



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

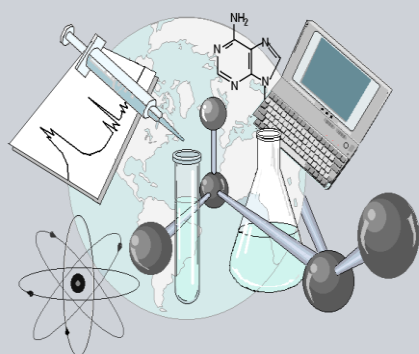
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DOUGLAS VANZIN**

**“Estudo Computacional dos Equilíbrios Tautoméricos  
e Protolíticos dos Corantes Eritrosina B e Eosina Y”**

**CEE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, ABRIL/2014.**

DOUGLAS VANZIN

---

**“Estudo Computacional dos Equilíbrios Tautoméricos e Protolíticos dos Corantes Eritrosina B e Eosina Y”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Noboru Hioka

**MARINGÁ, ABRIL/2014.**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

V285e Vanzin, Douglas  
Estudo computacional dos equilíbrios tautoméricos e protolíticos dos corantes eritrosina B e eosina Y / Douglas Vanzin. -- Maringá, 2014.  
128 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Noboru Hioka.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Físico - Química. 2. Química teórica. 3. Teoria do funcional de densidade. I. Hioka, Noboru, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed.541.3

MGC-001110



**Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Douglas Vanzin**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 07 de abril de 2014.

**COMISSÃO JULGADORA:**

Prof. Dr. Noboru Hioka  
Presidente - DQI/UEM

Prof. Dr. Rodrigo Meneghetti Pontes  
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés de Oliveira  
Membro - UFABC

"A harmonia das leis naturais revela uma inteligência de tal superioridade que, comparada a ela, todo o pensamento sistemático e as ações dos seres humanos são uma reflexão insignificante."

(Albert Einstein)

“Pensa como pensam os sábios, mas fala como falam as pessoas simples.”

(Aristóteles)

## Agradecimentos

A Deus por sempre me providenciar o necessário, me proteger e dar forças para realizar este trabalho.

Aos meus pais Pedrinho e Neulides pelo amor e apoio incondicional, por tanta dedicação, ensinamentos e exemplos de vida.

À Erika, minha namorada e companheira, pelo carinho, amor, paciência e por acreditar muito em mim.

Ao Prof. Noboru Hioka por confiar em minha capacidade, por todos os ensinamentos, orientação e amizade.

Ao Prof. Wilker Caetano pelo espaço cedido no grupo de pesquisas e pelas discussões sempre proveitosas.

Ao Prof. Rodrigo Meneghetti pelo enorme auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos no uso de programas e interpretação dos resultados.

Ao Prof. Antônio Eduardo da Hora Machado por permitir o uso do pacote computacional Gaussian e pelo auxílio remoto sempre que necessário.

Ao Prof. Vagner Batistela por me iniciar na área de química computacional, pelo incentivo e auxílio em tudo que pôde.

À Prof.<sup>a</sup> Jacqueline Marques pelas contribuições na discussão das estruturas moleculares dos corantes xantênicos.

Ao Diogo Pellosi e Bianca Estevão por permitir o uso de seus dados experimentais.

A todos os colegas “xantenóides”, em especial ao Diogo pelas discussões e auxílio acerca dos compostos estudados.

À Cristiane e Marina por sempre ajudarem prontamente em todos os processos burocráticos de compras de computadores e equipamentos.

A todos os amigos do grupo NUPESF, em especial ao Gustavo, Katieli e Camila por tantos anos de convivência e amizade.

Ao Claudemir e Cristina (secretaria) pela solicitude e atenção sempre que precisei.

À CAPES pela bolsa concedida.

À CAPES, CNPq e SETI pelo auxílio financeiro que permite o funcionamento do grupo NUPESF e tornou este trabalho possível.

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação e cooperaram para a realização deste trabalho.

# Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE ESQUEMAS .....	II
LISTA DE TABELAS .....	III
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	V
LISTA DE SÍMBOLOS.....	VII
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	X
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CORANTES XANTÊNICOS .....	2
1.2 ESTUDOS DE $pK_a$ DE CORANTES XANTÊNICOS .....	5
<b>2. MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL .....</b>	<b>10</b>
2.1 FUNDAMENTAÇÃO DOS MÉTODOS MECÂNICO-QUÂNTICOS .....	10
2.2 TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE (DFT) .....	14
2.3 FUNCIONAIS DE TROCA-CORRELAÇÃO .....	16
2.4 CONJUNTO DE FUNÇÕES DE BASE .....	19
2.5 ESTADOS ELETRÔNICOS EXCITADOS .....	20
2.6 TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE DEPENDENTE DO TEMPO (TD-DFT) .....	21
2.7 MODELOS CONTÍNUOS DE SOLVATAÇÃO .....	22
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>29</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>30</b>
4.1 EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO: CÁLCULOS EMPÍRICOS .....	30
4.2 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS COM AS ESTRUTURAS PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS.....	31
4.2.1 <i>Estado Fundamental</i> .....	31
4.2.2 <i>Estado Excitado</i> .....	33
4.3 EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO POR MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	33
4.4 CÁLCULOS DE $pK_a$ .....	34
4.4.1 <i>Cálculos de <math>pK_a</math> com o método direto</i> .....	34
4.4.2 <i>Cálculos de <math>pK_a</math> com o modelo de solvatação implícito-explicito</i> .....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>38</b>
5.1 EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO EMPÍRICO .....	38
5.2 EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO POR MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	44
5.3 ESTUDO DE $pK_a$ POR MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	51
5.3.1 <i><math>pK_a</math> da ERI e ERIMET em água e testes de diferentes níveis de teoria</i> .....	51
5.3.2 <i><math>pK_a</math> da ERI e ERIMET em DMSO e vácuo</i> .....	54
5.3.3 <i><math>pK_a</math> da EOS e EOSMET em água e vácuo</i> .....	56
5.3.4 <i><math>pK_a</math> da ERI e EOS através do modelo implícito-explicito</i> .....	58
5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL E COMPORTAMENTO ELETROSTÁTICO .....	60
5.4.1 <i>Otimização das estruturas</i> .....	60

5.4.2. <i>Análise eletrostática</i> .....	61
5.4.3. <i>Análise dos Orbitais Naturais de Ligação: Energia de Deslocalização Eletrônica</i> .....	64
5.4.4. <i>Análise dos Orbitais Naturais de Ligação: Distribuição de cargas e interações orbitales...</i>	67
5.5 ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO .....	73
5.5.1 <i>Escolha do nível de teoria</i> .....	73
5.5.2 <i>Estudo das transições eletrônicas das espécies protolíticas e tautoméricas</i> .....	76
5.5.3 <i>Orbitais HOMO e LUMO e o efeito da carga de COO- no grupo cromofórico</i> .....	84
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>89</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>92</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>100</b>



## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1.1.</b> DIAGRAMA DE JABLONSKI SIMPLIFICADO E MECANISMOS FOTOQUÍMICOS TIPO I E TIPO II. ....	2
<b>FIGURA 2.1.</b> MODELOS CONTÍNUOS DE SOLVATAÇÃO: (A) MODELO DE ONSAGER COM CAVIDADE ESFÉRICA E (B) MODELO PCM COM A CAVIDADE FORMADA POR ESFERAS CENTRADAS NOS ÁTOMOS, ADAPTADO DE PLIEGO (2006) E TOMASI <i>et al.</i> (2005). ....	24
<b>FIGURA 4.1.</b> CICLO TERMODINÂMICO PARA OBTENÇÃO DA VARIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DE GIBBS DE DESPROTONAÇÃO DE HA EM ÁGUA ( $\Delta G_{aq}$ ) OU DMSO ( $\Delta G_{aq} = \Delta G_{dms}$ ).....	35
<b>FIGURA 4.2.</b> CICLO TERMODINÂMICO PARA OBTENÇÃO DA VARIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DE GIBBS DE DESPROTONAÇÃO DE HA EM ÁGUA ( $\Delta G_{aq}$ ) ATRAVÉS DO MODELO DE SOLVATAÇÃO IMPLÍCITO-EXPLÍCITO .....	36
<b>FIGURA 5.1.</b> VISTA FRONTAL E LATERAL DOS TAUTÔMEROS NEQ E NEL DA ERITROSINA OTIMIZADOS COM B3LYP/DGDZVP E IEF-PCM/UFF EM ÁGUA.....	60
<b>FIGURA 5.2.</b> MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO DOS TAUTÔMEROS NEUTROS E MONOANIÔNICOS DA ERI OBTIDOS COM B3LYP/DGDZVP E SMD-COULOMB EM ÁGUA E ISOVALOR DE DENSIDADE DE $0,0004 \text{ e}/\text{Å}^3$ , A 298,15 K. AS SETAS REPRESENTAM METADE DO TAMANHO DO VETOR MOMENTO DE DIPOLO ( $\mu$ ) E APONTAM PARA O POLO POSITIVO. ....	62
<b>FIGURA 5.3.</b> MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO DOS TAUTÔMEROS NEUTROS E MONOANIÔNICOS DA EOS OBTIDOS COM B3LYP/DGDZVP E SMD-COULOMB EM ÁGUA E ISOVALOR DE DENSIDADE DE $0,0004 \text{ e}/\text{Å}^3$ , A 298,15 K. AS SETAS REPRESENTAM METADE DO TAMANHO DO VETOR MOMENTO DE DIPOLO ( $\mu$ ) E APONTAM PARA O POLO POSITIVO. ....	62
<b>FIGURA 5.4.</b> ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM ÁGUA DAS FORMAS PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS DA ERI E ERIMET DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE (QUIMIOMETRIA) E ESTIMADAS POR TD-DFT COM B3LYP/6-311++G(d,p) E SMD-COULOMB. (A) NE; (B) MA; (C) DA; (D) ERIMET-NE; (E) ERIMET-MA. ....	79
<b>FIGURA 5.5.</b> ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM 70% DMSO/ÁGUA DAS FORMAS PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS DA ERI DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE (QUIMIOMETRIA) E ESTIMADAS POR TD-DFT COM B3LYP/6-311++G(d,p) E SMD-COULOMB. (A) NE; (B) MA. ....	80
<b>FIGURA 5.6.</b> ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM ÁGUA DAS FORMAS PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS DA EOS E EOSMET DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE (QUIMIOMETRIA) E ESTIMADAS POR TD-DFT COM B3LYP/6-311++G(d,p) E SMD-COULOMB. (A) NE; (B) MA; (C) DA; (D) EOSMET-NE; (E) EOSMET-MA.....	81
<b>FIGURA 5.7.</b> VISTA FRONTAL DOS ORBITAIS HOMO E LUMO ( $0,0004 \text{ e}/\text{Å}^3$ ) DA ERI E EOS EM ÁGUA OBTIDOS COM O B3LYP/DGDZVP E IEF-PCM/UFF.....	86
<b>FIGURA 5.8.</b> VISTA LATERAL DOS ORBITAIS HOMO E LUMO ( $0,0004 \text{ e}/\text{Å}^3$ ) DA ERI E EOS EM ÁGUA OBTIDOS COM O B3LYP/DGDZVP E IEF-PCM/UFF.....	87

## Lista de Esquemas

<b>ESQUEMA 1.1.</b> FORMAS PROTOLÍTICAS – CATIÔNICA (CT), NEUTRAS (NE), MONOANIÔNICAS (MA) E DIANIÔNICA (DA) – E TAUTOMÉRICAS DA FLUORESCÉINA (FSC), EOSINA Y (EOS) E ERITROSINA B (ERI). NUMERAÇÃO DE NEQ DE ACORDO COM A IUPAC.....	4
<b>ESQUEMA 1.2.</b> EQUILÍBRIO PROTOLÍTICO ENTRE O METIL-ÉSTER NEUTRO (MET-NE) E METIL-ÉSTER MONOANIÔNICO (MET-MA) DA EOSINA Y (EOSMET) E DA ERITROSINA B (ERIMET).....	6
<b>ESQUEMA 5.1.</b> ESTRUTURA DA FORMA MAF DA ERI (X=I) E EOS (X=BR) NUMERADA DE ACORDO COM A IUPAC. (A) LIGAÇÕES CUJA ENERGIA É TRATADA NA TABELA 5.13. (B) EXEMPLO DA INTERAÇÃO ENTRE O ORBITAL $\sigma$ LIGANTE DA LIGAÇÃO C2–X20 COM OS ORBITAIS $\pi$ ANTILIGANTES ( $\pi^*$ ) DE C1–C13 E C3–C4..	68
<b>ESQUEMA 5.2.</b> ESTRUTURA DE NEQ DA ERI (X=I) E EOS (X=BR) ILUSTRANDO A INTERAÇÃO ENTRE OS ORBITAIS DOS PARES NÃO-LIGANTES (n) DE O8' COM O ORBITAL $\pi^*$ DE C9–C12.....	72

