



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**DISSERTAÇÃO FINAL**

**THAYNÁ BORGES DA SILVA**

**ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA SOLUBILIZAÇÃO DO 5,7-DIMETOXICUMARINA EM SOLVENTES HIDROFÓBICOS, HIDROFÍLICOS E MICELARES USANDO A ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO A 77 K E CÁLCULOS TD-DFT**

**Prof. Dr. Alberto dos Santos Marques**  
**Orientador**

**MANAUS – AM**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**DISSERTAÇÃO FINAL**

**THAYNÁ BORGES DA SILVA**

**ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA SOLUBILIZAÇÃO DO 5,7-DIMETOXICUMARINA EM SOLVENTES HIDROFÓBICOS, HIDROFÍLICOS E MICELARES USANDO A ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO A 77 K E CÁLCULOS TD-DFT**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química, na linha de pesquisa Química de Materiais e Interfaces.

**Prof. Dr. Alberto dos Santos Marques**

**Orientador**

**MANAUS – AM**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586e Silva, Thayná Borges  
Estudo espectroscópico da solubilização do 5,7-dimetoxicumarina em solventes hidrofóbicos, hidrofílicos e micelares usando a espectroscopia de emissão a 77 K e cálculos TD-DFT / Thayná Borges Silva . 2020  
89 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Alberto dos Santos Marques  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. 5,7-dimetoxicumarina. 2. propriedades fotofísicas. 3. espectroscopia de emissão . 4. td-dft. 5. micelas. I. Marques, Alberto dos Santos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

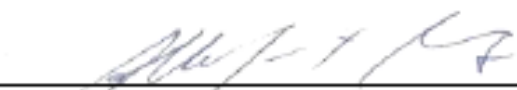
## FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo espectroscópico da solubilização do 5,7-dimetoxicumarina em solventes hidrofóbicos, hidrofílicos e micelares usando a espectroscopia de emissão a 77 K e cálculos DT-DFT

**THAYNÁ BORGES DA SILVA**


Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre(a) em Química.

Aprovada em 30 de outubro de 2020.




---

ALBERTO DOS SANTOS MARQUES (DQ/UFAM)  
Presidente/Orientador



---

ERCULES EPAMINONDAS DE SOUSA TEOTÔNIO (UFPB)  
Membro Externo



---

JOEL APARECIDO PASSO (DQ/UFAM)  
Membro Interno

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 30 de outubro de 2020.

Dedico este trabalho a minha mãe Vanusa Jardim Borges  
Meu maior e melhor exemplo de boa pessoa.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me sustentar e me manter forte, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador professor Dr. Alberto Marques, que depositou em mim credibilidade para conduzir essa pesquisa, e por toda dedicação desde a minha primeira iniciação científica no ano de 2014.

Ao professor Dr. Paulo Couceiro que disponibilizou espaço físico no laboratório, equipamentos e ensinamentos em disciplinas ministradas ou em conversas.

A amiga do grupo de pesquisa e agora Doutora Gisele Franco, que desde a iniciação científica me cedeu parte do seu tempo para me dar conselhos e fazer treinamentos sempre com muita dedicação Devo a Dra. Gisele e ao professor Alberto todo o aprendizado ao operar o espectrofotômetro de emissão e trabalhar com os softwares computacionais.

A todos os colegas que passaram pelo grupo de pesquisa LTMB, Larissa, Helene, Ted, Jonas, Jéssica, Luíza e Isabele.

A todos meus professores que marcaram a minha vida acadêmica tanto na graduação quanto na pós-graduação, gostaria de destacar: Katiuscia de Souza, Elzalina Soares, Rafael Salgado, Marlon de Souza, Neila Braga, Marcos Batista.

Aos colegas de laboratório da Pós-graduação em Físico-Química pelo convívio harmonioso e toda contribuição do dia a dia.

Aos meus amigos, especialmente Jéssica Ribeiro, Ewerton, Priscila, Larissa, Carla, Arlan, Emilly, Brenner, Fagnaldo e aos outros que por muitas vezes me ajudaram com apoio nas disciplinas, na pesquisa ou nos momentos que mais precisei.

A minha mãe, que além de ser a minha pessoa preferida no mundo é meu maior exemplo de filha, mulher, professora e boa pessoa.

Aos meus irmãos Jéssica e Yan que eu tanto amo e sempre foram meu grande apoio da vida.

Ao meu pai, meus familiares e amigos que me apoiam e entendem a minha ausência.

Ao meu namorado João Paulo que muitas vezes deixou seus afazeres para me ajudar a carregar litros de nitrogênio líquido, me compreendendo e apoiando em todos os momentos.

A Central Analítica da UFAM, em especial ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – NMRLAB, e ao técnico Kidney Gomes e professor Marcos Batista pela concessão de nitrogênio líquido.

Aos financiadores CAPES e FAPEAM pela concessão de bolsa e recursos para congressos, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas, ao Departamento de Química e os servidores da UFAM, que desempenham seu trabalho sempre com muito êxito mostrando que a Universidade Pública desenvolve trabalho sério e de qualidade.

## RESUMO

O 5,7-dimetoxicumarina (DMC) é um composto derivado da família das cumarinas, o qual está presente em plantas e no alimento como o limão da espécie *citrus* e o mamão da espécie *carica papaya*. As cumarinas destacam-se pelas suas propriedades biológicas que inclui ação antimutagênica contra as aminas heterocíclicas aromáticas (AHA), compostos mutagênicos produzidos durante o cozimento de proteína animal, como: o 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f]quinolina (IQ). Com o intuito de compreender a ação farmacológica e o comportamento químico do DMC em biomembranas, foi realizado o estudo espectroscópico da solubilização do DMC em solventes hidrofóbicos, hidrofílicos e micelares a 77K usando as espectroscopias de emissão a 77K, absorção UV/Visível e cálculos teóricos no nível TD-DFT e semiempíricos para a determinação de suas espécies nos seguintes solventes: metilciclohexano (MCH), etanol e 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) e solução tampão com pH sob condições fisiológicas e força iônica controlada. As espécies encontradas foram: (i) em MCH, agregado molecular via ligação de hidrogênio intramolecular (AM-H) e o monômero (M); (ii) em etanol: e o monômero do complexo ligado por ligação de hidrogênio entre o DMC e o etanol (M-H); (iii) em TFE: o monômero do complexo de ligação de hidrogênio forte (M-Hforte) entre o DMC e o TFE; (iv) solução tampão: agregado molecular hidrofóbico forte. Cada uma espécie mostrou propriedades fotofísicas distintas entre si e podem ser usadas como sondas fluorescentes diretas para investigar qual é a espécie que está solubilizada no interior das micelas neutra, aniônica e catiônica, preparadas em condições fisiológica. Por exemplo: a espécie ativa no solvente MCH (meio hidrofóbico) é o monômero do DMC, ele emite fluorescência através do estado eletrônico excitado de menor energia singlete  $S_1$  formado via conversão interna e assinalado como  $(\pi, \pi^*)$ , o máximo da banda está em 388 nm. A fosforescência é emitida pelo estado eletrônico excitado de menor energia triplete  $T_1$   $(\pi, \pi^*)$ , formado através de acoplamento spin-orbital do tipo:  $S_1$   $(\pi, \pi^*) \leftrightarrow T_2$   $(n, \pi^*) \leftrightarrow T_1$   $(\pi, \pi^*)$ , ela apresenta um espectro com a banda 0-0 situada em 470nm, originário da dupla ligação  $C_3=C_4$  do anel da pirona. Para a micela neutra é a espécie ativa no interior da micela é o DMC-H que fica ancorado na região aquosa com a dupla ligação etilênica do anel da pirona, impedindo a progressão vibracional omitindo a fosforescência e formando ligação de hidrogênio com a água através da carbonila da pirona. O grupo di-metoxi-benzeno do DMC fica na região hidrofóbica. As espécies determinadas no interior das micelas foram usadas para simular a inibição da mutagênese do IQ e alguns de seus derivados mais carcinógenos, inicialmente usando cálculos semiempíricos PM3. Os resultados de cálculos de calor de formação ( $\Delta H_f$ ) indicaram que a energia do mutagênico IQ diminuiu 131% ao formar ligação de hidrogênio com o antimutagênico DMC, indicando que a inibição do mutagênico IQ pelo DMC pode ser via interação entre o grupo amina do IQ e a carbonila do DMC através de ligação de hidrogênio intermolecular. Esses resultados podem ajudar a entender o mecanismo de transporte através de membranas demonstrando que a espectroscopia de emissão a 77K é uma técnica muito sensível, capaz de fazer uma sondagem direta no interior da micela, usando sondas fluorescentes e contribuem para o entendimento do mecanismo de inibição da mutagênese do IQ e derivados pelas espécies do DMC.

**Palavras-Chave:** 5,7-dimetoxicumarina, propriedades fotofísicas, espectroscopia de emissão, TD-DFT e micelas.



## ABSTRACT

The 5,7-dimethoxycoumarin (DMC) is a compound derived from the coumarin family, which is present in plants and in food such as lemon of the citrus species and papaya of the carica papaya species. Coumarins stand out for their biological properties that include antimutagenic action against aromatic heterocyclic amines (AHA), mutagenic compounds produced during the cooking of animal protein, such as 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). In order to understand the pharmacological action and chemical behavior of DMC in bio membranes, a spectroscopic study of the solubilization of DMC in hydrophobic, hydrophilic and micellar solvents at 77K was performed using 77K emission spectroscopy, UV/Visible absorption and theoretical calculations at the TD-DFT level and semi empirics for the determination of their species in the following solvents: methylcyclohexane (MCH), ethanol and 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) and buffer solution with pH under physiological conditions and controlled ionic strength. The species found were: (i) in MCH, molecular aggregate via intramolecular hydrogen bonding (AM-H) and the monomer (M); (ii) in ethanol: and the monomer of the complex linked by hydrogen bonding between DMC and ethanol (M-H); (iii) in TFE: the monomer of the strong hydrogen bonding complex (strong M-H) between DMC and TFE; (iv) buffer solution: strong hydrophobic molecular aggregate (AHF). Each species showed distinct photophysical properties and can be used as direct fluorescent probes to investigate which species is solubilized inside the neutral, anionic and cationic micelles, prepared under physiological conditions. For instance, the active species in the MCH solvent (hydrophobic medium), is the DMC monomer, it emits fluorescence through the excited electronic state of lower singlet energy  $S_1$  formed via internal conversion and marked as  $(\pi, \pi^*)$ , the maximum of band is at 388 nm. Phosphorescence is emitted by the excited electronic state of the lowest triplet energy  $T_1$   $(\pi, \pi^*)$ , formed through spin-orbital coupling of the type:  $S_1$   $(\pi, \pi^*) \leftrightarrow T_2$   $(n, \pi^*) \leftrightarrow T_1$   $(\pi, \pi^*)$ , it presents a spectrum with the 0-0 band located at 470nm, originating from the double bond C3 = C4 of the ring of the pyrone. For the neutral micelle, the active species inside the micelle is DMC-H, which is anchored in the aqueous region with the double ethylene bond of the pyrone ring and forms a hydrogen bond with water through the pyrone carbonyl. The DMC's di-methoxy-benzene group is in the hydrophobic region. The species determined inside the micelles were used to simulate the inhibition of IQ mutagenesis and some of its more potent derivatives, initially using PM3 semi-empirical calculations. The results of formation heat calculations ( $\Delta H_f$ ) indicated that the energy of the mutagenic IQ decreased 131% when forming a hydrogen bond with the antimutagenic DMC, indicating that the inhibition of the mutagenic IQ by DMC may be via interaction between the amine group of the IQ and DMC carbonyl through intermolecular hydrogen bonding. These results can help to understand the transport mechanism through membranes and demonstrate that 77K emission spectroscopy is a very sensitive technique, capable of probing directly inside the micelle, using fluorescent probes and contributing to the understanding of the mechanism of inhibition of mutagenesis of IQ and derivatives by DMC species.

**Keywords:** 5,7-dimethoxycoumarin, photophysical properties, emission spectroscopy, TD-DFT and micelles.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

- AHA - Aminas heterocíclicas aromáticas
- AHCs – Aminas heterocíclicas cancerígenas
- AM-H - Agregado molecular via ligação de hidrogênio intramolecular
- AMH – Agregado molecular hidrofóbico
- CMC - Concentração Crítica Micelar
- DFT - Teoria do Funcional da Densidade
- DMC - 5,7-Dimetoxicumarina
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- HOMO - Highest Occupied Molecular Orbital (Orbital molecular ocupado mais alto)
- HTAB - Brometo de Hexadeciltrimetilamônia
- IQ - 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina
- LESS - Lin Electronic Spectroscopy System (Sistema Espectroscopico Eletrônico Lin)
- LTMB - Laboratório de Tecnologia de Moléculas Bioativas
- LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Orbital molecular não ocupado mais baixo)
- MAO - Monoaminaoxidase
- MCH – Metilciclohexano
- M – Monômero
- M-H - Monômero do complexo formado por ligação de hidrogênio entre o DMC e etanol
- M-Hforte - Monômero do complexo de ligação de hidrogênio forte entre o DMC e TFE
- RMN - Ressonância Magnética Nuclear
- SDL - Sulfato dodecil de Lítio
- TFA - Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano
- TFE - 2,2,2-Trifluoroetanol
- TOM - Teoria do Orbital Molecular
- Triton X t-octylfenoxipolietoxietanol
- UV-Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fórmula estrutural da 1,2-Benzopirona.....	17
<b>Figura 2:</b> Fórmula estrutural do 5,7-dimetoxicumarina.....	19
<b>Figura 3:</b> Fórmula estrutural dos carcinogênicos IQ, Me-IQ e A $\alpha$ C.....	21
<b>Figura 4:</b> Figura 4: Micela e os pontos A, B, C e D indicam as possibilidades de interação do substrato e a micela. Figura adaptada de (MANIASSO,2001).....	23
<b>Figura 5:</b> Estrutura monomérica dos surfactantes aniônico, não-iônico e catiônico.....	24
<b>Figura 6:</b> Concentração Micelar Crítica.....	25
<b>Figura 7:</b> Tipos de orbitais moleculares e transições eletrônicas para moléculas orgânicas.....	27
<b>Figura 8:</b> Disposição eletrônica para moléculas orgânicas para o 1° caso e 2° caso.....	27
<b>Figura 9:</b> As possíveis transições para uma molécula ilustrativa.....	28
<b>Figura 10:</b> Disposição dos estados eletrônicos excitados para moléculas orgânicas do 1° caso.....	29
<b>Figura 11:</b> As possíveis transições para uma molécula ilustrativa.....	29
<b>Figura 12:</b> Disposição dos estados eletrônicos excitados para moléculas orgânicas do 2° caso.....	30
<b>Figura 13:</b> Transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ .....	32
<b>Figura 14:</b> Diagrama de Jablonski, adaptado.....	33
<b>Figura 15:</b> Relação entre absorção e emissão, adaptado.....	34
<b>Figura 16:</b> Cruzamento Intersistema e fosforescência, adaptado.....	36
<b>Figura 17:</b> Conversão Interna, adaptado.....	37
<b>Figura 18:</b> Efeito do Solvente: Alterações nos níveis de energia dos estados eletrônicos com a mudança do solvente de hidrocarboneto para hidroxílico ( $\Delta E_3 > \Delta E_1 > \Delta E_2$ ) adaptado (LAKOWICZ, 1999).....	39
<b>Figura 19:</b> Curvas de potencial de energia com modos vibracionais apresentando uma imagem especular relacionando a absorção com a emissão. (Pope E Swenberg, 1982).....	40
<b>Figura 20:</b> Os integrais envolvendo $h^{ceme}$ são em geral substituídos por parâmetros empíricos ou calculados separadamente.....	42
<b>Figura 21:</b> Esquema do espectrofotômetro de luminescência a 77 K.....	45
<b>Figura 22:</b> Estrutura molecular da DMC otimizada DFT utilizando DFT com B3LYP/6-311+G**.....	48

<b>Figura 23:</b> Espectros UV/Vis de absorção da DMC a 25°C em (A) MCH a 10 <sup>-4</sup> M, (B) EtOH a 10 <sup>-5</sup> M, (C) TFE a 10 <sup>-5</sup> M e (D) Tampão (pH=7,0).....	50
<b>Figura 24:</b> Espectro teórico de absorção UV/VIS para o DMC (A) MCH, (B) EtOH e (C) TFE calculados com o TDDFT e B3LYP/6-311+G** .....	52
<b>Figura 25:</b> Mapa de potencial eletrostático para DMC, EtOH e TFE, calculados com o DFT a 6-311G**/B3LYP.....	57
<b>Figura 26:</b> Energia dos orbitais HOMO e LUMO do DMC calculados com o TDDFT e B3LYP/6-311+G** .....	58
<b>Figura 27:</b> Espectros de emissão a 77 K para DMC em metilciclohexano com o efeito da concentração. ....	59
<b>Figura 28:</b> Figura 27: Espectro de emissão a 77 K para DMC a 10 <sup>-5</sup> mol/L em metilciclohexano com o efeito do átomo pesado.....	61
<b>Figura 29:</b> Processo fotofísico de desativação da DMC em meio hidrofóbico calculado com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G**.....	62
<b>Figura 30:</b> Espectros de emissão a 77 K para DMC em etanol com o efeito da concentração em 10 <sup>-2</sup> e 10 <sup>-3</sup> mol/L.....	63
<b>Figura 31:</b> Espectros de emissão a 77 K para DMC em etanol com o efeito da concentração em 10 <sup>-4</sup> e 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	64
<b>Figura 32:</b> Espectro de emissão a 77 K para DMC a 10 <sup>-5</sup> mol/L em etanol com o efeito do átomo pesado.....	65
<b>Figura 33:</b> Processo fotofísico de desativação da DMC em meio hidrofílico (etanol) calculado com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G**.....	66
<b>Figura 34:</b> Espectros de emissão a 77 K para DMC em 2,2,2-trifluoretanol com o efeito da concentração em 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup> e 10 <sup>-4</sup> mol/L.....	67
<b>Figura 35:</b> Espectros de emissão a 77 K para DMC em 2,2,2-trifluoretanol com o efeito da concentração em 10 <sup>-5</sup> mol/L.....	68
<b>Figura 36:</b> Espectro de emissão a 77 K para DMC a 10 <sup>-5</sup> mol/L em etanol com o efeito do átomo pesado.....	69
<b>Figura 37:</b> Processo fotofísico de desativação da DMC em meio hidrofílico (2,2,2-trifluoretanol) calculado com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G**.....	70
<b>Figura 38:</b> Espectro de emissão do DMC em solução tampão (pH = 7,0) a 10 <sup>-3</sup> e 10 <sup>-5</sup> mol/L com efeito da concentração.....	71
<b>Figura 39:</b> Espectros de emissão do DMC adicionado em surfactantes preparado com solução tampão pH=7, nas concentrações 100 vezes abaixo e 100 vezes acima da CMC em	

(A e B) aniônico, (C e D) catiônico e (E e F) não-aniônico na concentração 10 <sup>-3</sup> mol/L.....	74
<b>Figura 40:</b> Monômero do DMC solubilizado em micela.....	75
<b>Figura 41:</b> Espectros de emissão do DMC em micelas (a esquerda) e espécie do DMC caracterizadas em vários meios (AGM) (M em MCH), (M-H em EtOH) e (M-Hforte em TFE).....	76
<b>Figura 42:</b> Complexo antimutagênico/mutagênico.....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> As energias de excitação, E (eV), singlete, comprimento de onda, $\lambda$ (nm), dos espectro UV/VIS do DMC em metilciclohexano observado e calculado. Força de oscilador (f-valor), transição e amplitude, calculados.....	53
<b>Tabela 2:</b> As energias de excitação, E (eV), singlete, comprimento de onda, $\lambda$ (nm), dos espectro UV/VIS do DMC em etanol observado e calculado. Força de oscilador (f-valor), transição e amplitude, calculados.....	54
<b>Tabela 3:</b> As energias de excitação, E (eV), singlete, comprimento de onda, $\lambda$ (nm), dos espectro UV/VIS do DMC em 2,2,2-trifluoretanol observado e calculado. Força de oscilador (f-valor), transição e amplitude, calculados.....	55
<b>Tabela 4:</b> Cargas naturais.....	57
<b>Tabela 5:</b> Energias tripletes e singletes do DMC com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G em meio hidrofóbico.....	62
<b>Tabela 6:</b> Energias tripletes e singletes do DMC com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G em meio hidrofílico para etanol.....	65
<b>Tabela 7:</b> Energias tripletes e singletes do DMC com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G em meio hidrofílico para TFE.....	70
<b>Tabela 8:</b> Máximo da fluorescência em (nm) e $\Delta E$ dos estados excitados singlete para as espécies do DMC.....	72
<b>Tabela 9:</b> Calor de formação para as espécies da DMC.....	77
<b>Tabela 10:</b> Calor de formação para os mutagênicos e os complexos antimutagênico/mutagênico.....	78

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 As cumarinas.....</b>	<b>17</b>
3.1.1 5,7-Dimetoxicumarina e suas propriedades químicas, fotofísicas e biológicas ...	19
<b>3.2 Os mutagênicos IQ e derivados .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Micelas .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Fundamentos Teóricos .....</b>	<b>26</b>
3.4.1 Os orbitais moleculares de compostos orgânicos.....	26
3.4.2 O arranjo energético dos orbitais moleculares .....	27
3.4.3 As transições eletrônicas .....	30
3.4.4 As transições eletrônicas $n,\pi^*$ .....	31
3.4.5 As transições eletrônicas $\pi,\pi^*$ .....	31
3.4.6 A probabilidade das transições $n,\pi^*$ e $\pi,\pi^*$ .....	32
3.4.7 Processos fotofísicos de desativação .....	32
3.4.8 Fluorescência.....	33
3.4.9 Fosforescência .....	35
3.4.10 Cruzamento Intersistemas .....	35
3.4.11 Conversão Interna.....	36
3.4.12 Relaxação Vibracional.....	37
<b>3.5 Efeitos do solvente nos processos fotofísicos .....</b>	<b>38</b>
<b>3.6 Efeitos do átomo pesado.....</b>	<b>39</b>
<b>3.7 O princípio de Franck-Condor.....</b>	<b>40</b>
<b>3.8 Química Teórica e Cálculos computacionais.....</b>	<b>41</b>
3.8.1 Método Semi-Empíricos do SPARTAN 18: AM1, PM3 E RM1.....	41
3.8.2 Métodos ab initio.....	42
3.8.3 Teoria do Funcional da Densidade (DFT).....	43

<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Experimental.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Cálculos Teóricos.....</b>	<b>46</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Espectros experimentais de absorção UV/VIS do DMC.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Cálculos Teóricos para o DMC.....</b>	<b>52</b>
5.2.1 Espectros Teóricos UV/VIS de absorção.....	52
<b>5.3 Espectros de emissão a 77 K do DMC.....</b>	<b>59</b>
5.3.1 Espectros de emissão a 77 K do DMC em meio hidrofóbico.....	59
5.3.2 Espectros de emissão a 77 K do DMC em meio hidrofóbico (etanol) .....	63
5.3.3 Espectros de emissão a 77 K do DMC em meio hidrofílico (TFE) .....	67
5.3.4 Espectros de emissão a 77 K do DMC em meio hidrofílico (Tampão pH = 7,0) .....	71
<b>5.4 Espectros de emissão do DMC em micelas.....</b>	<b>73</b>
<b>5.5 Determinação Teórica da Inibição da Mutagênese do IQ e derivados pelo DMC..</b>	<b>77</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>
<b>8 FUTUROS TRABALHOS .....</b>	<b>87</b>
<b>9 CRONOGRAMA.....</b>	<b>88</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As cumarinas e seus derivados são moléculas bioativas amplamente distribuídas na natureza, as quais ocorrem como metabólitos secundários encontrados em muitas espécies vegetais, apresentando importantes aplicações biológicas. A sua concentração é maior em frutos, sementes e raízes presentes em Papilionaceae (Fabaceae), Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae, Poaceae, Umbelliferae e, principalmente, na Apiaceae e Rutaceae, as quais são mais abundantes (SANTOS,2013). Entre as diversas aplicabilidades as medicinais são as que mais despertam interesses e motivam pesquisas científicas.

Isso ocorre devido as cumarinas apresentarem atividades antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, antioxidante e terapêuticas para o tratamento do HIV. Ademais, as cumarinas podem auxiliar no tratamento do câncer, pois apresentam atividade citotóxica e podem inibir o crescimento de células cancerosas (SALEM, *et al.*, 2016), propriedade biológica presente no derivado 5,7-dimetoxicumarina (DMC).

O DMC é um dos principais constituintes de plantas como a *Citrus* limão e mamão *Carica papaya*, e pode apresentar atividade anticâncer pois inibe a proliferação de carcinoma em células (ALESIANI *et al.*, 2008). Do mesmo modo, apresenta potencial atividade antimutagênica contra o 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina, o (IQ) e seus derivados, que caracterizam compostos mutagênicos pertencente à família das aminas heterocíclicas aromáticas (AHA). Porém, muito pouco se sabe a respeito da solubilização do DMC em biomembranas e qual a espécie em ação que deve interagir com os mutagênicos IQ e derivados.

Portanto, com a finalidade de compreender a ação farmacológica dessa cumarina foi investigado a solubilização do DMC em biomembranas utilizando-a como sonda fluorescente direta para determinar a espécie ativa em solventes hidrofóbicos, hidrofílicos e micelares através das técnicas de espectroscopia de emissão a 77K, cálculos DFT e propriedades fotofísicas.

Em razão desse objetivo principal foi realizado o estudo do efeito do solvente e da concentração, bem como a solubilização de suas espécies em micelas neutra, catiônica e aniônica preparadas sob condições fisiológicas para identificar as espécies em ação no interior de biomembranas que deve inibir os mutagênicos IQ e seus derivados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

✓ Investigar a solubilização do 5,7-dimetoxicumarina (DMC) em biomembranas utilizando-o como sonda fluorescente direta que é determinante a espécie ativa em solventes hidrofóbicos, hidrofílicos e micelares através das técnicas de espectroscopia de emissão a 77K, cálculos DFT e propriedades fotofísicas.

### 2.2 Específicos

- ✓ Realizar o efeito do solvente, da concentração e do átomo pesado nas propriedades fotofísicas do DMC;
- ✓ Usar a espectroscopia de absorção e emissão a 77K caracterizando as espécies do DMC em solventes hidrofóbicos e hidrofílicos;
- ✓ Usar a espectroscopia de emissão a 77K caracterizando as espécies do DMC solubilizadas nas micelas: neutra, catiônica e aniônica preparadas sob condições fisiológicas;
- ✓ Realizar cálculos teóricos usando método a Teoria do Funcional da Densidade para obter as seguintes informações: orbitais moleculares, geometria molecular, energias de excitação eletrônica e espectro teórico UV/Vis do DMC.
- ✓ Determinação teórica da inibição da mutagênese dos carcinogênicos 2-Amino-9H-pirido[2,3-b]indol ( $A\alpha C$ ), 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ) e seu derivado 2-Amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]quinolina, (Me-IQ) pelo DMC com o cálculo semiempírico PM3.

