvida. Sob condições de stresse, as plantas acumulam, em compartimentos celulares diferentes e estruturas de tecidos, pigmentos capazes de atenuar partes da radiação UV e visível do espectro. Até a data, quatro principais grupos de pigmentos fotoprotectores

são conhecidos: aminoácidos, compostos fenólicos (incluindo ácidos fenólicos, flavonóis e antocianinas), alcalóides (betalaínas) e carotenóides. A acumulação de compostos por absorção UV (tais como aminoácidos e compostos fenólicos na parte inferior e superior das plantas, respectivamente) é um mecanismo ubíquo de adaptação e protecção contra os danos causado por elevados fluxos de radiação solar desenvolvidos por organismos fotoautotróficos, nas fases iniciais de sua evolução. Carotenóides, betalaínas, e antocianinas desempenharam um papel importante no longo processo de adaptação às condições de iluminação e na protecção das plantas contra as radiações nocivas [85].

## 1.8 O hemicetal

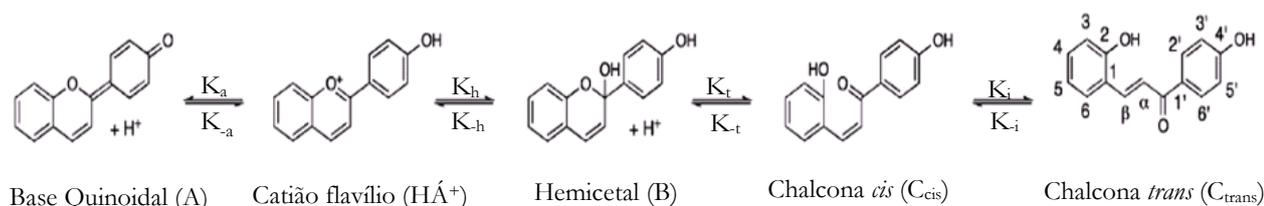
Ao longo destas décadas, uma grande investigação foi surgindo no domínio da química dos flavonóides e seus derivados tais como as antocianinas. Contudo, a maior parte deste estudo foi centrado no catião flavílio, espécie representativa das antocianinas a pH ácido. Em virtude do pH do meio intracelular se encontrar entre valores compreendidos entre 4.5 e 5, surgiu a necessidade de entendermos quais ou qual o verdadeiro papel da (s) espécies (s) dominante (s) nessa gama de pH e qual a sua função no papel fotoprotector nas plantas.

No início da questão, Leonard Jurd, seguiu a ideia geralmente aceite que o catião flavílio daria imediatamente origem a base quinoidal A colorida, em condições moderadamente ácidas, que seria então posteriormente hidratado para dar origem ao hemicetal B e chalcona C<sub>cis</sub>. Além disso, observou uma grande formação de hemicetal quando o catião flavílio era substituído na posição 3 por um grupo metóxilo ou hidroxilo, e quando estes não existiam, não mostravam nenhuma tendência para formar o hemicetal. Jurd estudou o composto 4',7-dihidroxi-3'-metoxiflavílio e concluiu que as soluções depois de equilibradas (passado 2 horas), numa gama de pH entre 0.63 – 4.36, eram compostas pelo catião flavílio e chalcona (*cis*) com um  $pK_a$  aparente de 3.17 (esquema 3) [86].



Esquema 3 Sequência reaccional proposta por Jurd [87].

Em complemento, ele obteve também a chalcona ionizada a  $\text{pH} = 12$  e o catião flavílio regenerado pela re-acidificação da solução voltando a um  $\text{pH} = 1$ . Jurd também estudou o composto 4',8 -dimetoxiflavílio (sem a base quinoidal) e concluiu que a conversão entre o catião flavílio e a chalcona daria lugar a um intermediário incolor, presumivelmente o hemicetal. Esta interpretação trouxe um grande avanço nos estudos da química do flavílio apesar da base quinoidal não dar directamente o hemicetal. Não ficou claro a partir do seu trabalho, se ele considerava o isómero *trans* chalcona como parte integrante no equilíbrio, num meio moderadamente ácido. Mais tarde, Jurd juntamente com outros colaboradores viriam a efectuar estudos em sais de flavílio derivados do 7-hidroxiflavílio, comprovando a existência destas chalconas (*trans*), bem como o facto de que a luz afectava esse equilíbrio. O autor concluiu assim que as 2-hidroxichalconas formadas no equilíbrio estariam na sua forma *-trans* e que a fotoisomerização seria o passo fotoquímico primário (esquema 4).



**Esquema 4.** Mecanismo de reacção de formação do hemicetal em solução aquosa [86].

Actualmente, após um longo período de investigação, a existência destas espécies/formas, em solução aquosa, foi bastante comprovada. Contudo, restam ainda algumas questões pendentes relativamente à forma hemicetal B, nomeadamente no processo de desactivação do seu estado excitado, após irradiação de luz na zona do UV /visível; quais as espécies formadas a partir desse estado excitado; quais os produtos resultantes desta reacção fotoquímica, e em que sentido se irá deslocar o equilíbrio perante factores exógenos tais como fortes irradiações solares. A produção de radicais livres assim como estados tripletos a partir desta molécula terão de ser investigados para assegurarmos que o seu papel na fotoprotecção, não tenha uma função prejudicial para o aparelho fotossintético nas plantas e contribuindo deste modo para a sua protecção. A busca de respostas a estas questões, serão a chave deste trabalho experimental (ver esquema 8).

## Capítulo 2

### Resultados e Discussão

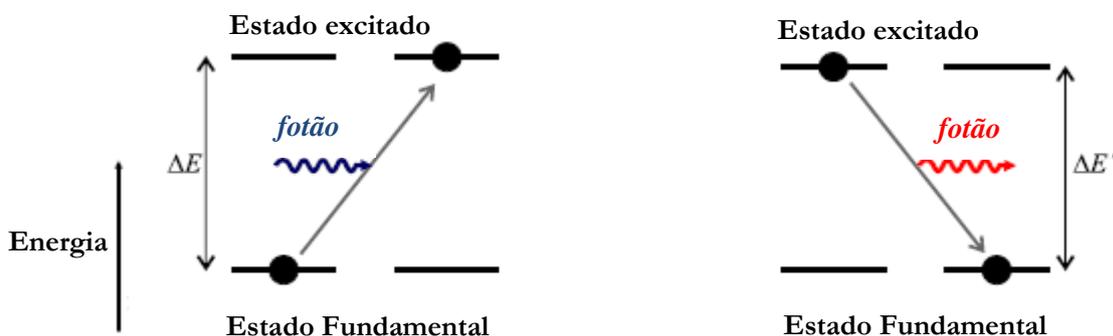
#### 2.1 Espectroscopia de absorção electrónica e fluorescência

A espectroscopia de absorção e fluorescência pode ser utilizada para quantificar as propriedades das diferentes amostras tais como concentração e propriedades fotofísicas de pigmentos naturais. A absorção de radiação ultravioleta ou visível por uma espécie atómica ou molecular M pode ser descrito de acordo com a equação 1:



O produto da interacção entre M e um fóton  $h\nu$  é uma espécie electronicamente excitada,  $M^*$ .

De seguida apresenta-se o esquema 5 da absorção de fótons pelas moléculas de pigmentos tais como as antocianinas e subsequente emissão de fluorescência dos fótons:



**Esquema 5.** Sistema simplificado da absorção de um fóton incidente e emissão de fluorescência de um fluoróforo [88].

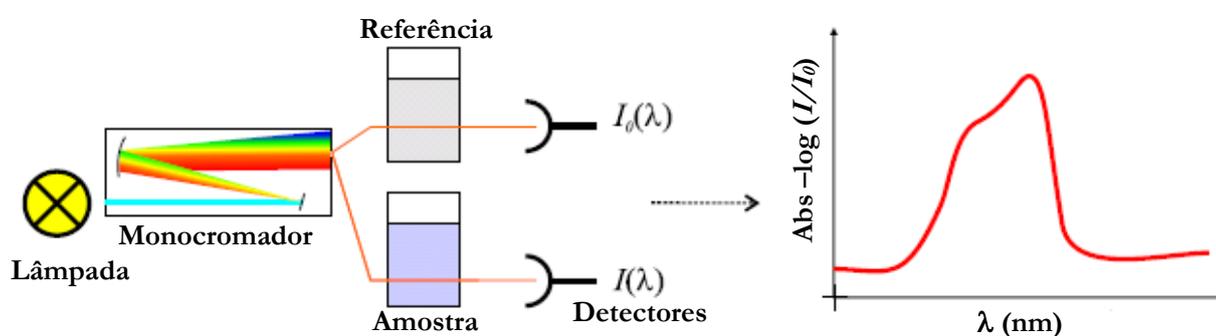
- **Absorção:** quando um fóton incidente atinge uma molécula de pigmento no seu estado fundamental, esta pode ser promovida a um estado excitado. O fóton é absorvido durante este processo, assim como a sua energia é utilizada para excitar a molécula. Este processo só ocorre se a energia do fóton for igual á diferença entre o estado excitado e fundamental:

$$E_{\text{fóton}} = \Delta E \quad (2)$$

A lei Beer-Lambert descreve o processo de absorção ( $A$ ) nas moléculas, também designado por densidade óptica (D.O.) que pode ser traduzida através da seguinte expressão:

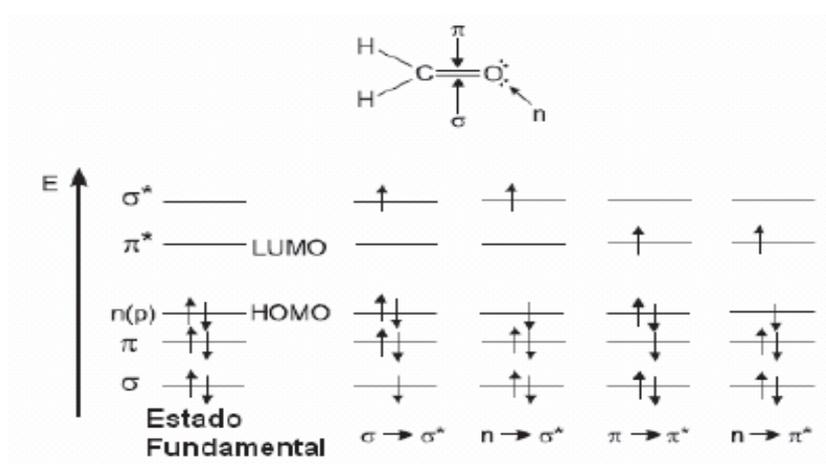
$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot c \quad (3)$$

onde  $A$  é a absorção,  $c$  a concentração da amostra,  $l$  o comprimento do percurso óptico e  $\varepsilon(\lambda)$  o coeficiente de absorvidade molar. A absorvidade molar pode também ser utilizada para identificar diferentes compostos ou espécie de um determinado equilíbrio em solução de uma amostra. É normalmente utilizado um espectrómetro de absorção como ilustrado na figura seguinte:



**Figura 12.** Espectrómetro de absorção [88].

A absorção de radiação electromagnética na região UV-Vis envolve os electrões de valência das moléculas. As transições electrónicas são denominadas de acordo com a orbital de origem e de destino do electrão (Figura 13),  $\sigma\sigma^*$ ,  $n\sigma^*$ ,  $\pi\pi^*$ ,  $n\pi^*$ , etc.



**Figura 13.** - Níveis de energia das orbitais moleculares do formaldeído e transições possíveis [89].

Uma vez que as energias de excitação associadas a electrões formando a maior parte das ligações  $\sigma$  são altas, a absorção de radiação por estes electrões está restrita à chamada região ultravioleta de vácuo ( $\lambda < 185$  nm), onde componentes da atmosfera também absorvem energia.

A absorção de radiação visível e ultravioleta de maior comprimento de onda está associada a um número limitado de grupos funcionais (*chromóforos*) que contêm electrões de valência com energias de excitação relativamente baixas. Estes são normalmente: (1) aqueles que participam directamente na formação de ligações  $\pi$  conjugadas, portanto associados a sequências de carbonos  $sp_2$  e/ou electrões não-ligantes (n) que estão normalmente localizados em átomos, como oxigénio, halogéneos, enxofre e azoto.

As absorptividades molares para as transições  $n,\pi^*$  são geralmente pequenas (10 a 100 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) enquanto os valores para transições  $\pi,\pi^*$ , por outro lado, normalmente têm absorptividades molares entre 1.000 e 50.000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [88].

➤ **Fluorescência:** se uma molécula excitada voltar ao seu estado fundamental, a sua energia  $\Delta E$  terá de ser depositada algures. Uma das possibilidades é a emissão de um fotão (fluorescência) transportando essa energia, ou então, essa energia pode ser convertida em calor (conversão interna) e/ou utilizada para dar origem a outra espécie intermediária que poderá ser ou não fluorescente.

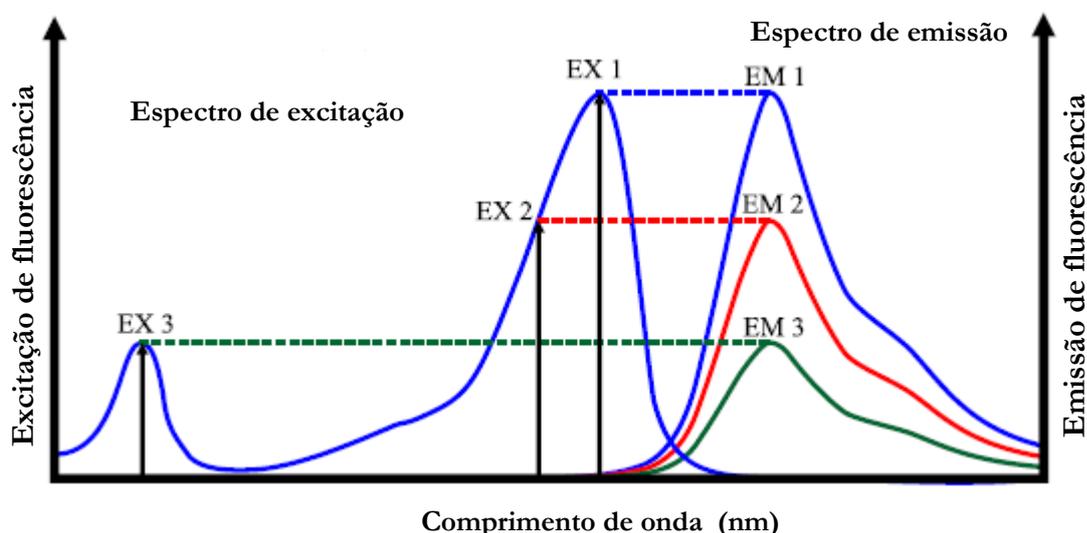
A fluorescência resulta de três principais processos que ocorrem na camada de electrões de valência:

1. **Excitação:** um fotão de energia  $h\nu_{ex}$  é fornecido através de uma fonte externa tal como uma lâmpada incandescente ou um laser e é absorvido pela molécula. A energia é utilizada para “empurar” um electrão do estado fundamental  $S_0$  para o estado excitado  $S_1$ . A absorção ocorre em cerca de  $1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$ .
2. **Relaxação não radiativa:** o electrão permanece no estado excitado um determinado tempo (cerca de 1 – 10 ns). Durante esse tempo o fluoróforo é submetido a alterações conformacionais e está também sujeito a múltiplas interações com o meio molecular em que se encontra (solvente), deixando a molécula no estado vibracional de menor energia do 1º estado excitado  $S_1$ .
3. **Emissão de fluorescência:** finalmente com uma determinada probabilidade um fotão de energia  $h\nu_f$  é emitido, voltando a molécula para o seu estado fundamental  $S_0$ . Devido a dissipação de energia durante o tempo de vida do estado excitado (relaxação não radiativa), a energia deste fotão é mais baixa e, por conseguinte, de maior comprimento

de onda do que o fóton absorvido  $h\nu_{\text{ex}}$ . A diferença de energia está relacionada com o desvio de Stokes, que é a diferença de comprimento de onda entre o máximo de emissão e o máximo de absorção:

$$\Delta\lambda_{\text{Stokes}} = \lambda_{\text{max. Emissão}} - \lambda_{\text{max. Absorção}} \quad (4)$$

Para moléculas com vários anéis aromáticos em solução aquosa, tais como as antocianinas, as transições electrónicas representadas por  $h\nu_{\text{ex}}$  e  $h\nu_{\text{flu}}$  são substituídas por espectros de energia chamados espectro de excitação de fluorescência e espectro de emissão de fluorescência, respectivamente (figura 14). A largura das bandas destes espectros tem particular importância para aplicações em que dois ou mais fluoróforos são detectados simultaneamente, como no caso das diferentes espécies (hemicetal e chalconas) encontradas no equilíbrio termodinâmico das antocianinas estudadas neste trabalho.