## Lista de Tabelas

<b>TABELA 5.1.</b> ABSORTIVIDADE MOLAR APARENTE ( $\epsilon$ ) JUNTO AO $\lambda_{M\acute{A}X}$ , FRAÇÃO MOLAR ( $\chi$ ) DOS TAUTÔMEROS NEUTROS (NE) E MONOANIÔNICOS (MA) DA ERI, CONSTANTES DE EQUILÍBRIO TAUTOMÉRICO ( $K_{Q-L}$ E $K_M$ ) E ENERGIA LIVRE PADRÃO DE REAÇÃO ( $\Delta_r G^\circ$ ) EM MISTURAS DE ÁGUA-DMSO E MEIO AQUOSO MICELAR A 30 °C, CALCULADOS COM DADOS DE PELLOSI (2012). ....	39
<b>TABELA 5.2.</b> ABSORTIVIDADE MOLAR APARENTE ( $\epsilon$ ) JUNTO AO $\lambda_{M\acute{A}X}$ , FRAÇÃO MOLAR ( $\chi$ ) DOS TAUTÔMEROS NEUTROS (NE) E MONOANIÔNICOS (MA) DA EOS, CONSTANTES DE EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO ( $K_{Q-L}$ E $K_M$ ) E ENERGIA LIVRE PADRÃO DE REAÇÃO ( $\Delta_r G^\circ$ ) EM MEIO AQUOSO MICELAR A 30 °C, CALCULADOS COM DADOS DE ESTEVÃO (2012). ....	41
<b>TABELA 5.3.</b> VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE PADRÃO DE REAÇÃO ( $\Delta_r G^\circ$ ) E CONSTANTE DE EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO ( $K_T$ ) DA ERITROSINA EM ÁGUA E VÁCUO OBTIDOS COM OS MODELOS DE SOLVENTE IEF-PCM E SMD COMBINADOS COM MODELOS DE RAIOS UFF, PAULING E SMD-COULOMB, A 298,15 K, EM M06-2X/DGDZVP E M06-2X/LANL2DZ(d,p). ....	46
<b>TABELA 5.4.</b> VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE PADRÃO DE REAÇÃO ( $\Delta_r G^\circ$ ) E CONSTANTE DE EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO ( $K_T$ ) DA ERITROSINA NO VÁCUO, EM ÁGUA E DMSO OBTIDOS COM OS MODELOS DE SOLVENTE IEF-PCM E COMBINADOS COM MODELOS DE RAIOS UFF, PAULING E SMD-COULOMB, A 298,15 K, EM B3LYP/DGDZVP E B3LYP/6-311++G(d,p). ....	47
<b>TABELA 5.5.</b> VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE PADRÃO DE REAÇÃO ( $\Delta_r G^\circ$ ) E CONSTANTE DE EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO ( $K_T$ ) DA EOSINA NO VÁCUO E EM ÁGUA OBTIDOS COM OS MODELOS DE SOLVENTE IEF-PCM E SMD COMBINADOS COM MODELOS DE RAIOS UFF, PAULING E SMD-COULOMB, A 298,15 K, EM B3LYP/DGDZVP E B3LYP/6-311++G(d,p). ....	49
<b>TABELA 5.6.</b> VALORES DE $pK_a$ PARA POSSÍVEIS EQUILÍBRIOS PROTOLÍTICOS ENTRE DIFERENTES TAUTÔMEROS DA ERI E ERIMET EM ÁGUA OBTIDOS COM OS MODELOS DE SOLVENTE IEF-PCM E SMD COMBINADOS COM MODELOS DE RAIOS UFF, PAULING E SMD-COULOMB, A 298,15 K, EM B3LYP/DGDZVP E B3LYP/6-311++G(d,p). ....	52
<b>TABELA 5.7.</b> VALORES DE $pK_a$ PARA POSSÍVEIS EQUILÍBRIOS PROTOLÍTICOS ENTRE DIFERENTES TAUTÔMEROS DA ERI EM ÁGUA OBTIDOS COM OS MODELOS DE SOLVENTE IEF-PCM E SMD COMBINADOS COM MODELOS DE RAIOS UFF, PAULING E SMD-COULOMB, A 298,15 K, EM M06-2X/DGDZVP E M06-2X/LANL2DZ(d,p). ....	53
<b>TABELA 5.8.</b> VALORES DE $pK_a$ PARA POSSÍVEIS EQUILÍBRIOS PROTOLÍTICOS ENTRE DIFERENTES TAUTÔMEROS DA ERI E ERIMET EM DMSO E VÁCUO OBTIDOS COM OS MODELOS DE SOLVENTE IEF-PCM E SMD COMBINADOS COM MODELOS DE RAIOS UFF, PAULING E SMD-COULOMB, A 298,15 K, EM B3LYP/DGDZVP E B3LYP/6-311++G(d,p). ....	55
<b>TABELA 5.9.</b> VALORES DE $pK_a$ PARA POSSÍVEIS EQUILÍBRIOS PROTOLÍTICOS ENTRE DIFERENTES TAUTÔMEROS DA EOS E EOSMET EM ÁGUA E VÁCUO OBTIDOS COM OS MODELOS DE SOLVENTE IEF-PCM E SMD COMBINADOS COM MODELOS DE RAIOS UFF, PAULING E SMD-COULOMB, A 298,15 K, EM B3LYP/DGDZVP E B3LYP/6-311++G(d,p). ....	57
<b>TABELA 5.10.</b> ÂNGULOS DIEDRAIS ENTRE OS ÁTOMOS C13-C9-C1'-C2' E C1'-C2'-C7'-O8' PARA AS ESPÉCIES DA ERI E EOS OBTIDOS COM B3LYP/DGDZVP E B3LYP/6-311++G(d,p) EM ÁGUA COM O MODELO DE SOLVENTES IEF-PCM/UFF, A 298,15 K. ....	61

<b>TABELA 5.11.</b> MOMENTOS DE DIPOLO (M) OBTIDOS COM B3LYP/6-311++G(d,p) E SMD-COULOMB EM ÁGUA E DMSO PARA AS ESPÉCIES PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS DA ERI, ERIMET, EOS E EOSMET, A 298,15 K.....	64
<b>TABELA 5.12.</b> ENERGIA DE DESLOCALIZAÇÃO ELETRÔNICA ( $E_{desl}$ ) OBTIDA POR NBO EM B3LYP/DGDZVP E SMD-COULOMB EM ÁGUA E DMSO, A 298,15 K.....	66
<b>TABELA 5.13.</b> ENERGIA DE ESTABILIZAÇÃO ELETRÔNICA ( $E_{estab}$ ) DA INTERAÇÃO ENTRE ORBITAL $\Sigma$ LIGANTE (DOADOR) E $\Pi$ ANTILIGANTE ( $\pi^*$ , ACCEPTOR), OBTIDO PARA A FORMA MAF DA EOS (X=Br) E ERI (X=I) ATRAVÉS DE NBO EM B3LYP/DGDZVP E SMD-COULOMB EM ÁGUA A 298,15 K. ....	68
<b>TABELA 5.14.</b> POLARIZAÇÃO DAS LIGAÇÕES QUÍMICAS C-X NA EOS (X=Br) E ERI (X=I) OBTIDAS PARA A FORMA MAC E MAF ATRAVÉS DE NBO EM B3LYP/DGDZVP E SMD-COULOMB EM ÁGUA. ....	69
<b>TABELA 5.15.</b> CARGAS PARCIAIS DE ALGUNS ELEMENTOS (UNIDADE DE CARGA ELEMENTAR, $e$ ) OBTIDAS POR NBO NO NÍVEL DE TEORIA B3LYP/DGDZVP EM VÁCUO E ÁGUA COM O MODELO DE SOLVENTE SMD-COULOMB.....	70
<b>TABELA 5.16.</b> ENERGIA DE ESTABILIZAÇÃO ELETRÔNICA ( $E_{estab}$ ) DA INTERAÇÃO ENTRE OS ORBITAIS DOS PARES NÃO-LIGANTES (n) DE O8' COM O ORBITAL $\pi^*$ DE C9-C12 OU $n^*$ DE C9 OBTIDAS ATRAVÉS DE ANÁLISE NBO COM B3LYP/DGDZVP E SMD-COULOMB EM ÁGUA. ....	72
<b>TABELA 5.17.</b> VALORES EXPERIMENTAIS DE COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO ( $\lambda_{MÁX}$ ) E ABSORTIVIDADE MOLAR (E) DAS ESPÉCIES PROTOLÍTICAS DA ERI, ERIMET, EOS E EOSMET EM ÁGUA, A 303,15 K, OBTIDOS DE PELLOSI (2012) E ESTEVÃO (2012).....	73
<b>TABELA 5.18.</b> COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO ( $\lambda_{MÁX}$ ) E A RESPECTIVA FORÇA DO OSCILADOR (f) DA ERI E ERIMET NOS DIFERENTES MODELOS DE SOLVATAÇÃO E CONJUNTOS DE RAIOS DE vdW TESTADOS EM ÁGUA, A 298,15 K, COM OS NÍVEIS DE TEORIA B3LYP/DGDZVP E B3LYP/6-311++G(d,p).....	75
<b>TABELA 5.19.</b> COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO ( $\lambda_{MÁX}$ ) E A RESPECTIVA FORÇA DO OSCILADOR (f) DA EOS E EOSMET NOS DIFERENTES MODELOS DE SOLVATAÇÃO E CONJUNTOS DE RAIOS DE VDW TESTADOS EM ÁGUA, A 298,15 K, COM AS METODOLOGIAS B3LYP/DGDZVP E B3LYP/6-311++G(d,p).....	75
<b>TABELA 5.20.</b> COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO ( $\lambda_{MÁX}$ ) E A RESPECTIVA FORÇA DO OSCILADOR (f) NO MÉTODO CIS COM AS FUNÇÕES DE BASE DGDZVP E 6-311++G(d,p), EM IEF-PCM/UFF EM ÁGUA A 298,15 K.....	76
<b>TABELA 5.21.</b> TRANSIÇÕES HOMO→LUMO, SEUS COEFICIENTES E ENERGIAS DE TRANSIÇÃO ( $\Delta E$ ), COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO ( $\lambda_{MÁX}$ ) E FORÇA DO OSCILADOR (f) DAS ESPÉCIES PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS DA ERI E ERIMET EM ÁGUA E DMSO, OBTIDAS COM B3LYP/6-311++G(d,p) E SMD-COULOMB, A 298,15 K.....	78
<b>TABELA 5.22.</b> TRANSIÇÕES HOMO→LUMO, SEUS COEFICIENTES E ENERGIAS DE TRANSIÇÃO ( $\Delta E$ ), COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO ( $\lambda_{MÁX}$ ) E FORÇA DO OSCILADOR (f) DAS ESPÉCIES PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS DA EOS E EOSMET EM ÁGUA, OBTIDAS COM B3LYP/6-311++G(d,p) E SMD-COULOMB, A 298,15 K.....	81
<b>TABELA 5.23.</b> CONSTANTE DE EQUILÍBRIO TAUTOMÉRICO DAS FORMAS NEUTRAS ( $K_{Q-L}$ ) E MONOANIÔNICAS ( $K_M$ ) EM ÁGUA E DMSO CALCULADAS COM A FORÇA DO OSCILADOR OBTIDA POR TD-DFT EM B3LYP/6-311++G(d,p) E SMD-COULOMB, A 298,15 K.....	82