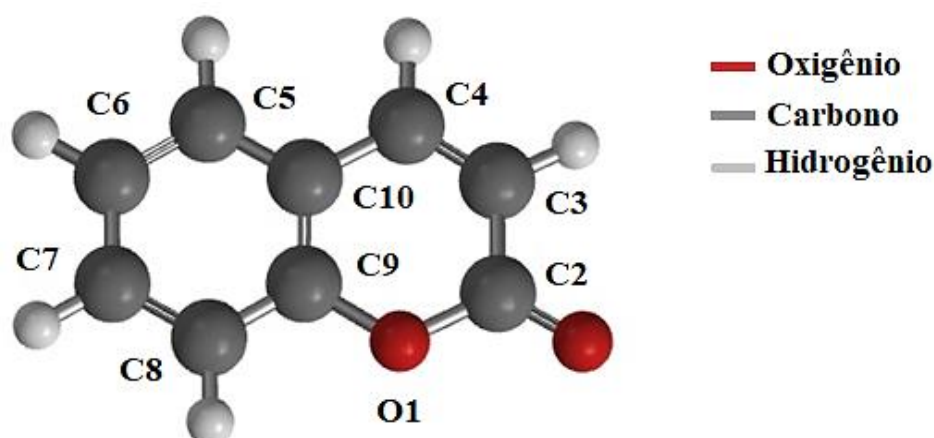
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 As Cumarinas

As Cumarinas (1,2-Benzopirona) e seus derivados são amplamente distribuídas na natureza, uma vez que aparecem como metabólitos secundários nas sementes, raízes e folhas de muitas espécies vegetais, apresentando importantes e diversas aplicabilidades biológicas. (MUSA, 2008). Particularmente, plantas pertencentes às ordens naturais de *Orchidaceae*, *Leguminoceae*, *Rutaceae*, *Umbelliferae* e *Labiatae* são ricas fontes de cumarinas que ocorrem naturalmente (SHAH, 1944).

Árvores e sementes que apresentam cumarinas em sua constituição são encontradas na floresta Amazônica. O cumaru, conhecido como cumaru-do-amazonas é uma árvore de grande porte, cujas sementes aromáticas ricas em cumarinas são usadas como fixador de perfume e no tratamento de coqueluche, como anticoagulantes e no tratamento da febre (SILVA 1997 e SAMPAIO 2000, *apud.*, MELO, 2005).

A respeito de sua constituição química, as cumarinas (figura 1) configuram um grupo de lactonas derivadas do ácido o-hidroxicinâmico. A fusão de um anel de pirona com um anel de benzeno dá origem a uma classe de compostos heterocíclicos conhecidos como benzopironas, as quais são comumente chamadas cumarinas contendo oxigênio como um membro do anel heterocíclico (LI, 2012).



**Figura 1:** Fórmula estrutural da 1,2-Benzopirona em modelo de bolas e varetas.

**Fonte:** Autora, (2020).

Os derivados de cumarinas vão diferenciar-se pela posição do grupo substituinte no anel aromático, assim alterando suas propriedades químicas. De acordo com Musa (2008), que discorre como as substituições na estrutura da cumarina alteram as bandas de fluorescência, citando um grupo metil na posição 4 de 7-hidroxi-cumarina ou 7-metoxicumarina, deslocando suas bandas de fluorescência para o vermelho.

As propriedades luminescentes das cumarinas são afetadas com alterações no pH e com o efeito do solvente. Estudos sobre o efeito do pH da solução na 7-hidroxi-4-metilcumarina mostrou o aumento na intensidade da fluorescência. O efeito do solvente deslocou para o vermelho tanto a absorção quanto a emissão para 13 derivados de cumarina, devido às ligações de hidrogênio, alterando suas características luminescentes (LI, 2012)

As cumarinas geralmente apresentam forte deslocamento de Stokes dependente da polaridade do meio, grandes mudanças nos momentos dipolo por excitação e altos rendimentos quânticos de fluorescência (KRYSTKOWIAK, *et al.*, 2012). O estudo da interação dessas moléculas com diferentes solventes gera diferentes propriedades físico-químicas, que desempenham papel significativo no fluxo de energia nos seus estados excitados (MOREIRA, 2014). Segundo Song (1973), que realizou estudos espectroscópicos das cumarinas nas temperaturas 12K e 77K e observou que as cumarinas emitem fluorescência e fosforescência, para a 1,2-benzopirona a fosforescência é mais intensa do que a fluorescência e apresenta natureza ( $\pi, \pi^*$ ) com progressão vibracional parcialmente localizado na ligação C3=C4 no anel da pirona.

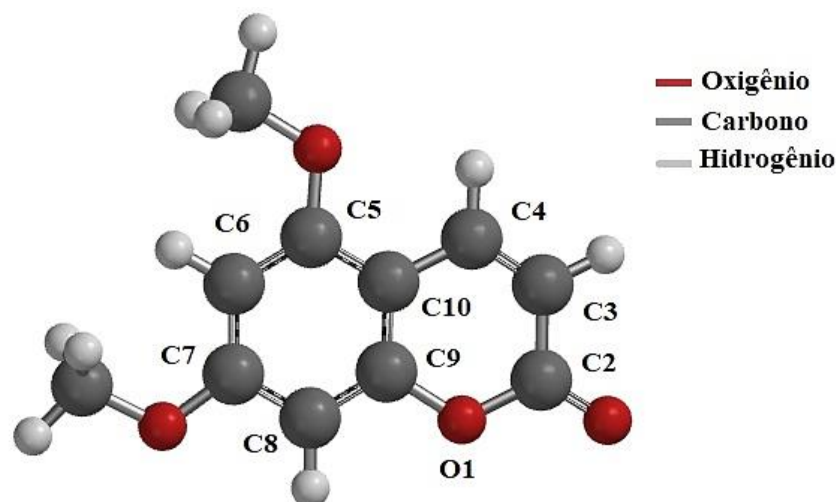
As propriedades físicas e químicas das cumarinas e seus derivados são vastamente estudadas, uma vez que suas aplicações podem ser empregadas em áreas da medicina, engenharia, física e química. O estudo de suas propriedades fotofísicas motivam o surgimento de novos materiais com atividades ópticas para o uso de corantes a laser, concentradores de energia solar em células fotovoltaicas, materiais ópticos não-lineares, sondas analíticas (ABDEL-MOTTALEB, *et al.*, 1992) e marcadores fluorescentes usados em medicamentos utilizados para monitorar as vias envolvidas na inibição de tumores (SHANKAR E BAHULAYAN, 2019).

Entre as suas diversas aplicabilidades supracitadas, destacam-se as aplicações biológicas que despertam interesses e motivam as investigações científicas. Por exemplo, as cumarinas têm propriedades, antibacteriana, anticoagulantes, antifúngica, antioxidantes e terapêuticas para HIV. Ademais, as cumarinas podem diminuir os efeitos colaterais causados pela radioterapia e auxiliar no tratamento do câncer, pois apresentam atividade citotóxica e podem inibir a ação de compostos mutagênicos (SALEM, *et al.*, 2016). Entre elas, quatro

espécies: cumarina, 7-hidroxycumarina, 7-hidroxi-6-metoxicumarina e 5,7-dimetoxicumarina que apresentam atividade inibitória (de maior ou menor nível) frente a câncer de mama, em estudos com animais (ratos) portadores de neoplasias mamárias, estudadas por Wattenberg em 1979.

### 3.1.1 5,7-Dimetoxicumarina e suas propriedades químicas, fotofísicas e biológicas

O 5,7-dimetoxicumarina (DMC) (figura 2) é um composto derivado da 1,2-benzopirona e possui dois grupos metóxi nos carbonos 5 e 7 do anel benzênico, sua fórmula molecular é  $C_{11}H_{10}O_4$  e massa molecular de 206,197 g/mol, tal cumarina é encontrada em plantas e no alimento, como o limão *Citrus* e o mamão *Carica Papaya* (SARIKAYA E DERELI, 2014). O DMC é solúvel em solventes orgânicos como o etanol, clorofórmio, éter dietílico, e parcialmente solúvel em água quente e pouco solúvel em água à temperatura ambiente (20°C) e absorve radiação eletromagnética na região do ultravioleta (LAKE, 1999).



**Figura 2:** Fórmula estrutural do 5,7-dimetoxicumarina em modelos de bolas e varetas.

**Fonte:** Autora, (2020).

Estudo de espectroscopia de absorção e emissão foram realizados para investigar as propriedades fotobiológicas da interação do DMC com as bases nitrogenadas do DNA, a partir das alterações espectrais resultantes da interação dessa cumarina com o sistema biológico. A fotocicloadição do DMC na timina, foi investigada por espectroscopia UV, fluorescência, RMN e infravermelho. Os deslocamentos nos máximos de absorção e de

fluorescência levaram a conclusão da formação da ligação do DMC com a timina pelo deslocamento para o azul da banda de 324 nm do DMC, para 285 nm.

Já a banda de absorção da timina em 260 nm desaparece, sugerindo a formação da ligação do DMC com a timina pela ligação dupla do carbono 3,4- e a ligação dupla 5,6 da timina (SHIM, 1981).

Para melhor compreender a atividade fotobiológica da DMC frente ao DNA, Shim et al (1986) investigou as propriedades fotofísicas do DMC em diferentes solventes. Observou-se o máximo da fluorescência sofreu deslocamento para o vermelho de 375 nm para 428 nm quando se substituiu o solvente hidroxilado por um hidrocarboneto, mostrando que a fluorescência do DMC sensível à polaridade do solvente. A fosforescência foi observada somente em solvente polar prótico, com a banda 0-0 em 476 nm, porém, a fosforescência não foi observada em hidrocarbonetos por falta de sensibilidade do equipamento.

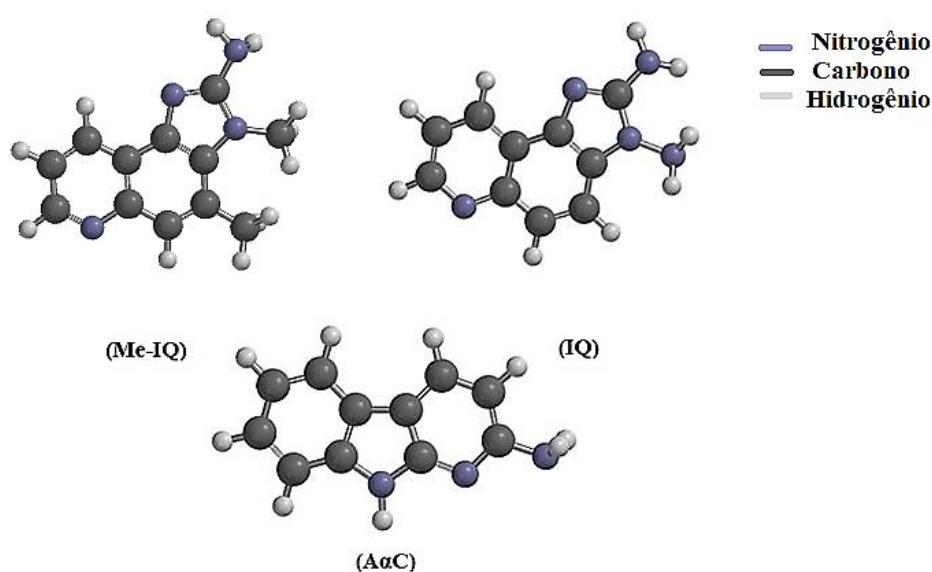
Além das propriedades fotofísicas, a atuação biológica da DMC desperta interesses, uma vez que a mesma tem potencial farmacológico frente a problemas neuropsiquiátricos. Ensaio obtidos com ratos mostraram que o DMC preveniu o estresse crônico induzido por depressão através do aumento da expressão de choque térmico da proteína-70 e inibição dos níveis de monoamina oxidase (MAO), (MA E WANG, 2017), enzima que degrada monoaminas neurotransmissoras como a serotonina e dopamina (HERRAIZ, 2009).

As propriedades antiproliferativas também são características dessa cumarina, pois o DMC bloqueia o ciclo celular de células malignas de melanoma importantes, impedindo a proliferação de carcinomas em células, apresentando atividade anticâncer (ALESIANI, *et al.*, 2008). Ademais, a mesma apresenta atividade antimutagênica frente a moléculas pertencentes à família das amins heterocíclicas aromáticas (AHA), compostos mutagênicos produzidos durante o cozimento de proteína animal.

Um estudo com ênfase nas relações estrutura e atividade desenvolvido por Edenharder, *et al.*, (1995) investigou o potencial antimutagênico de 51 cumarinas e derivados de origem sintética ou natural contra o 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinolina (IQ) e derivados, presente em *Salmonella typhimurium* TA98. Entre as diversas cumarinas, o DMC apresentou atividade entre moderada e forte em relação ao IQ e seus derivados, inibindo seu potencial poder carcinogênico no organismo, estimulado através da combinação do consumo de carnes cozidas a frutas, legumes e sucos, dos quais o DMC é constituinte.

### 3.2 Os mutagênicos IQ e derivados

O 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinolina, o (IQ) (figura 3) é um mutagênico pertencente à família das aminas heterocíclicas aromáticas (AHA), também chamadas de aminas heterocíclicas cancerígenas (AHCs). Esses compostos cancerígenos são produzidos durante o cozimento de alimentos, especialmente carnes ou peixe, sendo altamente mutagênicos em relação às *Salmonelas Typhimurium* na presença da mistura S9, além de mutagênicos in vitro e in vivo em direção a células de mamíferos (SUGIMURA, *et al.*, 2004).



**Figura 3:** Fórmula estrutural dos carcinogênicos IQ, Me-IQ e AαC em modelo de bolas e varetas.

**Fonte:** Autora, (2020).

Além do IQ a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (The International Agency for Research on Cancer) alerta sobre a produção de outros compostos durante o cozimento de proteínas de origem animal, esses compostos são derivados do IQ, que são formados durante o processo metabólico do mesmo no organismo. Entre eles citam-se os cancerígenos: 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-*f*] quinolina (MeIQ), 2-amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-*f*] quinoxalina (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-*f*] quinoxalina (DiMeIQx) e 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-*b*] piridina (PhIP) (SCHUT e SNYDERWINE, 1999). O mecanismo de ativação mutagênica do IQ está associado a formação do metabólito *N*-hidroxi-IQ, pelo citocromo P450, que ao continuar oxidando forma o NO<sub>2</sub>-IQ na presença de ar ou metanol. De modo que, o NO<sub>2</sub>-IQ mostrou-se duas vezes mais mutagênico que o IQ em *Salmonella typhimurium* TA98 (SNYDERWINE, 1987,

*apud.*, TAKAHATA, 2010). Além disso, apesar da principal exposição ao IQ ser através de alimentos, o IQ também está presente na fumaça do cigarro conforme Yamashita et al (1986).

Um estudo realizado para verificar o teor da exposição diária ao IQ, estima sobre a população dos EUA que a concentração das aminas aromáticas heterocíclicas varia de 100 ng a 10 µg por dia. Porém, a concentração desse carcinogênico pode mudar, pois depende do tipo de proteína animal, da temperatura de cozimento e modo de preparação segundo Turesky, *et al.*, (1993). Assim como o IQ, outros carcinogênicos estão presentes na fumaça do cigarro, entre eles destaca-se o 2-Amino-9H-pirido [2,3-b] indol o (AαC) a amina heterocíclica aromática carcinogênica mais abundante na fumaça do tabaco convencional. Além do mais, o AαC tem potencial cancerígeno no fígado de roedores, porém, pouco se conhece sobre seu potencial carcinogênico em humanos, uma vez que esses também são durante o cozimento de alimentos carnes, aves e peixes (BELLAMRI, *et al.*, 2017).

Kizil (2011) discorre que a formação desses compostos cancerígenos ocorre pela reação de Maillard. O músculo da carne contém creatina e creatinina, que podem reagir com aminoácidos e açúcares livres durante o cozimento. A creatina é, portanto, basicamente a responsável pela atividade mutagênica da carne, uma vez que durante o cozimento de carne ou peixe, a creatina é convertida em creatinina, que então forma parte dos precursores do IQ. As implicações resultantes dessas reações químicas geram os compostos carcinogênicos ou mutagênicos, que são compostos que podem induzir o surgimento de tumores no pulmão, estômago, fígado, vasos sanguíneos, cólon e mama durante o consumo desses alimentos em longo prazo em mamíferos. (BESSETTE, *et al.*, 2009). Entretanto, Bellamri (2018) destaca também a ligação dessas AHA com o surgimento do câncer de próstata, responsável pela segunda principal causa morte de câncer entre homens.

Portanto, como prevenção sugere-se que o consumo de legumes e frutas estejam associados ao consumo proteína de origem animal, uma vez que esses possuem em sua constituição antimutagênicos como flavonoides e cumarinas que atuam como inibidores das AHA. Assim, Edenharder, *et al.*, (1993) destaca que o consumo de legumes frutas e verduras, regularmente ingerido com a dieta ocidental em quantidades de até 1 g/ dia apresentou atividade antimutagênica contra o IQ.

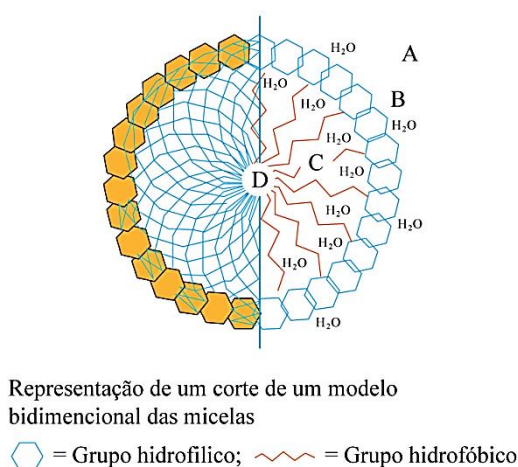
### **3.3 Micelas**

Descrito por McBrain em 1913 o termo “micela” é definido como “agregados de eletrólitos anfífilos (substâncias que possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica) em



soluções aquosas”, caracterizada por uma parte polar (cabeça) e outra apolar (cauda). As micelas podem ser o exemplo mais simples de imitação de membrana biológica, pois tendem a orientar moléculas orgânicas dentro de sua região hidrofóbica (MERTZ E LIN, 1991) semelhante a biomembranas constituídas por lipídios. As biomembranas por exemplo, são fluidos bidimensionais formados basicamente por lipídeos e proteínas (KOMURA e ANDELMAN, 2014). Desse modo, as micelas configuram-se como uma analogia as células, uma vez que composição química das células compreende proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, assim como os lipídeos que são os principais componentes das membranas celulares (COOPER e HAUSMAN, 2007).

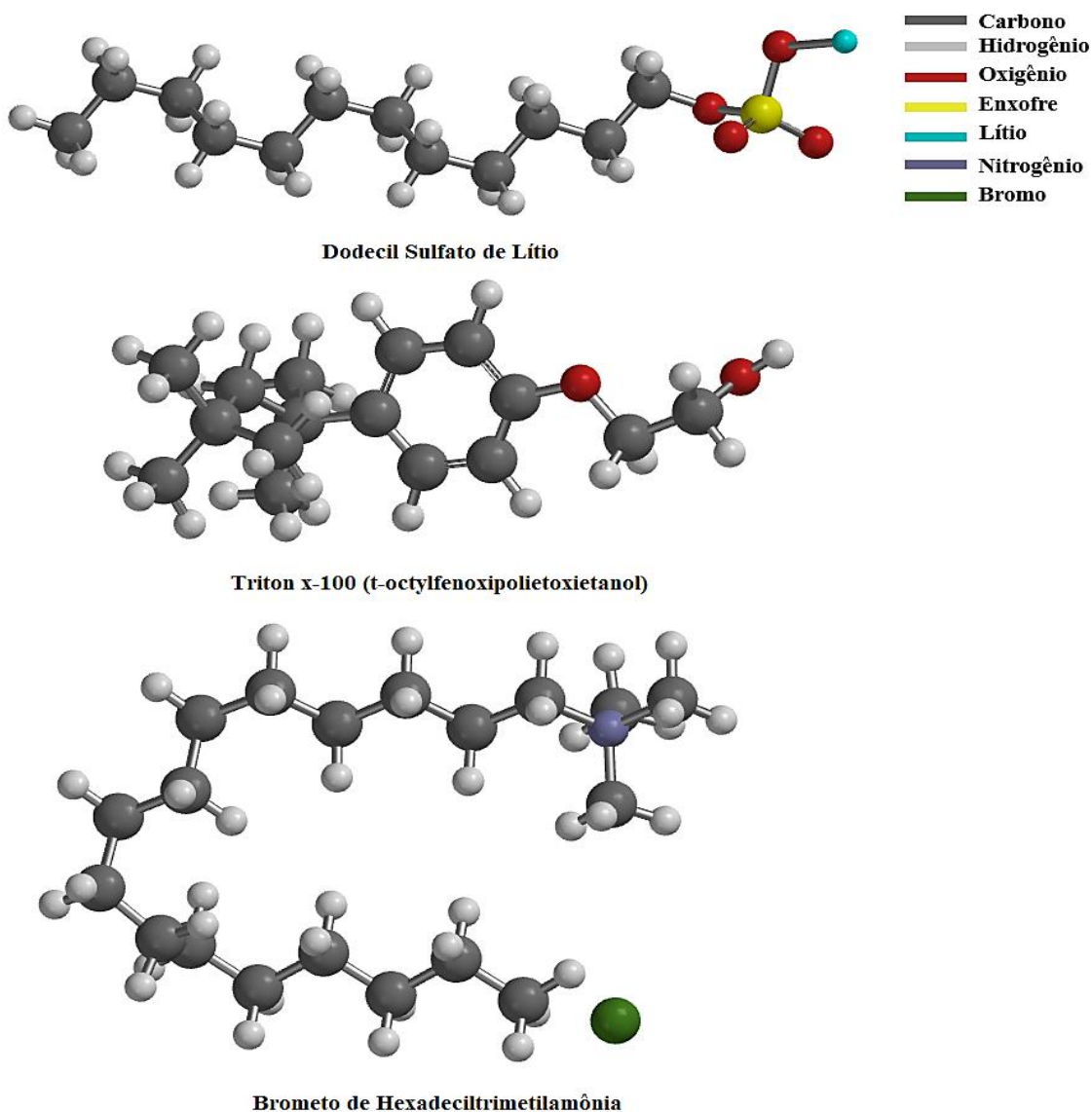
Portanto, utiliza-se o modelo micelar de Menger (MEGNER E BOYER, 1980), pois semelhante a biomembranas essa possui uma região hidrofóbica igual células formadas por lipídios. Denominada “porous-cluster” a micela de Menger seria um tipo de esponja constituída de três partes: o núcleo seco e hidrofóbico; a parte aquosa situada entre a região seca e a membrana que forma a superfície da micela e o lado de fora da micela constituída de uma solução tampão aquosa com pH fisiológico (figura 4).



**Figura 4:** Micela e os pontos A, B, C e D indicam as possibilidades de interação do substrato e a micela.  
**Fonte:** Maniasso, (2001).

Para gerar as micelas utilizam-se surfactantes que podem ser do tipo: aniônicos, catiônicos e neutros. Os aniônicos possuem grupos funcionais como sulfatos, sulfonatos, carboxilatos e fosfatos. Um exemplo de surfactante aniônico é o dodecil sulfato de lítio ( $C_{12}H_{25}LiO_4S$ ). Os não-iônicos podem ser álcoois de cadeias longas e alquil éteres, como o triton x-100 (t-octylfenoxipolietoxietanol) ( $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ ), que possui uma cadeia de óxido de polietileno hidrófilo com um grupo hidrofóbico aromático. Já os surfactantes

catiônicos apresentam-se como sais quaternários de amônio, como o brometo de hexadeciltrimetilamônia ( $C_{19}H_{42}NBr$ ) (SANTOS, 2014). A fórmula estrutural monomérica dos surfactantes representada em modelo de bolas e varetas é encontrada na figura 5.

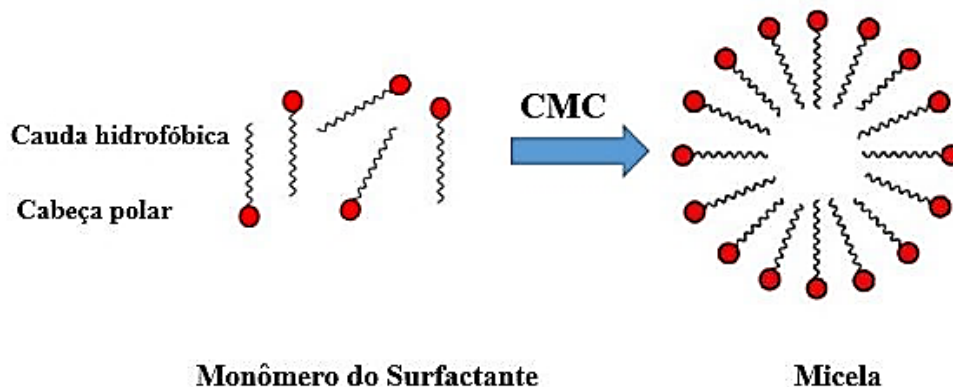


**Figura 5:** Estrutura monomérica dos surfactantes aniônico, não-iônico e catiônico.

**Fonte:** Autora, (2020).

Para ocorrer a formação das micelas, é necessário obedecer a concentração micelar crítica (CMC), que deve ocorrer quando as regiões estruturais hidrofílica e hidrofóbica se associam dinamicamente e espontaneamente em solução aquosa formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais (figura 6). Abaixo da CMC, o tensoativo

encontra-se na forma de monômeros. Em concentrações acima da CMC, as micelas possuem um diâmetro entre 3-6 nm o que representa de 30-200 monômeros (MANIASSO, 2001).



**Figura 6:** Concentração Micelar Crítica.

**Fonte:** <https://quimicayalgomas.com/salud/las-micelas>, (2020).

A literatura reporta o uso de micelas como sistemas modelo para imitar ambientes de membrana biológica, identificando o princípio ativo de substâncias orgânicas. Tal modelo permitiu caracterizar as espécies de drogas da dibucaína e identificar sua localização em micelas neutras, aniônicas e catiônicas para compreender a ação biológica de anestésicos em membranas lipídicas, uma vez que a espécie molecular identificada solubilizada no interior da micela será a espécie monomérica (MERTZ E LIN, 1991).

Starigazdová, *et al.*, (2020) discorre que uso de micelas permite o aumento do transporte local de substâncias ativas ou drogas hidrofóbicas para as células, uma vez que essas substâncias são capazes de penetrar as camadas mais profundas do tecido da epiderme, utilizando a curcumina solubilizada em micelas poliméricas à base de ácido hialurônico.

Além do mais, estudos com micelas neutras, catiônicas e aniônicas formadas em ambiente fisiológico, pH e a força iônica controlados, foram realizados para compreender solubilização de alucinógenos em biomembranas, identificando as espécies ativa, o sítio de interação com a membrana e a sua localização no interior da mesma utilizando a espectroscopia de emissão a 77K. Por meio desse sistema é possível assegurar a integridade estrutural micelar mesmo com o efeito da temperatura, seja a 77 K segundo (MARQUES, *et al.*, 2000; MARQUES *et al.*, 2002; LIN) e inclusive a 4,2 K conforme (GLOSH, *et al.*, 1986).

### 3.4 Fundamentos Teóricos

A absorção de energia sob a forma de radiação eletromagnética por compostos orgânicos na região do ultravioleta envolve promoção de elétrons de orbitais do estado fundamental para estados excitados de maior energia.

Normalmente, a energia fornecida promove a passagem de elétrons de orbitais do estado fundamental, conhecido por orbital ligante ocupado de maior energia (HOMO) para o orbital antiligante desocupado de menor energia.

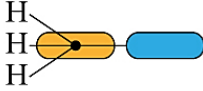
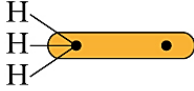


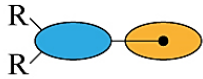
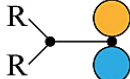
#### 3.4.1 Os orbitais moleculares de compostos orgânicos

Compostos orgânicos e biológicos possuem os seguintes orbitais moleculares:

- Orbital ligante sigma ( $\sigma$ );
- Orbital antiligante sigma ( $\sigma^*$ );
- Orbital ligante pi ( $\pi$ );
- Orbital antiligante pi ( $\pi^*$ );
- Orbital não ligante (n).