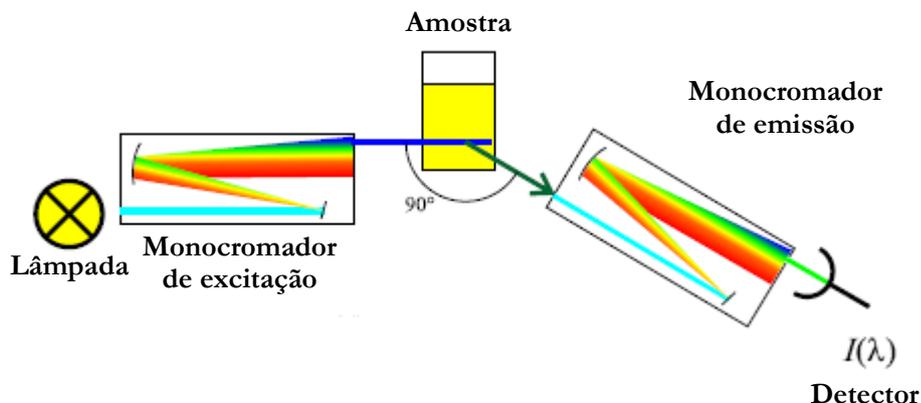


**Figura 14.** – Espectros de excitação e emissão de um fluoróforo. Os espectros de emissão foram obtidos para três diferentes comprimentos de onda de excitação (EX1, EX2, EX3) [88].

Sob raras exceções, o espectro de excitação de uma espécie fluorescente numa solução diluída é idêntica ao espectro de absorção. A intensidade da emissão é proporcional ao espectro de excitação de fluorescência no comprimento de onda de excitação (figura 14).

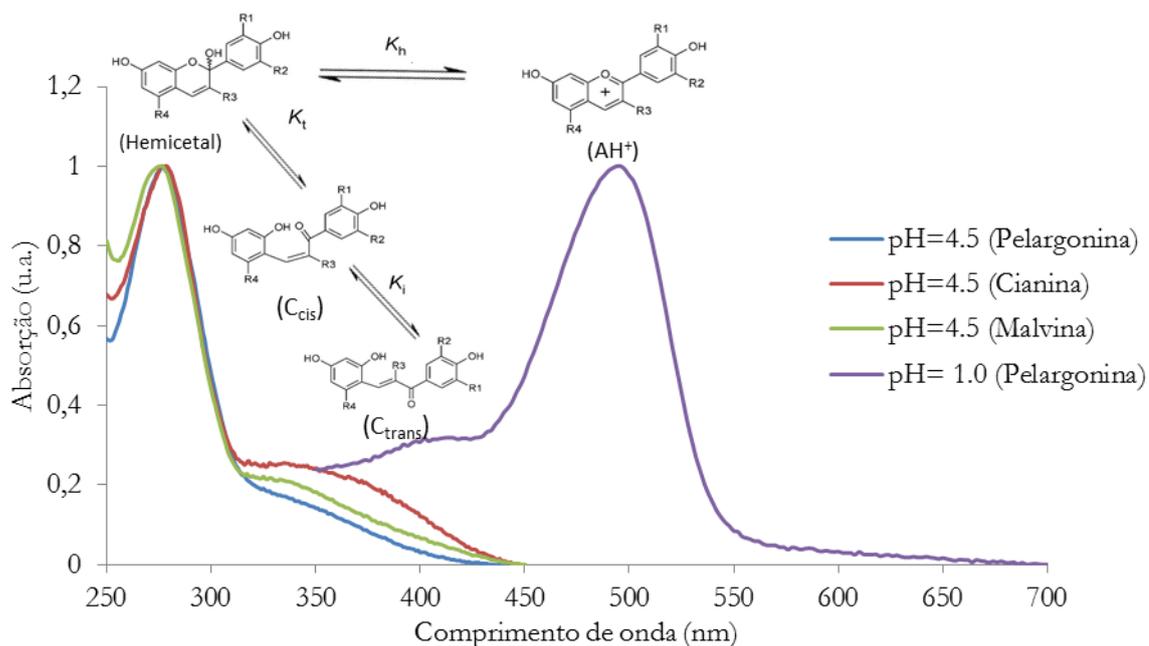
Os espectros de fluorescência podem ser medidos no espectrómetro de fluorescência (figura 15) que consiste numa fonte de luz de excitação para o comprimento de onda de excitação pretendido (parecido com o do espectrómetro de absorção, figura 15) e um detector de canais (fotões), também com um monocromador. O detector é posicionado perpendicularmente a

excitação para suprimir a luz vinda directamente da fonte e assim registar unicamente a fluorescência real da amostra.



**Figura 15.** – Ilustração simplificada de um espectrômetro de fluorescência [88].

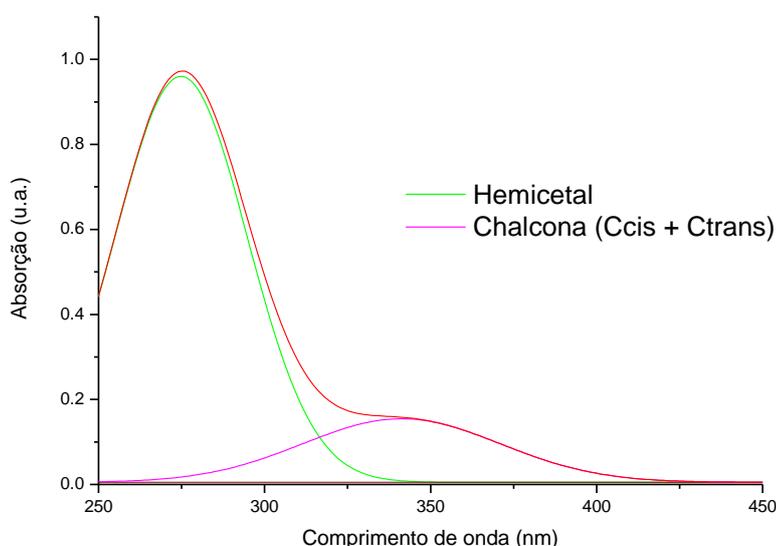
A análise dos espectros de absorção UV/Visível são da maior importância no estudo das propriedades espectroscópicas destes compostos. Na figura 16, apresenta-se os respectivos espectros de cada uma das antocianinas a pH= 4.5 e pH=1 para o catião flavílio da pelargonina.



**Figura 16.** Espectro de absorção das antocianinas estudadas (Pelargonina, Cianina e Malvina) a pH=4.5 e pH=1.0 e respectivo equilíbrio termodinâmico.

Os espectros de absorção apresentados na figura 16 foram traçados aguardando tempo suficiente após dissolução para garantir que as soluções tivessem atingido o equilíbrio. Nesta gama de pH é possível identificar-se, embora mascarada neste espectro pela absorção do segundo singlete do flavílio, que absorve na mesma zona do espectro, a banda típica do Hemicetal (B) com máximo de absorção a 275 nm no caso da malvina e 278 nm para a pelargonina e cianina, seguida das bandas de absorção das chalconas a 320 nm ( $C_{cis}$ ) <  $\lambda$  < 400 nm ( $C_{trans}$ ) não se conseguindo distinguir os isómeros *cis* e *trans* por absorção electrónica. Para pH= 1.0 observamos a banda típica do catião flavílio ( $AH^+$ ) nos 518 nm ilustrada para o caso da pelargonina.

A pH menos ácido, obtemos o somatório das absorções das diferentes espécies em equilíbrio. Considerando uma forma gaussiana para as bandas de absorção do hemicetal e das chalconas, pode-se obter as respectivas bandas de absorção, por decomposição espectral da figura 16. Obtêm-se assim os espectros da figura 17, em que a banda centrada a 278 nm é atribuída ao hemicetal enquanto aquela centrada a 325 - 355 nm é atribuída ao somatório das bandas das chalconas *cis* e *trans*.



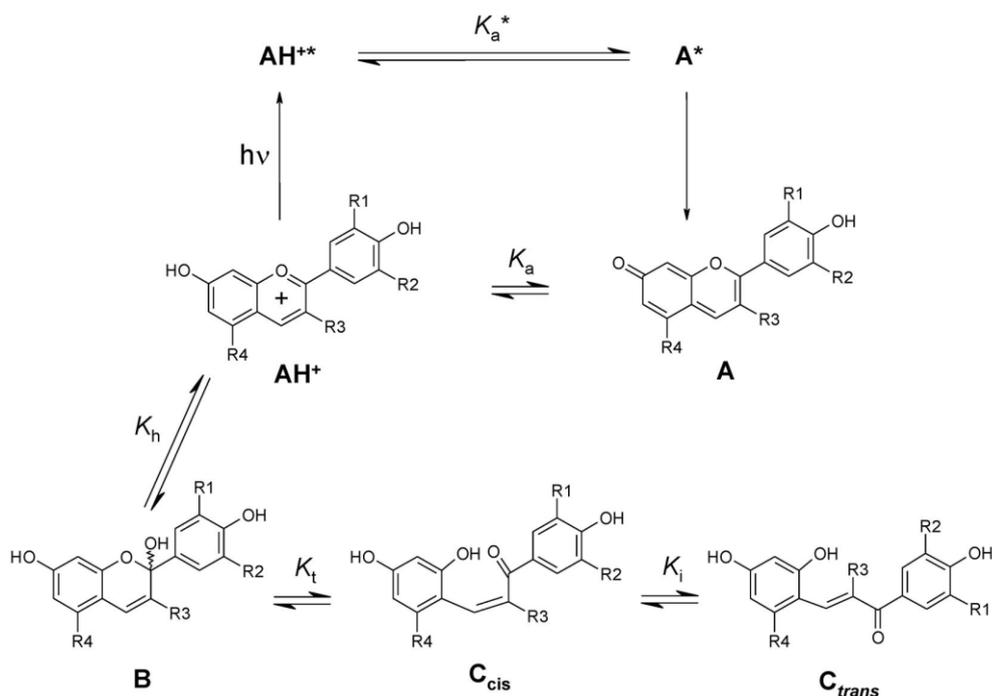
**Figura 17.** Decomposição gaussiana do espectro da figura 16 (pelargonina) a pH = 4.5.

A partir da figura 17, é possível termos uma ideia mais clara de onde absorvem as espécies hemicetal e chalconas.

## 2.2 Caracterização Fotoquímica

### 2.2.1 Fotoquímica de antocianinas

Como resultado da sua acumulação nos vacúolos das células epidérmicas, as antocianinas, têm sido bastante investigados no domínio da protecção dos tecidos das plantas contra a radiação solar em excesso. Sob a forma de catiões de flavílio de cor vermelha,  $AH^+$ , as antocianinas naturais absorvem fortemente a luz UV e verde sendo estes considerados também como super-photoácidos [90]. Como já demonstrado, as antocianinas naturais convertem a radiação absorvida em calor em menos de 10 picosegundos por transferência de protão ultra rápida para a água, seguida de curto decaimento resultante do estado excitado da base para o seu estado fundamental (A no Esquema 6) com uma eficiência quântica global de conversão da energia absorvida em calor superior a 0,99. Como consequência, para antocianinas livres, a transferência de protão no estado excitado servirá como um eficiente mecanismo de fotoprotecção. No entanto, em soluções aquosas, o catião flavílio  $AH^+$ , tem tendência a desaparecer a  $pH > 2-3$ , devido à hidratação. Isto reflecte o facto de valor do  $pK_a$  do grupo 7-OH das antocianinas ser de cerca de 4-5, enquanto que os valores  $pK_h$  para a hidratação de  $AH^+$  são tipicamente 1-2 unidades de pH inferiores. Assim, numa gama de pH mais elevado como o encontrado em vacúolos vegetais (por exemplo, tão elevada como pH 5,5), as antocianinas não complexadas irão existir principalmente sob a forma de hemicetal B (Esquema 1) e, em menores quantidades, nas outras formas, isto é, sob a forma da base quinoidal conjugada A, e dos isómeros  $C_{cis}$  e  $C_{tran}$ . Recorde-se que o catião flavílio (vermelho),  $AH^+$ , participa em solução aquosa numa série de equilíbrios acoplados envolvendo uma hidratação inicial que produz o incolor hemicetal B, que tautomeriza em chalconas ( $C_{cis}$  e  $C_{trans}$ ) amarelo pálido. A desprotonação do catião produz a forma básica quinoidal, A, responsável pela cor azul (Esquema 6).



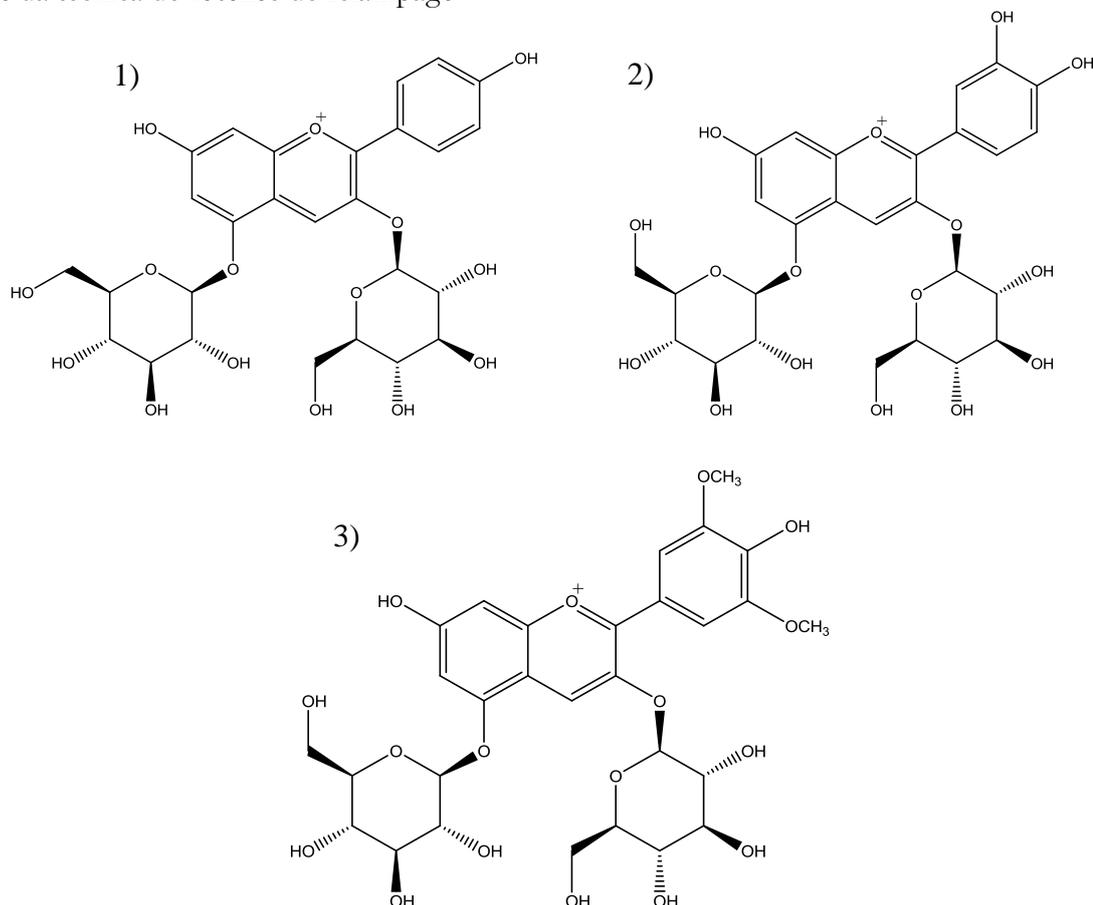
**Esquema 6** – Reactividade do estado fundamental e excitado das antocianinas [90].

A transferência de próton do estado excitado, ESPT, ( $K_a^*$ ) ocorre numa escala de tempo na ordem dos picosegundos e a transferência de próton do estado fundamental ( $K_a$ ) na ordem dos micro- aos nanosegundos. A hidratação no estado fundamental da forma catiónica  $AH^+$  para a forma hemicetal (B) é dependente do pH e moderadamente rápida (fracção de segundos a minutos) a pH próximo de 3-4. A tautomerização ( $K_t$ ) para formar a chalcona *cis* ( $C_{cis}$ ) é mais rápida (milissegundos) e a subsequente isomerização ( $K_i$ ) para a chalcona *trans* ( $C_{trans}$ ) é lenta (horas).