## Lista de Siglas e Abreviaturas

ASC – Superfície de Cargas Aparentes	HOMO – <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
B3LYP – Funcional híbrido <i>Becke-3-parameter-Lee-Yang-Parr</i>	IEF-PCM – <i>Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Method</i>
CIS – <i>Single-excitation Configuration Interaction</i>	IFDMO – Inativação Fotodinâmica de Microrganismos
CT – Catiônica	INDO/S – <i>Intermediate Neglect of Differential Overlap/Spectroscopy</i>
CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio	ISC – Cruzamento Inter-Sistemas
DA – Dianiônica	LCAO – <i>Linear Combination of Atomic Orbitals</i>
DFT – <i>Density Functional Theory</i>	LDA – <i>Local Density Approximation</i>
DGDZVP – <i>DGauss Double-Zeta Valence Polarized</i>	LUMO – <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
DMSO – Dimetilsulfóxido	MA – Monoaniônica
ECP – Potencial Nuclear Efetivo	MAC – Monoaniônica Carboxilato
EOS – Eosina Y	MAF – Monoaniônica Fenolato
EOSMET – Metil-éster da Eosina Y	MEP – Mapa de Potencial Eletrostático
ERI – Eritrosina B	MET-MA – Derivado Metil Éster Monoaniônico Fenolato
ERIMET – Metil-éster da Eritrosina B	MET-NE – Derivado Metil Éster Neutro Quinóide
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio	NBO – <i>Natural Bond Orbital</i>
FS – Fotossensibilizador	NE – Neutra
FSC – Fluoresceína	
GGA – <i>Generalized Gradient Approximation</i>	
HF – Hartree-Fock	

NEL – Neutra Lactona

NEQ – Neutra Quinóide

NEZ – Neutra Zwiteriônica

P-123 – Plurônico Polimérico Tribloco P-  
123

PCM – *Polarizable Continuum Method*

SAS – Superfície Acessível ao Solvente

SCRf – *Self Consistent Reaction Field*

SMD – Modelo de Solvente Universal

SP - *Single Point*

TD-DFT – *Time-Dependent Density  
Functional Theory*

TFD – Terapia Fotodinâmica

UFF – *Universal Force Field*

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

vdW – van der Waals

ZPE – *Zero Point Energy*

## Lista de Símbolos

(d,p) – Funções de polarização para átomos pesados e átomos de hidrogênio	$G_{cav}$ – Energia da cavitação do soluto em um solvente
++ Funções difusas para átomos pesados e átomos de hidrogênio	$G_{dis}$ – Energia de dispersão da interação soluto-solvente
$\Delta E$ – Variação de energia dos orbitais HOMO e LUMO	$G_{rep}$ – Energia de repulsão soluto-solvente
$\Delta_r G^0$ – variação da energia livre de Gibbs padrão de reação	$\hat{H}$ – Operador Hamiltoniano
$\Delta G_{sol}$ – Variação da energia livre de Gibbs de solvatação	$K_M$ – Constante de equilíbrio tautomérico das formas Monoaniônicas
$\Delta_r G_M^o$ – variação da energia livre de Gibbs padrão da reação dos tautômeros nonoaniônicos	$K_{Q-L}$ – Constante de equilíbrio tautomérico Quinóide-Lactona
$\Delta_r G_{Q-L}^o$ - variação da energia livre de Gibbs padrão da reação Quinóide-Lactona	$K_T$ – Constante de equilíbrio tautomérico
$\nabla\rho(r)$ – Gradiente da Densidade Eletrônica	$\epsilon$ – Coeficiente de absorvidade molar
$E_0$ – Energia Eletrônica	$\lambda_{max}$ – Comprimento de onda de máxima absorção
$E_{desl}$ – Energia de deslocalização eletrônica	$\mu$ – Momento de dipolo
$E_{estab}$ – Energia de estabilização eletrônica	$\xi$ – Constante dielétrica
$E_{HOMO}$ – Energia dos orbitais HOMO	$\rho(r)$ – Densidade eletrônica em um ponto de coordenada $r$
$E_{LUMO}$ – Energia dos orbitais LUMO	$\chi$ – Fração molar
$E_{XC}[\rho]$ – Funcional de troca-correlação	$\Psi$ – Função de onda
$G$ – Função Gaussiana	$n$ – Orbital de par de elétrons não ligantes
$G$ ( <i>itálico</i> ) – Energia livre de Gibbs	$\sigma$ – Orbital sigma ligante
$G_{corr}$ – Correção para a Energia livre de Gibbs	$\pi$ – Orbital “pi” ligante
	$\pi^*$ – Orbital “pi” antiligante

## Resumo

Diversos corantes combinados com luz na presença de oxigênio têm sido empregados no tratamento de doenças com crescimento anormal de tecidos (*e.g.* câncer), modalidade conhecida como Terapia Fotodinâmica (TFD), e no combate de vírus, bactérias, protozoários e fungos, denominada Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (IFDMO). Corantes xantênicos, tais como a Eosina Y (bromado) e Eritrosina B (iodado), são derivados halogenados da fluoresceína que têm mostrado grande potencial como fotossensibilizadores (FS) para TFD e IFDMO, porém apresentam um complicado equilíbrio em função do pH do meio e, adicionalmente, as espécies protolíticas estão presentes em equilíbrios tautoméricos. Além do pH, a constante dielétrica ( $\xi$ ) e interações eletrostáticas com o meio determinam a forma protolítica e tautomérica presente e, portanto, modulam as propriedades físico-químicas dos FS. Esses corantes apresentam fenômenos complexos de inversão de  $pK_a$ , já que sua estrutura possui grupo protolítico fenólico ( $-OH$ ) que em determinadas condições mostrou-se mais ácido do que seu grupamento ácido carboxílico ( $-COOH$ ); ou seja,  $pK_{a-OH} < pK_{a-COOH}$  o que não é comum. Partindo de um meio ácido, com o aumento do pH o equilíbrio protolítico é deslocado da forma catiônica (CT) para neutra (NE), seguida da forma monoaniônica (MA) e dianiônica (DA). A forma protolítica neutra pode ser constituída pelos tautômeros: zwitteriônico (NEZ), quinóide (NEQ) e lactona (NEL), enquanto a forma monoaniônica é composta pelos tautômeros carboxilato (MAC) e fenolato (MAF).

Neste trabalho foram calculadas as constantes de equilíbrio tautomérico ( $K_T$ ) entre  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  e  $MAC \rightleftharpoons MAF$  da Eosina e Eritrosina a partir das absorvidades molares ( $\epsilon$ ) obtidas anteriormente em nosso grupo de pesquisas em água, misturas DMSO/água e micelas de SDS, CTAB e P-123 para verificar a estabilidade relativa dos tautômeros de acordo com as condições do meio. Estes equilíbrios também foram avaliados calculando  $K_T$  por métodos químico-computacionais em água, DMSO e vácuo utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT). Foram testados os funcionais B3LYP e M06-2X, os conjuntos de base DGDZVP, 6-311++G(d,p) e LANL2DZ(d,p) e os modelos de solvatação IEF-PCM e SMD juntamente com os conjuntos de raios de van der Waals UFF, Pauling e SMD-Coulomb utilizando o pacote Gaussian 09 (UNIX). Os níveis de teoria obtidos foram avaliados através dos cálculos de  $K_T$  e  $pK_a$  no estado fundamental e dos espectros de absorção eletrônica (através da DFT dependente do tempo – TD-DFT) no estado singleto excitado, comparando as descrições teóricas com os dados experimentais. Os resultados indicaram B3LYP/DGZVP e B3LYP/6-311++G(d,p) como mais adequados para cálculos de  $K_T$ ,  $pK_a$  e espectros de absorção quando utilizados com SMD-



Coulomb. O conjunto de base DGDZVP destacou-se não apenas por descrever corretamente o sistema, mas também por ter baixo custo computacional em relação aos outros testados.

Os resultados de  $K_T$  (experimentais e teóricos) e os espectros de absorção de cada tautômero por TD-DFT, em geral, mostraram que NEQ torna-se favorável frente à NEL em água, sendo que NEL ( $\epsilon = 0$ , incolor) é mais bem estabilizado em ambientes de baixa  $\xi$ . Das espécies monoaniônicas da Eritrosina, MAC esta presente em maior quantidade em água enquanto a alta distribuição de cargas e o menor momento de dipolo de MAF a faz favorável em ambientes de baixa  $\xi$ . Observou-se que nos meios em que MAF é estabilizada ocorre inversão de  $pK_a$ , enquanto onde MAC é preferencial tem-se  $pK_{a-COOH} < pK_{a-OH}$ . Para a Eosina em água, MAF é tão favorecida quanto MAC, justificando sua inversão de  $pK_a$  neste meio. Assim, o tautômero MAF parece ser o responsável por causar inversão de  $pK_a$  nos meios onde está presente em grande quantidade. Esse resultado é importante para TFD e IFDMO visto que MAF absorve mais luz do que MAC.

A análise estrutural, a distribuição de cargas, os momentos de dipolo ( $\mu$ ), os orbitais naturais de ligação (NBO) e os orbitais HOMO-LUMO forneceram informações importantes do comportamento de cada espécie em diferentes meios. A maior concentração de cargas sobre o grupo carboxilato de MAC e seu maior momento de dipolo em relação à MAF justifica sua grande estabilidade em água para a Eritrosina. Por sua vez, a alta deslocalização de cargas da forma MAF da Eritrosina, constatada através de análises de NBO, contribui para sua estabilidade em DMSO. Em relação à Eosina, a estabilidade de MAF em água – que causa a inversão de  $pK_a$  neste meio – é pouco influenciada pela deslocalização eletrônica, e provavelmente se deve a efeitos estéricos e de solvatação, o qual é favorecido pelo alto momento de dipolo de MAF em água (apenas 2 debyes menor que MAC). Contribuições na sobreposição de orbitais  $\sigma$  de C–Br e C–I com  $\pi^*$  de C–C contribuem para a deslocalização eletrônica diferenciada da espécie MAF da Eosina e da Eritrosina.

Assim, tendo em vista que em aplicações fotodinâmicas a capacidade de absorção de luz é fundamental, este trabalho evidencia que algumas formas tautoméricas da Eritrosina e Eosina têm absorção de luz limitada, sendo que suas concentrações relativas foram estimadas. Desta forma, este estudo também se mostra importante para compreender o comportamento tão peculiar e complexo destes dois importantes candidatos a fotossensibilizador para TFD e IFDMO.

**Palavras-chave:** Química teórica, Teoria do Funcional da Densidade, Equilíbrio Tautomérico,  $pK_a$ , Eritrosina B, Eosina Y.

## Abstract

Several dyes combined with light in the presence of oxygen are used in the treatment of diseases with abnormal tissue growth (*e.g.* cancer), procedure known as Photodynamic Therapy (PDT), and to combat viruses, bacteria, protozoa and fungi, called Photodynamic Inactivation of Microorganisms (PDIMO). Xanthene dyes such as Eosin Y (brominated) and Erythrosin B (iodinated) are halogen-Fluorescein derivatives that have shown high potentiality as photosensitizers (PS) for PDT and PDIMO. However they exhibit a complex chemical equilibrium depending on the pH and, additionally, some of protolytic species are present in tautomeric equilibrium. Besides pH, dielectric constant ( $\xi$ ) and electrostatic interactions in the aqueous environment determine the protolytic and tautomeric forms and thus modulate the physico-chemical properties of the PS. These dyes exhibit a complex phenomena of reversal  $pK_a$ , since their structures have phenol group ( $-OH$ ) that under certain conditions was more acid than the carboxylic acid group ( $-COOH$ ), *i.e.*,  $pK_{a-OH} < pK_{a-COOH}$  which is not so usual. Starting from an acid medium, as the pH is increased, the equilibrium is shifted from the cationic (CT) protolytic form to neutral (NE), then to the monoanionic (MA) and finally to the dianionic (DA) form. The neutral form can be composed by tautomers: zwitterionic (NEZ), quinoid (NEQ) and lactone (NEL), while the monoanionic form is composed by carboxylate (MAC) and phenolate (MAF) tautomers.