A figura 7, apresenta as transições de menores energias, as formas dos orbitais moleculares no estado fundamental e excitado, considerando a absorção de um fóton para moléculas orgânicas.

Nota-se que os orbitais  $\pi$  possuem maior potencial de ionização que os orbitais n e os orbitais  $\sigma$ . Os orbitais  $\sigma$  e  $\pi$  participam das ligações entre os átomos para formação de molécula, esses são sensíveis às constantes vibracionais.

Tipos de ligação	Transições de menor energia	Forma do orbital	
		Estado excitado	Estado fundamental
$\text{H}_3\text{C-H}$	$\sigma \rightarrow \sigma^*$		
$\text{R}_2\text{C=CR}_2$	$\pi \rightarrow \pi^*$		
$\text{R}_2\text{C=O}$	$n \rightarrow \pi^*$		

**Figura 7:** Tipos de orbitais moleculares e transições eletrônicas para moléculas orgânicas.

**Fonte:** Adaptado de Piedade, (2009).

### 3.4.2 O arranjo energético dos orbitais moleculares

Para cada orbital molecular existe uma energia associada, a ordem dos níveis de energia para cada orbital depende da molécula, do substituinte e do solvente. Considerando uma molécula com seis elétrons, observam-se dois casos com possíveis arranjos de energia para os orbitais moleculares. No estado fundamental tem-se a configuração conforme a figura 8 abaixo:

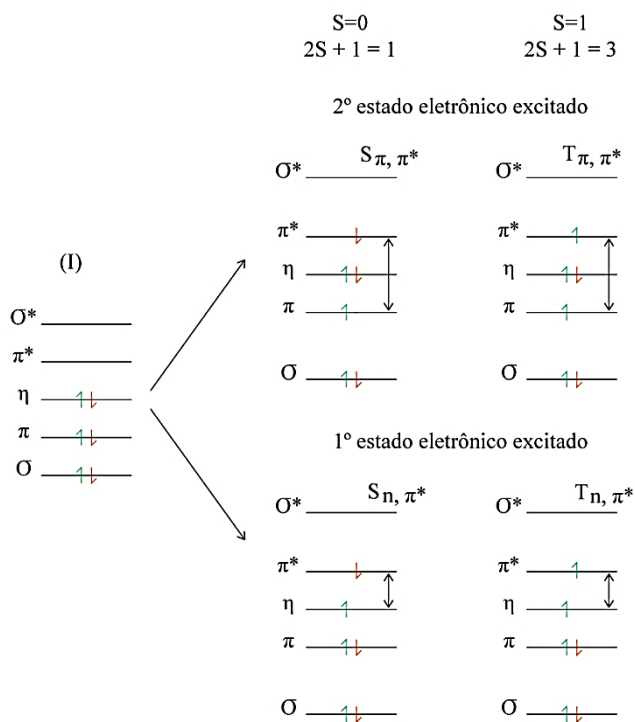
1º Caso	2º Caso
$\sigma^*$ _____	$\sigma^*$ _____
$\pi^*$ _____	$\pi^*$ _____
$\eta$ — $\uparrow\downarrow$ —	$\eta$ — $\uparrow\downarrow$ —
$\pi$ — $\uparrow\downarrow$ —	$\pi$ — $\uparrow\downarrow$ —
$\sigma$ — $\uparrow\downarrow$ —	$\sigma$ — $\uparrow\downarrow$ —

**Figura 8:** Disposição eletrônica para moléculas orgânicas para o 1º caso e 2º caso

**Fonte:** Valeur, (2001).

O momento angular spin ( $S = \sum_i S_i$ , com  $S_i = +\frac{1}{2}$  ou  $-\frac{1}{2}$ ) permanece igual a zero,  $S=0$ . Por causa da multiplicidade dos dois estados, fundamental e excitado, ( $M = 2S + 1$ ) será igual a 1, sendo denominado de estado eletrônico fundamental singlete ( $S_1$ ). Quando moléculas orgânicas interagem com uma fonte de excitação proveniente de uma lâmpada Hg/Xe de alta pressão, tendo sido selecionada a linha 313 nm por exemplo, ocorre a promoção dos elétrons da molécula para um orbital de maior energia, gerando os estados eletrônicos excitados. O estado eletrônico excitado singlete ( $S_1$ ) é produzido quando o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original (spins opostos), e a sua desativação para o estado fundamental produz a fluorescência (SO E DONG, 2002).

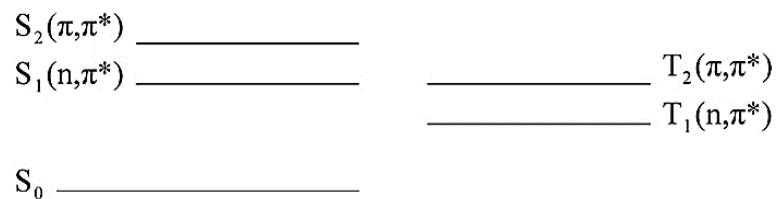
Quando ocorre alteração na orientação do spin do elétron no orbital excitado (spins paralelos), gera-se o estado eletrônico excitado triplete, cuja desativação (emissão de energia) produz a fosforescência. A função de onda simétrica é chamada de estado triplete e tem multiplicidade três (SO E DONG, 2002). Assim, O momento angular spin será  $S=1$ , e então a multiplicidade será ( $M = 2S+1= 3$ ). A figura 9 apresenta o diagrama I de energia que envolve as possíveis transições singlete e triplete do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  e formação dos estados eletrônicos excitados para uma molécula fictícia.



**Figura 9:** As possíveis transições para uma molécula ilustrativa (modificado de VALEUR,2001).

**Fonte:** Valeur, (2001).

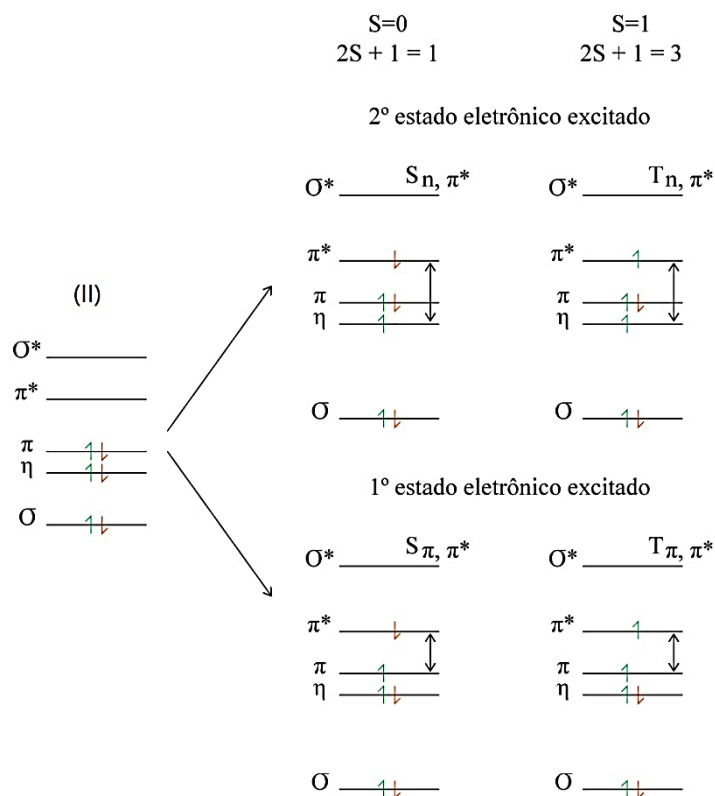
O diagrama I com os estados eletrônicos singlete e triplete pode ser observado de modo simplificado conforme a figura 10 a seguir:



**Figura 10:** Disposição dos estados eletrônicos excitados para moléculas orgânicas do 1º caso.

**Fonte:** Valeur ,(2001).

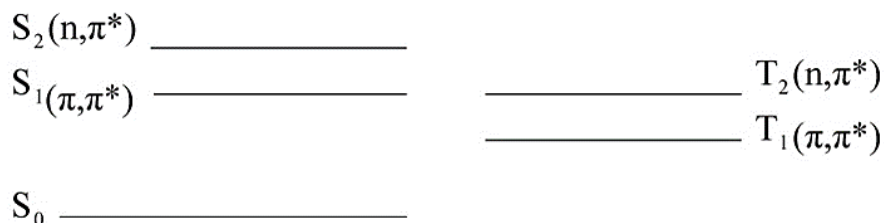
A figura 11 apresenta o diagrama II de energia que envolve os estados eletrônicos singlete e triplete do tipo  $\pi, \pi^*$  e  $n, \pi^*$  para uma molécula ilustrativa, uma vez que o estado excitado  $n, \pi^*$  possuem maior energia que o  $\pi, \pi^*$ .



**Figura 11:** As possíveis transições para uma molécula ilustrativa (modificado de VALEUR,2001).

**Fonte:** Valeur, (2001).

O diagrama II com os estados eletrônicos singlete e triplete pode ser observado de modo simplificado conforme a figura 12 a seguir:



**Figura 12:** Disposição dos estados eletrônicos excitados para moléculas orgânicas do 2º caso.

**Fonte:** Valeur, (2001).

A fluorescência vai apresentar propriedades distintas conforme a transição observada para os diagramas I e II. No diagrama I, o estado eletrônico excitado  $n, \pi^*$  possui um caráter de transferência de carga evidenciado pelo aumento de dipolo, o estado emissor é  $S_1(n, \pi^*)$  apresentando tempo de vida longo e é polarizado fora do plano. Para o diagrama II o estado eletrônico excitado, o emissor  $S_1(\pi, \pi^*)$  possui um tempo de vida curto e é polarizada no plano (VALEUR, 2001).

### 3.4.3 As transições eletrônicas

Quando moléculas orgânicas interagem com uma fonte de excitação proveniente de uma lâmpada Hg/Xe, a energia absorvida em 313 nm por exemplo, promove a molécula para um orbital de maior energia, gerando os estados eletrônicos excitados. Para moléculas orgânicas aromáticas ou insaturadas, esses estados podem ser do tipo  $n, \pi^*$  e  $\pi, \pi^*$ . A identificação da origem das transições e de seus estados eletrônicos, seja energia singlete ( $S_1$ ) ou triplete ( $T_1$ ), do tipo  $n, \pi^*$  ou  $\pi, \pi^*$  podem fornecer informações sobre a atividade fotoquímica e fotobiológica dos compostos orgânicos (HOLLER, *et al.*, 2009).

Tais transições eletrônicas estão correlacionadas com os cromóforos, que representam a região molecular de maior absorvidade. O grupo de átomos que produzem tal absorção são chamados de cromóforos. Portanto, a energia característica de uma transição e o comprimento de onda da radiação absorvida é caracterizada por um grupo de átomos e não dos próprios elétrons. (PAVIA, 2010, pg. 387).



#### 3.4.4 As transições eletrônicas $n,\pi^*$

Os derivados dos compostos carbonílicos representam um sistema molecular insaturado contendo átomos com pares de elétrons não ligantes. A transição responsável pela absorção de compostos carbonílicos pode ser representada pelos pares de elétrons não ligantes do átomo de oxigênio. Um desses elétrons pode ser excitado para um orbital vazio  $\pi^*$ , que resulta uma transição  $n\rightarrow\pi^*$ . Essas transições são tipicamente da ordem de 4 eV (290 nm). (ATKINS, 2006, / pg.489). Desse modo, a banda  $n,\pi^*$  pode ficar “escondida” sob a banda  $\pi,\pi^*$  mais intensa, isto é, devido as transições  $n,\pi^*$  serem simetricamente proibidas (regras de seleção) chamada também de transição proibida e ser pouco observada no espectro de absorção, portanto, as absorções são fracas e a força do oscilador (f) encontra-se em torno de  $2\times 10^{-4}$  a  $6\times 10^{-4}$ .

Tais transições produzem os estados eletrônicos excitados singlete-singlete, que possuem energia menor do que as transições  $\pi\rightarrow\pi^*$ , que permite a emissão de fluorescência. O tempo de vida da fluorescência do estado eletrônico excitado  $n,\pi^*$  é comparativamente mais longo e sensível à desativação não radiativa singlete do que o estado excitado  $\pi,\pi^*$ . Entretanto a emissão de fluorescência para o estado excitado  $n,\pi^*$  é mais fraca (PAVIA, 2010).

#### 3.4.5 As transições eletrônicas $\pi,\pi^*$

Uma transição  $\pi\rightarrow\pi^*$  pode resultar de uma absorção de um cromóforo  $C=C$ , tal energia é da ordem de 7 eV para uma dupla ligação não conjugada, o que corresponde 180 nm (região do ultravioleta). Para duplas conjugadas, a transição  $\pi\rightarrow\pi^*$  desloca-se para maiores comprimentos de onda (UV-Visível), isto, deve-se a energia dos orbitais moleculares que se encontram mais próximos (EL SAYED, 1963).

A diferença de energia entre os estados  $\pi$  e  $\pi^*$  é afetada quando temos duplas ligações conjugadas, estas conjugações ocasionam um espalhamento na carga eletrônica através do sistema conjugado, onde a densidade eletrônica pode ser deslocalizada por todo o sistema molecular no estado fundamental, ou seja, as energias dos orbitais moleculares tornam-se mais próximas e a transição  $\pi\rightarrow\pi^*$  muda para a região do visível. As transições  $\pi\rightarrow\pi^*$  são mais intensas do que as transições  $n\rightarrow\pi^*$ , a menos que sejam parcialmente proibidas por condição de simetria. Além disso, a formação do estado eletrônico excitado  $\pi,\pi^*$  singlete de menor energia emite fluorescência.

### 3.4.6 A probabilidade das transições $n,\pi^*$ e $\pi,\pi^*$

Ao passar para estados eletrônicos excitados as moléculas podem apresentar transições do tipo  $n\rightarrow\pi^*$ , e  $\pi\rightarrow\pi^*$ . As transições  $n\rightarrow\pi^*$  são permitidas por dipolo magnético e tem polarização fora do plano. Já as transições  $\pi\rightarrow\pi^*$  são permitidas por dipolo elétrico e tem polarização no plano, observadas na figura 13 a seguir:



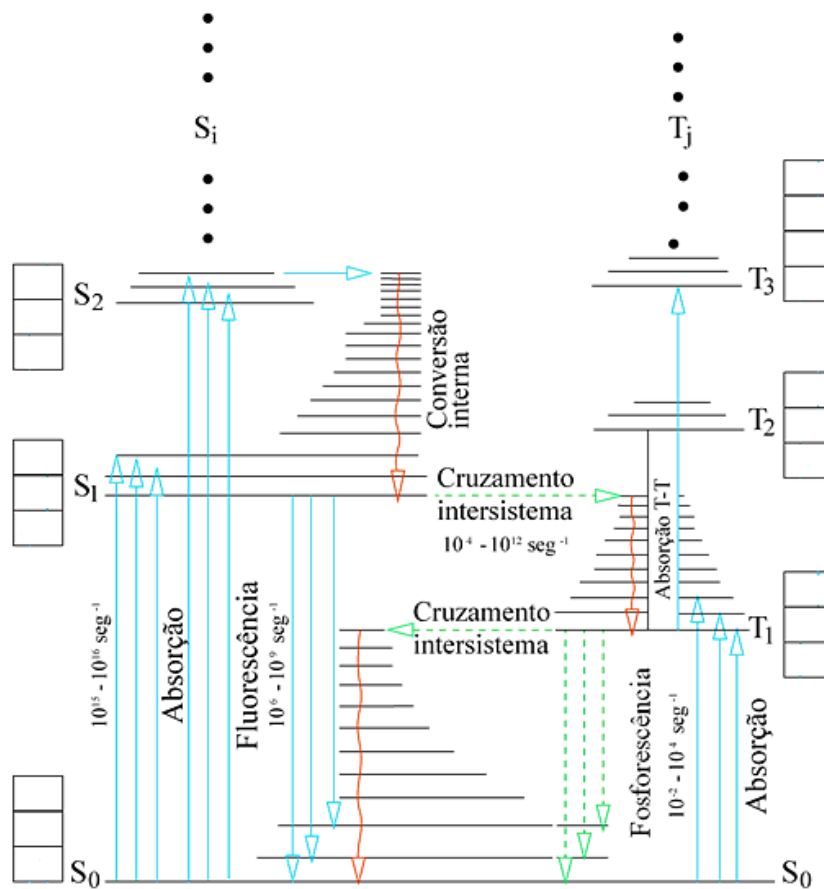
**Figura 13:** Transições  $n\rightarrow\pi^*$  e  $\pi\rightarrow\pi^*$ .

**Fonte:** Adaptado de Castro, (2020).

A figura (A) apresenta a  $n\rightarrow\pi^*$  permitida por dipolo magnético e polarização fora do plano. A figura (B) apresenta a transição  $\pi\rightarrow\pi^*$  permitida por dipolo elétrico com a polarização no plano. A probabilidade de ocorrer transição por dipolo elétrico é cerca de  $10^6$  vezes mais provável do que dipolo magnético.

### 3.4.7 Processos fotofísicos de desativação

Quando uma molécula absorve luz, ocorrem excitações eletrônicas, a energia recebida pode ser dissipada de duas formas: radiativamente e não-radiativamente. Os processos radiativos são: fluorescência e fosforescência. Os processos não-radiativos são: conversão interna e cruzamento intersistema. Tais processos podem ser ilustrados pelo diagrama de Jablonski (figura 14).

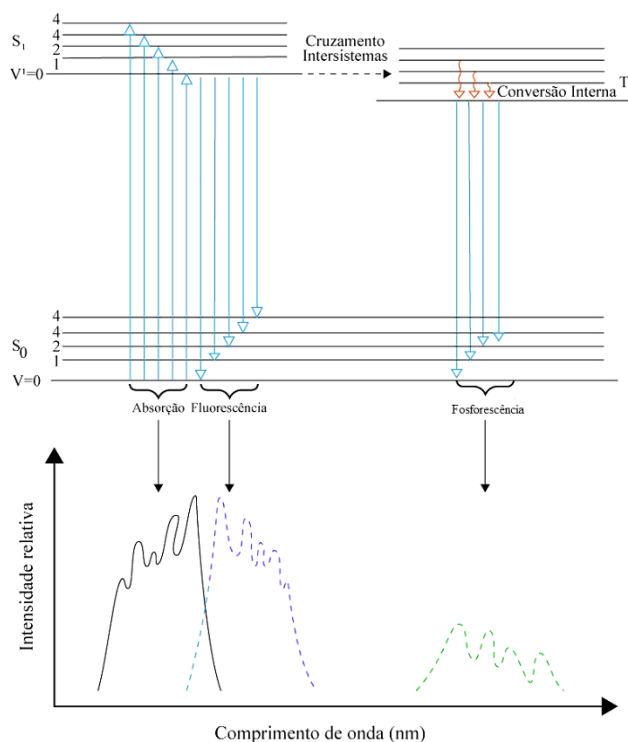


**Figura 14:** Diagrama de Jablonski, adaptado (TURRO, 1978).

**Fonte:** Turro, (1978).

### 3.4.8 Fluorescência

A fluorescência é um processo fotoluminescente no qual as moléculas são excitadas por absorção de radiação eletromagnética, quando essas moléculas retornam ao estado fundamental a radiação emitida cessa espontaneamente após o término da excitação e possui tempo de vida entre de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  segundos. Os fótons emitidos por essas moléculas possuem caráter singleto quando estas retornam para o estado fundamental. A figura 15 apresenta o diagrama esquemático dos processos fotofísicos envolvidos para a emissão e absorção de energia (SKOOG, *et al.*, 2006, pg.697).



**Figura 15:** Relação entre absorção e emissão, adaptado (McGLYN, *et al.*, 1969).

**Fonte:** McGLYN, *et al.*, (1969).

Moléculas com potencial fluorescente geralmente são ricas em elétrons  $\pi$  (como no caso das moléculas aromáticas), contendo ou não heteroátomos em sua cadeia principal. As moléculas planares favorecem a fluorescência, pois aumenta a interação e conjugação entre o sistema de elétrons  $\pi$ . A fluorescência advém de transições entre orbitais  $\pi \rightarrow \pi^*$  e em menor escala entre orbitais  $n \rightarrow \pi^*$ . A fluorescência mais intensa e mais útil é encontrada em compostos contendo grupos funcionais aromáticos com níveis de transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  de baixa energia. (ALVES, 2009).

A diferença (expressa em números de onda) entre o máximo da primeira banda de absorção e o máximo de fluorescência é chamado de deslocamento de Stokes. (VALEUR, 2001, pg. 38). Outros fatores também podem influenciar o máximo de fluorescência e sua intensidade, entre eles: efeito do solvente, pH, temperatura e concentração. Em muitas moléculas, a eficiência quântica da fluorescência decresce com o aumento da temperatura, pois em temperaturas elevadas aumenta a frequência de colisões e leva à maiores probabilidades de relaxação colisional (SKOOG, *et al.*, 2006, pg.786).

### 3.4.9 Fosforescência

A fosforescência é um fenômeno de fotoluminescência similar à fluorescência, porém, esses diferenciam-se pelos seus estados excitados. Quando a molécula retorna do estado  $T_1$  para o estado fundamental  $S_0$ , ela pode emitir energia em comprimentos de onda maiores, fenômeno chamado de fosforescência via cruzamento intersistema. A orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto). Portanto, um estado excitado tripleto apresenta um tempo de vida mais longo (tipicamente,  $10^{-2}$  a  $10^4$   $s^{-1}$ ). SKOOG (2006). Tal fenômeno pode ser observado na figura 14 (página 29).

Na fosforescência, a emissão espontânea pode persistir por longos períodos. A diferença sugere que a fluorescência é uma rápida conversão da radiação absorvida em energia emitida, porém a fosforescência envolve o armazenamento de energia e uma relaxação lenta da energia estocada na molécula (ATKINS, 2006 pg. 492).

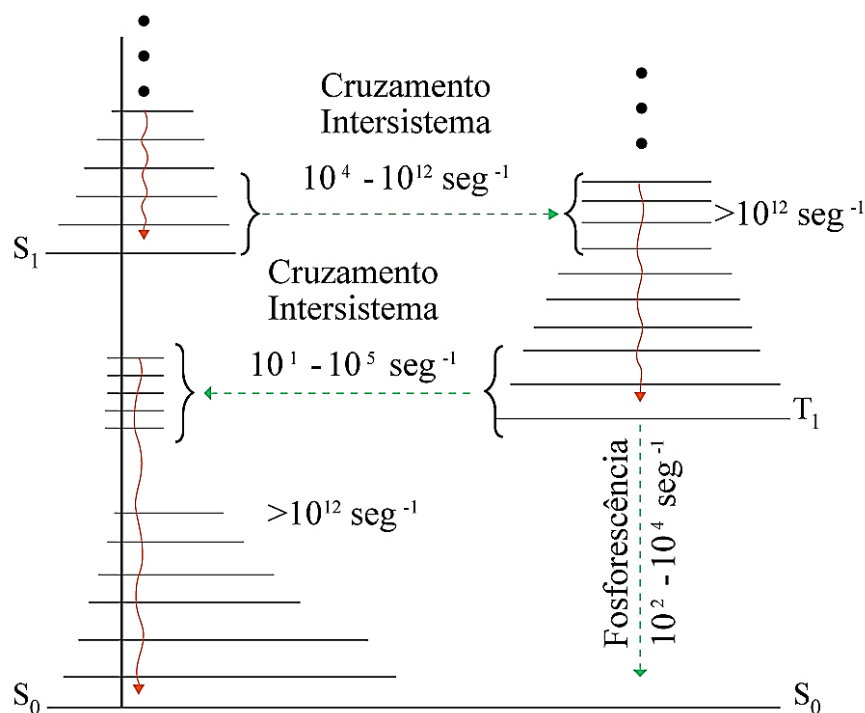
As interações com certas espécies químicas presentes no meio fosforescente com as espécies luminescentes podem diminuir ou eliminar a fosforescência, este fenômeno é chamado de “quenching” (desativação do estado excitado). A interação do oxigênio com moléculas no estado tripleto provoca a desativação da molécula excitada para o estado fundamental ( $T_1 \rightarrow S_0$ ). Esta desativação da molécula excitada é acompanhada pela transição do oxigênio do seu estado tripleto natural para um estado singlete excitado. Um dos modelos seguidos para descrever este tipo de interação propõe a transferência de carga, por contato, entre o oxigênio e o analito (SOUZA, 2008).

Para aumentar essa eficiência, a fosforescência é normalmente observada a baixas temperaturas em meio rígido, como vidros e quartzo. O espectro de fosforescência é localizado em comprimentos de onda maiores que no espectro de fluorescência, porque a energia do nível vibracional mais baixo do estado tripleto  $T_1$  é menor que o do estado singlete  $S_1$ . SKOOG (2006).

### 3.4.10 Cruzamento Intersistemas

O cruzamento intersistemas caracteriza-se por uma transição não-radiativa (simbolizada pelas flechas pontilhadas) entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes, entre os estados excitado singlete  $S_1$  para o estado excitado tripleto. Quando a molécula retorna do estado  $T_1$  para o

estado fundamental  $S_0$ , ela pode emitir energia em comprimentos de onda maiores, fenômeno chamado de fosforescência. A transição  $T_1 \rightarrow S_0$  é uma transição proibida por spin, mas ainda assim pode ser observada por causa do acoplamento spin-órbita (MARTINS E RONCONI, 2017). A figura 16 traz o diagrama que apresenta o cruzamento intersistema.



**Figura 16:** Cruzamento Intersistema e fosforescência, adaptado (McGLYN et al., 1969).

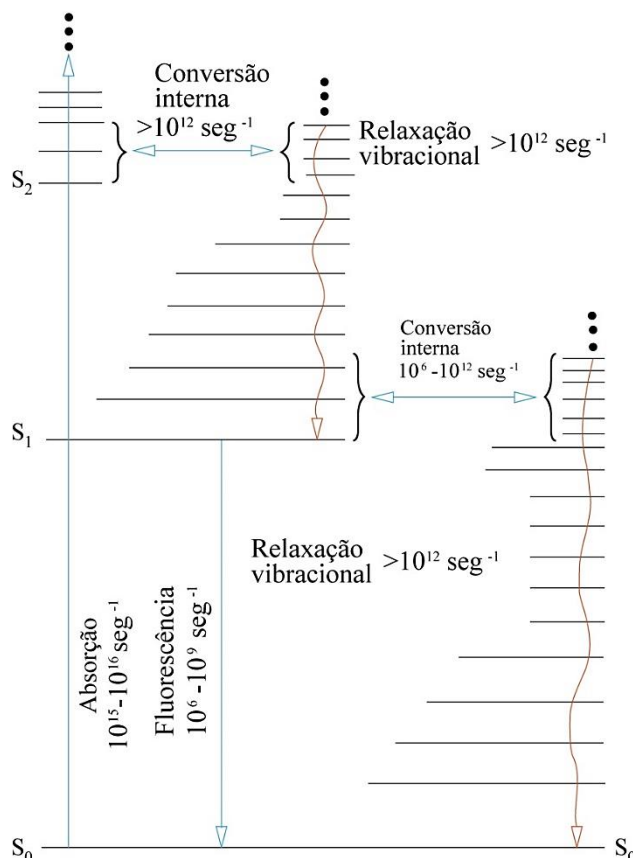
**Fonte:** McGLYN, *et al.*, (1969).