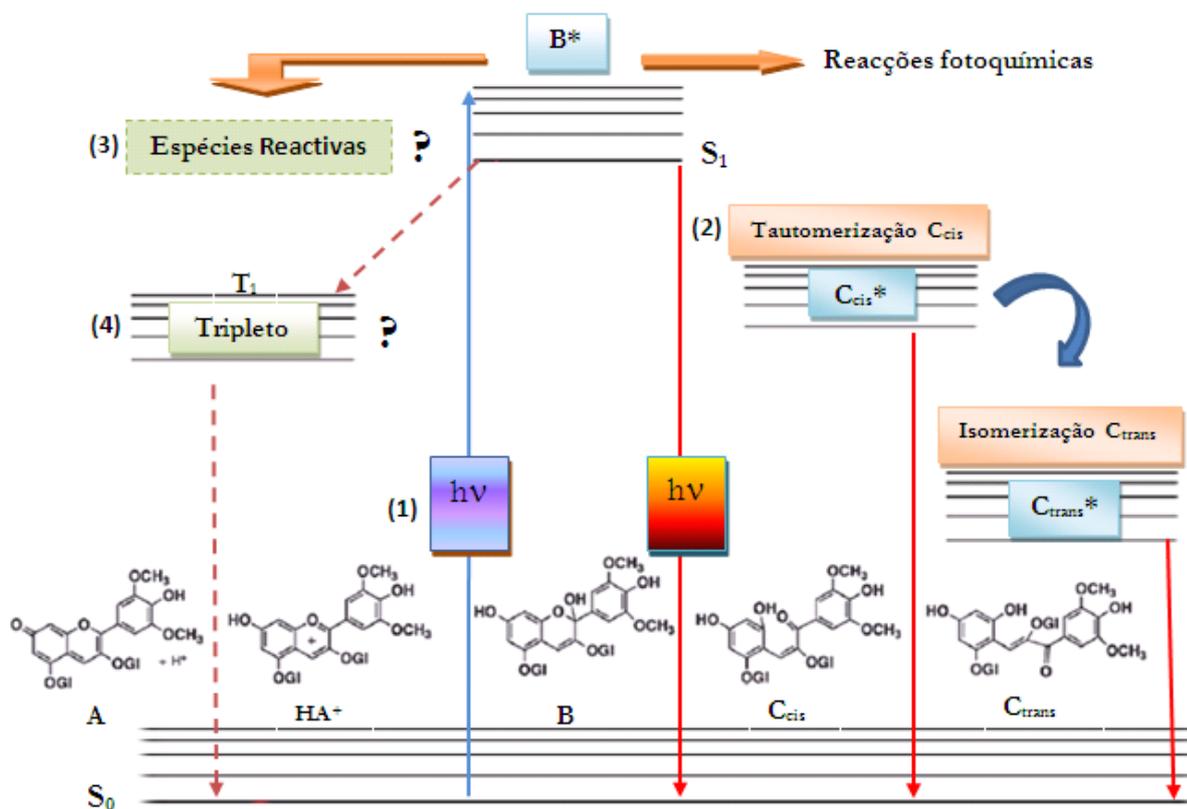
### 2.2.2. Fotoquímica do hemicetal

Com base nas publicações já referenciadas e resultados obtidos na caracterização fotoquímica do catião flavílio  $AH^+$  no papel fotoprotector nas plantas, surgiu a necessidade de entendermos melhor e completarmos estes estudos centrado a nossa investigação no intermediário hemicetal B, maioritariamente presente no vacúolo das plantas a pH 4.5-5, e presentemente muito pouco estudado. Para tal, foram seleccionadas três antocianinas naturais: a pelargonina (pelargonidina-3,5-di-O-glicosídeo), a cianina (cianidina-3,5-di-O-glicosídeo) e a malvina (malvidina-3,5-di-O-glicosídeo) (figura 18), preparadas em solução aquosa a pH  $\approx$  4.5-5.0, de modo a certificar de que a espécie hemicetal (B) neste tão complexo multi-equilíbrio de formas, fosse a espécie dominante.

Para tal, caracterizou-se este equilíbrio através de espectroscopia de absorção electrónica UV-Visível e fluorescência no estado estacionário assim como resolvida no tempo (tempos de vida de fluorescência). Foram obtidos os respectivos espectros de absorção, excitação e emissão de fluorescência das diferentes espécies presentes, a valores de pH próximos do encontrado no vacúolo das plantas. Posteriormente investigou-se a formação de espécies reactivas ou formação de tripletos através da técnica de fotólise de relâmpago.



**Figura 18.** Antocianinas utilizadas neste trabalho experimental: 1) pelargonidina-3,5-di-O-glicosídeo, 2) cianidina-3,5-di-O-glicosídeo e 3) malvidina-3,5-di-O-glicosídeo.

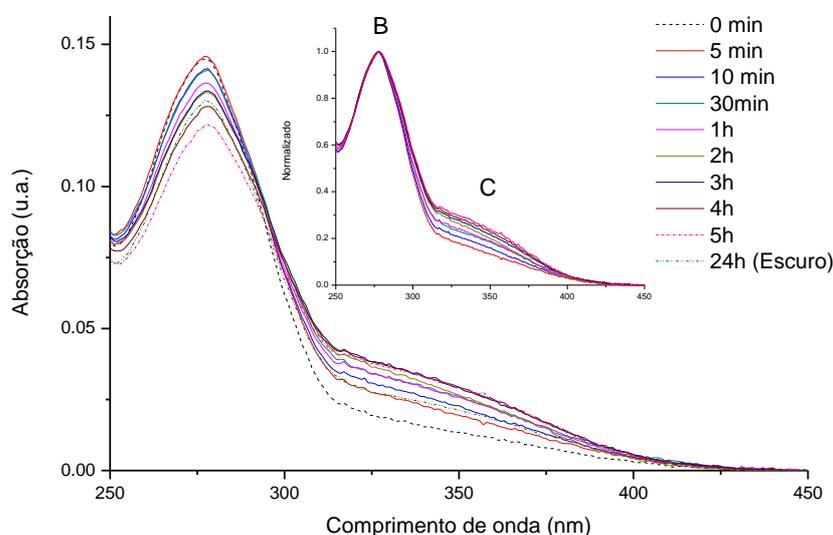


**Esquema 7** – Esquema reaccional proposto para o estado fundamental e excitado da forma B da malvina em solução aquosa e pH=4.5.

O esquema reaccional apresentado anteriormente (Esquema 7), foi proposto para clarificar o objectivo deste trabalho experimental. A excitação das moléculas de hemicetal B, pela absorção de um fóton de luz (1), irá converter parte dessa energia absorvida para promover um electrão do estado fundamental  $S_0$  para o primeiro estado excitado  $S_1$ , formando a espécie  $B^*$ , que irá existir durante um curto espaço de tempo, que decairá para o estado fundamental com emissão de fluorescência. No entanto, para além da formação da espécie  $B^*$ , podem ocorrer processos fotoquímicos que dêem origem a novas espécies. Por tautomerização,  $B^*$  pode dar origem a  $C_{cis}^*$  (2) e conseqüentemente por isomerização formar-se  $C_{trans}^*$  ou  $C_{trans}$ . Estas duas espécies podem também decair para o estado fundamental por fluorescência. Para além destes processos fotoquímicos, a forma excitada do hemicetal  $B^*$ , poderá formar possíveis espécies reactivas (3) ou ainda por conversão intersistemas pode transitar para o estado tripleto (4) que ao regressar ao estado fundamental dará origem a um processo chamado fosforescência.

### 2.2.3. Irradiação Contínua

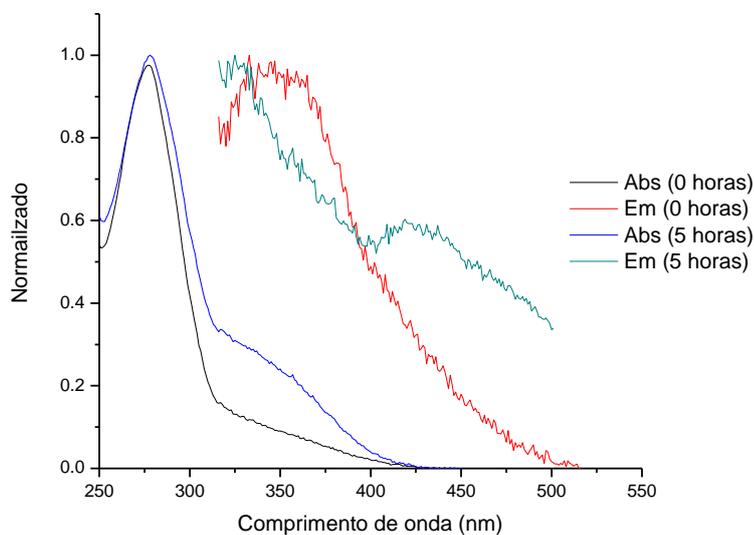
Os cromenos, neste caso o hemicetal B, são moléculas que por acção de um estímulo externo, podem converter-se noutras formas passíveis de isomerização *cis-trans* fotoinduzida, através da abertura do seu anel central. De seguida apresentam-se os estudos de irradiação contínua efectuados para a espécie B (hemicetal), de forma a entendermos para onde se irá deslocar o equilíbrio em presença de luz. A figura 19 apresenta a variação do espectro de absorção para a pelargonina com excitação a 278 nm.



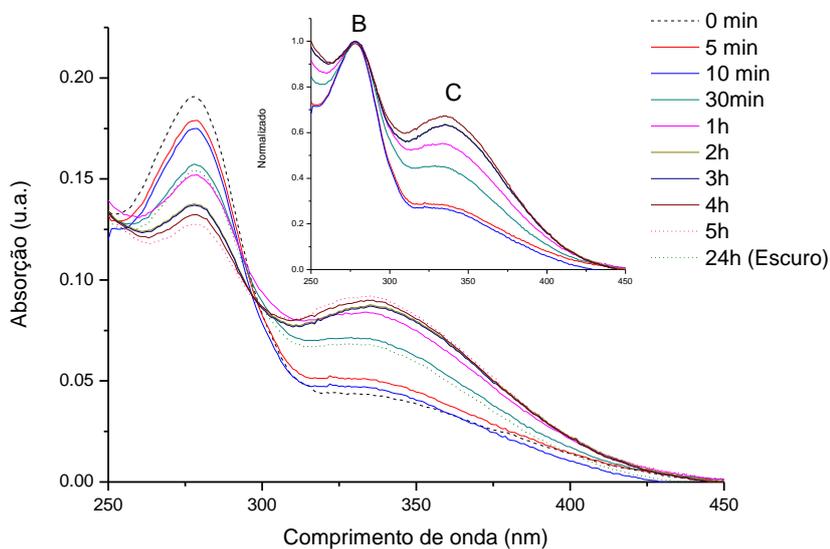
**Figura 19.** Variação do espectro de absorção da pelargonina com irradiação contínua de B (hemicetal) durante 5 horas, e consequente formação de C (chalconas). As soluções após irradiação foram mantidas no escuro durante 24 horas. Normalização dos espectros para o máximos de absorção do hemicetal a  $\lambda_{exc} = 278$  nm.

Foi possível observar o crescimento da banda de absorção correspondente às chalconas (335-350 nm), e o decréscimo da banda de absorção do hemicetal (278 nm), durante as 5 horas de irradiação contínua. Visivelmente, a irradiação da espécie B induziu a formação da espécie C. A solução aquosa de pelargonina foi guardada no escuro durante 24 h, e através da análise do espectro de absorção correspondente podemos considerar que mesmo na ausência de luz, grande parte da quantidade de C formada reverteu para a forma B, indicando reversibilidade do sistema.

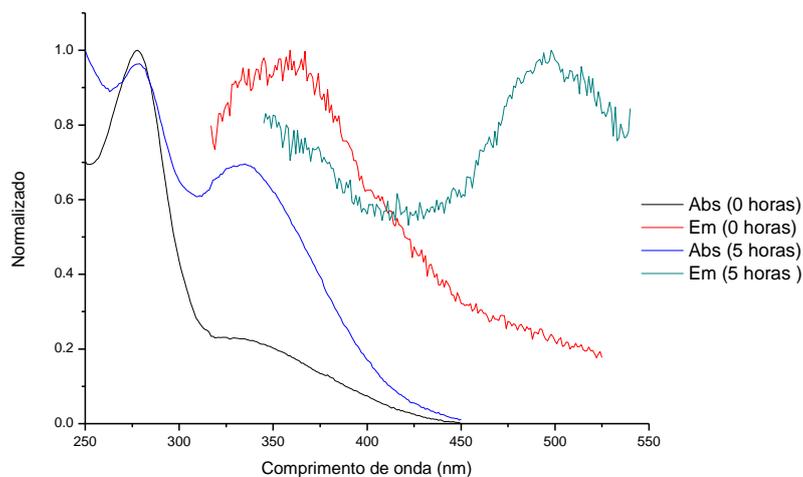
Seguiu-se também o equilíbrio fotoquímico através dos espectros de absorção e emissão de fluorescência, antes e depois da irradiação (figura 20).



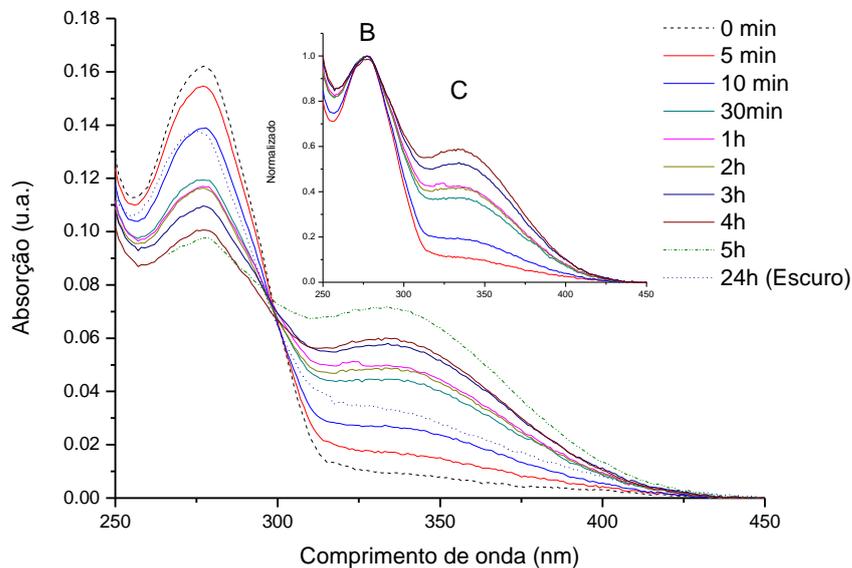
**Figura 20.** Espectros de absorção e emissão de fluorescência da pelargonina com excitação nos 278 nm, antes da irradiação - Abs (0 horas); Em (0 horas) e depois da irradiação – Abs (5 horas); Em (5 horas). Solução aquosa de pelargonina a pH= 4.5. Normalização dos espectros para o máximo de absorção e emissão de fluorescência.



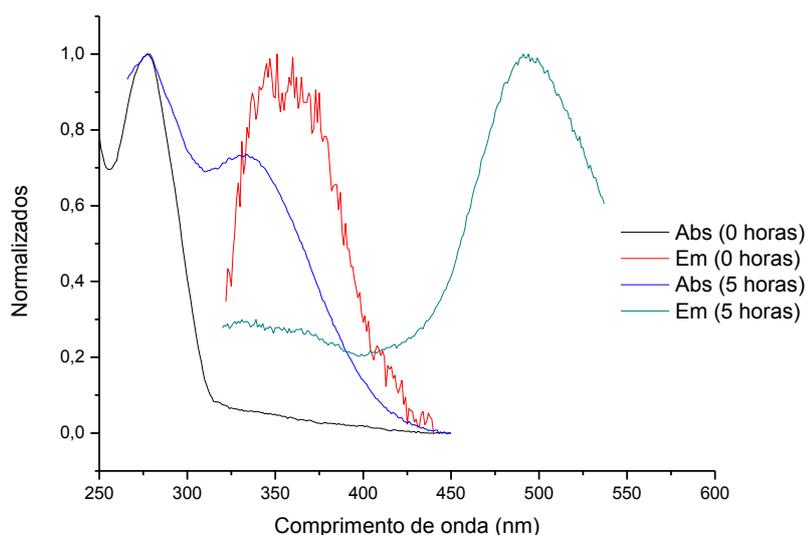
**Figura 21.** Variação espectral após irradiação de B da cianina durante 5 horas. As soluções após irradiação foram mantidas no escuro durante 24 horas.



**Figura 22.** Espectros de absorção e emissão de fluorescência da cianina com excitação nos 278 nm, antes da irradiação - Abs (0 horas); Em (0 horas) e depois da irradiação – Abs (5 horas); Em (5 horas). Solução aquosa de cianina a pH= 4.5. Normalização dos espectros para o máximo de absorção e emissão de fluorescência.



**Figura 23.** Variação espectral após irradiação de B da malvina durante 5 horas. As soluções após irradiação foram mantidas no escuro durante 24 horas.



**Figura 24.** Espectros de absorção e emissão de fluorescência da malvina com excitação nos 275 nm, antes da irradiação - Abs (0 horas); Em (0 horas) e depois da irradiação – Abs (5 horas); Em (5 horas). Solução aquosa de malvina a pH= 4.5. Normalização dos espectros para o máximo de absorção e emissão de fluorescência.

As figuras 19, 21 e 23 mostram claramente a diminuição da absorção de B e o aumento de C ( $C_{cis} + C_{trans}$ ) ao longo do tempo de irradiação de B para as diferentes antocianinas estudadas. Este processo fotoquímico ocorre devido a abertura do anel central de B por acção da luz deslocando o equilíbrio no sentido da formação de  $C_{cis}$  e, subsequentemente, de  $C_{trans}$ .