In this work we calculated the tautomeric equilibrium constant ( $K_T$ ) between  $NEL \rightleftharpoons NEQ$  and  $MAC \rightleftharpoons MAF$  of Eosin and Erythrosin using the molar absorptivities ( $\epsilon$ ) obtained previously in our research group in water, DMSO/water mixtures and SDS, CTAB and P-123 micelles to assess the relative stability of tautomers according to the environmental conditions. These equilibria were also evaluated by calculating  $K_T$  through chemical computational methods in water, DMSO and vacuum using the Density Functional Theory (DFT). The B3LYP and M06-2X functional, the basis set DGDZVP, 6-311++G(d,p) and LANL2DZ (d,p) and the IEF-PCM and SMD solvation model were tested along with the van der Waals radii set UFF, Pauling and SMD-Coulomb employing the Gaussian 09 (UNIX) package. The obtained levels of theory were assessed through  $K_T$  and  $pK_a$  calculations in the ground state and the electronic absorption spectra (by *Time Dependent*-DFT, TD-DFT) in the singlet excited state, comparing the theoretical descriptions with the experimental data. The results indicated B3LYP/DGZVP and B3LYP/6-311++G(d,p) as more suitable for calculations of  $K_T$ ,  $pK_a$  and absorption spectra when used with SMD-Coulomb. The DGDZVP basis described quite well the systems and showed low computational cost compared to others tested methodologies.

The  $K_T$  results (experimental and theoretical) and absorption spectra for each tautomer obtained by TD-DFT, in general showed: NEQ is favored than NEL in water, while NEL ( $\epsilon = 0$ , colorless) is more stabilized at low dielectric constant environments (DMSO presence). From the monoanionic species of Erythrosin, high amounts of MAC is found in water while the higher charge distribution and lower dipole moment of MAF make it favorable in low dielectric environments. It was observed that in the environments where MAF is stabilized, the  $pK_a$  inversion occurs, and where MAC is preferred the system shows  $pK_{a-COOH} < pK_{a-OH}$ . For Eosin, MAF is already favored in water, which justifies its  $pK_a$  reversion. Thus, the MAF tautomer seems to be responsible for causing reversal  $pK_a$ . This result is important for PDT and PDIMO since MAF absorbs more light than MAC.

The structural analysis, the charges distribution, the dipole moments ( $\mu$ ), the natural bond orbitals (NBO) and the HOMO-LUMO orbitals provided important information about the behavior of each species in different environments. The highest charge concentration on the carboxylate group of MAC and its larger dipole moment relative to MAF justifies its high stability in water for Erythrosin. In the other hand, the charge delocalization of MAF - Erythrosin obtained through NBO analysis explains its stability in DMSO. Regarding Eosin, the MAF stability in water – that causes the  $pK_a$  inversion – undergoes low influence by electron delocalization, which is probably due to steric and solvation effects that is favored by the high MAF dipole moment in water (2 debyes smaller than MAC). Contributions in the overlapping of  $\sigma$  (C-Br and C-I) with  $\pi^*$  (C-C) orbitals contribute to different electron delocalization for MAF of Eosin and Erythrosine.

Thus, considering that in PDT and PDIMO the light absorption capacity is fundamental, it is showed that some tautomeric forms of Erythrosine and Eosin have limited absorption of light and in solution is quantified their relative concentrations. In addition, the present work helps the understanding of these complex and peculiar behavior of two important candidates as photosensitizers for photodynamic applications.

**Keywords:** Theoretical Chemistry, Density Functional Theory, Tautomeric Equilibrium,  $pK_a$ , Erythrosin B, Eosin Y.

# 1. INTRODUÇÃO

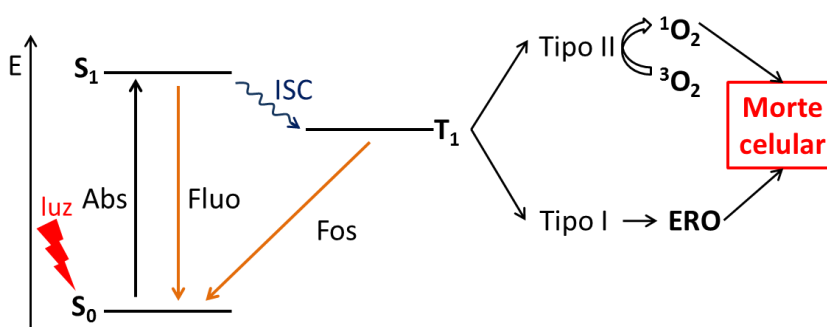
O uso de corantes remonta desde tempos pré-históricos em pinturas rupestres, cujas finalidades iam desde a sinalização de caminhos e indicação de fontes de água ou comida até a marcação de territórios. Historicamente o desenvolvimento de pigmentos contou com contribuições dos egípcios, chineses, gregos e romanos obtidos das mais variadas fontes e para as mais diversas finalidades (Barnett *et al.*, 2006). Atualmente o emprego de corantes e pigmentos é vasto sendo usado no tingimento de tecidos, cabelos, couro, papel e outros materiais, além de alimentos, bebidas, cosméticos, medicamentos, protetores solares, como princípio ativo em terapias médicas, em componentes eletrônicos, células solares, filmes fotográficos, etc. Também são empregados na pesquisa científica como sondas biológicas, marcadores celulares, indicadores de pH, etc (Barnet, 2006; Shahid, 2013).

Um corante deve absorver luz na região visível do espectro eletromagnético. Sua cor depende da diferença de energia  $\Delta E$  entre os orbitais moleculares HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), orbitais envolvidos na transição eletrônica da absorção de luz. Quanto menor o  $\Delta E$ , maior será o comprimento de onda que corresponde a máxima absorção,  $\lambda_{\max}$  (Valeur, 2002; Brown, 2005).

Uma característica marcante de corantes orgânicos é a presença extensiva de elétrons  $\pi$  deslocalizados. Para isso a molécula deve possuir duplas ligações C-C alternadas (hibridização  $sp^2$ ) que caracterizam conjugação das ligações  $\pi$ . Contudo, a conjugação requer que o orbital  $p$  de um átomo de carbono seja paralelo ao orbital  $p$  do carbono adjacente para haver sobreposição. Quanto maior a conjugação, menor o  $\Delta E$  e maior o  $\lambda_{\max}$  (Valeur, 2002; Brown, 2005).

Corantes possuem elevada absorção de luz visível e podem induzir ou participar de reações fotoquímicas, permitindo seu uso como agentes fototerapêuticos. Estes são chamados de fotossensibilizadores (FS). Um FS no estado fundamental tem multiplicidade de spin singlete ( $S_0$ ); ao absorver luz pode ser excitado para um estado  $S_1$ , de onde pode ocorrer um processo de

cruzamento inter-sistemas (ISC), adquirindo multiplicidade tripleto ( $T_1$ ) (Figura 1.1) (Valeur, 2002; Lakowicz, 2006). Em  $T_1$  o FS pode reagir com oxigênio molecular (tripleto,  $^3O_2$ ), gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) ou interagir formando oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Estas espécies, altamente oxidantes, atacam tecidos biológicos e constituem o princípio básico de tratamento de doenças com crescimento celular anormal – como o câncer – conhecida como Terapia Fotodinâmica (TFD) (Simplicio *et al*, 2002; Celli *et al*, 2010; Fayter *et al*, 2010; Mroz *et al*, 2011 ). Quando aplicado no controle contra fungos, bactérias, vírus e outros protozoários esta modalidade é chamada de Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (IFDMO) (Wainwright, 2002; Perussi, 2007; Gerola *et al*, 2011[a]).



**Figura 1.1.** Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismos fotoquímicos tipo I e tipo II.

Diversos compostos com potencial para aplicação em TFD têm sido estudados, com destaque para as porfirinas, clorinas e ftalocianinas (Nunes *et al*, 2004; Pervaiz *et al*, 2006; Gerola *et al*, 2011[a] e [b]). Contudo, novos princípios ativos vêm sendo estudados, tais como os corantes xantênicos, que apresentam potencial para aplicação em TFD e IFDMO (Perussi, 2007; Nagata *et al.*, 2012; Pellosi *et al.*, 2013).

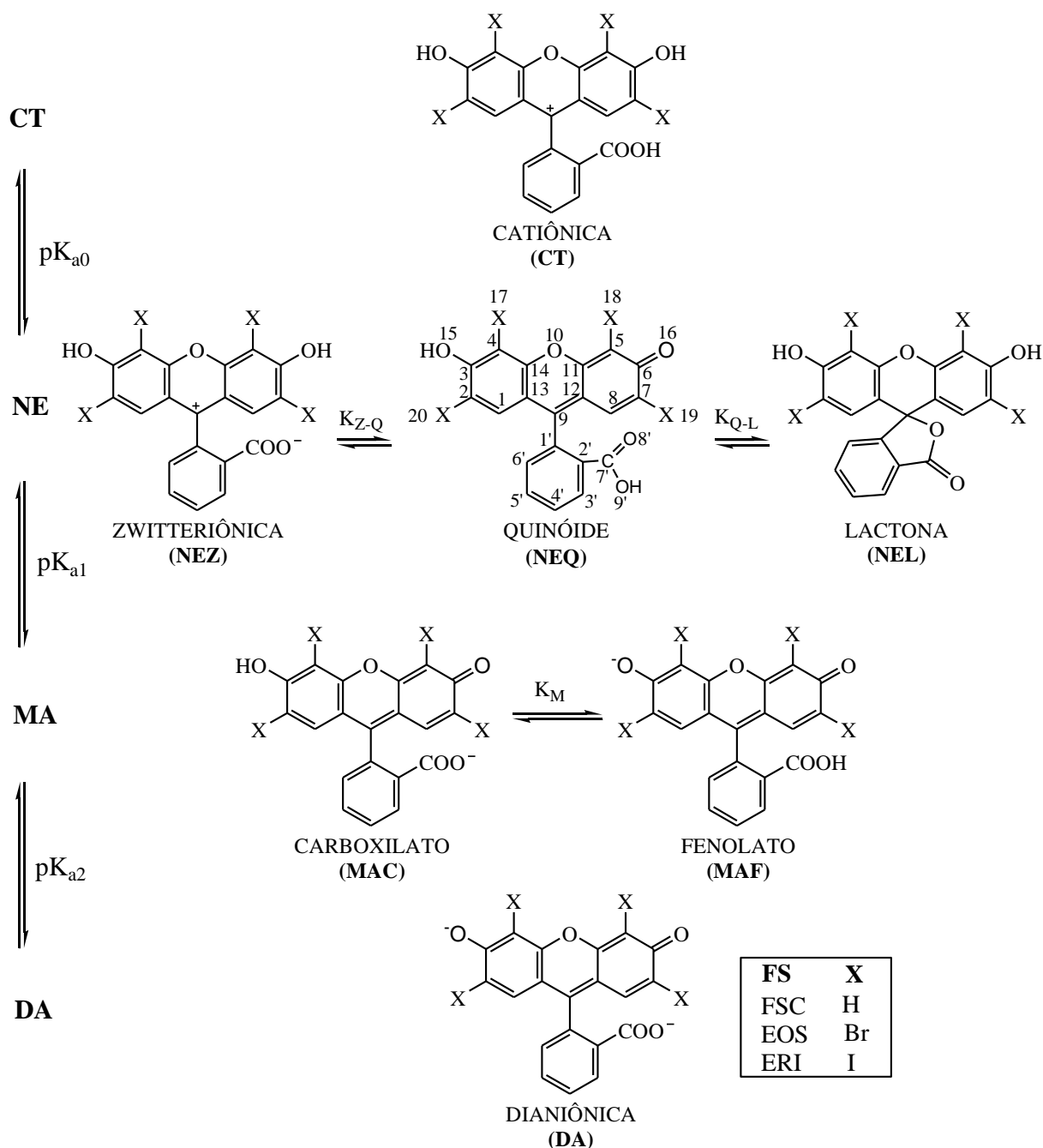
## 1.1 Corantes Xantênicos

Os corantes xantênicos são compostos constituídos de anéis aromáticos altamente conjugados, cuja unidade básica é constituída por três anéis condensados na parte superior da molécula (parte xantênica) que é a parte cromofórica (Esquema 1.1). Isso lhes proporciona boa absorção de luz na região visível de 430 a 550 nm e várias características desejáveis para

utilização fotodinâmica (Perussi, 2007). Estudos mostraram que a Eosina Y e a Eritrosina B apresentam elevada ação fotodinâmica frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Savin e Angeli, 1985; Pellosi, 2012; Estevão, 2012); além disso, a Eritrosina B também é um FS em potencial para uso da IFDMO no biofilme de placas dentárias devido a sua elevada fotoatividade contra microrganismos presentes na boca, tais como a bactéria *Streptococcus mutans* (Wood *et al.*, 2006; Nagata *et al.*, 2012).