El Sayed (1963) o qual elaborou regras de seleção das transições não radiativas para moléculas grandes em meio rígidos. As transições tipo cruzamento intersistemas, não radioativas  $^1(n, \pi^*) \longleftrightarrow ^3(\pi, \pi^*)$  ou  $^1(\pi, \pi^*) \longleftrightarrow ^3(n, \pi^*)$  podem ser mais rápidas que aquelas entre estados do mesmo tipo, ou seja,  $^1(n, \pi^*) \longleftrightarrow ^3(n, \pi^*)$  ou  $^1(\pi, \pi^*) \longleftrightarrow ^3(\pi, \pi^*)$ .

#### 3.4.11 Conversão Interna

Ao liberar energia, a molécula pode retornar ao estado fundamental de forma não radiativa pelo processo de conversão interna, onde a energia é perdida na forma de relaxação vibracional, através de colisões e mudanças conformacionais (MARTINS E RONCONI, 2017), isto entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spins ( $S_2 \rightarrow S_1$  ou

$T_2 \rightarrow T_1$ ). Porém, pode também ocorrer uma conversão externa, em que a desativação de um estado eletrônico excitado envolve interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos. (ALVES, 2009). Tal fenômeno encontra-se exemplificado na figura 17:



**Figura 17:** Conversão Interna, adaptado (McGLYN et al., 1969).

**Fonte:** McGLYN, *et al.*, (1969).

### 3.4.12 Relaxação Vibracional

A desativação vibracional ou relaxação, indicada por setas ondulares entre os níveis vibracionais, ocorre durante as colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente conforme observado na figura 15 (SKOOG, *et al.*, 2006). O tempo de vida médio de uma molécula excitada vibracionalmente é de  $10^{-12}$  s. Uma consequência da eficiência da relaxação vibracional é o fato da banda de fluorescência para uma dada transição eletrônica estar deslocada para comprimentos de onda maiores em relação à banda de absorção (deslocamento Stokes) (ALVES, 2009).

### 3.5 Efeito do solvente nos processos fotofísicos

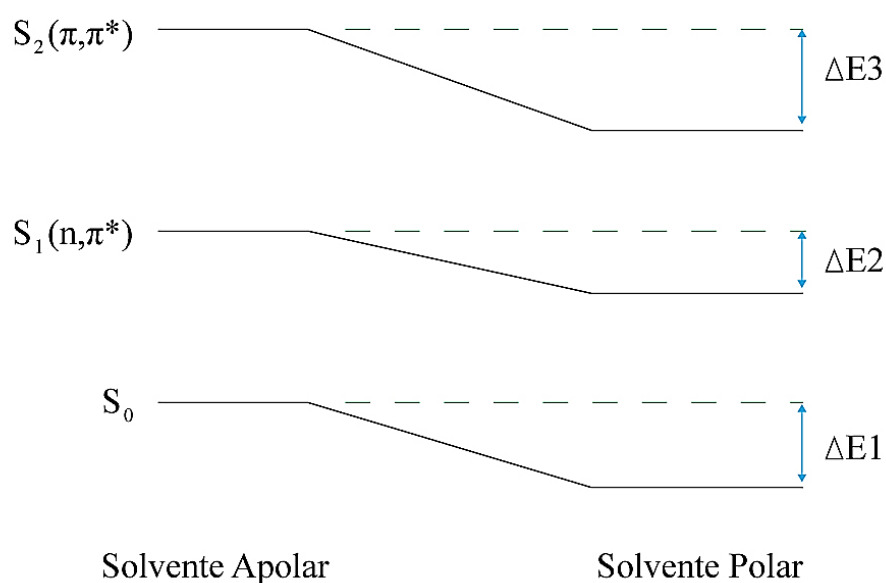
Scheibe (1927) em suas pesquisas notou que alguns deslocamentos anômalos para menores comprimentos de ondas que ocorriam em bandas de absorção para moléculas insaturadas quando mudava-se o solvente de baixa constante dielétrica para outro com maior constante dielétrica. Assim Burawoy (1939) concluiu que compostos que apresentavam em sua estrutura carbonilas e nitrogênios por exemplo, tendem a sofrer deslocamento para o azul (menores comprimentos de onda) quando aumentava a polaridade do solvente.

Posteriormente, Kasha (1950) atribuiu tais deslocamentos para o azul são características das transições  $n,\pi^*$ , essas que podem ser responsáveis pela ligação de hidrogênio, que ocorria via orbital  $n$  do soluto comprovado experimentalmente quando mudava-se o solvente de hidrocarboneto para um solvente hidroxilado. Assim, a ligação de hidrogênio deve estabilizar mais o estado fundamental do que o estado excitado e como resultado, a excitação envolvendo a remoção de um dos elétrons da ligação necessitará de mais energia (deslocamento para o azul) do que se o soluto estivesse em meio apolar. (PIEDADE, 2009).

Já os orbitais  $\pi,\pi^*$  pouco sofrem a interferência do solvente polar prótico, isto aumentará estabilidade do orbital  $\pi^*$  e a diferença de energia desta transição diminui e conseqüentemente suas bandas se deslocam para região do vermelho (maiores comprimentos de onda), uma vez que a transição  $n,\pi^*$  necessita de mais energia. (SCHEIBE, 1927). Tais mudanças podem ser observadas na figura 18.

Pavia (2010) discorre que em alguns casos as ligações de hidrogênio no estado excitado podem ser mais fortes que no estado fundamental, deslocando a absorção para comprimento de ondas maiores, pois a energia da transição eletrônica diminui, assim as transições  $\pi\rightarrow\pi^*$  também sofreriam deslocamento para regiões com maiores comprimentos de onda, essas causadas pelo solvente, semelhante ao observado para DMC em água e etanol.





**Figura 18:** Efeito do Solvente: Alterações nos níveis de energia dos estados eletrônicos com a mudança do solvente de hidrocarboneto para hidroxílico ( $\Delta E_3 > \Delta E_1 > \Delta E_2$ ) adaptado (LAKOWICZ, 1999).

**Fonte:** Lakowicz, (1999).

### 3.6 Efeito do átomo pesado

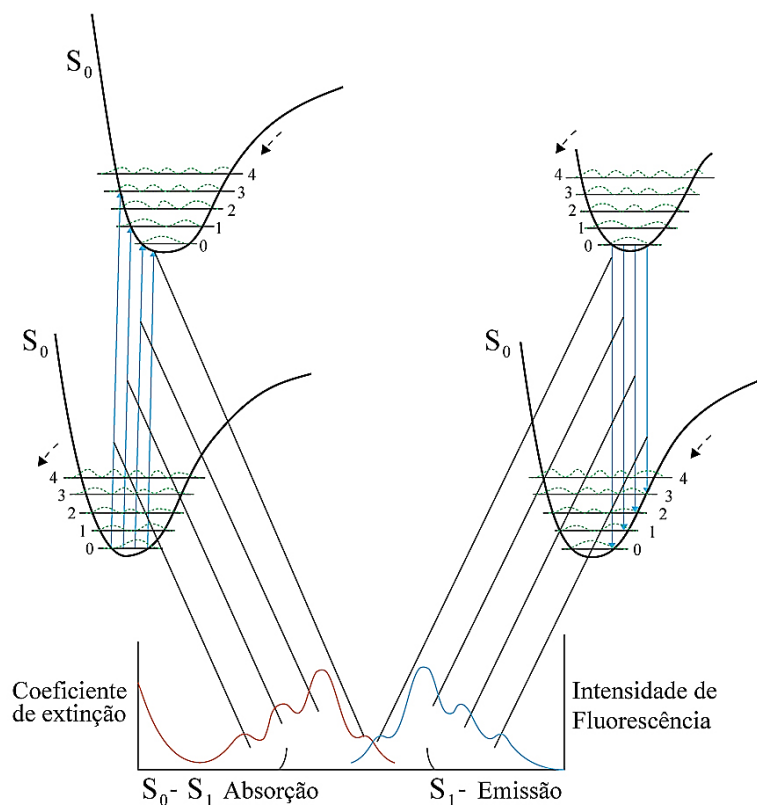
Wang e Hurtubise (1996) ressaltam o efeito do átomo pesado que também vem influenciar no fenômeno de fosforescência, isto é, devido ao acoplamento de spin-orbital, no qual o estado tripleto adquire algumas características de singleto e vice-versa. Esta condição aumenta o cruzamento intersistemas (CIS) do estado singleto para o estado excitado tripleto, aumentando a probabilidade de ocorrer a fosforescência, com a utilização de átomos halogenados.

Seybold (1977) realizou um estudo da influência do átomo pesado sobre as características luminescentes e descreve a ordem de eficiência para o átomo pesado para os íons de halogenetos:  $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ . Portanto, quando um átomo pesado é substituído em uma molécula aromática nota-se que:

- O tempo de vida da fosforescência diminui;
- O rendimento quântico de fluorescência diminui  $\Phi_F$ ;
- O rendimento quântico de fosforescência pode aumentar  $\Phi_P$ ;
- A constante do cruzamento intersistema pode aumentar;
- A força do oscilador da transição  $T_1 \leftarrow S_0$  invariavelmente aumenta.

### 3.7 O princípio de Franck-Condon

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência refletem o nível vibracional fundamental e os estados eletrônicos excitados. O princípio de Frank-Condon estabelece que os níveis vibracionais não se alteram durante as transições eletrônicas. Este princípio considera que as transições são verticais, como consequência do rápido movimento dos elétrons na transição eletrônica, em relação ao movimento dos núcleos durante a vibração; a transição eletrônica ocorre sem que haja tempo para mudança da distância internuclear (VALEUR, 2001). O espectro de fluorescência geralmente é semelhante à banda espectral de absorção na forma especular observada na figura 19, que consta os fenômenos de absorção e emissão com as bandas espectrais.



**Figura 19:** Curvas de potencial de energia com modos vibracionais apresentando uma imagem especular relacionando a absorção com a emissão (POPE E SWENBERG, 1982).

**Fonte:** Pope e Swenberg. (1982).

Na emissão, a baixas temperaturas, as bandas vibrônicas são governadas pelo princípio Franck-Condon. Os níveis vibracionais ( $v=0$ ) são altamente populados nos estados

fundamental e excitado, e se a posição de equilíbrio das configurações nucleares dos estados fundamental e excitado são semelhantes, a banda 0-0 é o máximo da banda de emissão. Se a posição de equilíbrio é um pouco diferente, a transição entre os níveis vibracionais mais provável será  $v=1$ ,  $v=2$  ou outro valor de  $v$ , dependendo do grau de deslocamento. A baixas temperaturas, quase todas as transições originam-se do nível  $v=0$ , sendo que o número de transições é muito menor, nas emissões ou absorções, do que na temperatura ambiente. Em baixas temperaturas se obtém espectros com melhor resolução para a estrutura vibracional, devido os processos de difusão, colisão e vibração serem mais lentos. Como consequência, há menor grau de competição entre fluorescência e conversão interna, supressão por difusão e desativação por colisão, em comparação com a temperatura ambiente (COSTA, 1998), possibilitando determinar a natureza dos estados emissores das moléculas, se  $n$ ,  $\pi^*$  ou  $\pi$ ,  $\pi^*$  (MACCOLL, *et al.*, 1978).

### 3.8 Química Teórica e Cálculos computacionais

O avanço dos computadores vem possibilitando a notoriedade dos métodos computacionais, que são utilizados como ferramentas indispensáveis para pesquisas em química. A partir de equações matemáticas torna-se possível calcular propriedades moleculares, simular o comportamento molecular, prever a energia envolvida em alguns processos químicos, calcular geometria, determinar estados de transição, descrever caminho de reação e entre outros. (ABREU, 2004). Os tópicos a seguir abordarão alguns métodos bem consolidados utilizados em pesquisas científicas para determinar propriedades químicas, entre eles constam os métodos: semi-empíricos, *ab initio* e a Teoria do Funcional da Densidade.

#### 3.8.1 Método Semi-Empíricos do SPARTAN 18: o PM3

Os métodos semi-empíricos limitam-se aos elétrons de valência, não considerando explicitamente os elétrons do cerne, que pouco contribuem para o comportamento químico das moléculas. O operador de Fock (equação 1.0) é então da forma em que  $h^{\text{cerne}}$  inclui o termo de energia cinética e de atração para o cerne (em vez de para os núcleos). Os integrais envolvendo  $h^{\text{cerne}}$  são em geral substituídos por parâmetros empíricos ou calculados separadamente (ALCÁCER, 2007).

$$f = h^{cerne} + \sum_{b=1}^{osoc} (J_b - K_b) \quad (1.0)$$

**Figura 20:** Os integrais envolvendo  $h^{cerne}$  são em geral substituídos por parâmetros empíricos ou calculados separadamente.

**Fonte:** Alcácer, (2007).

Os cálculos semi-empíricos podem prever a geometria de equilíbrio, estrutura de estado de transição de energia, entalpia de formação, momento de dipolo e energias de ionização, parâmetros que foram desenvolvidos para reproduzir uma série de dados experimentais. O método PM3 (Parametric Model 3) é um método desenvolvido por James Stewart e utiliza duas funções gaussianas para a função de repulsão do núcleo. Tal parametrização permite que o PM3 preveja bem as ligações de hidrogênio, porém, amplia as atrações não-físicas de hidrogênio-hidrogênio, que pode influenciar ao analisar interações intermoleculares. A precisão das previsões termoquímicas com PM3 pode ser melhor que outros métodos como o AM1 (Austin Model 1) outro método semi-empírico, portanto, as energias de calor de formação e geometrias de ligação de hidrogênio são mais exatas. “*O modelo PM3 tem sido amplamente utilizado para estimativa de propriedades moleculares e alguns metais de transição*” (RAMACHANDRAN et al, 2008, pg. 141).

### 3.8.2 Métodos *ab initio*

O método *ab initio* mais simples baseia-se na aproximação Hartree-Fock, o operador hamiltoniano para obter-se a energia total de um sistema qualquer, esse que pode ser separado em duas partes: a primeira de natureza eletrônica, enquanto que a segunda é de natureza nuclear (PIEIDADE, 2009). Tais cálculos não possuem em suas equações parâmetros empíricos ou semi-empíricos. Citam-se os cálculos Hartree-Fock e Teoria do Funcional da Densidade.

Os programas quanto mecânicos *ab initio* representam os orbitais através dos chamados conjuntos de base (CRAMER, 2002). Um conjunto de base mínimo contém apenas um número de funções necessário para acomodar todos os elétrons de um átomo, por exemplo, uma função 1s para os átomos de hidrogênio e hélio, funções 1s e 2s para o lítio e o berílio e assim por diante. O maior problema do conjunto de base mínimo é a impossibilidade de se expandir ou contrair os orbitais para que se ajustem ao ambiente molecular.

A melhor descrição dos elétrons é obtida através conjuntos de base de valência dividida, nos quais as funções que representam os elétrons de valência são divididas em dois componentes, um mais interno e compacto e outro mais externo e difuso. A introdução de funções de número quântico secundário maior (funções do tipo p para átomos de hidrogênio e funções do tipo d para os demais) nos chamados conjuntos de base de polarização permite que pequenos deslocamentos do centro de carga eletrônica em relação às posições nucleares sejam possíveis. Os conjuntos de base contendo funções difusas representam melhor sistemas aniônicos e estados excitados. Estes conjuntos são obtidos pela adição de orbitais s e p muito difusos para melhorar a descrição de pares de elétrons de alta energia (SANT'ANNA, 2009).

### 3.8.3 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

Método proposto por Thomas em 1927 e Fermi em 1928 baseia-se na densidade eletrônica do sistema que consiste em substituir a função de onda de N elétrons e a equação de Schrödinger pela densidade eletrônica. Tal proposta foi consolidada posteriormente por Kohn e Sham através de dois teoremas que mostram que existe um funcional de energia exata da densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$  e um princípio variacional exato para este funcional (KOHN E SHAM, 1965).

A energia é expressa como uma função de uma única “variável”, a densidade eletrônica (que é função das 3 coordenadas cartesianas), então, as equações que resultam da aplicação deste modelo são mais simples do que as resultantes da teoria do Hartree-Fock, onde as “variáveis” são o conjunto de funções de onda de um elétron (que são funções de  $3N$  variáveis, onde  $N$  é o número de átomos do sistema), (SANT'ANNA, 2009).

Os funcionais foram desenvolvidos a partir da mecânica quântica fundamental e outros a partir da parametrização de funções que melhor reproduzem resultados experimentais. Estes, são utilizados com aglutinação de acrônimos que designam os funcionais de troca e de correlação, respectivamente nessa ordem. O B3LYP é um funcional de troca Becke com funcional de correlação de Lee, Yang e Parr (LEE, YANG e PARR, 1988). Atualmente, um dos funcionais mais utilizados devido à qualidade dos seus resultados, particularmente para moléculas orgânicas (SANT'ANNA, 2009).

Desse modo, as propriedades de um sistema de muitos elétrons podem ser determinadas usando-se os funcionais, que nesse caso são espacialmente dependente densidade eletrônica. Por isso o nome Teoria do Funcional da Densidade, pois advém do uso de funcionais da densidade eletrônica (BECKE, 1993).

## 4 METODOLOGIA

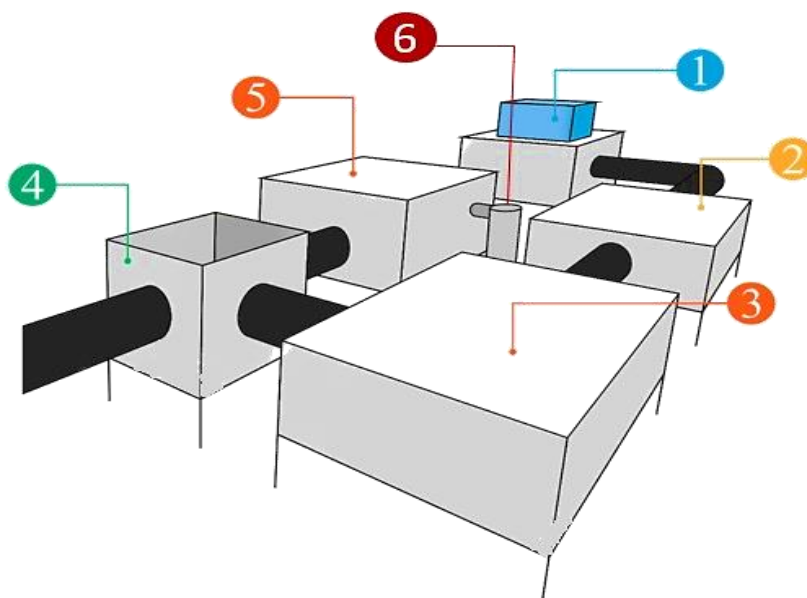
### 4.1 Experimental

O 5,7-dimetoxicumarina, metilciclohexano ( $C_6H_{11}CH_3$ ) 99%, etanol desidratado proof 200 proof absoluto, 2,2,2-trifluoroetanol para espectroscopia, triton x-100 (t-octylfenoxipolietoxietanol, surfactante neutro), dodecil sulfato de lítio ( $C_{12}H_{25}LiO_4S$ , surfactante aniônico), brometo de hexadeciltrimetilamônia ( $C_{19}H_{42}NBr$ , surfactante catiônico) 99%, 1-bromopentano  $CH_3(CH_2)_4Br$  99%, cloreto de sódio 99%, fosfato de sódio monobásico  $HNaPO_4$  98%, ácido clorídrico 35% e tris-base (2-amino-2-hydroxymethylaminometano) foram todos comprados pela Sigma- Aldrich do Brasil. Todas as soluções preparadas foram analisadas por espectroscopia de absorção. Para obter os espectros de emissão foram as soluções para análise foram recentemente preparadas e transferidas para tubos de quartzo transparentes, com espessura de 2 mm, essas foram seladas, mergulhadas e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. A preparação das soluções foi dividida em quatro etapas:

1. Estudo da fotofísica do DMC nos meios hidrofóbicos e hidrofílicos, por meio da preparação das soluções do DMC nas concentrações de  $1 \times 10^{-2}$  M até  $1 \times 10^{-6}$  M nos solventes: etanol, 2,2,2-trifluoroetanol, metilciclohexano e água duplamente destilada e deionizada;
2. Estudo da fotofísica do DMC em solução tampão, dissolvida na mistura de  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  e NaCl para ajustar a força iônica (pH 7,0, 0,05 M  $NaH_2PO_4/0,032$  M  $Na_2HPO_4$ , I = 0,1 M);
3. Estudo da fotofísica do DMC em soluções monoméricas de surfactantes abaixo da CMC: os surfactantes Triton x-100, Dodecil sulfato de lítio e Brometo de hexadeciltrimetilamônia foram dissolvidos individualmente em solução tampão (pH=7,0) nas respectivas concentrações  $3 \times 10^{-2}$ ,  $8,9 \times 10^{-3}$  e  $9,5 \times 10^{-2}$  mM, essas, encontram-se 100 vezes abaixo da concentração micelar crítica (CMC). Posteriormente, o DMC foi solubilizado na solução que continham os surfactantes dissolvidos em meio aquoso realizando o efeito da concentração de  $1 \times 10^{-2}$  até  $1 \times 10^{-5}$  mol/L;

4. Estudo da fotofísica do DMC em soluções micelares: Para obter as soluções micelares utilizou-se os surfactantes Triton x-100, Dodecil sulfato de lítio e Brometo de hexadeciltrimetilamônia dissolvidos individualmente em solução tampão (pH=7,0) nas respectivas concentrações  $3 \times 10^{-2}$ ,  $8,9 \times 10^{-3}$  e  $9,5 \times 10^{-2}$  mM, conforme (MURKERJEE, 1971). Essas concentrações encontram-se 100 vezes acima da concentração micelar crítica (CMC). Posteriormente, o DMC foi solubilizado nas soluções micelares realizando o efeito da concentração de  $1 \times 10^{-2}$  até  $1 \times 10^{-5}$  mol/L;
5. Todas as soluções micelares foram ultrassonicamente agitadas por 1 hora a  $45^{\circ}\text{C}$  usando um Bransonic ultrasonic cleaner modelo 8200 da Sigma Aldrich.

Os espectros de absorção foram registrados com o espectrofotômetro Ultravioleta Genesys 10S UV-VIS da Thermo Scientific. Os espectros de emissão em 77K foram medidos com o (Lin Electronic Spectroscopy System) fabricados pela ChemNova Technologies em Inc., Sycamore, Illinois, EUA conforme o esquema representado na figura 21.



**Figura 21:** Esquema do espectrofotômetro de luminescência a 77 K. (1) Fonte de alimentação, (2) monocromador iluminador, (3) monocromador 1, (4) suporte da amostra, (5) monocromador 2, (6) fotomultiplicadora.

**Fonte:** Autora, (2020).

O espectrofotômetro de emissão é constituído pelos seguintes componentes: (1) Fonte de alimentação de alta potência, Newport, modelo 70705, série 95; (2) Monocromador Iluminador, modelo 70525, série 121, que contém a lâmpada de Xe, 150W, Oriel sem ozônio; (3) Monocromador 1, Newport, modelo 74100, série 537 usado para excitar a amostra; (4) Suporte da amostra onde deve ser inserido o dewar óptico que contém o nitrogênio líquido para imergir a amostra analisada; (5) Monocromador 2 usado para receber os dados de emissão da amostra excitada, da Newport, modelo 74100, série 538, acoplado a (6) fotomultiplicadora Oriel Apex, modelo 77341 Newport, responsável por transformar a emissão recebida em sinal elétrico e enviar ao programa computacional.

O processamento de dados e a interface do sistema espectroscópico são feitos pelo software Lin. Todos os espectros de emissão aqui obtidos são claramente constituídos apenas por fluorescência e fosforescência ou fluorescência, onde cada uma dessas emissões é facilmente identificada, de modo que não se faz necessário obter espectros separados de fosforescência e fluorescência a baixa temperatura.

## 4.2 Cálculos Teóricos

Os cálculos quânticos foram realizados no computador Intel R COREL (TM) i5 4590 3,30GHz com 16 GB de RAM. O pacote computacional utilizado para simular os cálculos foi o SPARTAN 18® para o Windows, da Wavefunction Inc. que fornece um software de modelagem molecular e cálculo de propriedades químicas.

A geometria molecular da 5,7-Dimetoxicumarina foi realizada conforme cristalografia molecular consultada em Ma e Wang (2017). Os espectros UV/Vis teóricos foram calculados usando o TD-DFT com o funcional B3LYP e a função de base 6-311+G\*\*, esse foi comparado com os espectros de absorção experimentais. Primeiramente, a geometria da molécula foi otimizada e os parâmetros do cálculo selecionados.

O espectro teórico foi calculado para moléculas isoladas considerando o vácuo como ambiente apolar semelhante ao meio hidrofóbico tipo hidrocarboneto (metilciclohexano) e para o meio hidrofóbico hidroxilado (etanol e TFE) considerados como sítio associativo para formar o complexo com ligação de hidrogênio.

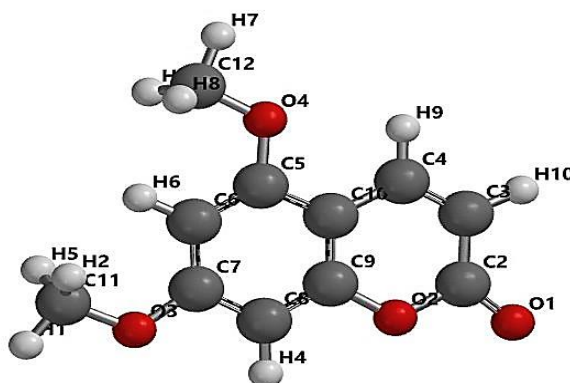
O cálculo para obter os espectros UV/Vis teóricos fornece informações como as energias singletes, tripletes, força do oscilador, origem da transição, orbitais moleculares e mapas dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, cargas naturais e mapas de potencial eletrostático contribuíram para a compreensão desta substância em nível molecular.



Os valores em comprimento de onda (nm) e a força do oscilador foram tratados no software Origin® para obter o espectro teórico. Para prever a estabilidade energética dos monômeros do DMC, agregados moleculares, complexo formado entre o monômero da DMC com ligação de hidrogênio entre etanol e 2,2,2-trifluoretanol e os complexos anti-mutagênicos/mutagênicos utilizou-se o cálculo semi-empírico (PM3), que permitiu a otimização da geometria e forneceu informações termodinâmicas como calor de formação em kJ/mol.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O 5,7-dimetoxicumarina (DMC) possui dois grupos metóxi substituintes nas posições 5 e 7 orientados em um ângulo de aproximadamente  $119^\circ$  em relação ao anel benzênico. A figura 21 apresenta a conformação de menor energia para DMC em  $-474.3348$  kJ/mol no vácuo.