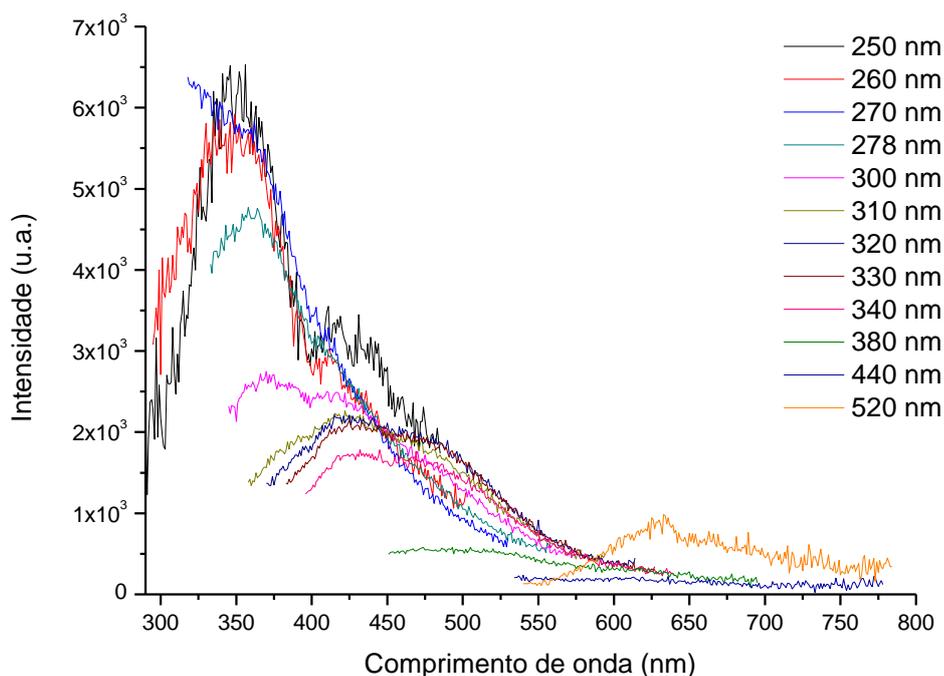
Através da análise espectral da figura 19 verificou-se que a pelargonina, mais especificamente a espécie B, reage fotoquimicamente com a luz abrindo o seu anel fotocromico convertendo-se nas espécies  $C_{cis}$  e  $C_{trans}$ , não sendo contudo possível, através de espectroscopia electrónica separarmos as bandas de absorção destas duas ultimas espécies.

O mesmo se observou para as outras duas antocianinas, cianina e malvina nas figuras 21 e 23 respectivamente. Fica de qualquer modo claro que, efectivamente, sob a acção de luz num comprimento de onda de irradiação a 278 nm para a pelargonina e cianina e 275 nm para a malvina, dá-se a conversão da espécie B em  $C_{cis} + C_{trans}$ . Não foi verificado qualquer existência de formação de outras bandas nos espectros para comprimentos de onda superiores a 450 nm.

Após 24 horas guardadas do escuro, verificou-se que o equilíbrio recupera substancialmente na direcção de formação de B, indicando a reversibilidade do sistema. A energia absorvida pela espécie B foi portanto gasta sob a forma de calor na reacção de tautomerização para formar  $C_{cis}$  e na isomerização desta espécie formando  $C_{trans}$ .

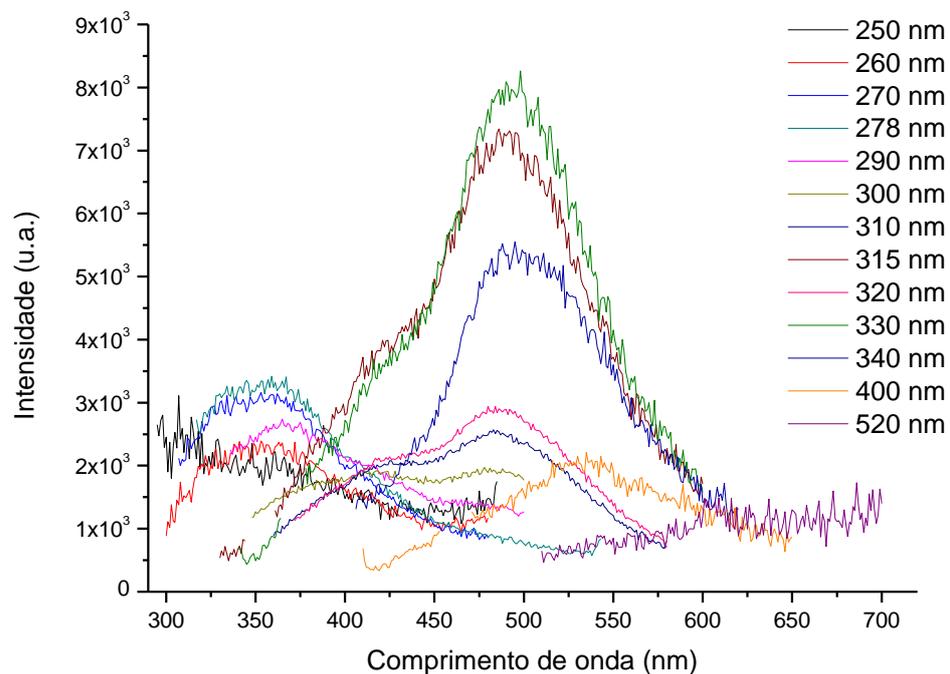
## 2.2.4 Emissão de fluorescência

Com o objectivo de estudarmos a fluorescência das formas presentes em equilíbrio a pH próximo de 4.5, procedeu-se a obtenção dos espectros de emissão de fluorescência para comprimentos de onda compreendidos entre 250 e 520 nm para as três antocianinas estudadas:

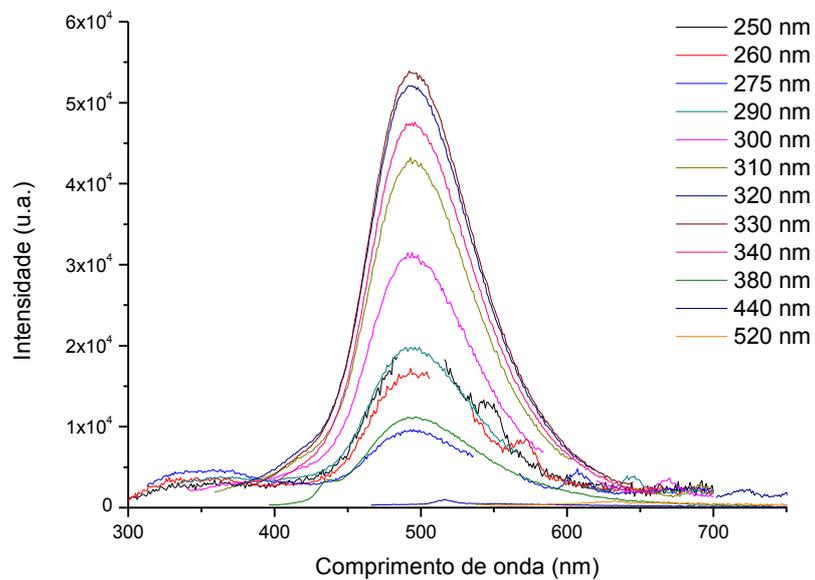


**Figura 25.** Emissão de fluorescência da pelargonina para comprimentos de onda de excitação compreendidos entre 250 e 520 nm. pH=4.5 em solução aquosa.

Analisando a figura 25 observamos que sempre que excitamos a forma B para comprimentos de onda próximos de 278 nm obtém-se uma banda de emissão de fluorescência com máximo situado nos 350 nm, característica do hemiacetal (B), que vai diminuindo a sua intensidade para maiores comprimentos de onda. Através desta caracterização foi possível verificar que a forma B emite fluorescência, contudo com intensidades bastante baixas em relação as outras espécies. Para comprimentos de onda de excitação próximos dos 320 nm observamos uma banda de emissão nos 430-440 nm muito pouco definida, devido a sobreposição da banda de emissão da forma B, com as duas bandas correspondentes as chalconas  $C_{cis}$  e  $C_{trans}$ . Excitando nos 520 nm ainda é possível identificarmos uma pequena banda de emissão nos 625 nm, correspondente a uma pequena parte de base quinonoidal que se forma quando se procede a dissolução dos iões em água.



**Figura 26.** Emissão de fluorescência da cianina para comprimentos de onda de excitação compreendidos entre 250 e 520 nm. pH=4.5 em solução aquosa.



**Figura 27.** Emissão de fluorescência da malvina para comprimentos de onda de excitação compreendidos entre 250 e 520 nm. pH=4.5 em solução aquosa.

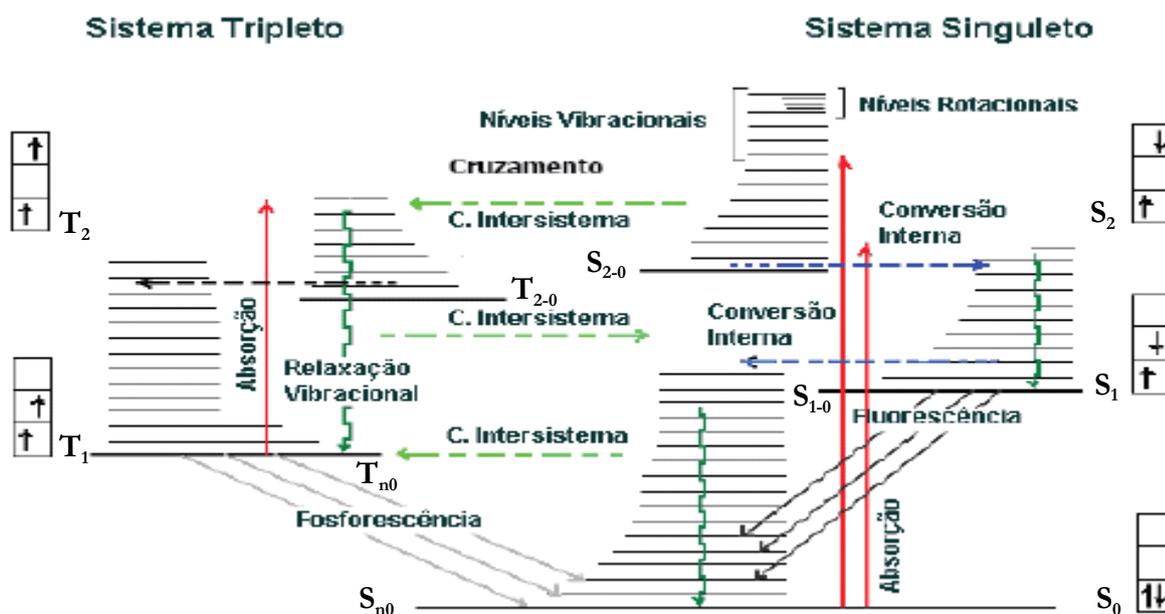
O mesmo se verifica no caso da cianina, na figura 26, onde claramente se identifica uma banda de emissão nos 350 nm correspondente ao hemicetal e outras duas a 430 e 495 nm da emissão das chalconas.

No caso da malvina, representada na figura 27, a emissão de fluorescência é muito baixa na zona correspondente ao hemicetal, obtendo-se apenas a banda correspondente a emissão da chalcona ( $C_{trans}$ ) nos 495 nm. Não se observa nenhuma banda característica da base quinoidal A.

Uma vez mais, confirma-se a presença da forma B numa gama de pH próximo do encontrado no vacúolo das plantas, assim como a emissão desta espécie e dos seus fotoprodutos associados. Neste caso prático, a fraca intensidade das bandas associadas a fluorescência da forma B mostrou ser mais um indício de que a energia luminosa (radiação UV) absorvida por essa espécie, é utilizada nas reacções químicas de tautomerização e consequente isomerização, utilizando parte dessa energia para a formação de chalconas e dissipando o resto sob a forma de calor.

## 2.3 Caracterização fotofísica

Os processos fotofísicos associados à relaxação dos estados excitados de uma molécula após absorção de luz foram exaustivamente estudados no século passado durante a década de 40 e os caminhos possíveis para a desactivação do estado excitado de uma molécula orgânica foram resumidos por Aleksander Jablónski (Figura 28) [91].



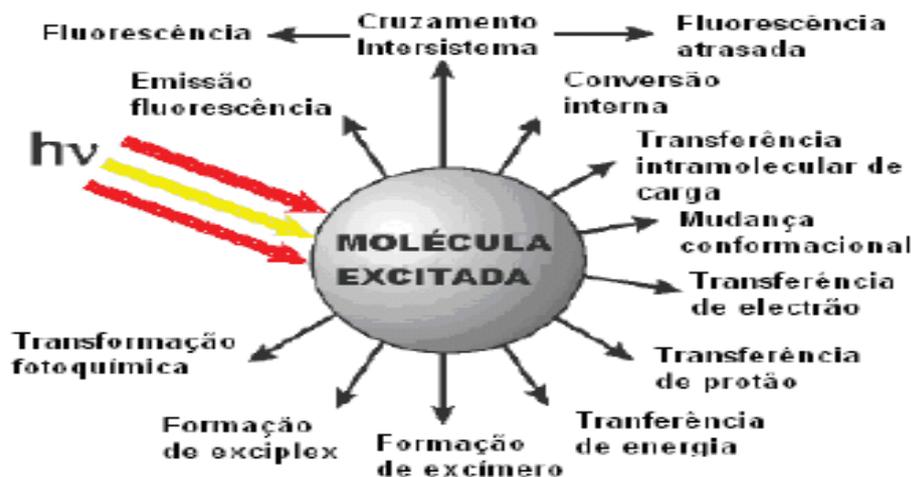
**Figura 28.** Diagrama de Jablónski: fenómenos eletrônicos intramoleculares possíveis em moléculas excitadas.

Uma molécula orgânica com um número par de electrões que se encontrem emparelhados no estado fundamental ( $S=0$  e multiplicidade de spin  $2S+1=1$ , i.e., singuleto) pode apresentar dois conjuntos de estados eletrônicos excitados possíveis: os que conservam o spin inicial  $S$  (singuletos) e os que sofrem alteração de spin  $T$  (tripleto) (Figura 29).



**Figura 29.** Representação do estado fundamental e dos estados excitados singuleto e triplete de uma molécula.

A cada estado electrónico,  $S_n$  ou  $T_n$ , estão obviamente associados vários estados vibracionais, mas de acordo com a distribuição estatística de Boltzmann, a grande maioria das moléculas encontra-se nos níveis vibracionais de menor energia ( $S_{n0}$  e  $T_{n0}$ ) à temperatura ambiente (Figura 28). Ao absorver um fóton, a molécula passa normalmente do estado electrónico fundamental  $S_0$  (de menor energia) para um estado excitado de maior energia ( $S_1, S_2, S_3, \dots$ ) do mesmo spin, uma vez que a transição electrónica com alteração de spin é proibida. Após formação do estado excitado a molécula tem ao seu dispor diversos mecanismos de desactivação para o estado fundamental (Figura 30).



**Figura 30.** Fenómenos possíveis em moléculas excitadas. (Adaptado [92]).

A molécula excitada pode relaxar por emissão de um fóton (processo radiativo), caracterizada pela constante de velocidade  $k_r$ . Pode atingir o estado tripleto mediante a inversão do spin de um dos electrões (cruzamento intersistemas), caracterizado pela constante de velocidade  $k_{isc}$ , ou por uma série de relaxações vibracionais, que leva a molécula excitada a decair através dos níveis vibracionais de estados electrónicos de igual multiplicidade, até atingir o nível vibracional do estado singuleto ou tripleto de menor energia (conversão interna), caracterizados pela constante de velocidade  $k_{ic}$ . Os processos que não dão origem à emissão de luz ( $k_{ic}$  e  $k_{isc}$ ) são classificados como processos não radiativos.

Devido à regra de selecção de spin, que proíbe as transições entre estados de diferente multiplicidade, normalmente a  $k_{ic} \gg k_{isc}$ . A relaxação global do estado excitado  $S_1$  é expressa pela soma de todos os processos descritos anteriormente,

$$\frac{dn_{S_1}}{dt} = - (k_r + k_{nr}) n_{S_1} \quad (2)$$

$$\text{ou} \quad \frac{dn_{S_1}}{dt} = -k_{S_1} n_{S_1} = -\frac{n_{S_1}}{\tau_{S_1}} \quad (3)$$

sendo  $n_{S_1}$  o número de partículas excitadas num dado instante,  $\tau_{S_1}$  o tempo de vida do estado  $S_{10}$ , também chamado tempo de vida de fluorescência, normalmente é da ordem dos nanossegundos para moléculas orgânicas em soluções líquidas. O decaimento tem uma lei exponencial relativamente à população do estado  $S_{10}$  (equação 4).

$$n_S(t) = n_{S_1}^0 e^{-t/\tau_{S_1}} \quad (4)$$

O decaimento do estado tripleto é descrito de forma semelhante relativamente aos processos de desactivação de  $T_{1,0}$ . Os tempos de vida dos tripletos  $T_1$ , para moléculas orgânicas em soluções líquidas são da ordem dos micro a milissegundos. Pode definir-se um rendimento quântico de fluorescência ( $\phi_{fl}$ ), eficiência com que a amostra emite fluorescência, através da razão entre o número de fótons emitidos e o número total de fótons absorvidos.

$$\phi_{fl} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (5)$$

O  $\phi_{fl}$  pode ser relacionado com o tempo de vida de fluorescência da seguinte forma:

$$\phi_{fl} = \frac{\tau_{S_1}}{\tau_r} \quad (6)$$

Em que  $\frac{1}{\tau_r} = k_r$  é a constante de velocidade radiativa acima descrita.