Os corantes xantênicos, representados no Esquema 1.1 pela Fluoresceína (FSC), Eosina Y (EOS) e Eritrosina B (ERI), possuem dois grupos fenólicos na parte xantênica e um grupo carboxílico na parte benzênica da molécula. Assim, os hidrogênios protolíticos destes grupos totalizam três  $pK_{a,s}$  e conseqüentemente quatro formas protolíticas, sendo a mais ácida a catiônica (CT), seguida pela neutra (NE), na seqüência a monoaniônica (MA) e a mais básica dianiônica (DA). Destas, a forma neutra NE pode ser composta pelas espécies tautoméricas zwitteriônica (NEZ), quinóide (NEQ) e lactona (NEL), enquanto para a forma monoaniônica MA existem os tautômeros carboxilato (MAC) e fenolato (MAF) (Mchedlov-Petrossyan e Mayorga, 1992; Jang *et al.*, 2001; Mchedlov-Petrossyan, 2005; Vodolazkaya *et al.*, 2009 [a] e [b]).

O  $pK_{a0}$  para os derivados xantênicos halogenados (EOS e ERI) em meio aquoso é negativo, fazendo a forma catiônica CT existir apenas em meios extremamente ácidos ( $pH < 0$ , escala de Hammett) enquanto a dianiônica DA predomina em meios neutros e alcalinos (Mchedlov-Petrossyan e Kleshchevnikova, 1994; Batistela *et al.*, 2010; Batistela *et al.*, 2011). Os átomos de bromo e iodo, respectivamente na Eosina Y e Eritrosina B, têm efeito retirador de densidade eletrônica, fazendo os valores de  $pK_{a,s}$  serem menores em relação à fluoresceína (não-halogenado) (Mchedlov-Petrossyan e Kleshchevnikova, 1994; Batistela *et al.*, 2011).



**Esquema 1.1.** Formas protolíticas – catiônica (CT), neutras (NE), monoaniônicas (MA) e dianiônica (DA) – e tautoméricas da Fluoresceína (FSC), Eosina Y (EOS) e Eritrosina B (ERI). Numeração de NEQ de acordo com a IUPAC.

Cada espécie protolítica presente em um dado meio e certo pH tem propriedades químicas, físicas, fotofísicas e biológicas específicas. Assim, é importante conhecer a forma protolítica e tautomérica de um possível FS para uso em TFD ou IFDMO, bem como suas características. Isso permite entender a interação com sítios alvo, inclusive células doentes que costumam apresentar pH micro-local mais ácido que tecidos saudáveis (Gatenby e Gawlinski,

1996), efeito também observado em regiões de cáries dentárias onde o pH é ao redor de 3 (Wood, 2006). Além disso, muito dos sistemas de formulação, chamados de *drug delivery systems* tais como nanopartículas micelares, vesiculares e poliméricas também alteram o pH micro-local junto às suas interfaces, tal como ocorre nas superfícies de membranas biológicas. Desse modo é fundamental o estudo de  $pK_a$  e o conhecimento da(s) espécie(s) predominante(s) em dado pH, as quais vão modular sua interação com sistemas carreadores, com membranas de células biológicas, bem como seus efeitos fotodinâmicos.

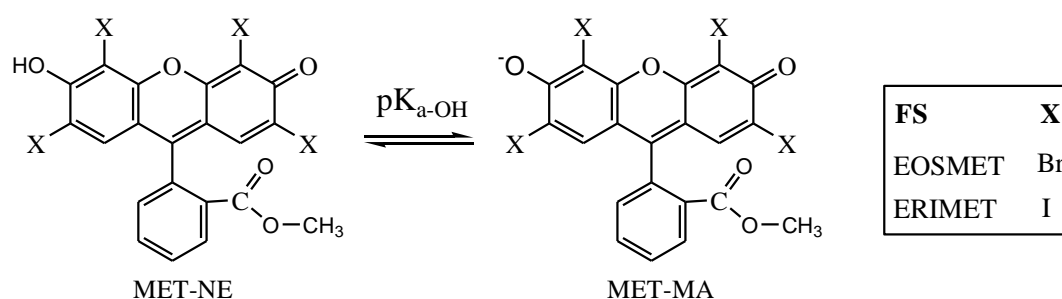
Assim, dentre outras coisas, neste trabalho discutem-se as interações e equilíbrios em meio água/DMSO, sistemas micelares de dodecil sulfato de sódio (SDS, aniônico), Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB, catiônico) e surfactantes poliméricos *Pluronic* P-123 (neutro).

## 1.2 Estudos de $pK_a$ de Corantes Xantênicos

Normalmente um grupo carboxílico deve mostrar maior acidez ( $pK_{a-COOH}$  menor) do que um grupo fenólico ( $pK_{a-OH}$  maior) (*CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 2007-2008). Contudo, em corantes xantênicos este fato não é necessariamente verdade. Inclusive nestes compostos há divergências na atribuição dos  $pK_a$ s de cada grupo ácido-base. Isso se deve à ineficiência das metodologias de análise univariada para o estudo destes sistemas protolíticos complexos e das várias estruturas tautoméricas possíveis para cada espécie (Batistela *et al.*, 2010 e 2011). Diferentes meios (orgânicos ou aquosos micelares) e/ou a presença de grupos doadores ou retiradores de densidade eletrônica ligados aos xantenos podem cooperar para que ocorra uma inversão de  $pK_a$ , fazendo  $pK_{a-OH} < pK_{a-COOH}$ . Isso foi observado para a 2,7-diclorofluoresceína em misturas benzeno-etanol-água e em solução de micelas não-iônicas (Mchedlov-Petrossyan *et al.*, 2006) e, também, para a Eosina Y em água e meio micelar, sendo a inversão atribuída ao efeito dos átomos de cloro e bromo, respectivamente, que alteram a acidez dos grupos protolíticos da porção xantênica (Batistela *et al.*, 2011; Estevão, 2012).



Metodologias quimiométricas de análise multivariada mostraram que a Eritrosina B, mesmo possuindo átomos pesados de iodo, não apresenta inversão de  $pK_a$  em água pura (Batistela *et al.*, 2011). Por comparação com um derivado metil-éster da Eritrosina (ERIMET, Esquema 1.2), que somente apresenta o  $pK_{a-OH}$ , e por semelhança espectral entre as espécies protolíticas da ERI e ERIMET atribuíram-se os seguintes equilíbrios em água:  $NEQ \rightleftharpoons MAC \rightleftharpoons DA$ , sendo correspondente a  $pK_{a-COOH} < pK_{a-OH}$  (Pellosi, 2012; Batistela *et al.*, 2011). Contudo, em misturas de água e dimetilsulfóxido (água/DMSO) e meios aquoso micelares de P-123 e CTAB, a Eritrosina apresentou inversão de  $pK_a$  (Pellosi, 2012). Em pH ácido a ausência de absorção da forma neutra da ERI (solução incolor, absorvidade molar ( $\epsilon$ )  $\cong 0$ ), indicou a predominância do tautômero NEL, já que a conjugação de ligações  $\pi$  na parte cromofórica é limitada devido à hibridização  $sp^3$  de C9 (Esquema 1.1). Assim, a espécie NEL foi favorecida em meio orgânico e em micro-ambientes micelares devido à baixa constante dielétrica ( $\xi$ ) do meio, enquanto solventes polares, como a água, favoreceram NEQ (Pellosi, 2012; Estevão, 2012; Mchedlov-Petrossyan e Kleshchevnikova, 1994; Batistela *et al.*, 2010; Mchedlov-Petrossyan *et al.*, 2006). Em pHs maiores onde tem-se MA, o  $\epsilon$  foi similar à da forma desprotonada da ERIMET, cujo grupo cromofórico é o fenolato, ou seja, igual ao MAF. Assim, o equilíbrio proposto por Pellosi (2012) e Batistela (Batistela *et al.*, 2011) para a ERI em meio aquoso-micelar e mistura de água/DMSO foi:  $NEL \rightleftharpoons MAF \rightleftharpoons DA$ , correspondendo a  $pK_{a-OH} < pK_{a-COOH}$ .



**Esquema 1.2.** Equilíbrio protolítico entre o metil-éster neutro (MET-NE) e metil-éster monoaniônico (MET-MA) da Eosina Y (EOSMET) e da Eritrosina B (ERIMET).

Sabe-se que a maioria dos corantes xantênicos tem o anel benzênico a  $\sim 90^\circ$  em relação ao grupo xanteno (Jang *et al.*, 2001; Batistela *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001; Slyusareva *et al.*, 2012), o que impede a ressonância entre essas duas partes da molécula por não ocorrer sobreposição de orbitais  $p$  (Jang *et al.*, 2001; Batistela *et al.*, 2010). Com isso, a inversão de  $pK_a$  da ERI pode ser justificada considerando que MAF é melhor estabilizada em meios de baixa  $\xi$ , como em misturas de água/solvente orgânico, devido a alta distribuição da carga negativa por ressonância (Mchedlov-Petrosyan e Mayorga, 1992; Batistela *et al.*, 2011), enquanto MAC é melhor solvatada em meios de alta  $\xi$  (água) porque a carga fica mais concentrada e restrita ao grupo carboxilato junto ao anel benzênico (Mchedlov-Petrosyan e Mayorga, 1992). Adicionalmente em termos de absorção de luz, o fato de o anel xantênico ser pouco afetado por substituintes no anel benzênico foi fundamental na atribuição dos  $pK_a$ s de cada grupo protolítico.

Estudos com a Eosina Y e seu derivado metil-éster (EOSMET, Esquema 1.2) mostraram inversão de  $pK_a$  mesmo em água pura e em meios aquoso-micelares de CTAB e P-123 (Estevão, 2012), mas não em SDS. Não foram propostas quais espécies tautoméricas contribuem em maior quantidade ao equilíbrio protolítico. Porém, a comparação dos espectros de absorção da EOS e EOSMET em água e meio aquoso-micelar indica que NEL predomina em qualquer meio. Para as espécies monoaniônicas, MAC e MAF parecem coexistir em água pura e SDS enquanto MAF é preferencial em meio aquoso-micelar de CTAB e P-123. Anteriormente, Batistela *et al.* (2011) atribuíram o equilíbrio protolítico da EOS em água aos seguintes tautômeros:  $NEQ \rightleftharpoons MAF \rightleftharpoons DA$ . Desta forma, o deslocamento do equilíbrio tautomérico  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  deve preceder o equilíbrio protolítico proposto.

Esta inversão de  $pK_a$  também foi observada para a fluoresceína em misturas de água-DMSO (Mchedlov-Petrosyan e Mayorga, 1992), sendo justificada através do deslocamento do equilíbrio tautomérico das espécies neutras de acordo com o meio. Duas prerrogativas básicas foram tomadas: (i) a forma NEL é incolor devido à hibridização  $sp^3$  do carbono central (C9) e (ii) o substituinte ligado a C2' influencia muito pouco na absorção de luz visível (ver Esquema

1.1). Assim, considerando a similaridade do grupo cromofórico (porção xantênica), o espectro de absorção da forma catiônica CT deve ser muito similar à neutra zwitteriônica NEZ, a neutra quinóide NEQ similar a monoaniônica MAC e, a monoaniônica MAF similar a dianiônica DA.