**Figura 22:** Estrutura molecular da DMC otimizada DFT utilizando DFT com B3LYP/6-311+G\*\*.

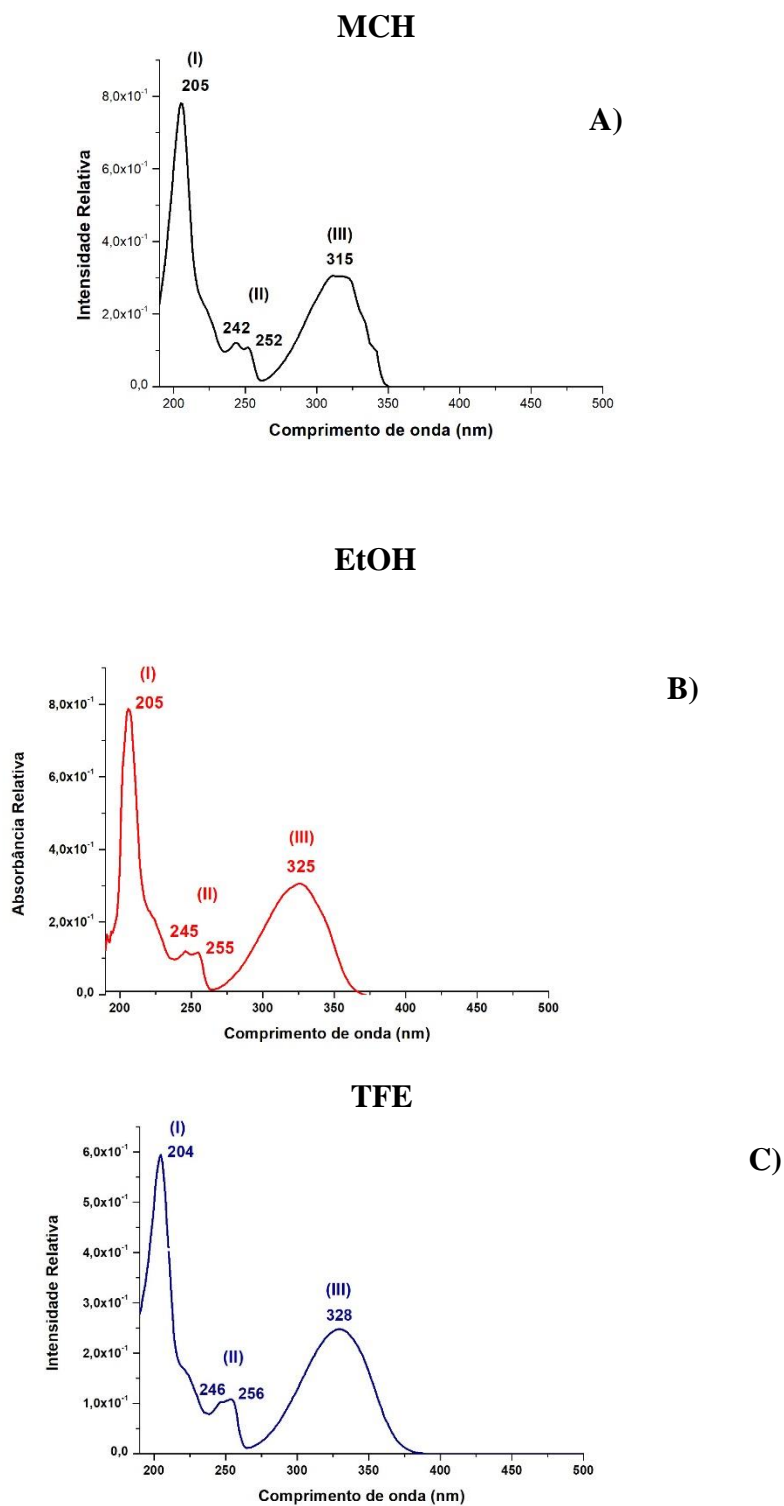
**Fonte:** Autora, (2020).

A literatura reporta duas conformações obtidas para o DMC com o cálculo DFT usando o funcional B3LYP e função de base 6-311++G(d, p), os valores são respectivamente  $-726.273682$  e  $-726.271339$  hartrees, sendo esse último a conformação mais estável conforme (SARIKAYA e DERELI, 2014). Para esta pesquisa calculou-se a espécie mais abundante de menor energia com o B3LYP/6-311+G\*\*, os resultados obtidos foram para três espécies do DMC: a espécie em vácuo, o complexo formando ligação de hidrogênio com o etanol e outro com o 2,2,2-trifluoetanol, os valores são respectivamente  $-726.270794$ ,  $-881.375638$  e  $-1179.202777$  hartrees, considerando moléculas rígidas e isoladas, simulando o estado sólido observado a 77K.

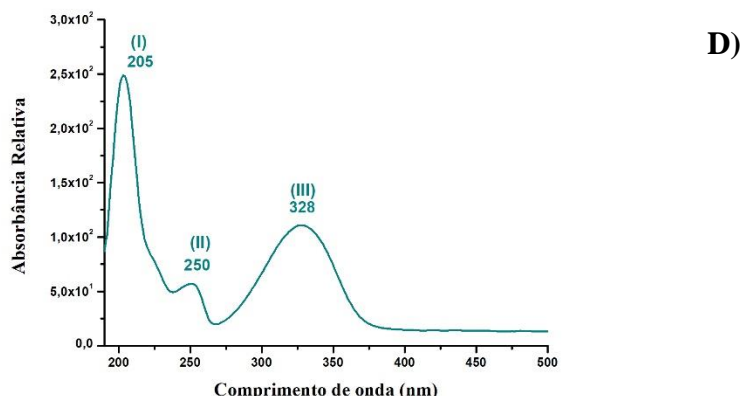
### 5.1 Espectros experimentais de absorção UV/VIS do DMC

Os espectros experimentais de absorção UV/Vis do DMC à temperatura ambiente foram obtidos com os solventes: metilciclohexano (MCH), etanol (EtOH), 2,2,2-trifluoetanol (TFE) e Tampão (pH=7,0). Em MCH e solução tampão a concentração analisada foi de  $1 \times 10^{-4}$  mol/L devido baixa solubilidade do DMC nesses solventes, já em

EtOH e TFE a concentração analisada foi  $1 \times 10^{-5}$  mol/L. O DMC apresenta dois cromóforos, o anel da pirona e o anel do benzeno e ambos possuem elétrons  $\pi$  em sua estrutura, além dos elétrons não ligantes provenientes dos orbitais “n” presentes em átomos como o oxigênio. A figura 22 apresenta os espectros de absorção do DMC em MCH a  $10^{-4}$  mol/L, EtOH e TFE, ambos a  $10^{-5}$  mol/L e Tampão (pH=7,0) a  $10^{-4}$  mol/L.



### Tampão pH 7,0



**Figura 23:** Espectros UV/Vis de absorção da DMC a 25°C em (A) MCH a  $10^{-4}$  M, (B) EtOH a  $10^{-5}$  M, (C) TFE a  $10^{-5}$  M e (D) Tampão (pH=7,0).

**Fonte:** Autora, (2020).

Os espectros experimentais UV/Vis do DMC apresentaram três bandas de absorção em todos os solventes. Em MCH a banda (I) é situada em 205 nm (com absorbância 0,812), a banda (II) em 242 nm (0.114) com um ombro em 252 nm (0.112) e banda (III) 315 nm (0.301). Para DMC em etanol as bandas são situadas em (I) 205 nm (0.776), (II) 245 nm (0.118) com um ombro em 255 nm (0.116) e (III) 325 nm (0.305). Em TFE os máximos das bandas são: (I) 204 nm (0.593), (II) 246 nm (0.102) com um ombro em 256 nm (0.108) e (III) 328 nm (0.251). Já em solução tampão a banda (I) é situada em 205 nm (com absorbância  $2,4 \times 10^2$ ), a banda (II) é caracterizada por somente um pico em 250 nm ( $2,4 \times 10^1$ ) e banda (III) 328 nm ( $1,0 \times 10^1$ ). Todas as bandas de absorção foram atribuídas a transições características do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , porém, a banda (III) devido suas características espectrais mais larga sugere a existência de transições  $n \rightarrow \pi^*$  escondida sob essa banda.

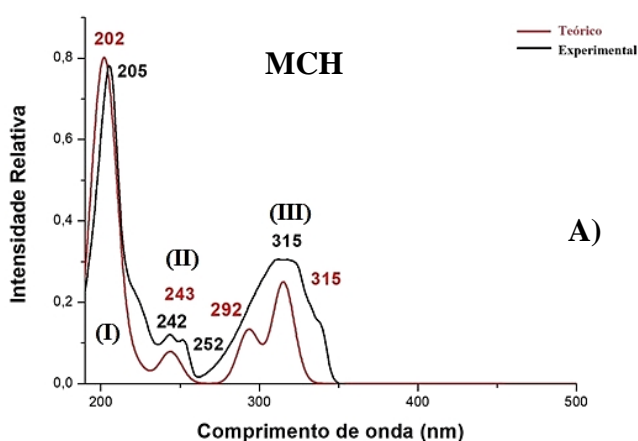
Ao comparar os quatros espectros notamos que esses são similares, porém as bandas (II) e (III) em EtOH, TFE e tampão sofreram deslocamentos para o vermelho todas em relação as bandas de absorção em MCH. As bandas (II) e (III) deslocaram, respectivamente, 2 e 3 nm em EtOH e 10 nm e 13 nm em TFE, já para a solução tampão os deslocamentos foram 8 nm para banda (II) e 13 nm para banda (III). O deslocamento de 13 nm da banda (III) no solvente TFE é mais acentuado do que em etanol, devido à eletronegatividade do grupo trifluorometil, que possui  $pK_a = 12,4$ , apresentando caráter ácido mais forte que o etanol, que possui  $pK_a = 15,9$ . (BROWN et al, pg.168, 2009). O mesmo ocorre em solução tampão, uma vez que se aumenta a polaridade do solvente.

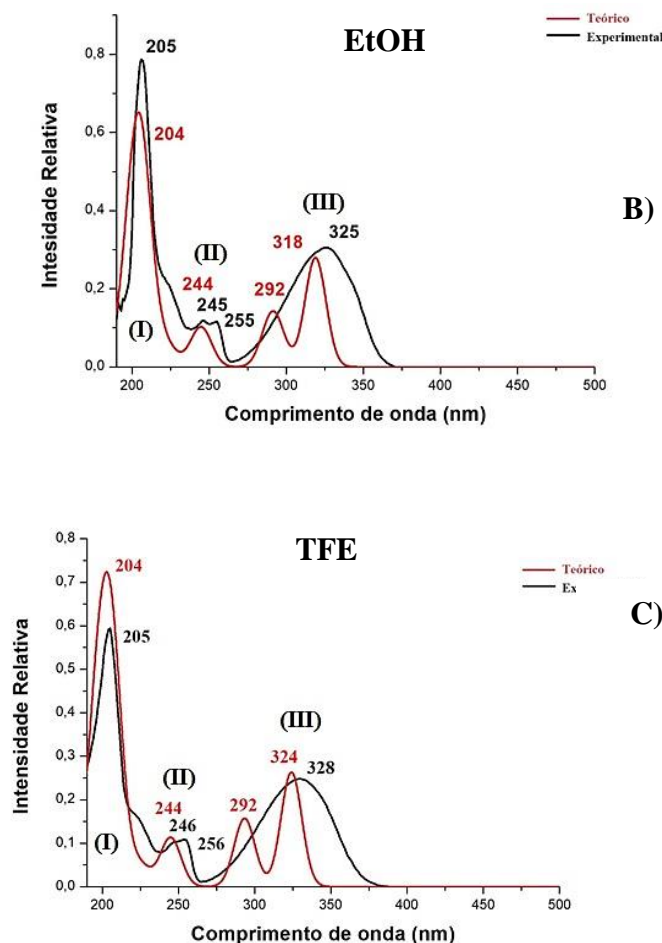
O efeito do solvente (tópico 3.5) pode fornecer a informação dos principais cromóforos absorptivos do DMC. Nota-se que a banda (I) permanece inalterada mesmo com efeito do solvente, entretanto as bandas (II) e (III) para etanol e 2,2,2-trifluoretanol sofreram deslocamento para a região do vermelho. A justificativa deve-se ao aumento da energia das transições  $n \rightarrow \pi^*$  que ocorrem quando se aumenta a polaridade do solvente, permitindo a formação da ligação de hidrogênio que deve acontecer entre a carbonila do anel da pirona e a hidroxila do solvente, indicando que o cromóforo absorptivo é o anel da pirona para essas duas bandas. Como não houve deslocamento para a banda (I), sugere-se que o cromóforo absorptivo responsável por essa transição seja o anel benzênico, pois não sofre mudanças com o aumento da polaridade do solvente.

## 5.2 Cálculos Teóricos para o DMC

### 5.2.1 Espectros Teóricos UV/VIS de absorção

O espectro de absorção teórico UV/VIS do DMC apresentou quatro bandas para todos os solventes analisados, foram eles: vácuo para simular o solvente hidrofóbico (apolar), o monômero formando ligação de hidrogênio com a hidroxila do etanol e do 2,2,2-trifluoretanol para simular o ambiente hidroxilado e polar. A figura 23 apresenta com os espectros de absorção teórico do DMC.





**Figura 24:** Espectro teórico de absorção UV/VIS para o DMC (A) MCH, (B) EtOH e (C) TFE calculados com o TDDFT e B3LYP/6-311+G\*\*.

**Fonte:** Autora, (2020).

No solvente hidrofóbico (espectro A) a banda (I') situada em 202 nm e força do oscilador ( $f=0,5241$ ) corresponde a uma transição do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos orbitais moleculares HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO+1, tendo como cromóforo absorptivo o anel benzênico; conforme observado experimentalmente; análogo a banda (I) do espectro experimental. A banda (II') em 243 nm com ( $f=0,0780$ ) corresponde a uma transição do HOMO  $\rightarrow$  LUMO+1 do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  proveniente da pirona para o anel benzênico, representando a banda (II) do espectro experimental. A banda (III') em 292 nm com ( $f=0,1322$ ) caracteriza-se uma transição do tipo HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  do anel benzênico para a pirona. Por último a banda (IV') em 315 nm com ( $f=0,2493$ ) que corresponde a banda (III) do espectro experimental, representando a transição dos orbitais HOMO  $\rightarrow$  LUMO, do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  da pirona para própria pirona, que é o cromóforo absorptivo mais importante do DMC.

Tais análises são concordantes com as nossas interpretações dos espectros de absorção experimentais, uma vez que as bandas de absorção são semelhantes e coincidentes, exceto a banda (III) do espectro experimental que representam as duas bandas de absorção (III') e (IV') do espectro teórico. Os dados teóricos e experimentais para o espectro UV/Vis do DMC encontram-se apresentados na tabela 1 e podem ser observados comparativamente.

**Tabela 1:** As energias de excitação, E (eV), singlete, comprimento de onda,  $\lambda$ (nm), dos espectro UV/VIS do DMC em metilciclohexano observado e calculado. Força de oscilador (f-valor), transição e amplitude, calculados.

Experimental				Calculado						
S	E (ev)	$\Lambda$ (nm)	Banda	E (ev)	$\Lambda$ (nm)	f-valor	Transição	%	Amplitude	Natureza
1	3,93	315	III	3,93	315,17	0,2493	HOMO→LUMO	83	0,9100	$\pi,\pi^*$
2				4,23	293,35	0,1322	HOMO-1→LUMO	78	0,8813	$\pi,\pi^*$
3	5,12	242	II	5,10	242,70	0,0780	HOMO→LUMO+1	75	0,8664	$\pi,\pi^*$
4				5,15	240,67	0,0008	HOMO→LUMO+2	97	0,9857	$\pi,\pi^*$
5				5,53	224,03	0,0214	HOMO→LUMO+3	58	-0,7595	$\pi,\pi^*$
6				5,55	223,42	0,0016	HOMO→LUMO+4	82	0,9070	$\pi,\pi^*$
7				5,67	218,86	0,0076	HOMO-1→LUMO+2	97	0,9825	$\pi,\pi^*$
8				5,69	217,91	0,0243	HOMO-3→LUMO	45	0,6709	$\pi,\pi^*$
9				5,81	213,50	0,0041	HOMO→LUMO+5	78	0,8823	$\pi,\pi^*$
10	6,04	205	I	6,05	205,09	0,5241	HOMO-1→LUMO+1	44	0,6632	$\pi,\pi^*$
11				6,08	203,84	0,0012	HOMO→LUMO+6	47	0,6831	$\pi,\pi^*$
12				6,14	202,05	0,0007	HOMO→LUMO+6	45	0,6705	$\pi,\pi^*$
13				6,16	201,36	0,0001	HOMO-2→LUMO+1	75	0,8672	$n,\pi^*$
14				6,25	198,48	0,1548	HOMO→LUMO+7	72	0,6989	$\pi,\pi^*$
15				6,30	196,84	0,2483	HOMO-1→LUMO+3	32	-0,5679	$\pi,\pi^*$
16				6,33	195,94	0,0031	HOMO→LUMO+8	61	0,7805	$\pi,\pi^*$
17				6,35	195,15	0,0001	HOMO-1→LUMO+5	57	0,7568	$\pi,\pi^*$
18				6,36	194,80	0,0005	HOMO-1→LUMO+5	71	0,8409	$\pi,\pi^*$
19				6,39	194,05	0,0005	HOMO→LUMO+9	63	0,7955	$\pi,\pi^*$
20				6,63	186,89	0,0004	HOMO-2→LUMO+3	33	0,5711	$n,\pi^*$

Fonte: Autora, (2020).

Para o meio hidroxilado (espectro B) o UV/VIS teórico calculado com o TDDFT para o DMC em etanol apresentou quatro bandas de absorção observadas em: 204, 244, 292 e 318 nm. A banda (I') em 204 nm e ( $f= 0,5232$ ) é similar ao espectro teórico em meio hidrofóbico, essa corresponde a uma transição do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  pelos orbitais moleculares HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO+1, que possui como cromóforo absorptivo o anel benzênico. A banda (II') em 244 nm com ( $f= 0,1017$ ) possui deslocamento de 1 nm para o vermelho e corresponde a uma transição do HOMO  $\rightarrow$  LUMO+1, do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  proveniente da pirona para o anel benzênico.

A banda (III') em 292 nm com ( $f= 0,0735$ ) semelhante ao espectro teórico do meio hidrofóbico caracteriza uma transição do tipo HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  do anel benzênico para a pirona. Por último ainda na banda (III') em 318 nm com ( $f= 0,2793$ ) apresentou deslocamento de 3 nm para o vermelho (em relação ao espectro A em vácuo) e representa uma transição do HOMO  $\rightarrow$  LUMO, do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  da pirona para própria pirona, o que justifica o deslocamento para o vermelho em ambos os espectros (teórico e experimental), pois esse cromóforo apresenta sensibilidade ao efeito do solvente. Os dados experimentais e teóricos encontram-se apresentados na tabela 2 a seguir.

**Tabela 2:** As energias de excitação, E (eV), singlete, comprimento de onda,  $\lambda$ (nm), dos espectro UV/VIS do DMC em etanol observado e calculado. Força de oscilador (f-valor), transição e amplitude, calculados.

Experimental				Calculado						
S	E (ev)	$\Lambda$ (nm)	Banda	E (ev)	$\Lambda$ (nm)	f-valor	Transição	Amplitude	Natureza	
1	3,81	325	III	3,89	318,91	0,2793	HOMO $\rightarrow$ LUMO	86	0.9270	$\pi, \pi^*$
2				4,23	292,84	0,0735	HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO	79	0.8912	$\pi, \pi^*$
3				4,28	289,91	0,0726	HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO	73	0.8536	$n, \pi^*$
4	5,06	245	II	5,07	244,70	0,1017	HOMO $\rightarrow$ LUMO+1	75	0.8644	$\pi, \pi^*$
5				5,20	238,47	0,0007	HOMO $\rightarrow$ LUMO+2	97	0.9860	$\pi, \pi^*$
6				5,52	224,71	0,0280	HOMO $\rightarrow$ LUMO+3	61	0.7834	$\pi, \pi^*$
7				5,62	220,63	0,0013	HOMO $\rightarrow$ LUMO+4	75	0.8653	$\pi, \pi^*$
8				5,69	218,03	0,0270	HOMO-4 $\rightarrow$ LUMO	51	-0.7142	$n, \pi^*$
9				5,74	216,18	0,0001	HOMO-5 $\rightarrow$ LUMO	91	0.9539	$\pi, \pi^*$
10				5,76	215,23	0,0090	HOMO-2 $\rightarrow$	76	0.8722	$n, \pi^*$



						LUMO+2				
<b>11</b>				5,78	214,42	0,0170	HOMO-1→LUMO+1	84	0.9180	$\pi,\pi^*$
<b>12</b>				5,86	211,73	0,0035	HOMO→LUMO+5	72	0.8481	$\pi,\pi^*$
<b>13</b>	<b>6,04</b>	<b>205</b>	<b>I</b>	<b>6,03</b>	<b>205,48</b>	0,5232	HOMO-2→LUMO+1	46	0.6799	$\pi,\pi^*$
<b>14</b>				6,10	203,09	0,0002	HOMO-1→LUMO+2	78	0.8860	$\pi,\pi^*$
<b>15</b>				6,18	200,56	0,0085	HOMO-1→LUMO+3	83	0.9133	$\pi,\pi^*$
<b>16</b>				6,21	199,80	0,0007	HOMO→LUMO+6	51	0.7128	$\pi,\pi^*$
<b>17</b>				6,23	199,17	0,0001	HOMO→LUMO+6	39	0.6226	$\pi,\pi^*$
<b>18</b>				6,27	197,58	0,1863	HOMO→LUMO+8	60	0.7747	$\pi,\pi^*$
<b>19</b>				6,31	196,63	0,0001	HOMO-3→LUMO+1	73	-0.8516	$\pi,\pi^*$
<b>20</b>				6,35	195,15	0,0001	HOMO-1→LUMO+5	57	0.7568	$\pi,\pi^*$

Fonte: Autora, (2020).

Para o DMC em TFE (espectro C) a banda (I') em 204 nm com ( $f= 0,5197$ ) é semelhante aos demais espectros e corresponde a uma transição do tipo  $\pi\rightarrow\pi^*$  pelos orbitais moleculares HOMO-1→LUMO+1, que possui como cromóforo absorvivo o anel benzênico. A banda (II') em 244 nm com ( $f= 0,1124$ ) teve deslocamento de 2 nm para o vermelho e corresponde a uma transição do HOMO→LUMO+1, do tipo  $\pi\rightarrow\pi^*$  proveniente da pirona para o anel benzênico. A banda (III') em 292 nm ( $0,1571$ ) é semelhante aos demais espectros, essa caracteriza uma transição do tipo HOMO-1 →LUMO do tipo  $\pi\rightarrow\pi^*$  do anel benzênico para a pirona. Por último a banda (IV') em 324 nm com ( $f= 0,2631$ ) deslocou para o vermelho 9 nm em relação ao espectro em meio hidrofóbico, essa transição envolve os orbitais HOMO→LUMO, do tipo  $\pi\rightarrow\pi^*$  da pirona para própria pirona, o que justifica o deslocamento para a região do vermelho pois, este cromóforo apresenta sensibilidade ao efeito do solvente, pois sob essa banda existe as transições  $n\rightarrow\pi^*$ .

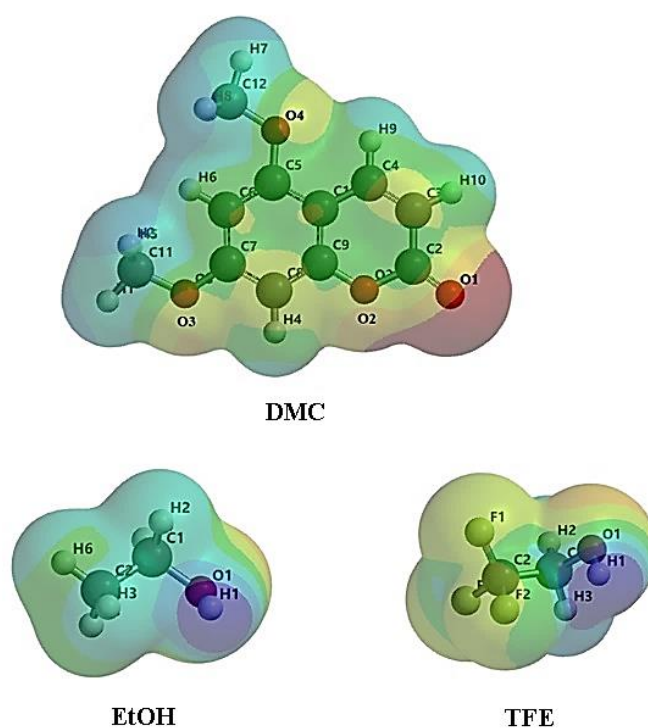
Esses dados encontram-se apresentados na tabela 3 e podem ser observados comparativamente.

**Tabela 3:** As energias de excitação, E (eV), singlete, comprimento de onda,  $\lambda$ (nm), dos espectro UV/VIS do DMC em 2,2,2-trifluoretanol observado e calculado. Força de oscilador (f-valor), transição e amplitude, calculados.

Experimental				Calculado						
S	E (ev)	$\Lambda$ (nm)	Banda	E (ev)	$\Lambda$ (nm)	f-valor	Transição	Amplitude	Natureza	
1	3,78	328	III	3,83	324,07	0,2631	HOMO→ LUMO	86	0.9290	$\pi,\pi^*$
2				4,23	293,34	0,1571	HOMO- 1→ LUMO	80	0.8951	$\pi,\pi^*$
3				4,96	249,85	0,0001	HOMO- 2→ LUMO	66	0.8113	$n,\pi^*$
4	5,04	246	II	5,06	244,82	0,1124	HOMO→ LUMO+1	75	0.8646	$\pi,\pi^*$
5				5,28	234,92	0,0007	HOMO→ LUMO+2	97	0.9833	$\pi,\pi^*$
6				5,51	225,20	0,0387	HOMO→ LUMO+3	50	0.7067	$\pi,\pi^*$
7				5,65	219,29	0,0157	HOMO- 4→ LUMO	41	0.6413	$n,\pi^*$
8				5,66	218,93	0,0015	HOMO → LUMO+4	86	0.9295	$\pi,\pi^*$
9				5,84	212,17	0,0099	HOMO- 1→ LUMO+2	95	0.9772	$\pi,\pi^*$
10				5,94	208,69	0,0035	HOMO → LUMO+5	83	0.9115	$\pi,\pi^*$
11	6,04	205	I	6,02	205,92	0,5197	HOMO- 1→ LUMO+1	54	0.7325	$\pi,\pi^*$
12				6,25	198,35	0,0016	HOMO- 1→ LUMO+4	48	0.6960	$\pi,\pi^*$
13				6,28	197,34	0,0061	HOMO→ LUMO+6	51	0.7148	$\pi,\pi^*$
14				6,30	196,89	0,3216	HOMO- 1→ LUMO+3	35	0.5937	$\pi,\pi^*$
15				6,34	195,63	0,0015	HOMO- 2→ LUMO+1	44	0.6161	$\pi,\pi^*$
16				6,35	195,15	0,0001	HOMO- 1→ LUMO+5	57	0.7564	$\pi,\pi^*$
17				6,37	194,73	0,0003	HOMO- 5→ LUMO	91	0.9547	$n,\pi^*$
18				6,38	194,45	0,0393	HOMO → LUMO+7	68	0.8262	$\pi,\pi^*$
19				6,40	193,63	0,0087	HOMO → LUMO+8	70	0.8339	$\pi,\pi^*$
20				6,51	190,33	0,0006	HOMO- 2→ LUMO+1	51	0.7171	$\pi,\pi^*$

Fonte: Autora, (2020).

Os cálculos de DFT fornecem os valores de comprimento da ligação de hidrogênio ( $O\cdots H$ ) de 1,70 Å e 1,90 Å para os complexos formados entre DMC-TFE e DMC-EtOH respectivamente. Na literatura o valor mais observado para o comprimento da ligação de hidrogênio de complexos fortemente ligados de ( $O\cdots H$ ) é 1,72 Å, (LINNEL, VINOGRADOV, 1971). O mapa de potencial eletrostático confirma que a região de maior carga negativa (cor vermelha) da DMC está na carbonila do anel da pirona, que, portanto, configura a região onde deve-se formar a ligação de hidrogênio. A figura 24 apresenta o mapa de potencial eletrostático calculado com o DFT a 6-311G\*\*/B3LYP.