Pode também definir-se a eficiência de formação do estado tripleto a partir do estado singuleto como sendo a razão da constante de velocidade de cruzamento intersistemas pela soma de todos os processos que despopulam o estado  $S_1$ .

$$\phi_T = \frac{k_{isc}}{k_r + k_{ic} + k_{isc}} \quad (7)$$

ou

$$\phi_T = \frac{\tau_{S_1}}{\tau_{isc}} \quad (8)$$

Em resumo, após uma absorção  $S_{0,0} \rightarrow S_{n-v}$  (Figura 28), poderá ocorrer uma rápida relaxação vibracional não radiativa de  $S_{n-v} \rightarrow S_{n,0}$ , seguida por uma conversão interna  $S_{n,0} \rightarrow S_{1-v}$ . Neste estado

pode seguir-se uma nova relaxação vibracional,  $S_{1-v} \rightarrow S_{1-0}$ . No estado  $S_{1-0}$  as moléculas podem: relaxar de volta ao estado fundamental radiativamente (fluorescência) ou não-radiativamente (por conversão interna  $S_{1-0} \rightarrow S_{0-v}$  ou cruzamento intersistemas  $S_{1-0} \rightarrow T_{n-v}$ ). Uma vez populado o estado  $T_{n-v}$ , este pode por sua vez relaxar por conversão interna até ao estado  $T_{1-0}$ , a partir do qual pode ocorrer desactivação radiativa ( $T_{1-0} \rightarrow S_{0-0}$ ), com a emissão de um fóton, processo denominado fosforescência e caracterizado pela constante de velocidade  $k_p$ . A fluorescência é uma transição permitida por multiplicidade de spin, a emissão de fosforescência é proibida. Na tabela seguinte estão indicados os tempos característicos das transições.

**Tabela 3-** Tempos característicos dos processos fotofísicos em moléculas orgânicas excitadas.

Processo	Tempo (s)
Absorção	$10^{-15}$
Relaxação vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Emissão a partir de $S_1$ (fluorescência)	$10^{-10} - 10^{-7}$
Cruzamento intersistemas	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Emissão a partir de $T_1$ (fosforescência)	$10^{-6} - 1$

Uma vez que os processos proibidos por multiplicidade de spin são mais lentos, as moléculas que se encontram no estado excitado tripleto são mais susceptíveis de serem desactivadas através de processos adicionais que envolvem, por exemplo, colisões com o oxigénio molecular ou outros processos fotoquímicos (*fotodegradação*). Como o estado electrónico fundamental do oxigénio molecular é também um estado tripleto, quando estas colisões ocorrem, dá-se transferência de energia do tripleto orgânico para o oxigénio, formando a espécie reactiva oxigénio singuleto [92].

Típicamente, as flavonas, cumarinas e cromenos absorvem significativamente na região do UV-B e UV-C, e por vezes apresentam também absorção no UV-A (apesar de praticamente toda essa radiação ser absorvida pelo oxigénio molecular). A maioria destes compostos têm rendimentos quânticos de formação de tripleto relativamente baixos e rendimentos quânticos de transferência de energia para formar oxigénio singuleto ainda mais baixos. No entanto, tem sido demonstrado para vários compostos desta família a existência de fotoactividade contra células e vírus, [93] e acredita-se que, tal como outros derivados fenólicos, são produzidos como forma de resistência das plantas a infecções por agentes patogénicos [94]. Becker et. al. foram os primeiros a avaliar as propriedades fotofísicas de vários compostos aparentados das flavonas e numa tentativa de aumentar a eficiência

fotobiocida (normalmente envolvendo estados tripleto), a analisar o efeito provocado nessas propriedades pela substituição do grupo carbonilo por um grupo tionilo.

No presente trabalho, seguindo a mesma linha de raciocínio, pretende-se compreender quais os processos de desactivação do estado excitado das formas presentes a pH intracelular e de que forma possam contribuir para a fotoprotecção do sistema fotossintético nas plantas. Deste modo poderemos entender se após absorção da radiação UV e visível nociva, estas formas irão favorecer quer a formação de tripletos de longo tempo de vida quer a formação de espécies reactivas de oxigénio por fotosensibilização, dando origem a fotoprodutos indesejados.

### 2.3.1 Rendimentos quânticos de fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência em função do comprimento de onda  $\phi_f(\lambda)$  é definido em função do número de fótons absorvidos  $N_{abs}$  e do número de fótons emitidos  $N_{em}$ :

$$\phi_f(\lambda) = \frac{N_{em}}{N_{abs}(\lambda)} \quad (9)$$

Como mencionado anteriormente, este quantifica a relação entre os decaimentos de fluorescência radiativos ou não radiativos do estado excitado.

Embora os mais antigos e fundamentais métodos para calcular rendimentos quânticos se baseiam na medida de luminescência absoluta, estes métodos são difíceis e requerem uma grande precisão.

Certos fluoróforos foram estabelecidos como padrões para o cálculo destes rendimentos quânticos de fluorescência, como por exemplo a N-acetiltirosinamida (NAYA) [95], utilizada neste trabalho.

Os rendimentos quânticos de novos compostos podem assim ser calculados a partir de valores conhecidos dos padrões através da equação (10).

$$\frac{\phi_{amostra}}{\phi_{referencia}} = \frac{N_{em,amostra}}{N_{em,referencia}} \cdot \frac{N_{abs,referencia}}{N_{abs,amostra}} = \frac{I_{em,amostra}}{I_{em,referencia}} \cdot \frac{A_{abs,referencia}}{A_{abs,amostra}} \quad (10)$$

$I_{em}$ , é o valor da integração da banda de emissão de fluorescência da amostra e da referência utilizada respectivamente, e  $A_{abs}$ , o valor da densidade óptica no máximo de absorção.

Esta expressão apenas é válida se as intensidades de fluorescência e absorvâncias forem medidas para um mesmo comprimento de onda de excitação.

Escrita de outra forma, podemos obter os rendimentos quânticos de fluorescência a partir da equação 11.

$$\phi_{fl,amostra} = \phi_{referencia} \cdot \frac{I_{em,amostra}}{I_{em,referencia}} \cdot \frac{A_{abs,referencia}}{A_{abs,amostra}} \cdot \frac{n_{amostra}^2}{n_{referencia}^2} \quad (11)$$

Os rendimentos quânticos de fluorescência das três antocianinas a pH= 4.5, medidos em relação à N-acetiltirosinamida (NAYA), (tabela 4), são semelhantes e da ordem de  $10^{-4}$ .

**Tabela 4** – Rendimentos quânticos de fluorescência ( $\phi$ ) obtidos para as diferentes antocianinas a pH=4.5, temperatura 20°C, com integração da banda de emissão de fluorescência para cada composto.

$\lambda_{exc}$	Composto	Solvente	$\Phi_f$
278 nm	NAYA	DI+20% $H_2O$	0.16817*
278 nm	Pelargonina	$H_2O$	0.00041
278 nm	Cianina	$H_2O$	0.00045
275 nm	Malvina	$H_2O$	0.00041

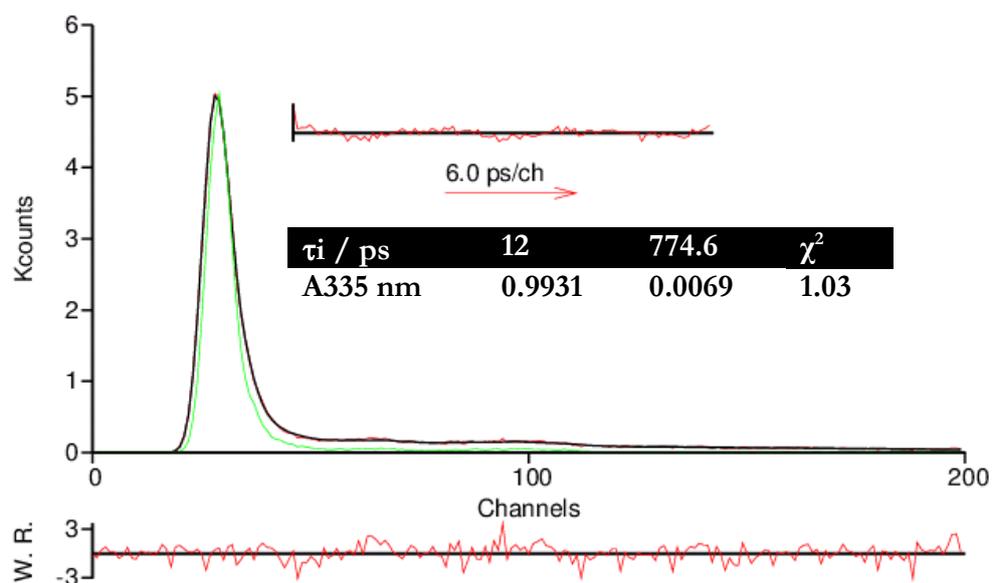
\*Valores obtidos com um erro associado de aproximadamente  $\pm 0.0001$ , com base na referência bibliográfica [Intramolecular Fluorescence Quenching of Tyrosine by the Peptide  $\alpha$ -Carbonyl Group Revisited].

### 2.3.2 Fluorescência resolvida no tempo

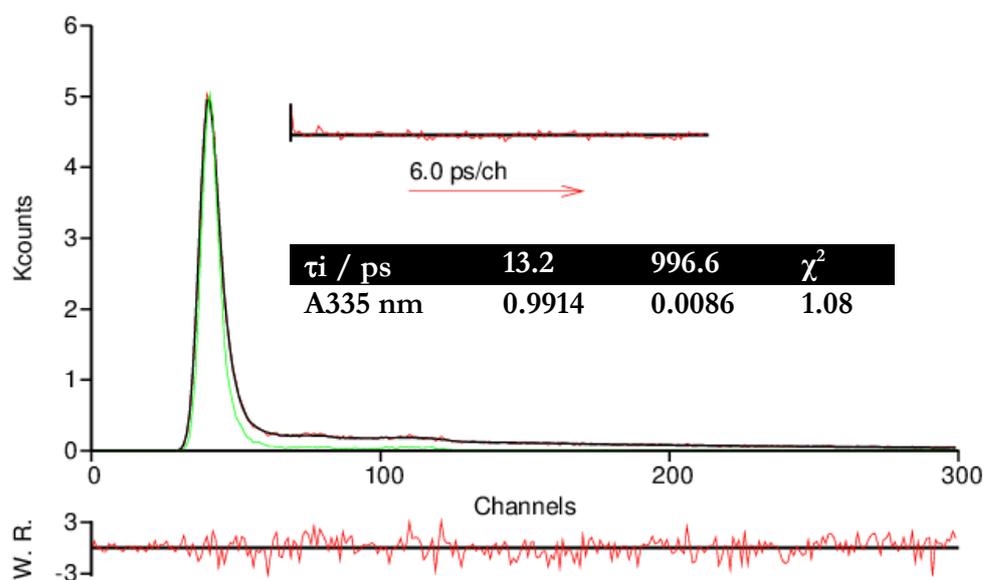
A caracterização fotofísica do hemicetal foi obtida através de um sistema de “*Single photon counting*”, fluorescência resolvida no tempo, obtendo-se os respectivos decaimentos de fluorescência e respectivos tempos de vida. A análise exponencial destes decaimentos foi efectuada através de um software adaptado obtendo-se os factores pré-exponenciais e os tempos de vida associados a cada espécie presente em solução, para o hemicetal das três antocianinas em estudo, com comprimento de onda de emissão nos 335 e 350 nm. Posteriormente, para verificarmos se as chalconas são formadas como resultado da abertura de anel, foram obtidos os decaimentos para comprimentos de onda de emissão a 420 nm.

**Decaimento do hemicetal** - Nas figuras 31 a 33 são apresentados os decaimentos de fluorescência do hemicetal da pelargonina, cianina e malvina, respectivamente, obtidos com excitação a 275e 278 nm e emissão a 335 e 350 nm. Em todos os casos os decaimentos são ajustáveis com somas de dois termos exponenciais dos quais o correspondente ao tempo mais curto

( $\tau_2 = 12-16$  ps) é largamente dominante, e é portanto atribuído ao tempo de decaimento do hemicetal. A ordem de grandeza deste tempo é forte indicação de que a reacção de abertura do anel C é o processo dominante do decaimento, ou seja, a constante de velocidade de abertura de anel  $k_{\text{open}} \cong 1/\tau_2$  (aproximadamente  $10^{11} \text{ s}^{-1}$ ). De  $k_f = \phi_f/\tau_f$  obtém-se  $k_f = 2.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ , valor típico de transições permitidas.

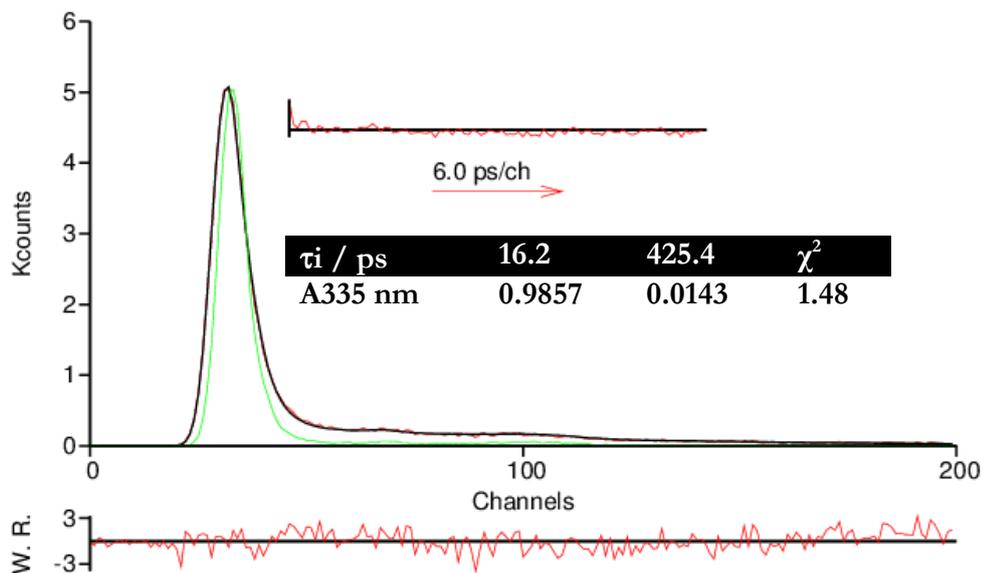


**Figura 31.** Análise individual do decaimento de fluorescência do hemicetal B da pelargonina com excitação a 278 nm e emissão de fluorescência a 335 nm, com uso de filtro de  $\lambda = 295$  nm.



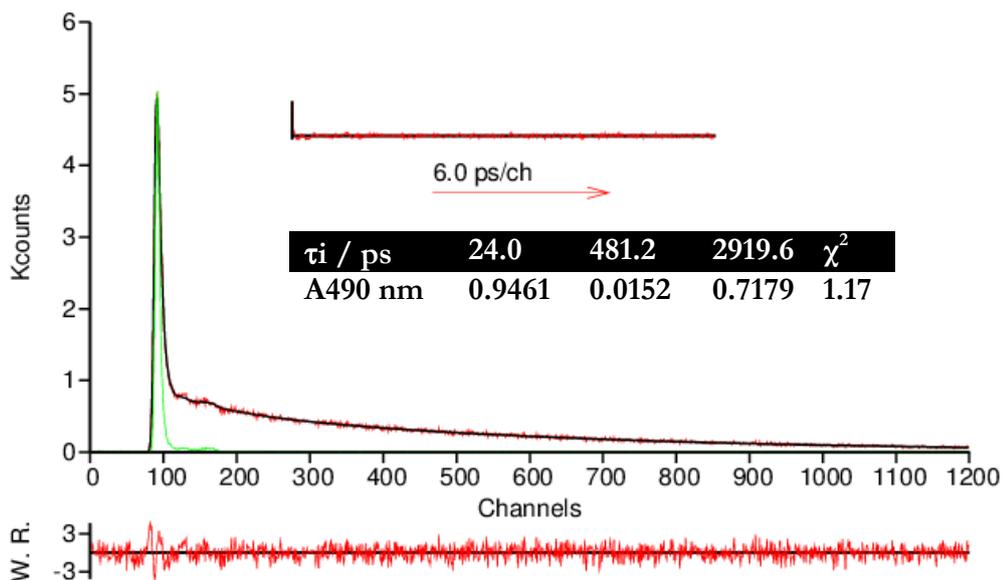
**Figura 32.** Análise individual do decaimento de fluorescência do hemicetal B da cianina com excitação a 278 nm e emissão de fluorescência a 335 nm, com uso de filtro de  $\lambda = 295$  nm.

O tempo mais longo (0.5 a 1 ns) pode reflectir emissão residual de chalcona (que também absorve a 278 nm), ou, mais provavelmente, a reversibilidade da reacção (também residual).



**Figura 33.** Análise individual do decaimento de fluorescência do hemiacetal B da malvina com excitação a 275 nm e emissão de fluorescência a 350 nm, com uso de filtro de  $\lambda= 295$  nm.

**Decaimento das chalconas** - Para verificar se a abertura de anel leva a formação de chalconas (ocorrência de um “rise-time”) foram medidos decaimentos ao comprimento de onda de emissão das chalconas (490 nm) com excitação no hemiacetal a 278 nm (Figura 34).