A comparação espectral das formas MA da fluoresceína com a sulfona-fluoresceína (composto com grupo  $-\text{SO}_3^-$  no lugar de  $-\text{COOH}$ ) que não forma a espécie lactona, provou a existência da forma MAC ao invés de MAF em qualquer proporção de água-DMSO (Mchedlov-Petrossyan e Mayorga, 1992). Para as espécies neutras da fluoresceína a absorvidade caiu mais de duas vezes ao passar de 21,6 para 91,3 % (m/m) de DMSO em água, o que foi atribuído à interconversão para a forma NEL (como citado antes, NEL tem  $\epsilon \cong 0$  e é favorecida em meios de baixa constante dielétrica), confirmada em análise de infravermelho da fluoresceína NE em DMSO ( $\text{C}=\text{O}$  de lactonas em  $1755 \text{ cm}^{-1}$ ). No mesmo trabalho os autores também calcularam a fração molar ( $\chi$ ) de cada tautômero NE no equilíbrio considerando a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) de cada espécie e que, pela prerrogativa (i), a forma lactona tem a absorvidade molar negligenciada, obtendo a seguinte expressão.

$$\epsilon_{NE} = \epsilon_{NEZ}\chi_{NEZ} + \epsilon_{NEQ}\chi_{NEQ} \quad \text{onde } \chi_{NEZ} + \chi_{NEQ} + \chi_{NEL} = 1 \quad (\text{Eq 1.1})$$

Através da prerrogativa (ii) o cálculo da fração molar de cada espécie foi feito considerando  $\epsilon_{CT} = \epsilon_{NEZ}$  e  $\epsilon_{MAC} = \epsilon_{NEQ}$ . O resultado em água pura foi:  $\chi_{NEZ} = 0,218 \pm 0,001$ ;  $\chi_{NEQ} = 0,111 \pm 0,001$  e;  $\chi_{NEL} = 0,671 \pm 0,009$ ; ou seja, para a fluoresceína (ausência de substituintes halogenados), mesmo em água pura verificou-se alto teor de NEL. Nestes estudos, mesmo a presença de pequena quantidade de DMSO na água, foi suficiente para provocar o desaparecimento da banda do tautômero NEZ (em 440 nm) e, adicionalmente, o deslocamento do equilíbrio  $\text{NEQ} \rightleftharpoons \text{NEL}$  a favor da NEL. Assim,  $\chi_{NEZ} \ll \chi_{NEQ} (< \chi_{NEL})$  e o termo  $\epsilon_{NEZ} \cdot \chi_{NEZ}$  na Eq 1.1 pode ser desconsiderado, resultando em  $\chi_{NEQ}$  que varia de 0,106 em 21,6 % (m/m) de DMSO a 0,0015 em 96,2 % (m/m) de DMSO/água.

Estudos dos tautômeros da fluoresceína também foram feitos por Jang *et al.*(2001) por modelagem molecular utilizando B3LYP/6-31++G(d,p) e o modelo de solvatação contínua de

Poisson-Boltzmann em água e DMSO. As energias livres de Gibbs relativas evidenciaram a coexistência de MAC e MAF como formas monoaniônicas MA, descartando uma possível espécie lactona (MAL), e de NEQ e NEL como formas neutras, tanto em água quanto em DMSO. Apesar da mistura de tautômeros para cada forma protolítica, MAF e NEL foram favorecidas em DMSO.

Sendo assim, os estudos dos corantes xantênicos evidenciam a grande complexidade de seus sistemas. Apesar da evidente dependência da inversão de  $pK_a$  com os deslocamentos dos equilíbrios tautoméricos de acordo com o meio, este fenômeno ainda não foi bem compreendido devido às peculiaridades de cada corante xantênico. Neste sentido, estudos computacionais de modelagem molecular podem auxiliar no entendimento desses fenômenos, aliando-se às evidências experimentais para uma descrição mais detalhada do sistema.

## 2. MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL

A química computacional tem ajudado na compreensão de sistemas moleculares complexos usando conceitos fundamentais da mecânica quântica. Os cálculos de modelagem molecular contam com métodos *ab initio*, semi-empíricos e do funcional de densidade (DFT), cuja escolha depende do tamanho das espécies, do nível de exatidão desejado e da infraestrutura computacional disponível.

Todos os métodos mecânico-quânticos fundamentam-se na equação de Schrödinger, descrevendo as moléculas em termos das interações dos núcleos e elétrons em arranjos de mínima energia. Como a resolução exata da equação de Schrödinger somente é possível para o átomo de Hidrogênio, uma série de aproximações são necessárias para sua resolução em um sistema com muitos elétrons. Dessa forma, não se deve esperar que propriedades moleculares calculadas teoricamente sejam idênticas aos resultados experimentais. Além disso, diferentes aproximações (teorias) levam a resultados distintos, existindo metodologias mais adequadas para cada tipo de estudo (Hehre, 2003).

### 2.1 Fundamentação dos Métodos Mecânico-Quânticos

Para um sistema multinuclear e multieletrônico com M núcleos e N elétrons a função de onda ( $\Psi$ ) e a energia (E) do sistema são obtidas com a equação de Schrödinger, escrita como  $\hat{H}\Psi = E\Psi$  e expandida através do operador Hamiltoniano (em unidades atômicas) (Szabo, 1996; Hehre, 2003; Levine, 2009):

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{A=1}^{M_{\text{núcleos}}} \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N_{\text{elétrons}}} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^{N_{\text{elétrons}}} \sum_{A=1}^{M_{\text{núcleos}}} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{A=1}^{M_{\text{núcleos}}} \sum_{B>A}^{M_{\text{núcleos}}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + \sum_{i=1}^{N_{\text{elétrons}}} \sum_{j>i}^{N_{\text{elétrons}}} \frac{1}{r_{ij}} \quad (\text{Eq 2.1})$$

onde os dois primeiros termos descrevem a energia cinética dos núcleos A e dos elétrons i, respectivamente, e os últimos três termos descrevem as interações coulômbicas que ocorrem entre elétron-núcleo, núcleo-núcleo e elétron-elétron.  $M_A$  é a massa dos núcleos A,  $Z_A$  é a carga

nuclear de A e  $R_{AB}$ ,  $r_{ij}$  e  $r_{iA}$  são as distâncias separando núcleos A de núcleos B, elétrons i de elétrons j e elétrons i de núcleos A, respectivamente.  $\nabla^2$  é o operador Laplaciano  $\left(\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}\right)$ .

Uma das aproximações que possibilita a resolução da equação de Schrödinger é a **aproximação de Born-Oppenheimer**. Nela se assume que os núcleos não se movem em relação aos elétrons (massas e velocidades muito diferentes), tornando nulo o primeiro termo da Eq 2.1. Isso leva a equação de Schrödinger eletrônica  $\hat{H}^{el}\Psi^{el} = E^{el}\Psi^{el}$ , cujo Hamiltoniano eletrônico é (Levine, 2009; Hehre, 2003):

$$\hat{H}^{el} = \underbrace{-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N_{elétrons}} \nabla_i^2}_{\sim T} - \underbrace{\sum_{i=1}^{N_{elétrons}} \sum_{A=1}^{M_{núcleos}} \frac{Z_A}{r_{iA}}}_{\sim v(r)} + \underbrace{\sum_{i=1}^{N_{elétrons}} \sum_{j>i}^{N_{elétrons}} \frac{1}{r_{ij}}}_{\sim V_{ee}} \quad (Eq 2.2)$$

A analogia dos três termos da equação com os símbolos  $T$ ,  $v(r)$  e  $V_{ee}$  visam a comparação com a Eq 2.8 que será feita adiante (Seção 2.2). A função de onda eletrônica,  $\Psi^{el}(r_i, R_A)$ , descreve o movimento dos elétrons através das coordenadas eletrônicas e nucleares.

Se os núcleos não se movimentam, a interação repulsiva núcleo-núcleo (quarto termo da Eq 2.1) deve ser constante e a energia total para núcleos fixos pode ser escrita como:

$$E^{tot} = E^{el} + \sum_{A=1}^{M_{núcleos}} \sum_{B>A}^{M_{núcleos}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (Eq 2.3)$$

Da mesma forma que o Hamiltoniano eletrônico é calculado a uma dada distância dos núcleos, também é necessário calcular um Hamiltoniano para descrever o movimento dos núcleos em relação aos elétrons. Como os elétrons se movem muito mais rápido que os núcleos, uma aproximação razoável é feita substituindo as coordenadas eletrônicas na Eq 2.1 pelos seus valores médios calculados pela função de onda eletrônica,  $\Psi^{el}$ . Isso gera o Hamiltoniano nuclear (Eq 2.4) para o movimento dos núcleos em um campo eletrônico médio (Szabo, 1996).

$$\begin{aligned}
\hat{H}^{nuclear} &= - \sum_{A=1}^{M_{nucleos}} \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \left\{ - \sum_{i=1}^{N_{elétrons}} \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^{N_{elétrons}} \sum_{A=1}^{M_{nucleos}} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{N_{elétrons}} \sum_{j>i}^{N_{elétrons}} \frac{1}{r_{ij}} \right\} + \sum_{A=1}^{M_{nucleos}} \sum_{B>A}^{M_{nucleos}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \\
&= - \sum_{A=1}^{M_{nucleos}} \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + E^{el}(R_A) + \sum_{A=1}^{M_{nucleos}} \sum_{B>A}^{M_{nucleos}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \\
&= - \sum_{A=1}^{M_{nucleos}} \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + E^{tot}(R_A) \tag{Eq 2.4}
\end{aligned}$$

A energia total,  $E^{tot}(R_A)$ , fornece um potencial para o movimento nuclear, ou seja, uma superfície de energia potencial. Desta forma, na aproximação de Born-Oppenheimer os núcleos se movem até atingir uma distância internuclear ( $R_A$ ) que corresponda ao mínimo de energia total, fornecendo a geometria mais estável (Szabo, 1996).

Portanto, a solução da equação de Schrödinger nuclear,  $\hat{H}^{nuclear}\Psi^{nuclear} = E^{nuclear}\Psi^{nuclear}$ , descreve a vibração, rotação e translação da molécula ( $\Psi^{nuclear} = \Psi^{nuclear}(R_A)$ ). A aproximação de Born-Oppenheimer para a energia total do sistema, além da vibração, translação e rotação, também inclui a energia eletrônica, ou seja, engloba todas as contribuições energéticas. Assim, a aproximação correspondente à função de onda total do sistema fica:

$$\Psi(r_i, R_A) = \Psi^{el}(r_i, R_A)\Psi^{nuclear}(R_A) \tag{Eq 2.5}$$

Outra grande simplificação da equação de Schrödinger é feita com a **aproximação de Hartree-Fock**, que considera que os elétrons se movem independentemente um do outro, cada qual descrito por um orbital (Levine, 2009; Hehre, 2003). A função de onda total é descrita por um determinante de Slater (Eq 2.6), que garante a antissimetria ao trocar as coordenadas de dois elétrons e não permite que tenham o mesmo número quântico (princípio de Pauli) (Hehre, 2003; Morgon e Coutinho, 2007; Jensen, 2007).

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(1) & \chi_2(1) & \cdots & \chi_n(1) \\ \chi_1(2) & \chi_2(2) & \cdots & \chi_n(2) \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ \chi_1(N) & \chi_2(N) & \cdots & \chi_n(N) \end{vmatrix} \tag{Eq 2.6}$$

Na Eq 2.6,  $\chi_i$  é denominado spin orbital, sendo o produto da função de um orbital molecular,  $\Psi_i$ , com uma função de spin  $\alpha$  (+1/2) ou  $\beta$  (-1/2). O conjunto de orbitais moleculares que levam ao menor estado de energia da molécula é obtido através do campo auto-consistente, mais conhecido como *self-consistent-field* (SCF) (Hehre, 2003). O SCF é parecido com o procedimento feito pela aproximação de Hartree-Fock, mas também inclui processos de funcionais de densidade, tendo a forma  $f(i) \chi(x_i) = \varepsilon \chi(x_i)$ , sendo  $f(i)$  o operador de Fock.

$$f(i) = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v^{eff}(i) \quad (Eq\ 2.7)$$

$x_i$  representa o spin e as coordenadas espaciais do elétron  $i$ ,  $\chi$  os spin orbitais e  $v^{eff}$  é potencial efetivo “observado” pelo elétron  $i$ , o qual depende dos spin orbitais dos outros elétrons. A natureza do potencial efetivo  $v^{eff}$  depende da metodologia SCF utilizada (Hehre, 2003).