**Figura 25:** Mapa de potencial eletrostático para DMC, EtOH e TFE, calculados com o DFT a 6-311G\*\*/B3LYP.

**Fonte:** Autora, (2020).

Os cálculos de DFT forneceram os resultados sobre as cargas naturais para DMC, EtOH e TFE, que podem ser observados na tabela 1.

**Tabela 4:** Cargas naturais

DMC	EtOH	TFE
(O1) = -0,564	(O1) = -0,740	(O1) = -0,714

(O2) = -0,508	(H1) = +0,452	(H1) = +0,470
(O3) = -0,511	(H2) = +0,150	(H2) = +0,205
(O4) = -0,522	(H3) = +0,190	(H3) = +0,183

Fonte: Autora, (2020).

A partir dos valores de cargas naturais pode-se constatar que a ligação de hidrogênio formada deve ocorrer preferencialmente pela carbonila do anel da pirona, com o hidrogênio mais positivos do EtOH e TFE, que são respectivamente H1 e H1. Tal região representa o principal cromóforo absorptivo do DMC, uma vez que o solvente perturba eletronicamente a pirona e essa promove os deslocamentos de bandas de absorção para a região do vermelho. Os mapas de orbitais moleculares podem ilustrar as regiões dos orbitais de fronteiras (FMOs), que envolve o HOMO (cor vermelha) e LUMO (cor azul), estes podem fornecer a ideia do fluxo eletrônico presente na molécula e prever reatividade molecular, uma vez que reações químicas são governadas por elétrons. (PEREIRA, D. H.; LA PORTA, F. A.; SANTIAGO, 2016). A respeito da reatividade molecular do DMC, calculou-se a diferença energética dos orbitais moleculares HOMO e LUMO. A figura 25 apresenta os orbitais HOMO e LUMO calculados com o TDDFT e B3LYP/6-311+G\*\*.

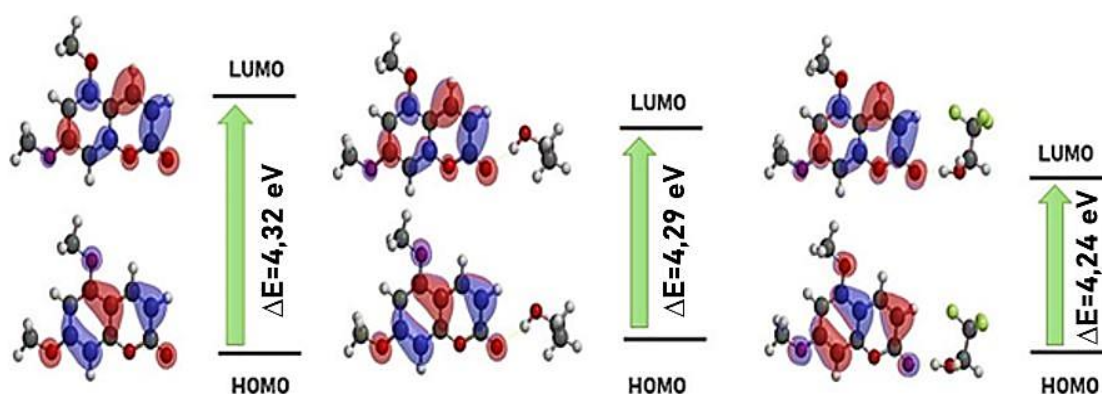


Figura 26: Energia dos orbitais HOMO e LUMO do DMC calculados com o TDDFT e B3LYP/6-311+G\*\*.

Fonte: Autora, (2020).

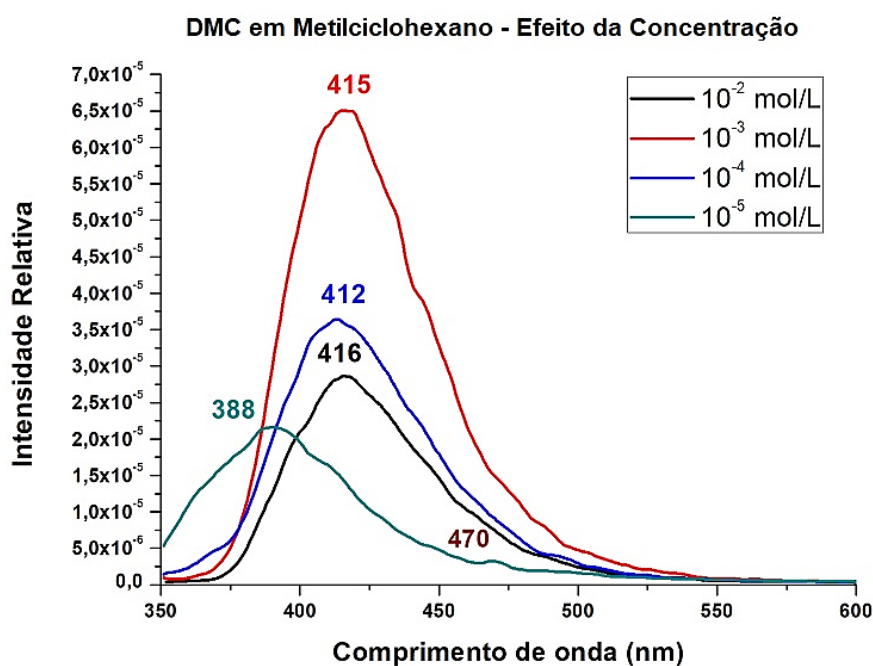
O  $\Delta E$  entre HOMO e LUMO sugere que o DMC solubilizado em 2,2,2-trifluoretanol apresentaria maior reatividade, uma vez que apresenta menor valor de  $\Delta E$  comparado aos demais solventes, indicando assim que este pode apresentar propriedades farmacológicas

diferente dos demais. Porém, partir somente dos dados obtidos no cálculo do UV/Vis não é o suficiente para caracterizar as espécies solubilizadas nos meios hidrofóbico e hidrofílico. Para determinar a espécie ativa do DMC utiliza-se a espectroscopia de emissão a 77 K, desse modo, será possível identificar qual a espécie ativa a penetrar a micela que representa o modelo de membrana biológica.

### 5.3 Espectros de emissão a 77 K do DMC

#### 5.3.1 Espectros de emissão a 77 K do DMC em meio hidrofóbico

Na figura 26 temos os espectros de emissão a 77 K da DMC em metilciclohexano realizando o efeito da concentração entre  $10^{-2}$  até  $10^{-5}$  mol/L.



**Figura 27:** Espectros de emissão a 77 K para DMC em metilciclohexano com o efeito da concentração.

**Fonte:** Autora, (2020).

O espectro de emissão a  $10^{-2}$  mol/L tem o máximo da fluorescência em 416 nm e aparentemente nenhuma fosforescência, sua intensidade relativa é inferior as concentrações  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  mol/L pois o DMC apresenta baixa solubilidade em metilciclohexano. Ainda nas concentrações  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  mol/L tem-se a emissão de fluorescência com máximo em 415 e 412 nm, respectivamente e nenhuma fosforescência. Essas três emissões foram assinaladas

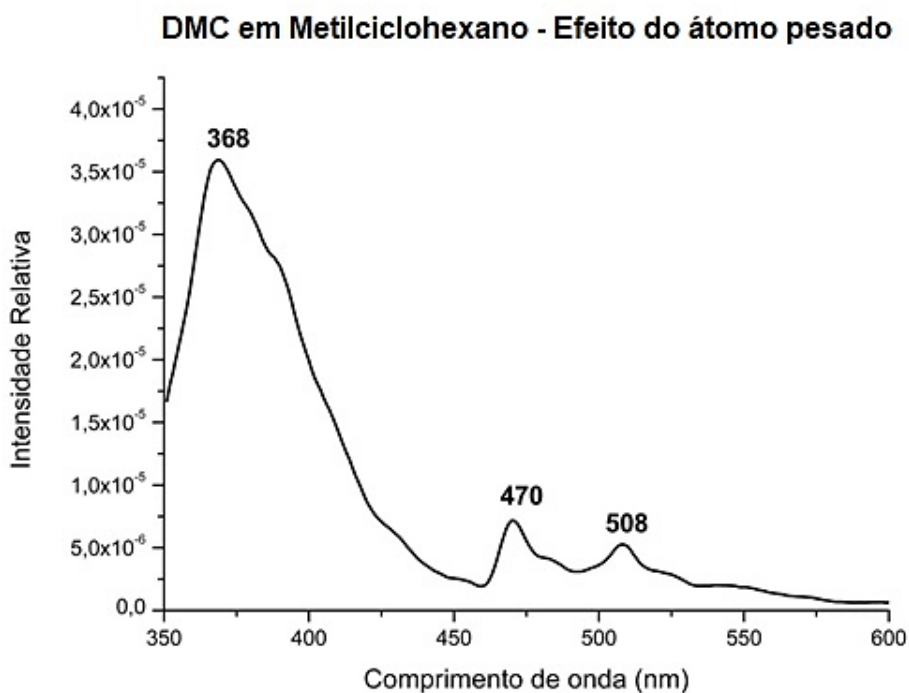
como provenientes da espécie agregado molecular, formada através de autoagregação da DMC, via ligação de hidrogênio intramolecular (AM-H).

Para o DMC na concentração de  $10^{-5}$  mol/L tem-se a emissão da fluorescência em 388 nm e a presença de um pico discreto de fosforescência representado pela banda 0-0 em 470 nm. Observa-se que a fluorescência está deslocada para o azul em relação ao espectro na concentração  $10^{-2}$  mol/L aproximadamente  $\cong 28$  nm, com o máximo da fluorescência em 388 nm e a banda 0-0 da fosforescência em 470 nm. Portanto, a partir dessas características espectrais a emissão do espectro em  $10^{-5}$  mol/L foi assinalada como proveniente da espécie do monômero do DMC (M) em meio hidrofóbico.

O grande deslocamento da fluorescência para o azul observado no (M) indica que em altas concentrações do DMC a espécie (AM-H) é muito estável em meio hidrofóbico. Diminuindo a concentração o agregado molecular desagrega deslocando o equilíbrio entre (AM-H) e (M) totalmente para o monômero. Em resumo, o agregado molecular é muito estável em solvente hidrofóbico e a desagregação só ocorre quando a solução está muito diluída. Os cálculos semi-empíricos (PM3) reforçam tal argumento, uma vez que o calor de formação ( $\Delta H_{\text{formação}}$ ) para o agregado molecular é menor do que para o (M), [ $(\Delta H_{\text{formação}}) = -1456,3275$  kJ/mol para o (AM-H) e  $-474,3348$  kJ/mol para o (M)], confirmando que o agregado molecular é mais estável do que o monômero em maiores concentrações no solvente hidrofóbico.

O efeito do átomo pesado (tópico 3.6) foi observado para emissão do DMC na concentração  $10^{-5}$  mol/L com a presença do bromo em solução, ocorreu um aumento na velocidade do cruzamento intersistema aumentando a população do estado triplete de menor energia  $T_1$  aumentando a intensidade relativa da fosforescência. A banda da emissão da fosforescência é mostrada mais claramente com a banda 0-0 em 470 nm e novo pico proveniente da progressão vibracional em 508 nm.

A figura 28 apresenta a emissão do monômero do DMC com o efeito do átomo pesado.



**Figura 28:** Espectro de emissão a 77 K para DMC a  $10^{-5}$  mol/L em metilciclohexano com o efeito do átomo pesado.

**Fonte:** Autora, (2020).

Estudos de alta resolução sobre análises vibracionais da fosforescência das cumarinas concluíram que há uma progressão vibracional na fosforescência e que o estado emissor ( $\pi, \pi^*$ ) está parcialmente localizado na ligação (C3=C4) do anel da pirona, (SONG, 1973). Portanto, em meio hidrofóbico o DMC apresenta duas espécies emissoras: em maiores concentrações o agregado molecular (AM-H) que tem como característica a emissão de fluorescência e ausência de fosforescência e na concentração  $1 \times 10^{-5}$  M o monômero (M) que apresentou fluorescência e fosforescência.

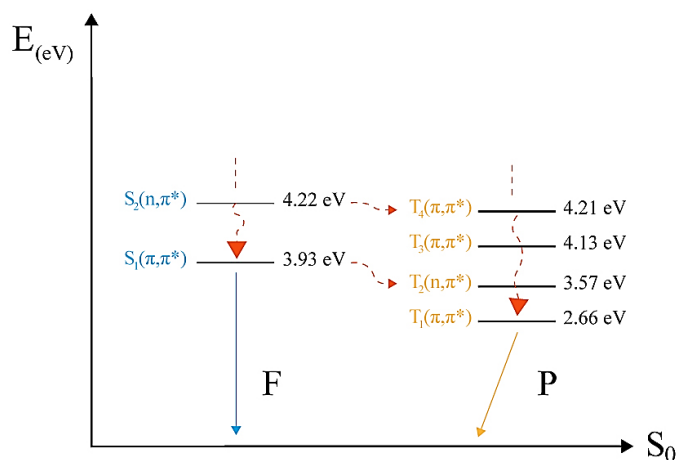
O cálculo TD-DFT com o funcional e função de base B3LYP/6-311+G\*\* informam as energias tripletes e singletes calculadas para o DMC em meio hidrofóbico conforme a tabela 5.

**Tabela 5:** Os estados eletrônicos excitados singlete e triplete do DMC calculados com método TD-DFT usando o B3LYP/6-311+G , simulando o meio hidrofóbico.

	nm	eV	f	Transição	Contribuição
T <sub>1</sub>	464,8	2,66	0	D(54)→V(1)	0,9543
T <sub>2</sub>	347,1	3,57	0	D(53)→V(1)	0,9297
S <sub>1</sub>	315,1	3,93	0,2493	D(54)→V(1)	0,9100
T <sub>3</sub>	300,2	4,13	0	D(53)→V(2)	0,7679
T <sub>4</sub>	294,5	4,21	0	D(52)→V(1)	0,9492
S <sub>2</sub>	293,3	4,22	0,1321	D(53)→V(1)	0,8813
T <sub>5</sub>	291,5	4,25	0	D(54)→V(2)	-0,8963

**Fonte:** Autora, (2020).

As propriedades fotofísicas da espécie monomérica observada experimentalmente a 77 K foram descritas usando o esquema abaixo conforme a figura 29.



**Figura 29:** Processo fotofísico de desativação da DMC em meio hidrofóbico calculado com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G\*\*.

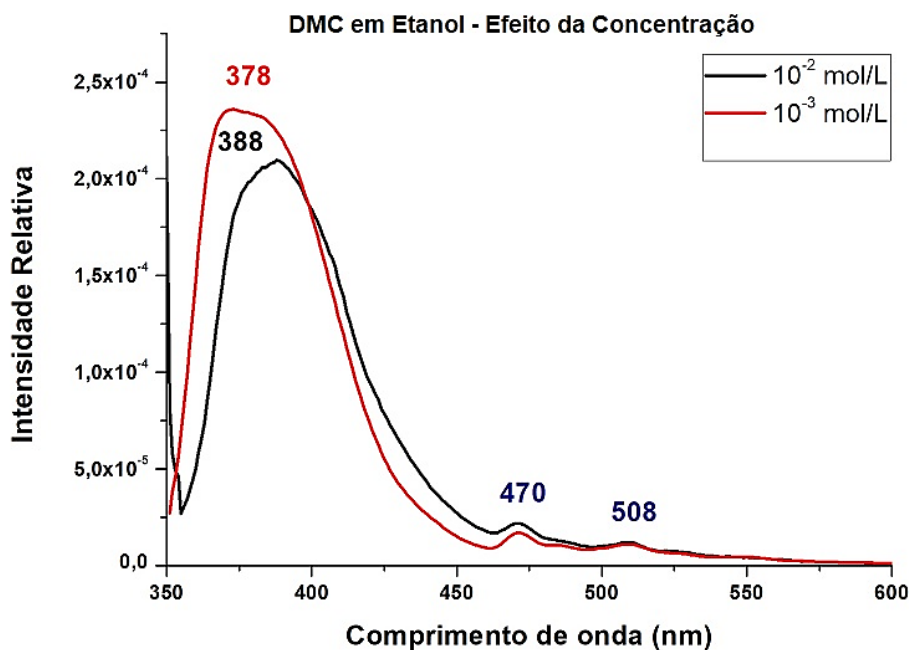
**Fonte:** Autora, (2020).



Para fotofísica do (M) tem-se que: a desativação de energia ocorre por conversão interna na forma de relaxação vibracional entre os estados eletrônicos excitados singlete de maiores energias até a molécula chegar ao estado eletrônico excitado  $S_2(n,\pi^*)$  e o estado  $S_1(\pi, \pi^*)$ . Desse modo, as moléculas populam o estado eletrônico excitado de menor energia  $S_1(\pi, \pi^*)$  que emite a fluorescência do monômero do DMC. A população do estado triplete  $T_1$  ocorre via acoplamento spin-orbital de segunda ordem do tipo:  $S_2(n,\pi^*) \sim T_4(\pi,\pi^*)$  uma vez que encontram-se muito próximos, com diferença de 0,01 eV e os estados excitados  $S_1(\pi,\pi^*) \sim T_2(n,\pi^*)$  iguais 0,36 eV, o que favorece o fraco acoplamento spin-orbital de segunda ordem do tipo:  $S_2(n,\pi^*) \sim T_4(\pi,\pi^*) \sim T_3 \sim T_2 \sim T_1(\pi,\pi^*)$ , populando pobremente o estado  $T_1(\pi,\pi^*)$ , o que justifica a emissão fraca da fosforescência.

### 5.3.2 Espectros de emissão a 77 K do DMC em meio hidrofóbico (etanol)

Para o DMC em etanol (figura 30), as concentrações analisadas foram entre  $1 \times 10^{-2}$  a  $1 \times 10^{-5}$  mol/L.

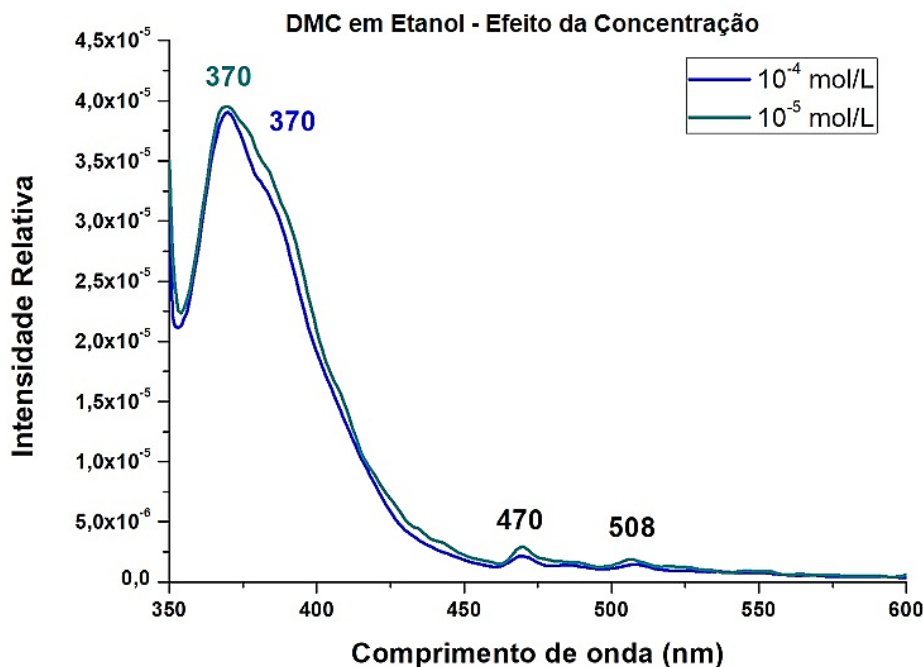


**Figura 30:** Espectros de emissão a 77 K para DMC em etanol com o efeito da concentração em  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  mol/L.

**Fonte:** Autora, (2020).

Na concentração  $10^{-2}$  mol/L tem-se o máximo da fluorescência em 388 nm e para  $10^{-3}$  mol/L a fluorescência possui um máximo em 378 nm, ambos os espectros possuem a banda de fosforescência com dois picos, um em 470 nm e outro aparentemente em 508 nm.

A figura 31 está a emissão do DMC a  $10^{-4}$  mol/L e  $10^{-5}$  mol/L, com o máximo da fluorescência em 370 nm e uma banda de fosforescência com dois picos, a banda 0-0 em 470 e um pico em 508 nm, mostrando que a fosforescência é igual à do (AM-H), Fig. 27.



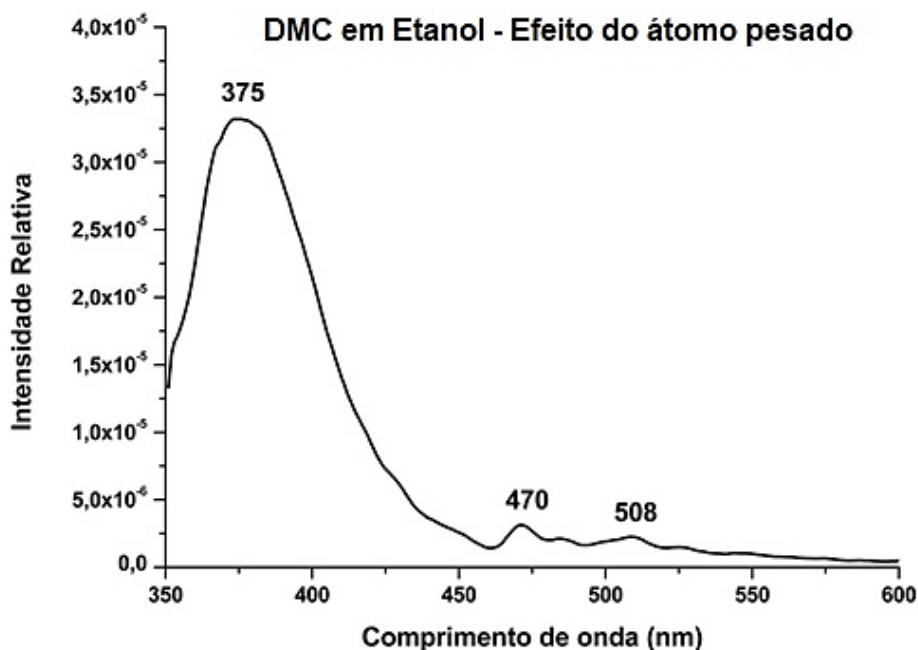
**Figura 31:** Espectros de emissão a 77 K para DMC em etanol com o efeito da concentração em  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  mol/L.

**Fonte:** Autora, (2020).

Na Fig 31 estão as emissões nas concentrações ( $1 \times 10^{-4}$  e  $1 \times 10^{-5}$  mol/L), nota-se que a fluorescência está deslocada para o azul aproximadamente  $\cong 18$  nm em relação ao espectro na concentração  $10^{-2}$  mol/L e 8 nm em relação a concentração  $1 \times 10^{-3}$  M e a espécie emissora foi assinalada como agregação molecular ligada através de ligações de hidrogênio intramoleculares, (AM-H). Conseqüentemente, em menores concentrações ( $1 \times 10^{-4}$  até  $1 \times 10^{-5}$  M) ocorre a desagregação molecular e a formação do monômero do complexo de ligação de hidrogênio com o etanol, via carbonila com a hidroxila do etanol (M-H).

A figura 31 apresenta o espectro do DMC a  $10^{-5}$  mol/L com o efeito do átomo pesado. Comparando com o espectro da Fig 30, concentração  $1 \times 10^{-5}$  M, nota-se o aumento da intensidade relativa da banda da fosforescência em relação a fosforescência da Fig 30, e como foi observado para o MCH em metilciclohexano, Fig. 27. A banda 0-0 está situada em 470 nm e o segundo pico em 508 nm, a banda da fosforescência é semelhante àquela da banda

de fosforescência do DMC em MCH, concentração  $1 \times 10^{-5}$  M Fig 27. Em meio hidrofóbico, metilciclohexano e etanol, a emissão da fosforescência é localizada, provavelmente no anel da pirona, o que está de acordo com a literatura e o estado emissor  $T_1$  é  $(\pi, \pi^*)$ .



**Figura 32:** Espectro de emissão a 77 K para DMC a  $10^{-5}$  mol/L em etanol com o efeito do átomo pesado.

**Fonte:** Autora, (2020).

Os resultados indicam que as espécies emissoras do DMC dissolvido em etanol são: agregado molecular com ligação de hidrogênio (AM-H) e monômero formando um complexo com ligação de hidrogênio entre a pirona do DMC com a hidroxila do etanol (M-H). Os resultados dos cálculos TD-DFT usando o funcional e função de base B3LYP/6-311+G\*\* estão na tabela 6.

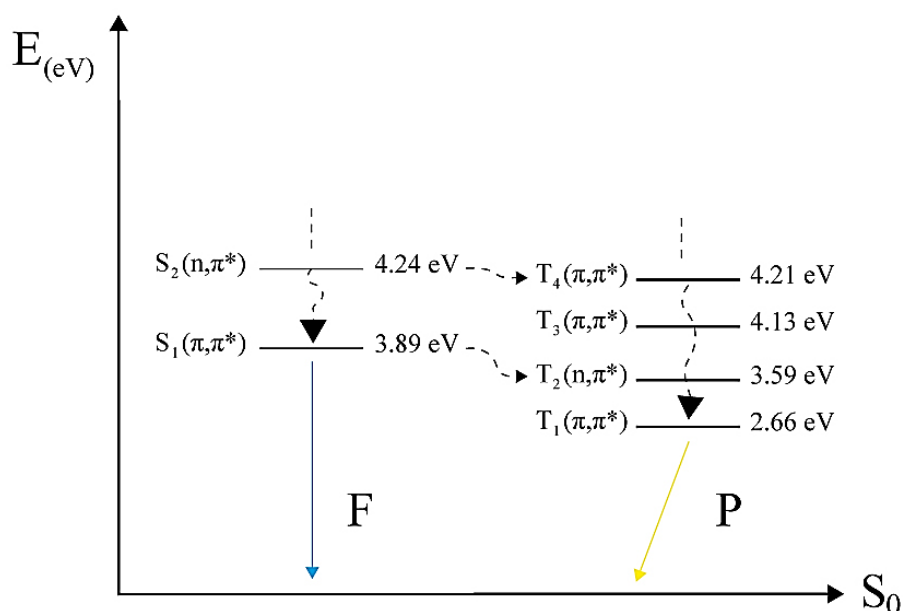
**Tabela 6:** Os estados eletrônicos excitados singlete e triplete do DMC calculados com método TD-DFT usando o B3LYP/6-311+G, simulando o meio hidrofóbico etanol.

	nm	eV	f	Transição	Contribuição
$T_1$	466,0	2,66	0	D(67)→V(1)	0,9537
$T_2$	345,3	3,59	0	D(65) →V(1)	0,8288
$S_1$	318,9	3,88	0,2793	D(67) →V(1)	0,9270

T <sub>3</sub>	300,0	4,13	0	D(65) → V(2)	0,6671
T <sub>4</sub>	294,3	4,21	0	D(67) → V(2)	0,8678
S <sub>2</sub>	292,8	4,23	0,0734	D(66) → V(1)	0,8912
T <sub>5</sub>	291,7	4,24	0	D(67) → V(2)	-0,8427

Fonte: Autora, (2020).

As propriedades fotofísicas do monômero (M-H) considerando os resultados experimentais a 77 K e os cálculos TDDFT estão esquematizadas na figura 32.



**Figura 33:** Processo fotofísico de desativação da DMC em meio hidrofóbico (etanol) calculado com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G\*\*.