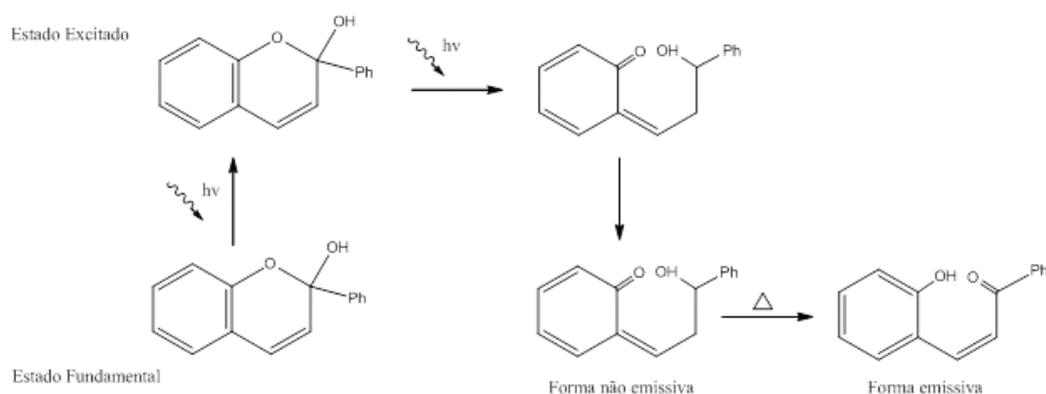


**Figura 34.** Análise individual do decaimento de fluorescência das chalconas da cianina com excitação a 278 nm e emissão de fluorescência a 490 nm, com uso de filtro de  $\lambda= 295$  nm.

Verificou-se que não há “rise-time”, o que pode resultar de uma das seguintes razões:

- 1- O “rise-time” ser mascarado pela emissão residual do hemicetal ao comprimento de onda de emissão da chalcona;
- 2- A chalcona *cis*, directamente excitada a 278 nm, desprotonar no estado excitado [96] e o resultante decaimento rápido mascarar o “rise-time”.
- 3- A chalcona resultante da abertura do anel do hemicetal estar vibracionalmente excitada mas no estado electrónico fundamental e não emitir.
- 4- O produto fotoquímico da reacção do hemicetal ter a estrutura típica da forma aberta dos cromenos, com o carbonilo no anel A (Esquema 8), a qual não é emissiva no caso dos cromenos. Se esta forma intermediária for formada, rearranjando para dar posteriormente  $C_{cis}$  no estado fundamental, então também não haverá emissão de fluorescência de  $C_{cis}$  resultante da reacção do hemicetal.

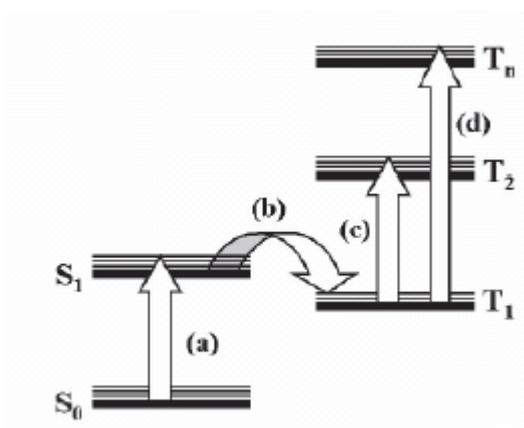
Os tempos de vida ( $\tau$ )<sub>i</sub> observados no decaimento da Figura 34 são atribuídos às emissões das chalcona *cis* e *trans* e das suas reacções de fotodesprotonação [96] após excitação directa das mesmas a 278 nm (ver Figuras 25-27).



**Esquema 8** – Formação da chalcona *cis*, forma emissiva, via estado excitado da forma não emissiva resultante da excitação do hemicetal.

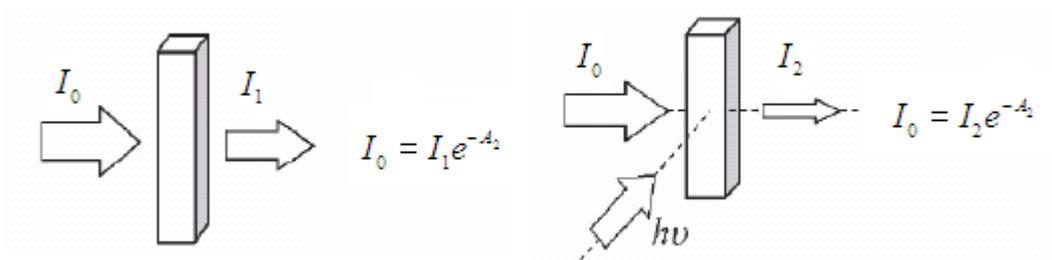
### 2.3.3 Fotólise de relâmpago

A fotólise de relâmpago surgiu na década de 50 por Ronald Norrish e George Porter, demonstrando ser uma técnica extremamente útil para o estudo de espectros de absorção de espécies transientes, de estados excitados e da dinâmica da sua transformação na gama temporal dos nanosegundos a milisegundos. O princípio básico de funcionamento é o bombardeamento da amostra com um pulso curto de luz de grande intensidade, *flash* ou relâmpago (mais recentemente designado *pump*), em geral utilizando um laser pulsado, a um comprimento de onda ao qual a amostra absorva. Como consequência deste pulso, um número mensurável de moléculas é promovido para um estado de maior energia, estado excitado. Os processos decorrentes da formação, relaxação ou reacção destas moléculas no estado excitado dão origem a mudanças no espectro de absorção que são medidas por uma segunda fonte de luz (contínua ou pulsada) que incide sobre a amostra a 90° do pulso de excitação (*probe*). O fundamento desta técnica consiste em monitorizar a dependência temporal da absorção a vários comprimentos de onda. Desta forma determinam-se espectros, tempos de vida, rendimentos quânticos, níveis de energia e outras características de produtos criados pela absorção de luz. O tempo de duração do pulso é normalmente de nanosegundos para criar uma perturbação mais rápida do que os tempos de vida das espécies que se desejam medir ( $S_1$  e  $T_1$ , radicais livres, foto-isómeros, etc). O tempo de vida relativamente longo do estado tripleto  $T_1$  faz com que esta técnica seja particularmente adequada para a detecção destes estados e dos espectros de absorção correspondentes às transições  $T_1 \rightarrow T_n$  (Figura 37) [97].



**Figura 37.** Este diagrama apresenta o caminho seguido para a absorção tripleto-triplete; a) absorção, b) cruzamento intersistemas, c) transição  $T_1 \rightarrow T_2$ , d) transição  $T_1 \rightarrow T_n$ .

Com o espectro de absorção do estado tripleto, pode ser estabelecida a cinética de decaimento  $T_1$ . A variação da absorção no comprimento de onda de análise pode ser determinada considerando a radiação incidente, absorvida ou transmitida, antes e após o pulso do laser (Figura 38).



**Figura 38.** Representação gráfica da determinação da variação da absorvância em fotólise de relâmpago.

Quando uma luz de intensidade  $I_0$  incide sobre uma amostra, parte da luz é absorvida ( $\Delta A_1$ ), e a outra parte,  $I_1$ , é transmitida pela amostra. Na presença do pulso e excitação será observada uma alteração na absorção  $A_2$  com a intensidade transmitida  $I_2$ . As intensidades de absorção estão relacionadas conforme a equação:

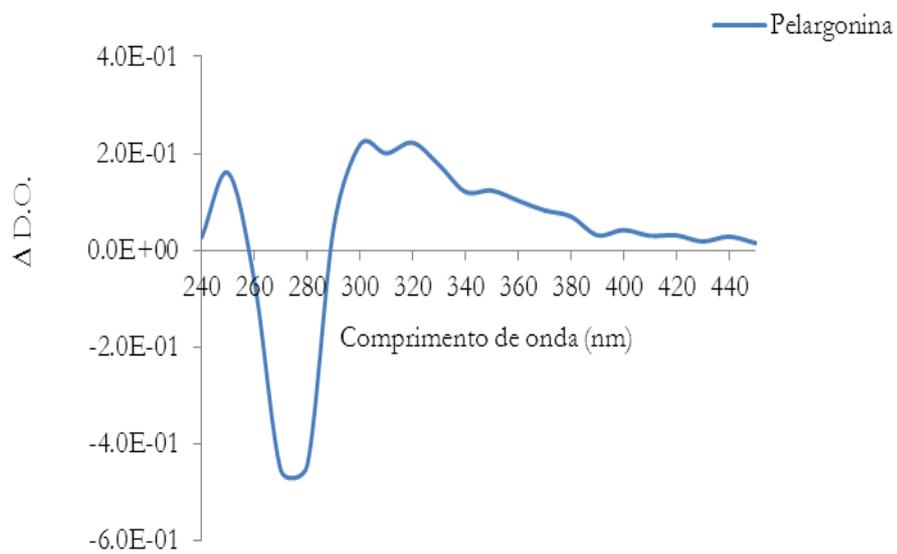
$$\frac{I_2}{I_1} = e^{-(A_2 - A_1)} = e^{-\Delta A}$$

o que permite medir a variação da absorvância em função do tempo.

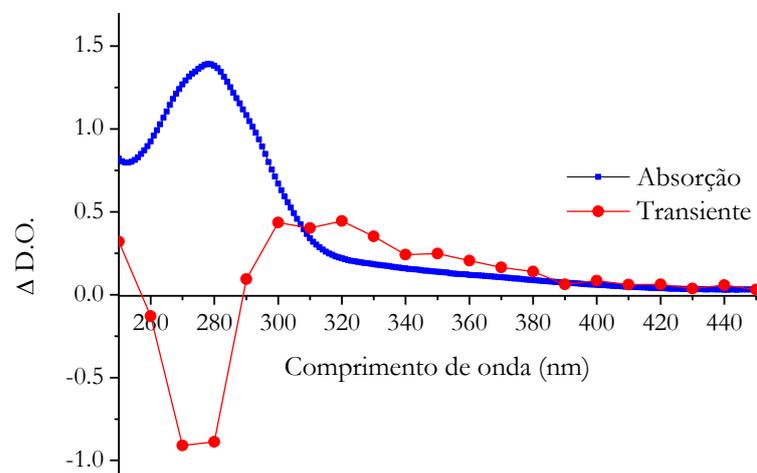
Para verificar se o fecho do anel também pode ser induzido pela luz, foram efectuadas medidas de absorção transiente (*ns-flash-fotólise*) da pelargonina (figura 39-41), cianina (figura 42-44) e malvina (figura 45-47), respectivamente, com excitação a 266 nm (absorção maioritariamente devida ao hemicetal) e a 355 nm (excitação maioritária nas chalconas, figuras 48-50)). Através desta técnica os fenómenos rápidos na gama temporal da ordem dos pico-segundos não são visíveis, contudo pode-se obter informação sobre a evolução das espécies formadas a tempos mais longos [98].

### ***Absorção transiente da Pelargonina com excitação do hemicetal***

No espectro de absorção transiente da pelargonina resultante de excitação a 266 nm (figura 39), podemos observar claramente o “bleaching” do hemicetal a ca. 280 nm, assim como a formação de novas espécies na gama de comprimentos de onda de 310-390 nm. A figura 40, relacionando o espectro de absorção electrónica em estado estacionário com o espectro de absorção transiente, evidencia estas observações.

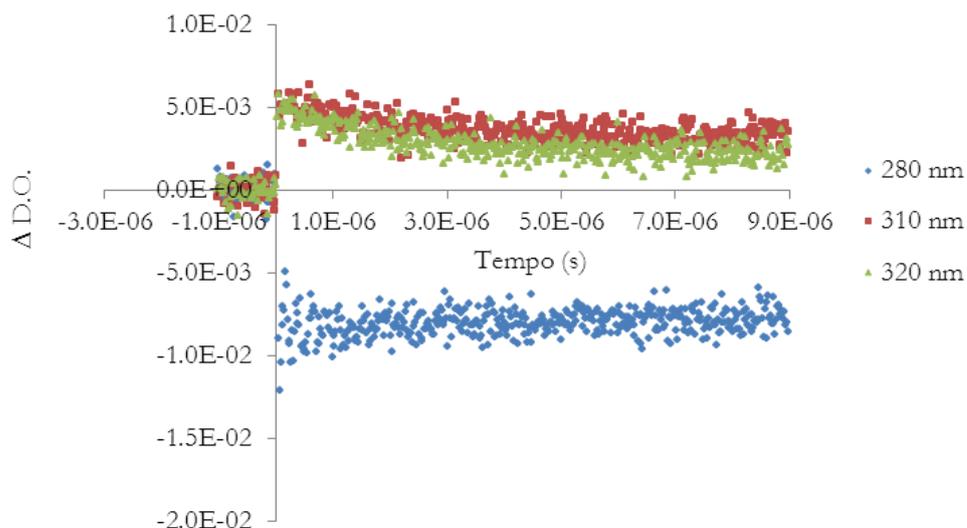


**Figura 39.** Espectro de absorção transiente para a pelargonina com  $\lambda_{exc} = 266$  nm (zona do hemicetal).



**Figura 40.** Espectros de absorção estacionária e transiente da pelargonina com excitação a  $\lambda_{exc} = 266$  nm (zona de absorção do hemicetal).

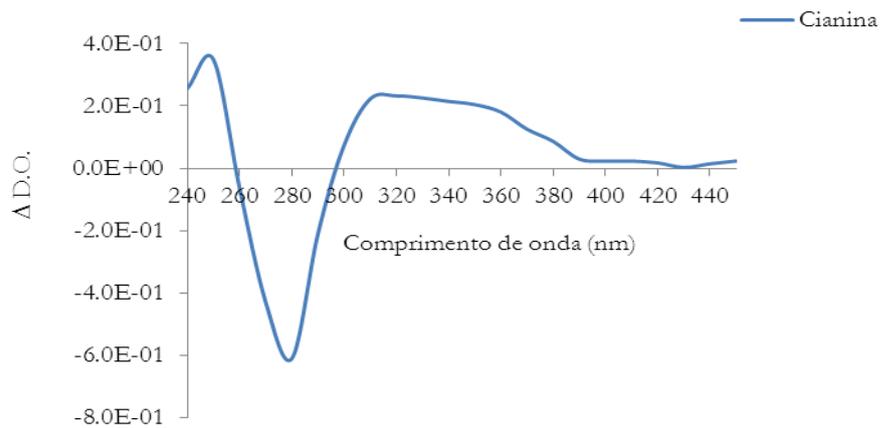
A variação da absorvância da pelargonina aos comprimentos de onda de 280, 310 e 320 nm após excitação a 266 nm (figura 41), mostra uma ligeira recuperação do “bleaching” do hemicetal a 280 nm e ligeiro decréscimo das absorvâncias a 310 e 320 nm durante os primeiros 4  $\mu$ s. Após esta variação inicial tanto o “bleaching” como as absorvâncias mantêm-se independentes do tempo. Os resultados indicam claramente a ocorrência de uma reacção fotoquímica, da qual resultam fotoprodutos no estado fundamental que absorvem na região das chalconas.



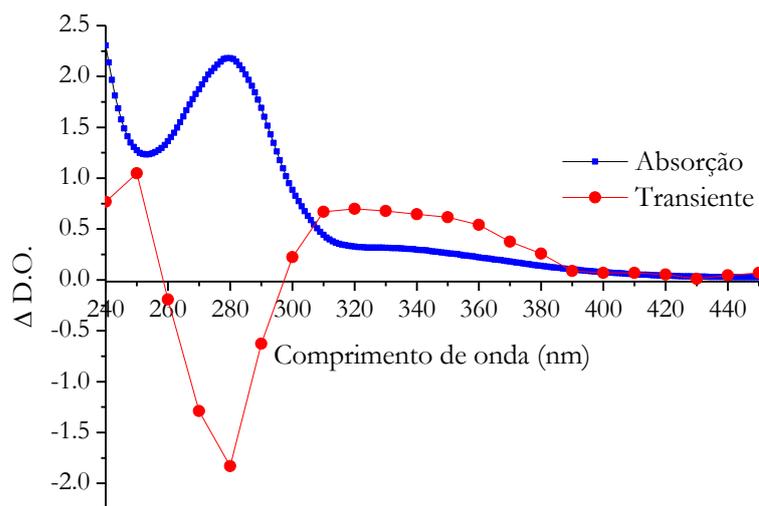
**Figura 41.** Variação da absorvância da pelargonina a 280, 310 e 320 nm, nos primeiros 10  $\mu$ s após excitação a 266 nm.