A aproximação de Hartree-Fock leva às equações de Hartree-Fock, que são um conjunto de equações diferenciais acopladas, cada uma contendo as coordenadas de um único elétron. Apesar de poderem ser resolvidas numericamente, uma aproximação adicional transformando-as em equações algébricas facilita o processo. As equações de Hartree-Fock dos elétrons de cada átomo em uma molécula podem então se combinar para formar os orbitais moleculares. Na prática, os orbitais moleculares são resultado das combinações lineares de um conjunto finito de funções atômicas, conhecidas como funções de base (conjunto de funções de bases). Este processo é conhecido como **combinação linear de orbitais atômicos** ou, na sigla em inglês, **LCAO** (Hehre, 2003).

Contudo, devido à série de aproximações utilizadas, a equação de Schrödinger calculada não é exatamente a real. A energia obtida por métodos Hartree-Fock (HF) é diferente da experimental por superestimar a energia de repulsão elétron-elétron devido ao tratamento dos movimentos eletrônicos independentes (Hehre, 2003). Sua correção é feita com a inserção da **energia de correlação**, que é definida como a diferença entre a energia HF e a energia exata (experimental). A obtenção da energia de correlação de forma sistemática é o desafio central dos cálculos *ab initio* para estados estacionários. Apesar de existirem ótimos métodos, como os



perturbativos e os *coupled-cluster*, estes são computacionalmente muito custosos e inviabilizam sua utilização em moléculas grandes. Nestes casos, uma opção com custo computacional moderado e boa correlação energética é a teoria do funcional da densidade (Morgon e Coutinho, 2007).

## 2.2 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

A DFT (do inglês *Density Functional Theory*) pode ser usada em sistemas com até aproximadamente 100 átomos com custo computacional moderado e resultados muito melhores que Hartree-Fock (Hehre, 2003). A DFT teve início com as propostas de Hohenberg e Kohn (1964) baseando-se na densidade eletrônica  $\rho(r)$ , que fornece a probabilidade de encontrar o elétron no ponto de coordenada  $r$  a certa distância do núcleo. Para isso provou-se que todas as grandezas físicas em um sistema são funcionais da densidade e podem ser determinadas por  $\rho(r)$  (Marques e Botti, 2006). Desta forma, podemos escrever a energia total  $E$  de um sistema como um funcional (função de uma função) de  $\rho(r)$ , na forma  $E[\rho(r)]$  (Geerlings *et al.*, 2003; Morgon e Coutinho, 2007; Trsic e Pinto, 2009).

$$E[\rho] = \int \rho(r) v(r) dr + F_{HK}[\rho] \quad \text{onde} \quad F_{HK}[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (\text{Eq 2.8})$$

onde  $v(r)$  é o potencial externo causado pelo núcleo e  $F_{HK}[\rho]$  o funcional de Hohenberg-Kohn que contem os funcionais de energia cinética eletrônica,  $T[\rho]$ , e o de interação elétron-elétron,  $V_{ee}[\rho]$ . Os termos da Eq 2.8 aqui escritos em função de  $\rho(r)$  são análogos aos mostrados na aproximação de Born-Oppenheimer (Eq 2.2). Minimizando  $E[\rho]$  obtêm-se o estado fundamental do sistema e sua densidade eletrônica que permite o cálculo de qualquer propriedade (Marques e Botti, 2006).

No ano seguinte Kohn e Sham (1965) reescreveram a Eq 2.8 tornando explícita a repulsão elétron-elétron de Coulomb e definindo uma nova função universal  $G[\rho]$ .

$$E[\rho] = G(\rho) + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1-r_2|} dr_1 dr_2 + \int \rho(r) v(r) dr \quad \text{onde} \quad G[\rho] = T_s[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad (\text{Eq 2.9})$$

onde  $T_s[\rho]$  é o funcional de energia cinética de elétrons que não interagem mas com densidade de elétrons interagentes.  $E_{xc}[\rho]$  é o funcional de troca-correlação que inclui a interação elétron-elétron não clássica e a energia cinética residual dos elétrons que interagem.

Para descrever os funcionais de densidade, Kohn e Sham propuseram que os  $N$  elétrons independentes (não interagentes) que obedecem à equação de Schrödinger em um sistema de referência pode ser descrito pelo hamiltoniano (Geerlings, *et. al.*, 2003; Trsic e Pinto, 2009):

$$\hat{H}_{ref} = \sum_i^N \left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_i(r) \right] = \hat{H}_i^{KS} \quad (Eq 2.10)$$

A função de onda  $\Psi^{KS}$  do estado fundamental desse sistema de elétrons independentes pode então ser obtida aplicando a mesma aproximação utilizada no método Hartree-Fock. Considerando um sistema *closed-shell* (multiplicidade de spin singlete), a aproximação é feita por um produto anti-simetrizado de  $N$  funções de um elétron,  $\psi_i^{KS}$ , com o determinante de Slater (Morgon e Coutinho, 2007):

$$\Psi^{KS} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \psi_1^{KS}(r_1) & \psi_2^{KS}(r_1) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_1) \\ \psi_1^{KS}(r_2) & \psi_2^{KS}(r_2) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \psi_1^{KS}(r_N) & \psi_2^{KS}(r_N) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_N) \end{vmatrix} \quad (Eq 2.11)$$

sendo que os orbitais de Kohn-Sham (KS),  $\psi_i^{KS}$ , são obtidos a partir da equação de Schrödinger de um elétron:

$$\left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_i(r) \right] \psi_i^{KS} = \varepsilon_i \psi_i^{KS} \quad (Eq 2.12)$$

Minimizando a energia da equação 2.9 obtêm-se o potencial efetivo,  $v_{ef}(r)$ , cuja expressão derivada resulta na equação 2.13 (Geerlings, *et. al.*, 2003; Morgon e Coutinho, 2007).

$$v_{ef}(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r_1)}{|r-r_1|} dr_1 + v_{xc}(r) \quad \text{sendo} \quad v_{xc}(r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (Eq 2.13)$$

Como  $v_{ef}(r)$  depende da densidade eletrônica  $\rho(r)$ , as equações 2.12 e 2.13 podem ser resolvidas através de procedimento auto-consistente, conhecido como *Kohn-Sham Self Consistent Field* (KS-SCF) (Geerlings, *et. al.*, 2003; Morgon e Coutinho, 2007).

Portanto, a densidade eletrônica,  $\rho(r)$ , é uma quantidade fundamental que, além da descrição de estruturas moleculares, também permite o cálculo de propriedades (eletronegatividade, potencial químico, dureza de ácidos e bases, etc) para compreensão do comportamento químico de átomos, moléculas, *clusters*, sólidos, etc (Morgon e Coutinho, 2007). No entanto, o maior desafio da DFT é a descrição adequada de  $E_{XC}[\rho]$  da Eq 2.9 em termos energéticos e interações eletrônicas não triviais.

## 2.3 Funcionais de Troca-Correlação

A *Aproximação da Densidade Local* (LDA, do inglês *Local Density Approximation*) proposta por Kohn e Shan (1965) foi a forma mais simples para encontrar a energia de troca-correlação,  $E_{XC}[\rho]$ . Ela consiste no tratamento da densidade eletrônica como um gás homogêneo de elétrons para derivar funcionais de troca ( $E_X[\rho]$ ) e correlação ( $E_C[\rho]$ ) aproximados, sendo que  $E_{XC}[\rho] = E_X[\rho] + E_C[\rho]$ . Incorporando a derivação de Dirac para um gás de elétrons homogêneos obtêm-se a expressão de troca (Kohn e Sham, 1965; Morgon e Coutinho, 2007; Cohen, 2012).

$$E_X^{LDA}[\rho] = -\frac{3}{4} \left( \frac{3}{\pi} \right)^{1/3} \int \rho^{4/3} dr \quad (\text{Eq 2.14})$$

O termo  $E_C[\rho]$  contém a correlação eletrônica não incluída na energia de Coulomb da Eq 2.9 e a contribuição da diferença entre energia cinética exata e a  $T_S[\rho]$ . Isso é feito por métodos de aproximação usando simulações de Monte Carlo nos limites de alta e baixa densidade (Morgon e Coutinho, 2007; Cohen, 2012). A aproximação LDA é boa para a predição de estruturas de complexos de metais de transição e para sistemas no estado sólido, porém péssimas para átomos e moléculas onde a distribuição eletrônica é não homogênea (Morgon e Coutinho, 2007).

A partir da aproximação LDA grandes melhorias foram feitas nos funcionais de troca-correlação ao incluir correções do gradiente da densidade eletrônica,  $\nabla\rho(r)$ , para se levar em conta a não homogeneidade da verdadeira densidade eletrônica. Para isso expandiu-se o funcional LDA como uma série de Taylor – porém limitada ao segundo termo da série – com

posterior correção do seu comportamento assintótico para distâncias muito grandes (Morgon e Coutinho, 2007). Assim, o funcional de troca  $E_X[\rho]$  apresenta a forma geral:

$$E_X^{GGA}[\rho] = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{1/3} \int \rho^{4/3}(r) F\left(\frac{|\nabla\rho(r)|}{2\rho(3\pi^2\rho)^{1/3}}\right) dr \quad (Eq 2.15)$$

Diferentes funcionais de troca e correlação são definidos pelas possíveis formas de escrever o termo  $F$ . Funcionais desse tipo são denominados de **Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA)**, do inglês *Generalized Gradient Approximation*). Os funcionais de troca GGA mais conhecidos são o PBE, originalmente proposto por Perdew (1986), e o B88 (Becke, 1988), enquanto os funcionais de correlação GGA mais importantes são o LYP (Lee, Yang e Parr, 1988) e o de Perdew (1981 e 1986).

Um avanço ainda maior aos funcionais GGA se obteve ao incluir derivadas de maior ordem à densidade eletrônica. Assim, Perdew e Schmidt (2001) criaram os funcionais **meta-GGA** através da escala de aproximações de Jacob para o funcional de troca-correlação exato. A escala inicia-se com a aproximação LDA, seguida por GGA e, como terceiro componente, o meta-GGA que incorpora outros termos locais à forma:

$$E_{XC}^{mGGA}[\rho] = \int \rho^{4/3} F[\rho(r), \nabla\rho(r), \nabla^2(r), \tau(r) \dots] dr \quad (Eq 2.16)$$

O termo de energia cinética,  $\tau$ , também é incluído, onde  $\tau = \frac{1}{2} \sum_i |\nabla\psi_i|^2$ . É possível ainda adicionar à equação um quarto termo que se refere aos funcionais não-locais dos orbitais ocupados e um quinto termo para todos os orbitais (ocupados e desocupados) (Cohen, 2012).