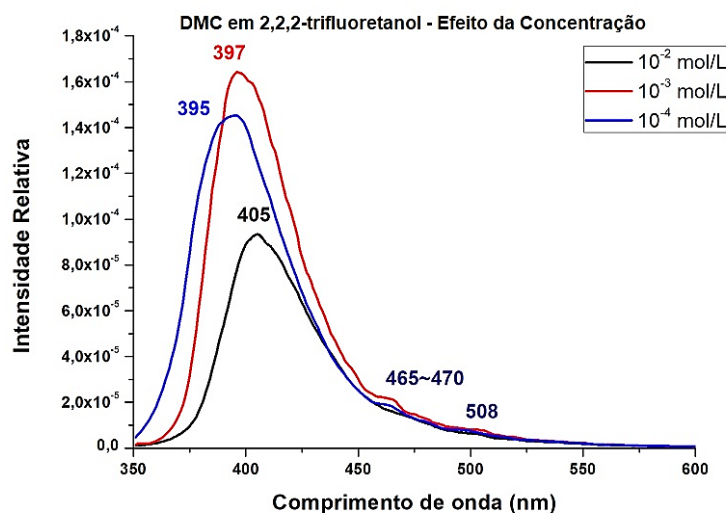
Fonte: Autora, (2020).

Comparando as figuras 29 e 33 pode-se verificar o efeito da ligação de hidrogênio nas propriedades fotofísicas do DMC em etanol, o estado eletrônico excitado singlete S<sub>2</sub> (n,π\*) aumentou de energia, caracterizado pelos deslocamentos para o azul da fluorescência enquanto o estado S<sub>1</sub> (π,π\*) diminuiu de energia conforme observado no efeito solvente (tópico 3.5). Assim o complexo monomérico (M-H) após excitação é desativado energeticamente por desativação radiativa via fluorescência e fosforescência sendo a fluorescência é mais intensa do que a fosforescência.

Os cálculos TD-DFT sugerem que a população do estado eletrônico excitado triplete  $T_1(\pi, \pi^*)$  foi feita através do acoplamento spin-orbital entre os estados  $S_2(n, \pi^*)$  e  $T_4(\pi, \pi^*)$  que estão um pouco mais afastados (0,03 eV) e os estados excitados  $S_1(n, \pi^*)$  e  $T_2(\pi, \pi^*)$ , o que pode influenciar na intensidade da fosforescência, seguidos de desativação não radiativa via conversão interna emitindo a fosforescência através do estado  $T_1(\pi, \pi^*)$ , com a contribuição dos orbitais  $D(67) \rightarrow V(1)$  localizados na região da pirona. A fotofísica do (M-H) é similar à do (M): A desativação de energia ocorre por conversão interna na forma de relaxação vibracional entre os estados eletrônicos excitados singlete de maiores energias até a molécula chegar ao estado eletrônico excitado  $S_2(n, \pi^*)$  e o estado  $S_1(\pi, \pi^*)$ . Desse modo, as moléculas populam o estado eletrônico excitado de menor energia  $S_1(\pi, \pi^*)$  que emite a fluorescência do monômero do DMC. A população do estado triplete  $T_1$  ocorre via acoplamento spin-orbital de segunda ordem do tipo:  $S_2(n, \pi^*) \sim T_4(\pi, \pi^*)$  uma vez que encontram-se muito próximos, com diferença de 0,03 eV e os estados excitados  $S_1(\pi, \pi^*) \sim T_2(n, \pi^*)$  iguais 0,30 eV, o que favorece o fraco acoplamento spin-orbital de segunda ordem do tipo:  $S_2(n, \pi^*) \sim T_4(\pi, \pi^*) \sim T_3 \sim T_2 \sim T_1(\pi, \pi^*)$ , populando pobremente o estado  $T_1(\pi, \pi^*)$ , o que justifica a emissão fraca da fosforescência.

### 5.3.3 Espectros de emissão a 77 K do DMC em meio hidrofílico (TFE)

A figura 34 mostra a emissão da DMC em TFE nas concentrações de  $1 \times 10^{-2}$  a  $1 \times 10^{-4}$  mol/L.

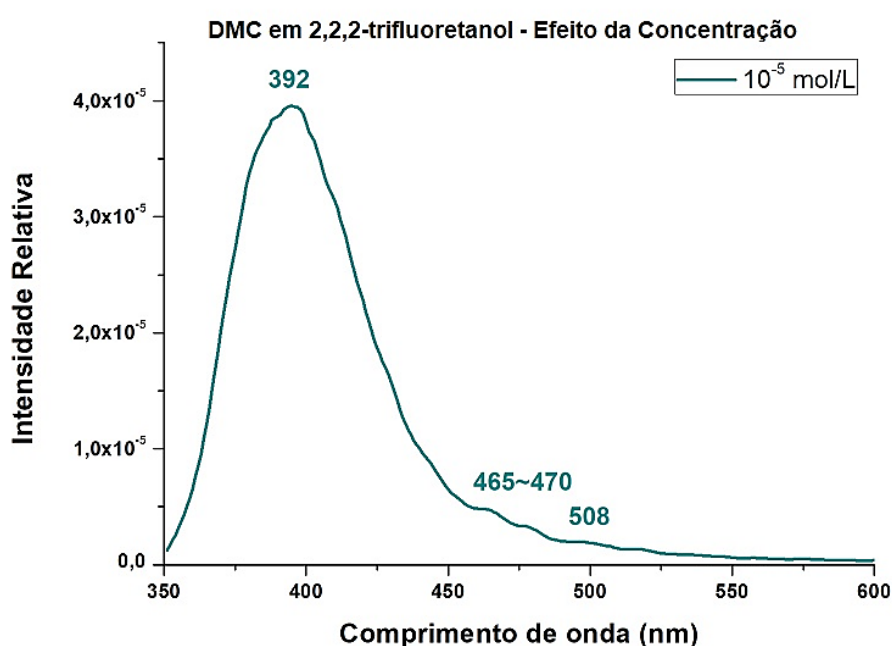


**Figura 34:** Espectros de emissão a 77 K para DMC em 2,2,2-trifluoretanol com o efeito da concentração em  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  mol/L.

**Fonte:** Autora, (2020).

O DMC na concentração  $10^{-2}$  mol/L possui o máximo da fluorescência a 405 nm, e aparentemente nenhuma fosforescência, essa emissão foi assinalada como agregado molecular (AM-H). Para a  $10^{-3}$  mol/L o máximo da fluorescência em 397 nm e para  $10^{-4}$  mol/L o máximo da fluorescência é 395 nm. Nota-se que a partir da concentração  $10^{-3}$  mol/L é possível ver uma banda discreta de fosforescência com o pico da banda 0-0 situada em  $\approx 470$  nm. Nas duas concentrações a Fluorescência é mais intensa do que a fosforescência.

A figura 35 apresenta o espectro de emissão do DMC para a concentração a  $10^{-5}$  mol/L.



**Figura 35:** Espectros de emissão a 77 K para DMC em 2,2,2-trifluoretanol com o efeito da concentração em  $10^{-5}$  mol/L.

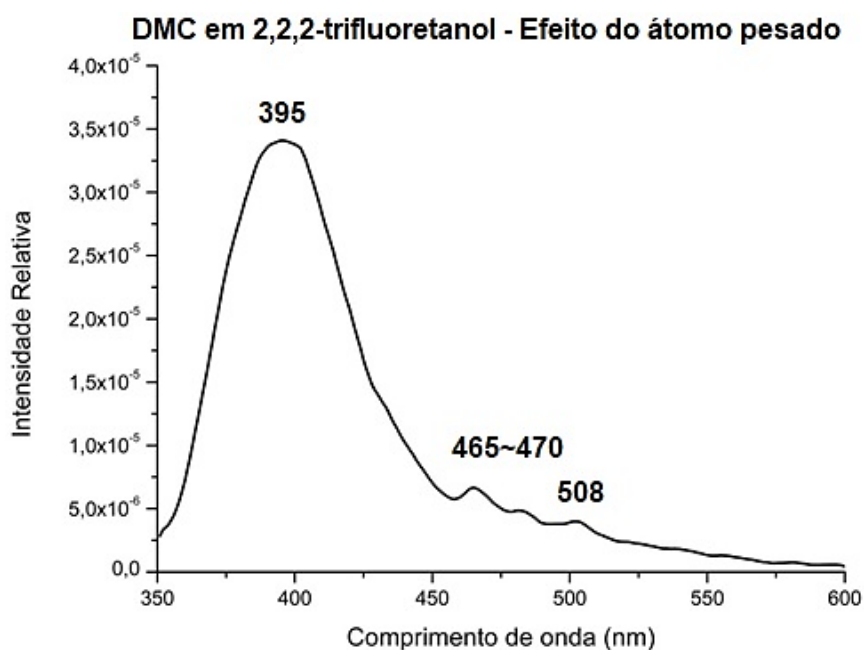
**Fonte:** Autora, (2020).

Para DMC na concentração  $10^{-5}$  mol/L tem-se a fluorescência em 390 nm e a banda de fosforescência mostra um pico assinalado como a banda 0-0 em 470 nm. Nas concentrações  $1 \times 10^{-2}$  M até a concentração  $1 \times 10^{-4}$  M, a fosforescência permanece na mesma faixa de comprimento de onda, mas o máximo da fluorescência apresenta um deslocamento para o azul que vai desde 405 nm até 395 nm e essas emissões foram assinaladas como oriundas do (AM-H). Na concentração  $1 \times 10^{-5}$  M, o máximo da fluorescência está situado em 392 nm, ver Fig. 34, e em menores concentrações do que  $1 \times 10^{-5}$  M (não mostrado) a emissão permanece igual à da Fig. 34, caracterizando que a partir da concentração  $1 \times 10^{-5}$

M observamos a emissão do monômero do complexo por ligação de hidrogênio entre o DMC via carbonila da pirona com a hidroxila do TFE que devido a sua acidez formou um complexo de ligação de hidrogênio forte (M-Hforte). Comparando o espectro de emissão do (M-H) com o espectro de emissão do (M-Hforte), observa-se que o espectro do (M-Hforte) é deslocado para o vermelho 22nm, e comparando o espectro do (M-Hforte) com o espectro de emissão do (M) o deslocamento para o vermelho é de 24nm.

A fosforescência das três espécies, (M), (M-H) e (M-Hforte), não apresentou deslocamento o que está de acordo com a literatura, a fosforescência desses monômeros é localizada e oriunda do anel da pirona.

A figura 35 apresenta o espectro do DMC com o efeito do átomo pesado em 2,2,2-trifluoretanol na concentração de  $10^{-5}$  M. A emissão da fosforescência fica mais intensa comparada com a da Fig. 34, caracterizando o aumento da velocidade do cruzamento inter sistemas e o aumento da população do estado  $T_1$ .



**Figura 36:** Espectro de emissão a 77 K para DMC a  $10^{-5}$  mol/L em 2,2,2-trifluoretanol com o efeito do átomo pesado.

**Fonte:** Autora, (2020).

A espécie emissora do DMC dissolvido em 2,2,2-trifluoretanol em maiores concentrações é o agregado molecular (AM), ao diminuir a concentração esse se autodesagrega e desloca o equilíbrio para o monômero formando um complexo com ligação de hidrogênio (M-Hforte) entre a pirona do DMC com a hidroxila do solvente, devido a

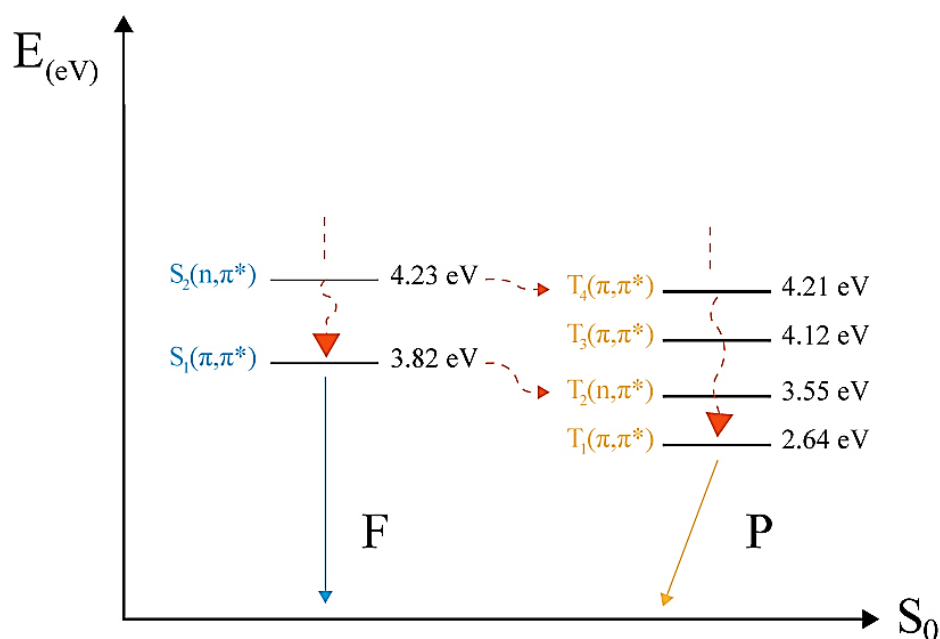
acidez do tfe. O cálculo TD-DFT com o funcional e função de base B3LYP/6-311+G\*\* informam as energias singlete e triplete calculadas para o DMC em meio hidrofóbico para TFE, ver a tabela abaixo.

**Tabela 7:** Energias tripletes e singletes do DMC com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G em meio hidrofílico para TFE.

	nm	eV	f	Transição	Contribuição
T <sub>1</sub>	468,0	2,64	0	D(79) → V(1)	0,9537
T <sub>2</sub>	348,4	3,55	0	D( 78) → V(1)	0,9344
S <sub>1</sub>	324,0	3,82	0,2630	D(79) → V(1)	0,9290
T <sub>3</sub>	300,7	4,12	0	D(78) → V(2)	0,7117
T <sub>4</sub>	294,3	4,21	0	D(79) → V(2)	0,8869
S <sub>2</sub>	293,3	4,22	0,1570	D( 78) → V(1)	0,8951
T <sub>5</sub>	280,2	4,42	0	D( 76) → V(1)	0,8851

Fonte: Autora, (2020).

As propriedades fotofísicas do (M-Hforte) considerando os resultados observados experimentalmente a 77 K e os cálculos TD-DFT estão esquematizados na figura 37.



**Figura 37:** Processo fotofísico de desativação da DMC em meio hidrofílico (2,2,2-trifluoretanol) calculado com o TDDFT usando o B3LYP/6-311+G\*\*.

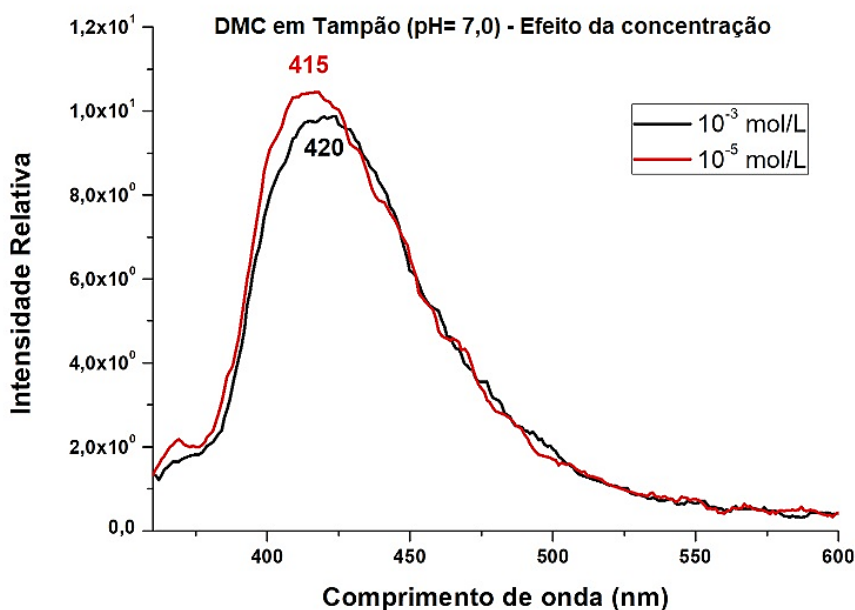
Fonte: Autora, (2020).



A fotofísica da DMC em TFE é semelhante em etanol (figura 28). A ligação de hidrogênios deslocou para maiores energias o estado eletrônico excitado ( $n,\pi^*$ ), separando os estados  $S_1$  e  $S_2$ . A desativação não radiativa é via conversão interna na forma de relaxação vibracional, entre  $S_1$  e  $S_2$ , que vai popular o estado  $S_1$  que emite fluorescência do tipo ( $\pi, \pi^*$ ) uma vez que influenciado pelo efeito do solvente diminui de energia e desloca a emissão da fluorescência do monômero do DMC para o vermelho em relação ao MCH e EtOH. O distanciamento dos estados  $S_2(n,\pi^*)$  e  $T_4(\pi, \pi^*)$  diminui a possibilidade do acoplamento spin-orbital e a população do estado tripleto diminui, resultando numa emissão de fosforescência menos intensa comparada com a emissão do DMC dissolvido em MCH. Assim, a emissão de fosforescência deve ocorrer através do estado  $T_1(\pi, \pi^*)$ , com a contribuição dos orbitais  $D(79) \rightarrow V(1)$  localizados na região da pirona.

#### 5.3.4 Espectros de emissão a 77 K do DMC em meio hidrofílico (Tampão pH=7,0)

A figura 38 apresenta o espectro do DMC solubilizado em solução tampão preparado a ambiente fisiológico com pH 7,0. A melhor emissão observada foi a partir da concentração de  $10^{-3}$  mol/L, pois tal cumarina apresentou baixa solubilidade em meio aquoso. Desse modo, o espectro abaixo apresenta a emissão do DMC nas concentrações  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  mol/L.



**Figura 38:** Espectro de emissão do DMC em solução tampão (pH = 7,0) a  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  mol/L com efeito da concentração.

**Fonte:** Autora, (2020).

Para concentração  $10^{-3}$  mol/L tem-se o máximo da emissão de fluorescência em 420 nm, a intensidade da mesma é menor que a  $10^{-5}$  mol/L devido à baixa solubilidade do DMC em soluções aquosas. Já para concentração  $10^{-5}$  mol/L tem-se um deslocamento curto de 5 nm para o azul e nenhuma fosforescência, isso sugere que para o meio aquoso a espécie caracterizada do DMC é o agregado molecular.

O deslocamento da fluorescência para maiores comprimentos de onda está relacionado com o aumento da polaridade do solvente, elevando ainda mais a energia dos estados eletrônicos excitados ( $n,\pi^*$ ) e diminuindo a energia do estado eletrônico excitado ( $\pi,\pi^*$ ), distanciando os estados singlete  $S_2$  e  $T_3$ , e  $S_1$  e  $T_2$  que vão interferir na ausência da fosforescência. O deslocamento para o vermelho da fluorescência e a ausência da fosforescência informam que a espécie emissora em solução aquosa com pH fisiológico é de fato o agregado molecular hidrofóbico forte (AMH-F), uma vez que mesmo realizando o efeito da concentração para menores molaridades ( $10^{-5}$  mol/L), a espécie (AMH-F) não desagrega para o monômero e não emite fosforescência.

O efeito do solvente pode ser observado ao comparar a diferença de energia entre os estados excitados  $S_1$  ( $n,\pi^*$ ) e  $S_2$  ( $\pi,\pi^*$ ) para as espécies monoméricas, uma vez que aumenta a polaridade do solvente (tópico 3.5) tem-se como reflexo o aumento da energia dos estados excitados ( $n,\pi^*$ ) e a diminuição dos estados excitados ( $\pi,\pi^*$ ). Desse modo, ao aumentar a polaridade do solvente nota-se que a diferença de energia entre os estados  $S_1$  e  $S_2$  deve aumentar e como consequência disso tem-se uma emissão ( $\pi,\pi^*$ ) mais pura caracterizado pelo deslocamento do máximo de fluorescência para o vermelho, conforme a tabela X abaixo.

**Tabela 8:** Máximo da fluorescência em (nm) e  $\Delta E$  dos estados excitados singlete para as espécies do DMC.

ESPÉCIES	MCH	EtOH	TFE
Máx da (F)	388	370	392
$S_1$ - $S_2$	0,29	0,35	0,41

Fonte: Autora, (2020).

Desta maneira, foram caracterizadas quatro espécies emissoras para o DMC dissolvido nos meios hidrofóbicos e hidrofílicos: (AM), (M), (M-H) e (M-Hforte). A caracterização das espécies monoméricas do DMC é essencial para compreensão da atividade

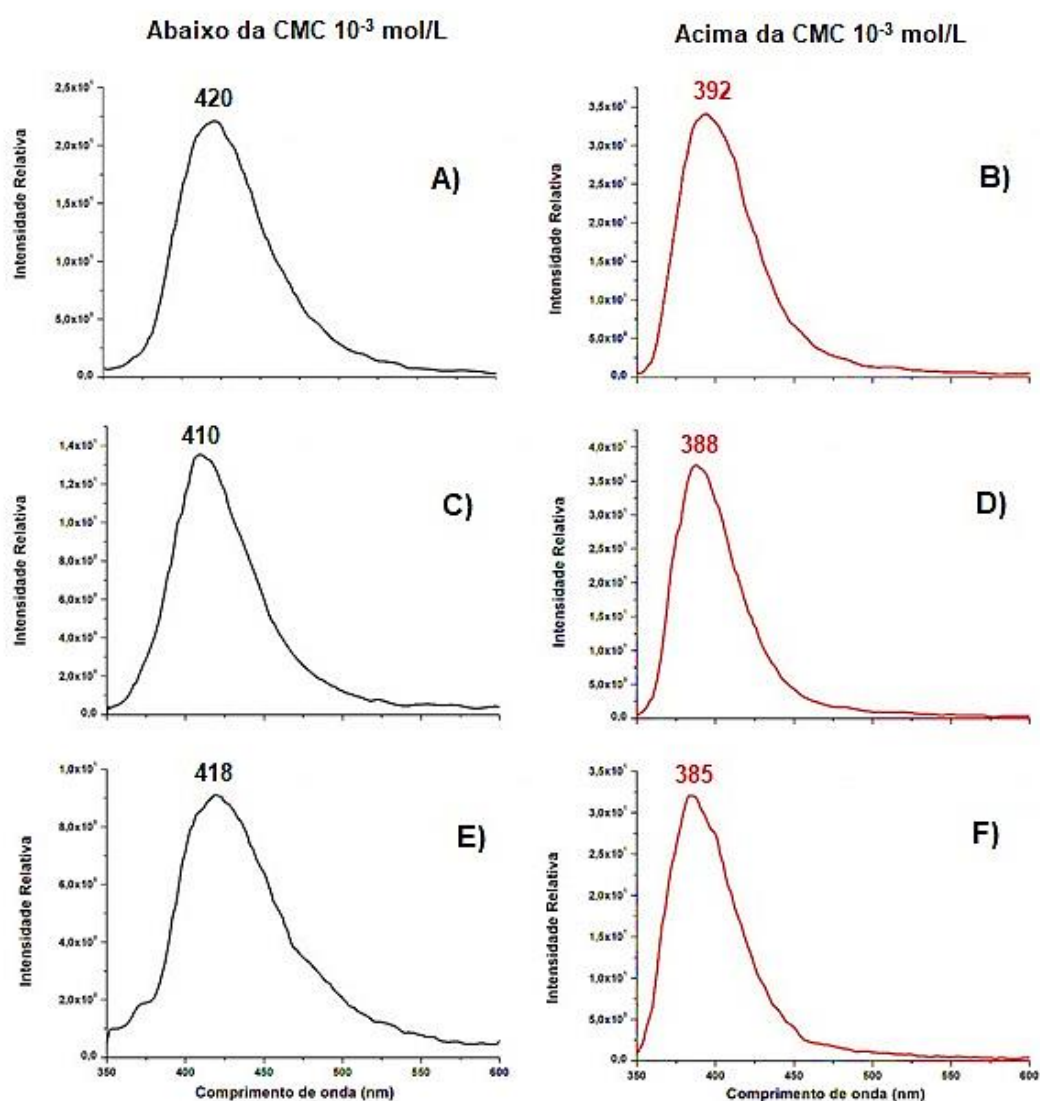
molecular do antimutagênico e determinar a espécie ativa que deve penetrar a biomembrana permitindo sua ação farmacológica. Nota-se que todas as espécies caracterizadas até aqui apresentaram propriedades fotofísicas diferentes umas das outras e pode ser utilizada como sondas fluorescentes, pois permitirá uma sondagem direta da solubilização da mesma em micelas, assim será possível determinar a espécie solubilizada, o tipo de interação com o interior da micela, e aonde ela fica ancorada. Usando a espectroscopia de emissão a 77K, pode-se identificar de forma direta a espécie que é solubilizada.

#### 5.4 Espectros de emissão do DMC em micelas

Para conhecer o comportamento químico do DMC em biomembranas utiliza-se as micelas, o procedimento necessário é: realizar a emissão do DMC em soluções 100 vezes abaixo da CMC e 100 vezes acima da CMC. Abaixo da CMC existe os monômeros dos surfactantes e acima da CMC as micelas, a diferença da emissão desses dois ambientes pode confirmar a penetração da molécula dentro da biomembrana. A figura 38 apresenta os espectros do DMC em soluções abaixo e acima da CMC para os surfactantes aniônicos, catiônicos e não-iônicos na concentração  $1 \times 10^{-3}$  mol/L.

Para as soluções 100 vezes abaixo do CMC, tem-se que o DMC solubilizado em surfactante aniônico (espectro A) apresenta emissão de fluorescência na cor azul, essa possui o máximo em 420 nm, tal espécie não apresentou emissão de fosforescência.

Para o espectro (C) tem-se que o DMC solubilizado em surfactante catiônico apresenta o máximo da fluorescência em 410 nm e não possui emissão de fosforescência. Assim, o mesmo é observado para o surfactante não-iônico (espectro E) com o máximo da fluorescência em 418 nm e que também não possui emissão de fosforescência. Portanto, todas as espécies emissoras foram assinaladas como agregado molecular hidrofóbico, uma vez que não há registro da fosforescência que deve-se à proximidade entre os estados  $S_2 (n, \pi^*)$  e  $S_1 (\pi, \pi^*)$ , diminuindo a taxa de acoplamento spin-orbital.



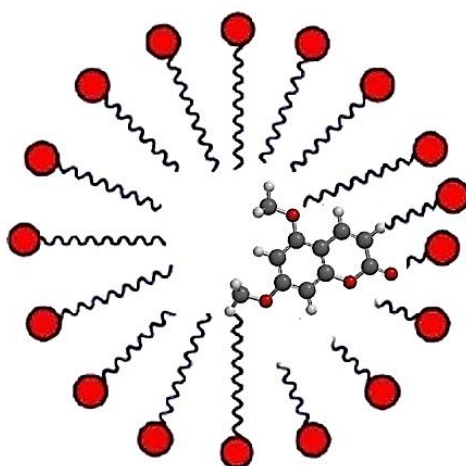
**Figura 39:** Espectros de emissão do DMC adicionado em surfactantes preparado com solução tampão pH=7, nas concentrações 100 vezes abaixo e 100 vezes acima da CMC em (A e B) aniônico, (C e D) catiônico e (E e F) não-aniônico na concentração 10<sup>-3</sup> mol/L.

**Fonte:** Autora, (2020).

No entanto, quando ocorre a formação das micelas (acima da CMC), tem-se um deslocamento nítido no máximo de emissão da fluorescência. Na presença da micela aniônica (espectro B) a emissão do DMC apresenta o máximo de fluorescência em 392 nm, com uma diferença de 28 nm de deslocamento para a região do azul. Essa diferença observada na fotofísica da emissão de fluorescência sugere a existência de duas espécies diferentes: para soluções abaixo da CMC o agregado molecular e para soluções acima da CMC o monômero do DMC. Para essa espécie não foi registrado a emissão de fosforescência.