#### ***Absorção transiente da Cianina com excitação do hemicetal***

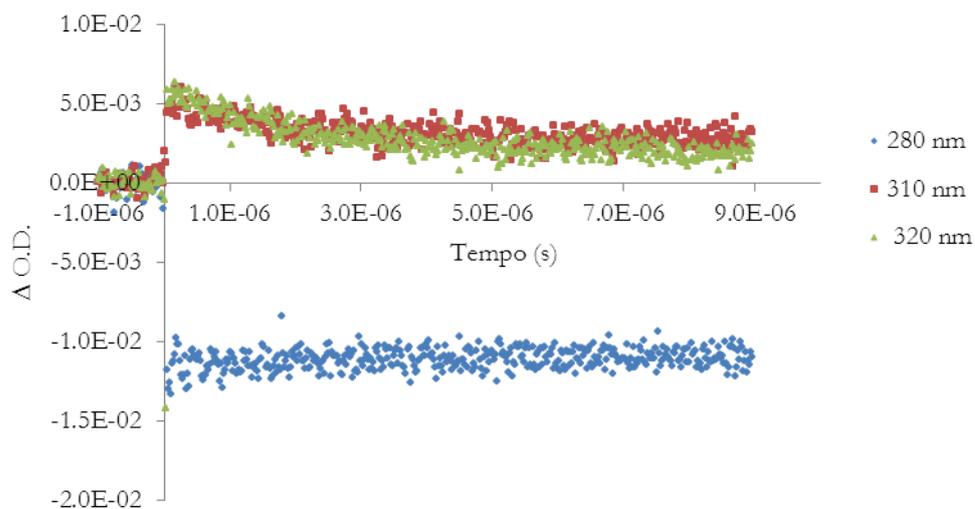
Com a cianina foram obtidos espectros transientes semelhantes aos da pelargonina (figuras 42 e 43). No entanto, a variação temporal das absorvâncias a 310 e 320 nm (figura 44) é mais pronunciada, especialmente a 320 nm.



**Figura 42.** Espectro de absorção transiente para a cianina com  $\lambda_{exc} = 266$  nm (zona do hemicetal).



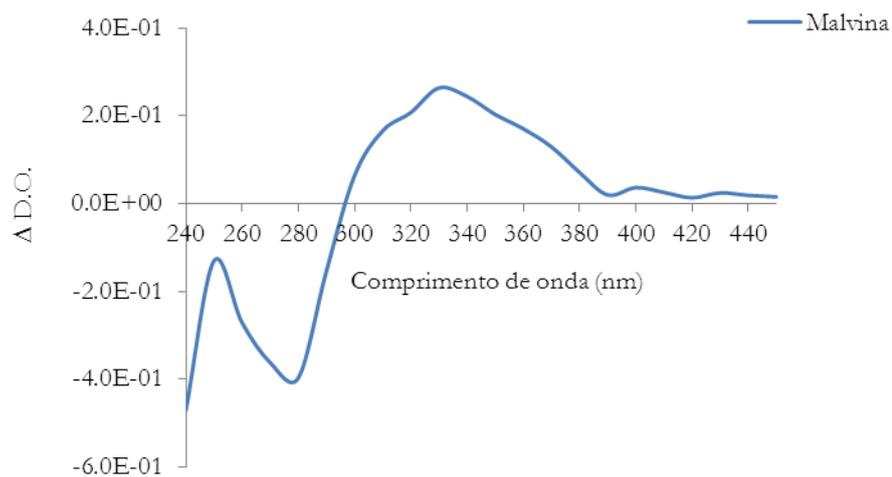
**Figura 43.** Espectros de absorção estacionária e transiente da cianina com excitação a  $\lambda_{exc} = 266$  nm (zona de absorção do hemicetal).



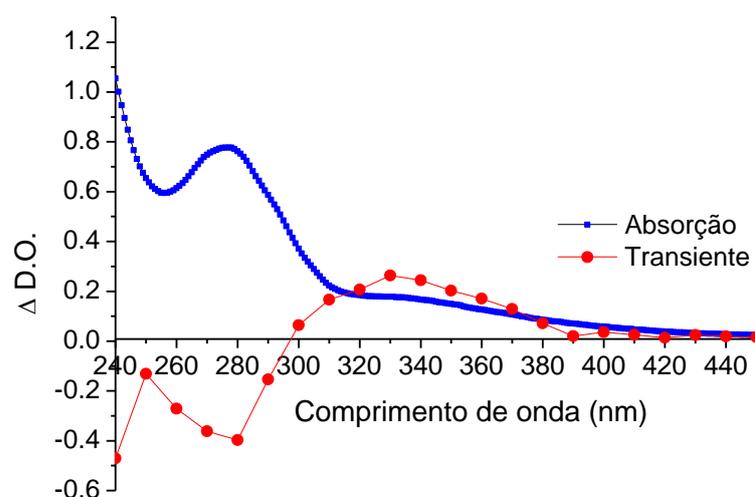
**Figura 44.** Variação da absorvância da cianina a 280, 310 e 320 nm, nos primeiros 10  $\mu$ s após excitação a 266 nm.

***Absorção transiente da Malvina com excitação do hemicetal***

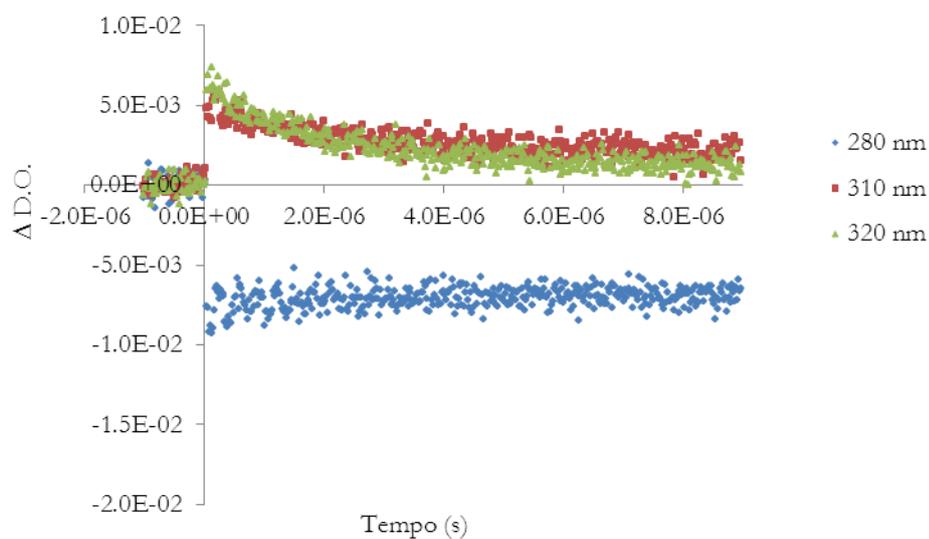
Nas figuras 45, 46 e 47, são apresentados os resultados obtidos para a malvina, os quais são qualitativamente idênticos aos da cianina.



**Figura 46.** Espectro de absorção transiente para a malvina com  $\lambda_{exc} = 266$  nm (zona do hemicetal).



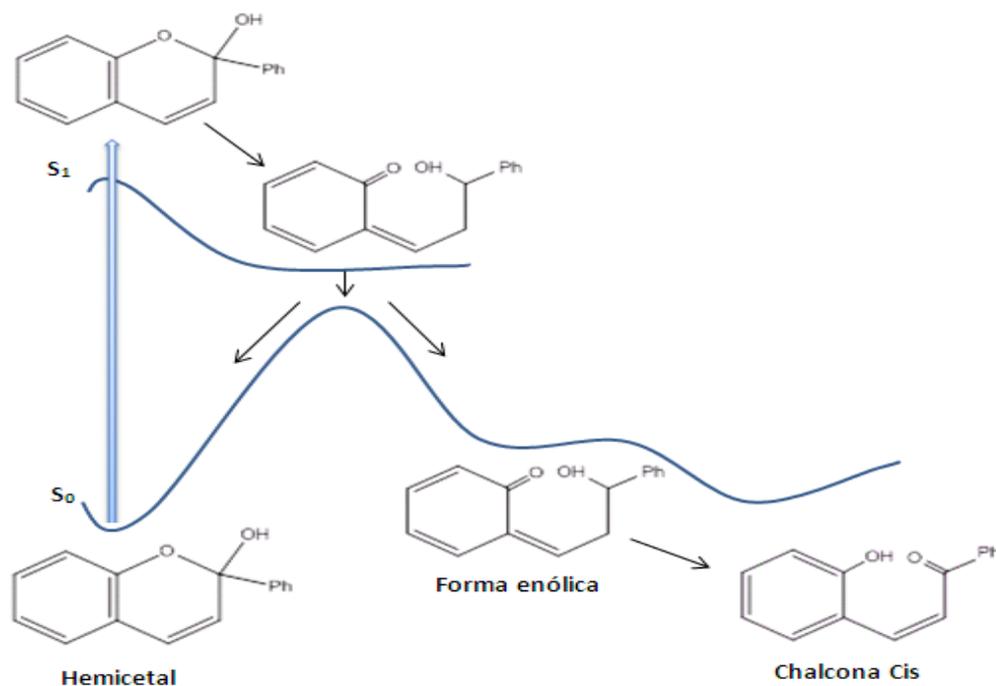
**Figura 47.** Espectros de absorção estacionária e transiente da malvina com excitação a  $\lambda_{exc} = 266$  nm (zona de absorção do hemicetal).



**Figura 45.** Variação da absorvância da malvina a 280, 310 e 320 nm, nos primeiros 10  $\mu$ s após excitação a 266 nm.

Em conclusão, os resultados mostram que o hemicetal abre o anel C, daí resultando uma forma aberta, com maior deslocalização  $\pi$ . A diferente variação das absorvâncias a 310 e 320 nm,

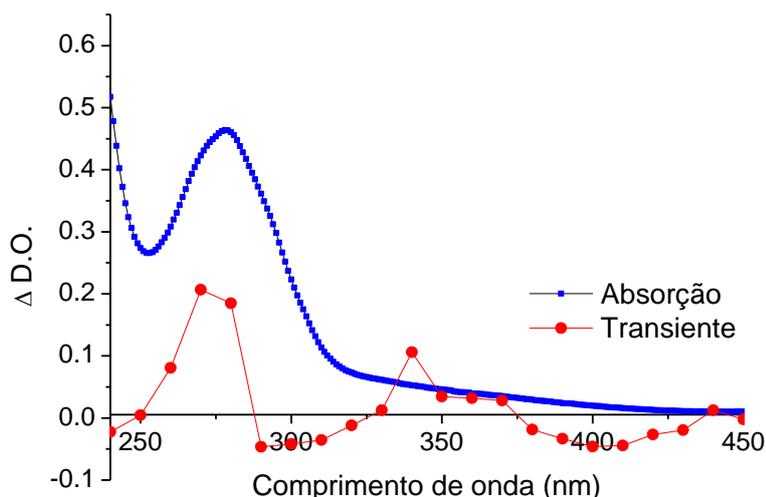
especialmente notória nos casos da cianina e malvina, sugere que o produto inicial no estado fundamental é a forma enólica (Esquema 9) que assim absorveria comprimentos de onda maiores do que a *cis*-chalcona [99<sup>a</sup>].



**Esquema 9** – Esquema ilustrativo da reação fotoquímica da abertura de anel originando a forma enólica a partir do estado  $S_1$  excitado do hemicetal.

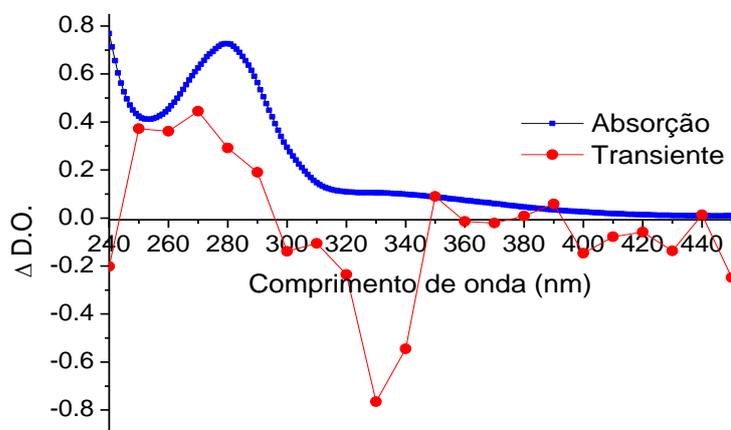
### ***Absorção transiente da Pelargonina, Cianina e Malvina com excitação das chalconas***

A possibilidade de conversão fotoquímica chalcona  $\rightarrow$  hemicetal foi investigada também por *flash*-fotólise excitando as chalconas a 355 nm. Nas figuras 48-50 são apresentados os espectros de absorção transiente das três antocianinas estudadas, obtidos com excitação a 355 nm. A qualidade dos espectros é inferior à dos obtidos com excitação nos 266 nm, devido à baixa absorvância destes isômeros ao comprimento de onda de excitação relativamente à do hemicetal, impedindo o aumento da concentração da solução. Esta limitação experimental reflecte-se na baixa qualidade dos espectros de absorção transiente, assim como na dificuldade da interpretação destes.

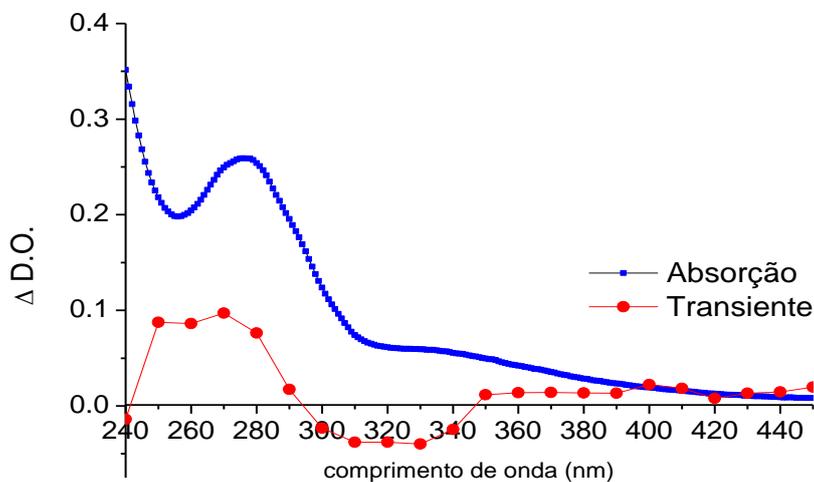


**Figura 48.** Espectro de absorção estacionária e transiente para a pelargonina com  $\lambda_{exc} = 355$  nm (zona das chalconas).

Para todas as antocianinas, foi possível identificar a formação de hemicetal a ca. 280 nm ( $\Delta D.O.$  positiva), mostrando que a reação de fecho do anel pode ser fotoinduzida. Nos casos da cianina (figura 49) e da malvina (figura 50) foi também possível identificar o desaparecimento da cis-chalcona a ca. 320 nm ( $\Delta D.O.$  negativa). No entanto, o caso da pelargonina não é totalmente claro, em particular o “bleaching” a 400 nm, comprimento de onda ao qual a absorvância do estado fundamental é praticamente nula (ver figura 29). Não foi possível esclarecer estes resultados em tempo útil.



**Figura 49.** Espectro de absorção estacionária e transiente para a cianina com  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm (zona das chalconas).



**Figura 50.** Espectro de absorção estacionária e transiente para a malvina com  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm (zona das chalconas).

A última observação pertinente destes espectros é a relativa independência de  $\Delta D.O.$  do comprimento de onda acima de 350 nm nos casos da cianina e malvina (figuras 49 e 50). A explicação residirá provavelmente nos processos de fotoisomerização das chalconas (*cis* e *trans*). De facto, como ambas as espécies absorvem ao comprimento de onda de 355 nm estão a ser excitadas simultaneamente, e poderá ocorrer por exemplo o bleaching da *trans*-chalcona devido ao flash de luz, assim como formação desta mesma espécie por isomerização da *cis*-chalcona, isto é, aparecendo como uma variação de densidade óptica igual a zero ou mesmo negativa. O mesmo se pode concluir para a malvina (figura 50). Fica assim em aberto para o futuro um estudo mais aprofundado de como a fotoisomerização das duas chalconas e a fototaumerização da *cis*-chalcona para hemiacetal competem entre si.

## Capítulo 3

### Conclusão

Com este trabalho experimental foi possível caracterizar a fotofísica e fotoquímica do hemicetal de três antocianinas naturais, nunca anteriormente estudadas. Deste estudo foi possível concluir que a forma hemicetal B destas três antocianinas reage fotoquimicamente abrindo o anel central em cerca de 12-16 ps para dar  $C_{cis}$ . A não observação de fluorescência de  $C_{cis}$  com excitação do hemicetal indica que  $C_{cis}$  é produzida no estado fundamental. Deste modo, praticamente toda a radiação UV absorvida por B é despendida na reacção fotoquímica.

Os espectros de absorção transiente mostraram para as três antocianinas estudadas que efectivamente sob a acção da luz, a sua forma B irá formar transientes na zonas de absorção das chalconas quando excitado a 266 nm, assim como para um comprimento de onda de excitação de 355 nm, foi possível observar a formação de um transiente na zona do hemicetal ( $\lambda=280$  nm).

Conclui-se portanto que o hemicetal também protege a planta eficientemente de um eventual excesso de radiação UV. A importância desta função é óbvia dado ser o hemicetal a forma dominante das antocianinas ao pH dos vacúolos celulares.

Para completar o objectivo deste estudo (racionalização do eventual papel do hemicetal na protecção das plantas contra excesso de radiação UV), será necessário completá-lo com o estudo das reacções subsequentes da  $C_{cis}$  e assegurar que estão ausentes espécies reactivas com biomoléculas (radicais e/ou tripletos).