O espectro (D) apresenta a emissão do DMC em micela catiônica que possui o máximo de fluorescência em 388 nm, com deslocamento de 22 nm para região do azul, devido sua característica espectral tem-se que o DMC penetra no interior da micela, independente da alta concentração de cargas positivas interfacial no exterior da estrutura micelar. Ao comparar os espectros abaixo e acima da CMC tem-se novamente a emissão de duas espécies distintas: o agregado molecular e o monômero do DMC. Não foi registrado emissão de fosforescência. O espectro C mostra a emissão do DMC em micela não-iônica (ou neutra), esse apresenta o máximo da emissão de fluorescência em 385 nm e não foi observada nenhuma fosforescência. Semelhante as características espectrais observadas para as micelas aniônicas e catiônicas nota-se para a micela neutra que houve um deslocamento de 33 nm para o azul, confirmando a penetração do monômero do DMC na biomembrana.

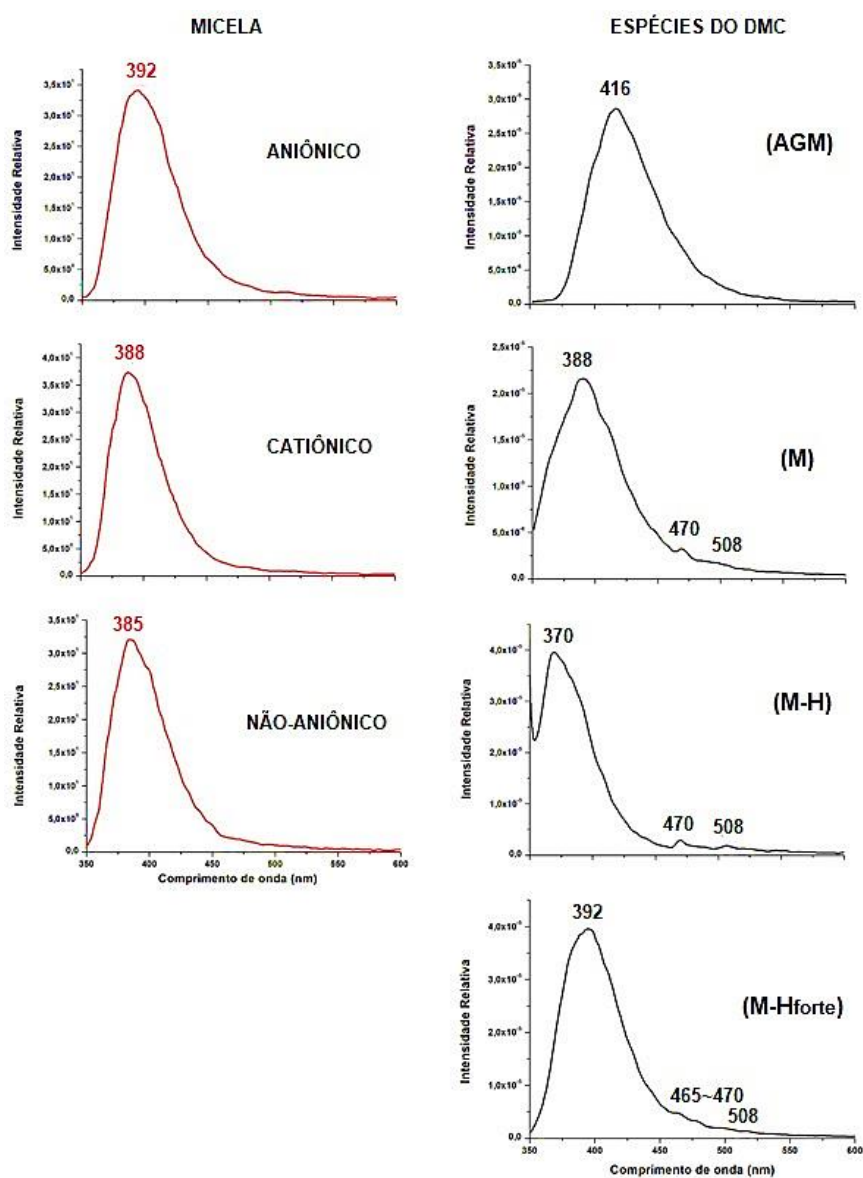
A ausência da fosforescência deve-se ao tipo de ancoramento da espécie monomérica, uma vez que a literatura afirma que somente as espécies monoméricas encontram-se presentes no interior da biomembrana, então a região de ancoramento do monômero do DMC dentro na micela deve suprimir os modos vibracionais do grupo etileno da pirona e impedindo a emissão de fosforescência. Isso sugere que o DMC penetra nas micelas neutra, aniônica e catiônica, no interior da região hidrofóbica das micelas, ocupando a interface da região hidrofóbica e da região aquosa da micela, com o anel da pirona ancorado através da dupla ligação etilênica do anel da pirona (C3=C4) na região aquosa formando um complexo de ligação de hidrogênio com a carbonila, justificando o não registro da fosforescência no espectro da nova espécie e o di-metoxi-benzeno fica ancorado na região hidrofóbica (figura 38).



**Figura 40:** Monômero do DMC solubilizado em micela

**Fonte:** Autora, (2020).

Uma vez que o DMC apresenta propriedades fotofísicas diferentes umas das outras em diferentes meios, este pode ser utilizado como sondas fluorescentes, pois permitirá uma sondagem direta da solubilização do mesmo em micelas, assim determinando a espécie solubilizada, o tipo de interação com o interior da micela, e aonde ela fica ancorada. A figura 39 apresenta os máximos em (nm) das fluorescências em vários meios a 77 K.



**Figura 41:** Espectros de emissão do DMC em micelas (a esquerda) e espécie do DMC caracterizadas em vários meios (AGM) (M em MCH), (M-H em EtOH) e (M-Hforte em TFE).

**Fonte:** Autora, (2020).

Conforme a figura acima verifica-se que a emissão do monômero do DMC em micela possui as mesmas características espectrais observadas em TFE, porém com a ausência da fosforescência, ainda que apresente deslocamentos para as micelas catiônicas e neutras, que se justifica pelo fato das propriedades fotofísicas do DMC serem muito sensíveis ao efeito do solvente. Portanto, a espécie ativa em biomembranas do DMC é o monômero fazendo com ligação de hidrogênio formado entre a carbonila da pirona e a região aquosa das micelas. Os resultados obtidos com os cálculos semiempíricos (tabela 9) informam o calor de formação de cada espécie solubilizada nas micelas, tal informação pode prever parâmetros de estabilidade entre as espécies caracterizadas.

A tabela 9 abaixo apresenta a energia de formação para cada espécie de DMC identificada.

**Tabela 9:** Calor de formação para as espécies da DMC.

MONÔMEROS		AGREGADO MOLECULAR
ETANOL	-733,5995	-1456,3275
TFE	-1372,3385	
MCH	-474,3348	

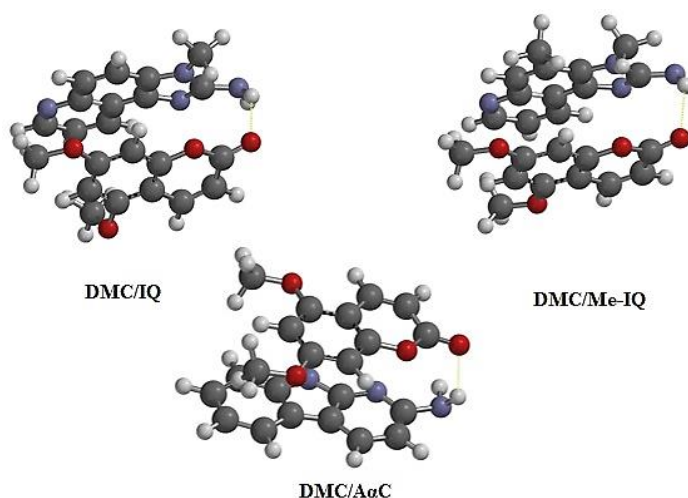
**Fonte:** Autora, (2020).

Os cálculos semi-empíricos com o PM3 para calor de formação mostraram que o complexo entre a DMC e o TFE é o mais estável do que os monômeros presentes nos demais solventes, assim, os resultados confirmam qual a espécie ativa solubilizada em micela. Tal estudo corrobora para compreensão do mecanismo de transporte de moléculas bioativas em biomembranas. A partir dessas análises, define-se o modo que a espécie monomérica deve interagir com o mutagênico IQ e seus derivados para diminuir seu efeito de carcinogênese. Cálculos teóricos que preveem estabilidade podem fornecer informações sobre o calor de formação da interação do antimutagênico DMC com os mutagênicos AαC, IQ e derivados.

### 5.5 Determinação Teórica da Inibição da Mutagênese do IQ e derivados pelo DMC

O estudo da solubilização do DMC em micelas mais os cálculos teóricos DFT e semiempíricos proveram informações sobre a atividade molecular do monômero do

antimutagênico. Informações sobre cargas atômicas forneceram a região molecular mais provável onde deve-se ocorrer a formação da ligação, os cálculos de absorção UV/VIS dispuseram a região de maior fotoatividade e os cálculos de energias de excitação informou a natureza dos estados excitados assim como, as regiões moleculares responsáveis pela fluorescência e emissão. Todas essas informações apontam para região da pirona, que, portanto, deve ser a região que deve interagir com os mutagênicos A $\alpha$ C, IQ e derivados, conforme a figura 40 a seguir.



**Figura 42:** Complexo antimutagênico/mutagênico.

**Fonte:** Autora, (2020).

O DMC deve formar o complexo com os mutagênicos via ligação de hidrogênio, uma vez que em membranas biológicas essa é a espécie ativa. O cálculo semi-empírico PM3 é fundamentado em dados experimentais e podem prever as energias de calor de formação para os complexos formados entre o DMC e os mutagênicos A $\alpha$ C, IQ e Me-IQ em kJ/mol conforme a tabela 10.

**Tabela 10:** Calor de formação para os mutagênicos e os complexos antimutagênico/mutagênico.

Espécie	IQ	Me-IQ	A $\alpha$ C	DMC
<b>Monômero</b>	276,6563 kJ/mol	240,7973 kJ/mol	235,8561 kJ/mol	-474,3243 kJ/mol
<b>Complexo/DMC</b>	-210,8717 kJ/mol	-254,1979 kJ/mol	-245,4229 kJ/mol	

**Fonte:** Autora, (2020).



Ao comparar as energias de  $\Delta H_{\text{formação}}$  entre os mutagênicos e os complexos formados, tem-se que a energia dos mutagênicos diminuiu 131, 95 e 96 para IQ, Me-IQ e A $\alpha$ C respectivamente ao formar ligação de hidrogênio com o antimutagênico DMC, assim diminuindo sua instabilidade energética. Tais resultados podem indicar que a inibição do mutagênico IQ e outros pelo DMC pode ser via interação entre o grupo amina dos mutagênicos e a carbonila do DMC através de ligação de hidrogênio intermolecular. Esses resultados podem ajudar a entender o mecanismo de transporte através da inibição da mutagenicidade do IQ e seus derivados frente as cumarinas como o 5,7-dimetoxicumarina.

## 6 CONCLUSÃO

O estudo do efeito do solvente foi realizado detalhadamente para conhecer as propriedades fotofísicas do DMC em vizinhanças hidrofóbicas e hidrofílicas. Os espectros de absorção nos solventes usados, mostraram que os espectros têm as mesmas características e as diferenças estão no aumento da intensidade das banda e deslocamentos das bandas de maiores comprimentos de onda para o vermelho. Usando a espectroscopia de emissão na temperatura de 77K foi possível caracterizar cinco espécies: em MCH o monômero e o agregado molecular (AM); em etanol o monômero do complexo ligado por ligação de hidrogênio (M-H) entre o DMC e o etanol; em TFE o monômero do complexo ligado por ligação de hidrogênio forte (M-Hforte) entre o DMC e o TFE; e em solução tampão, (pH=7,0, I=0,1M) o agregado hidrofóbico forte (AHF). Todas essas espécies possuem distintas propriedades fotofísicas entre si e podem ser usadas como sondas fluorescentes diretas, no estudo da solubilização do DMC nas micro-vizinhanças das micelas e bio-membranas.

A análise dos espectros de absorção e emissão mais os cálculos DFT, indicaram que o estado eletrônico singlete emissor da fluorescência das espécies da DMC, é o  $S_1 (\pi, \pi^*)$  e o da fosforescência fraca é o estado eletrônico triplete  $T_1 (\pi, \pi^*)$ . A fraca fosforescência é justificada pelo acoplamento spin-orbital pouco eficiente entre os estados singlete e triplete e a maior velocidade de desativação radiativa via estado eletrônico excitado  $S_1 (\pi, \pi^*)$  e também a ausência de um efetivo efeito da proximidade dos estados  $S_1 (\pi, \pi^*)$  e  $S_2 (n, \pi^*)$  o que favorece a desativação radiativa via  $S_1$ .

Na presença das micelas não-iônica, aniônica e catiônica, preparadas com solução tampão pH = 7,0, I = 0,1M, a espécie (AHF) desagrega e penetra no interior das micelas, neutra aniônica e catiônica, na forma monomérica e nas três micelas, forma um complexo ligado por ligação de hidrogênio forte com a água, ficando ancorada nessa região aquosa com o anel da pirona via dupla ligação C3 = C4. Esta é a “espécie em ação” do DMC no interior da micela e sua sexta espécie encontrada. Essas observações justificam a ausência da fosforescência nesses espectros dentro das micelas. O desaparecimento da fosforescência do monômero do DMC no interior das micelas indica que estado excitado triplete  $(\pi, \pi^*)$  tem um papel importante na fotoatividade do DMC e segundo os nossos cálculos ele está localizado no anel da pirona.

A solubilização do DMC nas micelas é completamente diferente da solubilização da cumarina o que pode lançar luz para justificar os diferentes comportamentos na fotoatividade das duas moléculas na medicina e biologia. Os resultados obtidos podem ajudar a caracterizar

as espécies em ação e os sítios de ação da DMC na membrana, assim como os mecanismos de transporte da droga através da membrana. Uma vez que se conhece o sítio de interação desse antimutagênico foi possível realizar o estudo teórico do complexo formado pelo antimutagênico DMC e os mutagênicos derivados do IQ. Os resultados de calor de formação ( $\Delta H$ ) discorre que a energia dos mutagênicos diminuiu 131, 95 e 96 para IQ, Me-IQ e A $\alpha$ C respectivamente ao formar ligação de hidrogênio com o antimutagênico DMC. Esses resultados podem indicar que a inibição do mutagênico IQ e outros pelo DMC pode ser via interação entre o grupo amina dos mutagênicos e a carbonila do DMC através de ligação de hidrogênio intermolecular, portanto, vem ajudar a compreender o mecanismo de transporte através da inibição da mutagenicidade do IQ e seus derivados frente as cumarinas como o 5,7-dimetoxicumarina.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOTTALEB, M,S,A, Photophysics and dynamics of coumarin laser dyes and their analytical implications, *Journal of Chemical Sciences - Indian Academy of Sciences*, Vol, 104, No, 2, pp, 185-196, 1992,
- ABU-EITTHAR e EL-TAWIL, The electronic absorption spectra of some coumarins, A molecular orbital treatment, *Can J Chem*, 63,, 1173-1179, 1985,
- ALESIANI, D, et al, Cell cycle arrest and differentiation induction by 5,7-dimethoxycoumarin in melanoma cell lines, *International Journal of Oncology* vol,32, pp, 425-434, 2008,
- ALVES, L,C,J, “Aplicação de métodos quimiométricos de calibração De segunda ordem e transferência de calibração na determinação simultânea de misturas de fármacos utilizando espectroscopia de fluorescência molecular em fase sólida”, 102 f, Dissertação de Mestrado - Instituto de Química, Departamento de Química Analítica – Universidade Estadual de Campinas, 2009,
- ATKINS, P, PAULA, J, *PHYSICAL CHEMISTRY*, Oxford University Press, Edição 8, 2006,
- BELLAMRI, Medjda et al, Metabolic activation of the cooked meat carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in human prostate, *Toxicological Sciences*, v, 163, n, 2, p, 543–556, 2018
- BELLAMRI, Medjda et al, Metabolism of the Tobacco Carcinogen 2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC) in Primary Human Hepatocytes, *Chemical Research in Toxicology*, v. 30, n. 2, p. 657–668, 2017
- BESSETTE, et al, Biomonitoring of Carcinogenic Heterocyclic Aromatic Amines in Hair: A Validation Study, *Chem Res Toxicol*, 2009 August 17; 22(8): 1454–1463, doi:10.1021/tx900155f,
- BORGES, B, K., BORGES, S,W, *Fundamentos de Espectrometria e Aplicações*, edição 1, editora Atheneu, 2018,
- BROWN, W., FOOTE, C., et al, *Organic Chemistry*, Editor Cengage, Edição 8, 2009,
- BURAWOY, A, The light absorption of organic compounds, and the nature of unsaturated linkages, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 20: 1177-1188, 1939,
- COSTA, I, Encapsulamento fotoassistido de um alucinógeno em matriz de sol-gel opticamente transparente e usado como sensor químico, Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, 1998

- EDENHARDER, R, et al, Inhibition of mutagenesis of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) by coumarins and furanocoumarins, chromanones and furanochromanones, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v, 345, n, 1–2, p, 57–71, 1995,
- EDENHARDER, R., RAUSCHER R, Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens, 1993,
- EL-SAYED D, M.A.; *J, Chem, Phys*, 1963, 39, 1899,
- FRANCO, G.; ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS COM INTERESSE FARMACOLÓGICO. Orientador: Alberto dos Santos Marques. 2020. 148 f. Tese de Doutorado (Doutor em Química, Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Am, 2020. Disponível em: [https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/8038/2/Tese\\_GiseleFranco\\_PPGQ.pdf](https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/8038/2/Tese_GiseleFranco_PPGQ.pdf). Acesso em: 21 dez. 2020.
- GLOSH, S.; Petrin, M.; Mak, A.H.; *J. Phys. Chem.* 1986, 90, 5206. Hadley,
- HERRAIZ T, GONZÁLEZ D, ANCÍN-AZPILICUETA C, ARÁN VJ, GUILLÉN H, Beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human [MAO], *Food Chem Toxicol* 2010; 48(3): 839-845, 2010,
- HOLLER, F,J, et al, *Princípios de análise instrumental*, Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056
- KARAKAŞ SARIKAYA, E., DERELI, Ö, Study on molecular structure and vibrational spectra of 5,7-dimethoxycoumarin using DFT: A combined experimental and quantum chemical approach, *Opt, Spectrosc*, 117, 240–249 (2014)
- KASHA, M.; *J, Discuss, Faraday Soc*, 1950, 9, 14,
- KIZIL, Mevlüde; OZ, Fatih; BESLER, H Tanju, A Review on the Formation of Carcinogenic/Mutagenic Heterocyclic Aromatic Amines, *Journal of Food Processing & Technology*, v, 02, n, 05, 2011,
- KOMURA, Shigeyuki; ANDELMAN, David, Physical aspects of heterogeneities in multi-component lipid membranes, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 208, p. 34–46, 2014.
- KRYSTKOWIAK, E, et al, Hydrogen bond effects in the ground and excited singlet states of 4H-1-benzopyrane-4-thione in water—theory and experiment, *Phys, Chem, Chem, Phys*, 2012,14, 8842-8851, 2012,
- LAKOWICZ, J, R, In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2º,ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999,

- LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal* Published for the British Industrial Biological Research Association, 37(4), 423–453. (1999),
- LI, H., CAI, L., CHEN, Z, Coumarin-Derived Fluorescent Chemosensors, *Advances in Chemical Sensors – IntechOpen*, Prof, Wen Wang (Ed.), ISBN: 978-953-307-792-5, InTech, 2012,
- LINNEL R., VINOGRADOV., S, *Hydrogen Bonding*, Editora Van Nostrand Reinhold (1971), 1° ed, 1971,
- MA, Tao; WANG, Chunxia, 5,7-Dimethoxycoumarin Inhibits Neuronal Apoptosis By Targeting Caspase-3 Expression in Rats With Acute Cerebral Infarction, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v, 16, n, 4, p, 877-883, 2017
- MACCOLL, A. *Quarter*. Ver 1947, 1, 16.
- MANIASSO, Nelson, *Ambientes micelares em química analítica*, Quím, Nova, São Paulo , v, 24, n, 1, p, 87-93, Feb, 2001,
- MARQUES A, D, S., G, S, S, *Marques Photochemical and Photobiol*, 59 (2), p,153-160, 1994,
- MARQUES, A,D,S., LIN, C,T, Molecular complexes of IQ and 4-hydroxy-coumarin: a mutagen–anti-mutagen system, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol 74, pp, 63-71, 2004,
- MARQUES, A,D,S., LIN, C,T et al, Experimental and Theoretical Studies of 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline Derivatives: Cooked-Food Mutagens, *International Journal of Quantum Chemistry*, Vol, 110, 2047–2056 (2010),
- MCGLYNN, S,P.; AZUMI, T.; Kinoshita, M.; *Spectroscopy of the Triplet State*; Prentice-Hall: Englewood Cliffs, 1969, p, 261,
- MELO, O,LZ, *Alterações Fisiológicas E Bioquímicas Durante A Germinação De Sementes De Espécies Da Flora Amazônica*, 93 f – Tese de Doutorado - Instituto Nacional De Pesquisas Da Amazônia – INPA - Universidade Federal Do Amazonas –UFAM, 2005,
- MENGER F, M., B,J, Boyer, Water penetration into micelles as determined by optical rotary dispersion, *J, Am, Chem, Soc*, 102(1980), 5936-5938,
- MERTZ C,J., C,T, Lin, Solubilization sites and acid-base forms of dibucaine hydrochloride in neutral and charged micellar solutions, *Photochemical Photobiol*, 53(1991), 307-316,
- MURKERJEE, P.; Mysels, K,J, *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant system*; NSRDS: Washington DC, 1971,

- MUSA, Musiliyu; COOPERWOOD, John; KHAN, M, Omar, A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer, [s.l.: s.n.], 2008,
- OLIVEIRA, G,B, O estado da arte da ligação de hidrogênio, Química, Nova, Vol, 38, No, 10, 1313-1322, 2015
- PAVIA, D, L; LAMPMAN, G, M; KRIZ, G, S, Introdução à Espectroscopia, 4ª Edição, Canadá: Thomson Learning, p, 365 – 398, 2010,
- PIEIDADE, S,C, Estudo da estrutura - atividade da norharmana, DHM-cumarina e riparinas I, II, III usando espectroscopia eletrônica e cálculos teóricos, 142 F, Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Ciências da Saúde - ESA/UEA, Universidade do Estado do Amazonas, 2009,
- POPE, M.; SWENBERG, S,E, Electronic Processes in Organic Crystals and Polymers, Oxford University Press; 2 edition, 1982,
- RANGEL-YAGUI, C, O.; PESSOA-JR, A.; BLANKSCHTEIN, D., Two-phase aqueous micellar systems: an alternative method for protein purification, Braz, J, Chem, Eng., São Paulo , v, 21, n, 4, p, 531-544, Dec, 2004
- SALEM, M,A,I.; MARZOUK, M,I.; EL-KAZAK, M,A, Synthesis and Characterization of Some New Coumarins with In Vitro Antitumor and Antioxidant Activity and High Protective Effects against DNA Damage, Molecules, 21, 249, 2016,
- SANTOS, S, M, Teoria de micelização: propriedades de soluções de surfactantes via minimização da energia livre de gibbs, 68 f, Dissertação de mestrado – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014,
- SCHEIBE, G.; FELGOR, E.; ROSSLER, G, Pattern Hidrogenio Connection, Ber, 60, 1406, 1927,
- SCHUT, Herman A,J.; SNYDERWINE, Elizabeth G, DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: Implications for mutagenesis and carcinogenesis, Carcinogenesis, v, 20, n, 3, p, 353–368, 1999,
- SEYBOLD, P,G, External Heavy-Atom Effect on Room-Temperature Luminescence of Adsorbed Dyes, J, Phys, Chem, v 81, p, 2035-2040, 1977,
- SHAH, M,N.; et al, THE CHEMISTRY OF COUMARINS, Chemical Reviews 36 (1), 1-62, 1944 DOI: 10,1021/cr60113a001
- SHANKAR, E,P,S.; BAHULAYAN D, Chemistry, chemical biology and photophysics of certain new chromene–triazole–coumarin triads as fluorescent inhibitors of CDK2 and CDK4 induced cancers, In: Royal Socitey of Chemistry, Vol 43, pp,13863—13872, 2019
- SHIM, C,S., et al, Photocycloaddition reaction, v, 34, p, 177–182, 1981,

- SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006,
- SONG P, –S., W, H, Gordon III, Journal Physics Chemical 74 (24) ,, P4234-4240,1973,
- SOTOMAYOR, Maria Del Pilar Taboada et al, Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas, Química Nova, Sociedade Brasileira de Química, v, 31, n, 7, p, 1755-1774, 2008,
- SOUZA, F,C, Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente, 172 f, Dissertação de Mestrado, – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008;
- STARIGAZDOVÁ, Jana et al, In vitro investigation of hyaluronan-based polymeric micelles for drug delivery into the skin: The internalization pathway, European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 143, n. August 2019, 2020.
- TAKAHATA, Y, et al, Experimental and Theoretical Studies of 2-amino-3-methylimidazo[4,5f]quinoline Derivatives: Cooked-Food mutagens,; International Journal od Quantum Chemistry, Vol 110, 2047-2056,, 2010
- TURRO, N,J,; Modern Molecular Photochemistry, Benjamin Cummings: Menlo Park, 1978,
- TURESKY, R.J., W.G. Stillwell, P.L. Skipper, and S.R. Tannenbaum. (1993). Metabolism of the food-borne carcinogens 2-amino-3-methylimidazo-[4,5f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline in the rat as a model for human biomonitoring. Environ Health Perspect 99:123-128.
- VALEUR, B,, Molecular Fluorescence Principles and Application,, Wiley VCH, 2001,
- WANG, Jiangshan; HURTUBISE, Robert J, Solid-matrix luminescence in glucose and trehalose glasses with heavy-atom salts, Analytica Chimica Acta, v, 332, n, 2-3, p, 299-305, 1996,
- WATTENBERG, L,W,, LAM, L,K,T,, FLADMOE, A,V, Inhibition Of Chemical Carcinogen-induced Neoplasiaby Coumarins and a-Angelicalactone, American Association for Cancer Research, Vol 39, pp,1651-1 654, 1979,
- WENSKA, Y N; FACULFY, Stefan Paszyc; UILIVERSIT, Mickiewicz; et al, Coumarin-nucleotide base pairs, Ultraviolet absorption, fluorescence, and photo- chemical study, v, 3, n, 4, p, 2–6, 2006
- YAMASHITA, K., A. Umemoto, S. Grivas, S. Kato, S. Sato, and T. Sugimura. (1988). Heterocyclic amine-DNA adducts analyzed by <sup>32</sup>P-postlabeling method. Nucleic Acids Symp Ser 111-114.



## **8 FUTUROS TRABALHOS**

- ❖ Determinação experimental da Inibição da Mutagênese do IQ e derivados em matrizes Sol-gel.



10	Elaboração e apresentação da aula de qualificação						x	x	x	x				
11	Qualificação									x				
12	Correção da Qualificação									x	x			
13	Elaboração da Dissertação Final									x	x	x	x	x
14	Defesa da Dissertação													x

Fonte: Autora, (2020).