# Capítulo 4

## Experimental

### 4.1 Materiais e métodos

**Material e reagentes** – As antocianinas naturais, de elevado grau de pureza, pelargonidina-3,5-di-O-glicosídeo, cianidina-3,5-di-O-glicosídeo e malvidina-3,5-di-O-glicosídeo, utilizadas neste trabalho foram compradas na Extrasynthèse. As soluções foram preparadas em água milipore e em balões de diluição volumétricos.

A N-acetil tirosinamida (NAYA), foi comprada na Sigma.

**Medidor de pH** – o pH das soluções foi controlado através de um medidor de pH CRISON pH METER BASIC 20.

**Absorção e fluorescência UV-Visível** - Os espectros de absorção e fluorescência foram medidos num espectrofotómetro Beckman DU-70 e num fluorímetro SPEX Fluorolog 212I, respectivamente. Os espectros de fluorescência foram obtidos através de uma geometria de ângulo recto no modo S / R e corrigido para o sistema óptico, detector de comprimento de onda de emissão (espectros de emissão) e intensidade da lâmpada (espectros de excitação).

**Fluorescência resolvida no tempo** – Os decaimentos de fluorescência foram medidos usando a técnica de “picosecond time-correlated single-photon counting (TCSPC)”. A fonte de excitação utilizada para o pulso (82 MHz) de laser foi um sistema “Ti: Sapphire Tsunami laser (Spectra Physics) bombeado com um laser de estado sólido Millennia Xs (Spectra Physics). As medições foram realizadas por excitação das amostras com luz polarizada verticalmente, definindo o polarizador de emissão no ângulo mágico (54.7°). O sistema de detecção electrónica incluiu um fotomultiplicador de microcanais (Hamamatsu, R3809u MCP-50-PT) e uma placa de aquisição SPC-630 (Becker e Hickl, GmbH). Pulso e da amostra foram recolhidas até 10 kcounts tinha sido acumulado no máximo. O pulso de excitação experimental foi medido por meio de uma solução de dispersante de Ludox em água, cuja transmitância no comprimento de onda de excitação foi aferido com o da amostra. A resolução temporal do aparelho é de 2-3 ps [99].

**Fotólise de relâmpago** – Os espectros de absorção transiente foram obtidos a partir de um laser de fotólise de relâmpago LK60 usando a 3ª harmónica para excitação a 355 nm e a 4ª harmónica para excitação a 266 nm [100].



# Bibliografía

- [1] Silvan A.M., Abad M.J. Bermejo P. Sollhuber M. e Villar A., *Journal of Natural Products*, **59**, , 1183-1185. 1996.
- [2] Ito C. M., Itoigawa S., Katsuno M., Omura H., Tokuda H., Nishino H. Furukawa, *Journal of Natural Products*, **63**, 1218-1224. 2000.
- [3] Shibata K., Shibata Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **41**, 208-220, 1919.
- [4] Whitting D., *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 583-606, 2001.
- [5] Curtright R. D., Rynearson J. A., Markwell J., *J. Chem. Educ.*, **71**, 682-684, 1994.
- [6] Gottlieb O., *Micromolecular Evolution, Systematics And Ecology*, Springer, Berlin, 142-148, 1980.
- [7] Harborne J.C.; Williams C.A. *Phytochemistry*, **55**, 481-504, 2000.
- [8] Harborne J.C. and Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **55**, 481, 2000.
- [9] Gould K.S. and Lee D.W., Anthocyanins in leaves, *Advances in Botanical Research*, Amsterdam, **37**, 2002.
- [10] Simmonds M.S.J., Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge, *Phytochemistry*, **21**, 64 , 2003.
- [11] Close D.C., and Beadle C.L., The ecophysiology of foliar anthocyanin, *Bot. Rev.*, **69**, 149, 2003.
- [12] Figueiredo P.R., *Tese de Doutoramento*, Universidade Nova de Lisboa, 1-3, 1994.
- [13] Moon Y.J., Wang X., Morris M.E. *Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol in Vitro*, **20**, 187-210, 2006.
- [14] Beecher G.R., Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake, *J. Nutritional.*, **10**, 133, 2003.
- [15] Hodek P., Trefil P., Štiborová M., Flavonoids - potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chem Biol Interact*, **1**, 139, 2002.
- [16] Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **5**, pp. 79, 2004.
- [17] Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J.M., Tuñón M.J., Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidants, *Nutr. Hosp.*, **6**, pp. 17, 2002.
- [17<sup>a</sup>] Chaves M.H., Ayres M.C.C., *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, 1509-1512, 2009.
- [18] Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E., Boelens P.G., Van Norren K., Van Leeuwen P.A., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J. C. Nutricional*, **25**, 418, 2001.
- [19] Kuskoski E.M., Asuero A.G., García-Parilla M.C., Troncoso A.M., Fett R., Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciencia Tecnologia Alimentar* **24**, 691, 2004.

- [20] Prior R.L., Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. C. Nutricional*, **78**, 2003.
- [21] Øyvind M. A., Kenneth R. M., Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications, pp. 397-406, 2006.
- [22] Harborne J.B., Grayer R.J., The anthocyanins. In: *The flavonoids: advances in research since 1980*, 1-20, 1988.
- [23] Bridle P., Timberlake C. F., *Food Chem.*, **58**, 103-109, 1997.
- [24] Brouillard R., Figueiredo P., Elhabiri M., Dangles O., *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Eds. Tomás-Barberán F. A., Robins R. J., Clarendon Press, Oxford; Chapter 3, pp. 29-49, 1997.
- [25] Costa C. T., Horton D., Margolis S. A., *J. Chromatogr. A*, **881**, 403-410, 2000.
- [26] Maçanita A. L., Pina F. Lima J., *C. Boletim de Biotecnologia*, **60**, 4-13. 1997.
- [26<sup>a</sup>] Freitas A.A., Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Brasil, 2005.
- [27] Figueiredo P., Lima J. C., Santos H., Wigand M. C., Brouillard R., Maçanita A. L., Pina F., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1249-1254. 1994.
- [28] El Hajj H., Dangles O., Figueiredo P., Brouillard R., *Helv. Chim. Acta*, **80**, 398-413. 1997.
- [29] Pina, F.; Melo, M. J.; Ballardini, R.; Flamigni, L.; Maestri, M. *New J. Chem.*, **21**, 969-976. 1997b.
- [30] Pina F. J., *Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 2109-2116. 1998<sup>a</sup>.
- [31] Pina F. J., *Photochem. Photobiol. A*, **117**, 51-59. 1998b.
- [32] Pina F., Roque A., *J. Photochem. Photobiol. A*, **114**, 59-64. 1998.
- [33] Melo M. J., Moncada M. C., Pina F., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 1987-1991. 2000.
- [34] Amic D.; Baranac J., Vukadinovic V. J., *Agric. Food Chem.*, **38**, 936-940. 1990.
- [35] McClelland R. A., Gedge S. J. *Am. Chem. Soc.*, **102**, 5838-5848. 1980.
- [36] Lima J. C., Abreu I., Brouillard R., Macanita. A. L., *Chem. Phys. Letters*, **298**, 189-195, 1998.
- [37] Figueiredo P., Lima J. C., Santos H.; Wigand M. C., Brouillard R.; Maçanita A. L., Pina F., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1249-1254. 1994.
- [38] Pina F.; Benedito L.; Melo M. J.; Parola A. J.; Bernardo A. J. *Chem. Soc. Faraday Trans.*, **92**, 1693-1699. 1996.
- [39] Pina F., Benedito L., Melo M. J.; Parola A. J., Lima J. C., Maçanita A. L., *Anal. Quím. Int. Ed.*, **93**, 111-118. 1997<sup>a</sup>.
- [40] Pina F., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 2109-2116. 1998<sup>a</sup>.
- [41] Matsushima R., Mizuno H., Itoh H. *J. Photochem. Photobiol. A*, **89**, 251-256, 1995.
- [42] Matsushima R., Suzuki N., Murakami T., Morioka M., *J. Photochem. Photobiol. A*, **109**, 91-94. 1997.
- [43] Matsushima R., Murakami T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **73**, 2215-2219, 1999.

- [44] Horiuchi H., Yokawa A., Okutsu T., Hiratsuka H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 2429-2435, 2000.
- [45] Maestri M., Pina F., Roque A., Passaniti P., *J. Photochem. Photobiol. A*, **137**, 21-28, 2000.
- [46] Figueiredo P., *Tese de Doutoramento*, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, 1994.
- [47] Lima J. C. , *Tese de Douturamento*, Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa. 1996.
- [48] Moreira Jr., P. F., Giestas L., Yihwa C., Giongo C. V., Quina F. H., Maçanita A. L., Lima J. C., *J. Phys. Chem. A*, **107**, 4203-4210, 2003.
- [49] Lima J. C., Giongo C. V., Lopes A.; Melo E., Quina F. H., Maçanita A. L., *J. Phys. Chem. A*, **106**, 5851-5859, 2002.
- [50] Giestas L., Yihwa C., Lima J. C., Giongo C. V., Lopes A., Maçanita A. L., Quina F. H.; *J. Phys. Chem. A*, **107**, 3263-3269, 2003.
- [51] Giongo C. V., Yihwa C., Moreira Jr., P. F., Lima J. C., Freitas A. A., Alves M., Quina F. H.; Maçanita A. L.; *Langmuir*, **18**, 10109-10115, 2002.
- [52] Silva P. F., Lima J. C., Quina F. H.; Maçanita A. L., *J. Phys. Chem. A*, **108**, 10133-10140, 2004.
- [53] Brouillard R., Dubois J. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 1359-1364, 1977.
- [54] Pina F., Benedito L., Melo M. J., Parola A. J., Bernardo A. , *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **92**, 1693-1699, 1996.
- [55] Chen L., Hrazdina G., *Phytochemistry*, **20**, 297-303, 1981
- [56] Brouillard R., Mazza G., Saad Z., Gary A. M. A., Cheminat A. , *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2604-2610, 1989.
- [57] Dangles O., Brouillard R., *Can. J. Chem.*, **70**, 2174-2189, 1992.
- [58] Baranac J., Petranovic N. A., Markovic J. M. D., *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1694-1697, 1997.
- [59] Silva P. F., Lima J. C., Quina F. H., Maçanita A. L., *J. Phys. Chem. A*, **108**, 10133-10140, 2004.
- [60] Silva P. F., Lima J. C., Freitas A. A., Shimizu K., Maçanita A. L., Quina F. H., *J. Phys. Chem. A*, **109**, 7329-7338, 2005.
- [61] Goto T., Kondo T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 17-33, 1991.
- [62] Brouillard R., Chahime J. M. H. , *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5375-5378, 1980.
- [63] Rangel VLBI, Correa MA, Fotoprotecao. *Cosmet Toil (edicao em portugues)* **14**: 88-95, 2002.
- [64] Markhan KR, Ryan KG, Bloor SJ, Mitchell KA An increase in the luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry* **48**: 791-794, 1998.
- [65] Ladygin V.G., Biosynthesis of Carotenoids in the Chloroplasts of Algae and Higher Plants, *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. **47**, 796–814, 2000.
- [66] Bukhov N.G., Dynamic Light Regulation of Photosynthesis (A Review), *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. **51**, pp. 742–753, 2004.

- [67] Munné-Bosch S. and Alegre L. Plant Aging Increases Oxidative Stress in Chloroplasts, *Planta*, vol. **214**, 608–615, 2002.
- [68] Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., and Jacobs G., Anthocyanins in Vegetative Tissues: A Proposed Unified Function in Photoprotection, *New Phytol.*, vol. **155**, 349–361, 2002.
- [69] Hoch W.A., Singaas E.L. and McCown B.H., Resorption Protection. Anthocyanins Facilitate Nutrient Recovery in Autumn by Shielding Leaves from Potentially Damaging Light Levels, *Plant Physiol.*, vol. **133**, 1296–1305, 2003.
- [70] Merzlyak M.N., Aktivirovannyi kislorod i okislitel'nye protsessy v membranakh rastitel'noi kletki (Activated Oxygen and Oxydative Processes in Plant Cell Membranes), *Itogi Nauki Tekhn., Ser. Fiziol. Rast.*, vol. **6**, 1989.
- [71] Foyer C.H. and Noctor G., Oxygen Processing in Photosynthesis: Regulation and Signalling, *New Phytol.*, vol. **146**, 359–388, 2000.
- [72] Jansen M.A.K., Gaba V. and Greenberg B.M., Higher Plants and UV-B Radiation: Balancing Damage, Repair and Acclimation, *Trends Plant Sci.*, , vol. **3**, 131–135, 1998.
- [73] Bornman J.F., Reuber S., Cen Y.-P. and Weissenbock G., Ultraviolet Radiation as a Stress Factor and the Role of Protective Pigments, *Plants and UV-B: Responses to Environmental Change*, Lumsden, J., Ed., Cambridge: Cambridge Univ. Press, 157– 168, 1997.
- [74] Niyogi K. Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. **50**, 333–359, 1999.
- [75] Rakitin V.Yu., Prudnikova O.N., Karyagin V.V., Rakitina T.Ya., Vlasov P.V., Borisova T.A., Novikova G.V. and Moshkov I.E., Ethylene Evolution and ABA and Polyamine Content in *Arabidopsis thaliana* during UV-B Stress, *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. **55**, 355–361, 2008.
- [76] Logan B.A., Korniyev D., Hardison J. and Holaday A.S., The Role of Antioxidant Enzymes in Photoprotection, *Photosynth. Res.*, vol. **88**, 119– 132, 2006.
- [77] Solovchenko A. and Merzlyak M., Optical Properties and Contribution of Cuticle to UV Protection in Plants: Experiments with Apple Fruit, *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. **2**, 861–866, 2003.
- [78] Shick J.M. and Dunlap W.C., Mycosporine-Like Amino Acids and Related Gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV-Protective Functions in Aquatic Organisms, *Annu. Rev. Physiol.*, vol. **64**, 223– 262, 2002.
- [79] Pietrini F., Iannelli M.A. and Massacci A., Anthocyanin Accumulation in the Illuminated Surface of Maize Leaves Enhances Protection from Photo-Inhibitory Risks at Low Temperature, without Further Limitation to Photosynthesis, *Plant, Cell Environ.*, vol. **25**, 1251–1259, 2002
- [80] Merzlyak et al. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves. *J. Exp. Bot.* **59**, 3903-3911, by permission of Oxford University Press, 2008.

- [81] Han Q., Shinohara K., Kakubari Y. and Mukai Y., Photoprotective Role of Rhodoxanthin during Cold Acclimation in *Cryptomeria japonica*, *Plant, Cell Environ.*, vol. **26**, 715–723, 2003.
- [82] Chalker-Scott, L., Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses, *Photochem. Photobiol.*, vol. **70**, 1–9, 1999.
- [83] Day T.A., Howells B.W. and Rice W.J., Ultraviolet Absorption and Epidermal-Transmittance Spectra in Foliage, *Physiol. Plant.*, vol. **92**, 207–218. 1994
- [84] Silva P. et al *J. Phys. Chem. A*, **108**, 10133 – 10140, 2004.
- [85] *A.E. Solovchenko, M.N. Merzhyak* published in *Fiziologiya Rastenii*, Vol. 55, No. **6**, pp. 803–822. , 2008.
- [86] Pina F., Melo M. J., Laia C., Parola A. J., Lima J. C., Critical Review, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 869–908. 2012.
- [87] Jurd L., *J. Org. Chem.*, **28**, 987–991. 1963.
- [88] Krieger J., Tóth K., Langowski J., Absorption and Fluorescence Spectroscopy, Fluorescence Correlation Spectroscopy, Germany.
- [89] Leitão E., Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2008.
- [90] Quina F.H., et al, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 81, No. 9, 1687–1694, 2009.
- [91] Karplus, M. e Porter, R. N. "Atoms and Molecules - An Introduction for Students of Physical Chemistry", The Benjamin, London, 1970.
- [92] Valeur B., "*Molecular Fluorescence: Principles and Applications*" Wiley- VCH Verlag GmbH, , ISBNs: 3-527-29919-X (Hardcover); 3-527-60024-8 (Electronic), 2001.
- [93] Becker R. S., Chakravorti S., Gartner C. A., *J.Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89** (7), 1007-1009, 1993
- [94] Nicholson R. L., Hammerschmidt R., *Annu. Rev. of Phytopathol.*, **30**, 369-389, 1992.
- [95] Noronha M., et al, *J. Phys. Chem. A*, PAGE EST: 11.8, 2004.
- [96] Lima J.C., Danesh P., Figueiredo P., Pina F.S., Maçanita A., *Photochemistry and Photobiology*, vol. **59**, 4, 412-418, 1994.
- [97] Porter G., Norrish R.G.W., *Nature* **164**, 658, 1949.
- [98] Walter J. M., 4th edition *Physical Chemistry*, 1970.
- [99] Di Paolo, R. E., Burrows, H. D., Morgado, J .and Maçanita A. L., *Chemphyschem.*, , 10(2), 448-54, 2009.
- [99<sup>a</sup>] Horiuchi H, Yokawa A., Okutsu T., Hiratsuka H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 2429-2435, 1999.
- [100] Pinheiro A.V., Parola A.J., Batista B.V. and Lima J.C., *J. Phys. Chem. A*, 114, 12795–12803, 2010.