Provavelmente os maiores avanços no desenvolvimento de funcionais de troca-correlação foram feitos com a inclusão de termos de troca Hartree-Fock ( $E_X^{HF}$ ), criando os **Funcionais Híbridos**. A ideia original utiliza a conexão adiabática para argumentar que o funcional deve conter o  $E_X^{HF}$  em um modelo linear que faça sua “mistura” com algum funcional de troca-correlação local (Cohen, 2012).

$$E_{XC}^{BHH} = \frac{1}{2} E_X^{HF} + \frac{1}{2} W_1^{LDA} \quad (Eq 2.17)$$

O termo  $W$  se deve ao método de conexão adiabática que conecta, adiabaticamente, o sistema de  $N$  elétrons que interagem com o sistema de  $N$  elétrons que não interagem, de forma que a densidade eletrônica permanece igual à densidade exata. Assim, a partir da Eq 2.17 originaram-se funcionais híbridos que tiveram seu desempenho melhorado após introduzir parâmetros ajustados experimentalmente.

$$E_{XC}^{B3} = aE_X^{HF} + (1 - a)E_X^{LDA} + b\Delta E_X^{B88} + cE_C^{GGA} + (1 - c)E_C^{LDA} \quad (Eq\ 2.18)$$

onde os parâmetros  $a$ ,  $b$  e  $c$  foram ajustados com o conjunto de dados experimentais G1, de Pople e colaboradores (Cohen, 2012). Este ajuste junto com o funcional GGA-LYP e a expressão de correlação local de Vosko, Wilk e Nusai (VWN) resultou no funcional B3LYP, implementado no pacote Gaussian (Stephens *et al.*, 1994).

$$E_{XC}^{B3LYP} = 0,2E_X^{HF} + 0,8E_X^{LDA} + 0,72\Delta E_X^{B88} + 0,81E_C^{LYP} + 0,19E_C^{VWN} \quad (Eq\ 2.19)$$

Devido a alguns cancelamentos de erros, o B3LYP tem sido o funcional DFT de maior sucesso e o mais extensivamente usado em química, fornecendo ótimos resultados a um custo computacional moderado (Cohen, 2012). O método híbrido foi assim consagrado com um erro médio de 2 kcal/mol. No entanto, grande parte de suas limitações reside na região das interações fracas, principalmente as intermoleculares (Morgon e Coutinho, 2007).

Apesar do grande sucesso do funcional B3LYP com a adição de três parâmetros empíricos ( $a$ ,  $b$  e  $c$ ), isso certamente ainda não resolveu o problema da troca-correlação. Há algum tempo o grupo de Truhlar têm combinado diferentes tipos de funcionais de troca-correlação e estendido os níveis de parametrização para um grande número de espécies químicas importantes para obter funcionais DFT usuais. Melhorias importantes em relação ao B3LYP foram conseguidas principalmente com a família de funcionais M05 e M06, que são híbridos globais meta-GGA (Cohen, 2012). Os maiores destaques são o M05-2X, M06 e M06-2X nos estudos termoquímicos, cinéticos e interações não-covalentes, melhorando os resultados em relação ao consagrado B3LYP (Zhao e Truhlar, 2008 [a] e [b]; Hohenstein *et al.*, 2008).

## 2.4 Conjunto de Funções de Base

Os orbitais de Kohn-Sham podem ser expandidos com um *conjunto de funções de base* através da Combinação Linear de Funções Gaussianas para formar os orbitais moleculares (Morgon e Coutinho, 2007). A representação mais simples dos orbitais atômicos é feita pelo *conjunto de base mínimo*, *STO-3G*, que tem as funções necessárias para acomodar todos os elétrons de cada átomo. Isso significa que é necessária uma função (*1s*) para descrever o Hidrogênio ou Hélio, um conjunto de cinco funções (*1s, 2s, 2p<sub>x</sub>, 2p<sub>y</sub>, 2p<sub>z</sub>*) para descrever elementos do Lítio ao Neônio e assim sucessivamente. Um conjunto de base pode ser melhorado (i) ao aumentar o número de funções por átomo, *e.g.*, duplicar (*double-zeta*), triplicar (*triple-zeta*), etc. e (ii) ao separar os orbitais de valência dos orbitais internos (*split-valence basis set*), tratando as camadas internas de modo mais simplificado e duplicando, triplicando, etc, apenas as funções da camada de valência, que são quimicamente mais importantes (Hehre, 2003; Trsic e Pinto, 2009; Foresman e Frisch, 1996).

Um exemplo de conjunto de base com valência *double-zeta* é o 6-31G, onde cada orbital interno é expandido com seis gaussianas (G) e os orbitais de valência são divididos em duas camadas de tamanhos distintos: na mais interna os orbitais são expandidos por 3G e na mais externa por 1G. Em um conjunto de base *triple-zeta*, tal como o 6-311G, os orbitais de valência são divididos em três camadas e expandidos por 3G, 1G e 1G, de dentro pra fora (Hehre, 2003).

Para que, além do tamanho, a forma dos orbitais também seja mudada são utilizadas *funções de polarização*. Essas funções adicionam orbitais com momento angular maior do que o necessário para descrever átomos no estado fundamental, permitindo o deslocamento de elétrons para além da posição nuclear. Com isso melhora-se a descrição de ligações químicas. Na prática, uma função de base polarizada significa que foram adicionadas funções *d* para elementos representativos (com orbitais de valência *s* e *p*), *e.g.* 6-31G(d), e funções *p* para átomos de hidrogênio, *e.g.* 6-31G(d,p). Isso permite a descrição correta de orbitais híbridos *sp* ou *pd* que formam ligações químicas (Hehre, 2003; Foresman e Frisch, 1996).

Sistemas com orbitais que ocupam regiões distantes do núcleo necessitam de funções ainda maiores, conhecidas por *funções difusas*. Elas são usadas para descrever moléculas com par de elétrons livres, ânions, espécies radicalares, estados excitados, etc. Com um sinal + adiciona-se uma função difusa apenas para elementos pesados (não-hidrogenóides) ao conjunto de base, e.g. 6-31+G(d,p). Com um segundo + é possível adicioná-la também aos átomos de Hidrogênio, e.g. 6-31++G(d,p) (Hehre, 2003; Foresman e Frisch, 1996).

Para elementos pesados, além do quarto período da tabela periódica, os elétrons próximos ao núcleo costumam ser tratados de maneira aproximada através de um Potencial Nuclear Efetivo (ECP), também conhecido como *pseudo-potencial*. Assim, a descrição desses elementos é simplificada por tratar explicitamente apenas a camada de valência. Isso prejudica a eficácia dos resultados, mas permite o estudo de sistemas com elementos pesados para os quais a maioria das funções de base ainda não são parametrizadas (Hehre, 2003; Foresman e Frisch, 1996). No entanto, existem alguns conjuntos de funções de base amplamente parametrizados para a maioria dos elementos, mesmo para os mais pesados. Alguns exemplos são: DGDZVP (H-Xe), UGBs (H-Lr), CEP-4G e CEP-31G (H-Rn), MidiX (H, C-F, S-Cl, I, Br) e QZVP (H-Rn). Porém, apesar de alguns destes exemplos possuírem funções de polarização incluídas na definição, nenhum deles possui ou permite adicionar funções difusas, exceto o UGBs (Gaussian 09 User's Reference).

## 2.5 Estados Eletrônicos Excitados

Em um sistema inicialmente no estado fundamental que sofre uma perturbação dependente do tempo é possível estimar as transições eletrônicas através do momento dipolar de transição. Com a função de onda do estado fundamental obtém-se a função de onda do estado excitado, com a qual a energia e outras propriedades moleculares podem ser calculadas (Young, 2001). Um dos métodos mais comuns para obter a energia do estado excitado é o CIS (*Single-excitation Configuration Interaction*). O método CIS utiliza o conjunto de orbitais moleculares

obtidos no estado fundamental (usualmente através de HF) e transfere um elétron para um orbital virtual, gerando assim a função de onda do estado excitado (Young, 2001).

Também existem métodos semi-empíricos para o cálculo de estado excitado, tal como o INDO/S (*Intermediate Neglect of Differential Overlap/Spectroscopy*), mais conhecido como ZINDO. Este método foi desenvolvido principalmente para metais de transição e não é parametrizado para elementos de alto número atômico, tal como Bromo e Iodo (Young, 2001, 2001; Trsic, 2009). Atualmente o método mais popular para estudar o estado excitado é a TD-DFT (*Time-dependent Density Functional Theory*). A TD-DFT é uma extensão da DFT para o tratamento do estado excitado. Consiste em tratar a mecânica quântica dependente do tempo simplificando a equação de Schrödinger para muitos corpos através da densidade eletrônica (Fiolhais *et al.*, 2003).

## 2.6 Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT)

Um sistema de  $N$  elétrons de coordenadas  $r$  pode ser descrito pela equação de Schrödinger dependente do tempo:

$$i \frac{\partial}{\partial t} \Psi(r, t) = \hat{H}(r, t) \Psi(r, t) \quad (\text{Eq 2.20})$$

cujo Hamiltoniano é:

$$\hat{H}(r, t) = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N_{\text{elétrons}}} \nabla_i^2 + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1, i \neq j}^{N_{\text{elétrons}}} \frac{1}{|r_i - r_j|} + \hat{V}_{\text{ext}}(r, t) \quad (\text{Eq 2.21})$$

onde o primeiro termo representa a energia cinética dos elétrons, o segundo descreve a repulsão coulômbica elétron-elétron e  $\hat{V}_{\text{ext}}(r, t)$  é o potencial externo dependente do tempo (Fiolhais *et al.*, 2003).

Todos os observáveis do sistema podem ser descritos como um funcional da densidade eletrônica (teorema de Runge-Cross). Assim, Kohn e Sham propuseram que a complicada equação de Schrödinger para  $N$  elétrons interagentes (Eq 2.20) pode ser resolvida considerando um sistema de elétrons que não interagem sujeitos a um potencial externo,  $v_{KS}$ . Este potencial é



tomado de forma que os elétrons (de Kohn-Sham) não interagentes tenham a mesma densidade eletrônica dos elétrons interagentes do sistema original. Com isso, os elétrons de Kohn-Sham obedecem à equação de Schrödinger dependente do tempo escrita na forma de um único corpo, resolvendo o problema de muitos corpos (Fiolhais *et al.*, 2003; Casida e Huix-Rotllant, 2012).

$$i \frac{\partial}{\partial t} \psi_i(r, t) = \left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_{KS} \right] \psi_i(r, t) \quad (\text{Eq 2.22})$$

Na Eq 2.22 o potencial de Kohn-Sham,  $v_{KS}$ , é separado da seguinte forma:

$$v_{KS}(r, t) = v_{ext}(r, t) + v_{hartree}(r, t) + v_{XC}(r, t) \quad (\text{Eq 2.23})$$

onde o primeiro termo,  $v_{ext}(r, t)$ , é novamente o potencial externo, seguido do potencial de Hartree,  $v_{hartree}(r, t)$ , que considera a interação eletrostática clássica entre elétrons. O último termo,  $v_{XC}(r, t)$ , é o potencial de troca-correlação que compreende todos os efeitos não triviais de muitos corpos (Fiolhais *et al.*, 2003; Casida e Huix-Rotllant, 2012).

Na DFT,  $v_{XC}$  é escrito em função da energia e constitui os funcionais de troca-correlação,  $E_{XC}$ . Na TD-DFT a dependência com o tempo faz com que um funcional de  $v_{XC}$  tenha apenas uma expressão aproximada. Várias aproximações de  $v_{XC}$  para TD-DFT têm sido desenvolvidas nos últimos anos, iniciando com a ALDA (*Adiabatic Local Density Approximation*), mas estas ainda não são bem definidas como para a DFT (Fiolhais *et al.*, 2003; Casida e Huix-Rotllant, 2012).

## 2.7 Modelos Contínuos de Solvatação

Há duas maneiras de tratar o efeito do solvente na otimização estrutural ou cálculo das propriedades de uma molécula: através de (i) modelos contínuos ou (ii) modelos discretos de solvente. Os modelos contínuos se baseiam numa descrição implícita, com o soluto imerso em um material dielétrico, caracterizado principalmente pela constante dielétrica ( $\xi$ ) do solvente. Ou seja, sem a inserção explícita de moléculas do solvente. Os modelos discretos consistem em adicionar moléculas do solvente ao redor do soluto. Apesar de mais adequados para descrever o sistema, a presença de uma grande quantidade de moléculas explícitas do solvente torna o

cálculo computacional muito custoso. Isso se deve a necessidade de conhecer as posições de cada molécula no sistema, que chegam facilmente à casa de centenas ou milhares (Morgon e Coutinho, 2007). Também é possível utilizar o modelo implícito e adicionar moléculas explícitas de solvente formando um *cluster-continuum*, também chamado de modelo implícito-explícito (Bryantsev *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Riccardi *et al.*, 2013).

Todos os modelos contínuos são baseados na equação de Poisson, que descreve a interação entre uma densidade de cargas arbitrária  $\rho(r)$  com um dielétrico contínuo através do potencial eletrostático  $\phi$  e a constante dielétrica  $\xi$  (Morgon e Coutinho, 2007; Young, 2001).

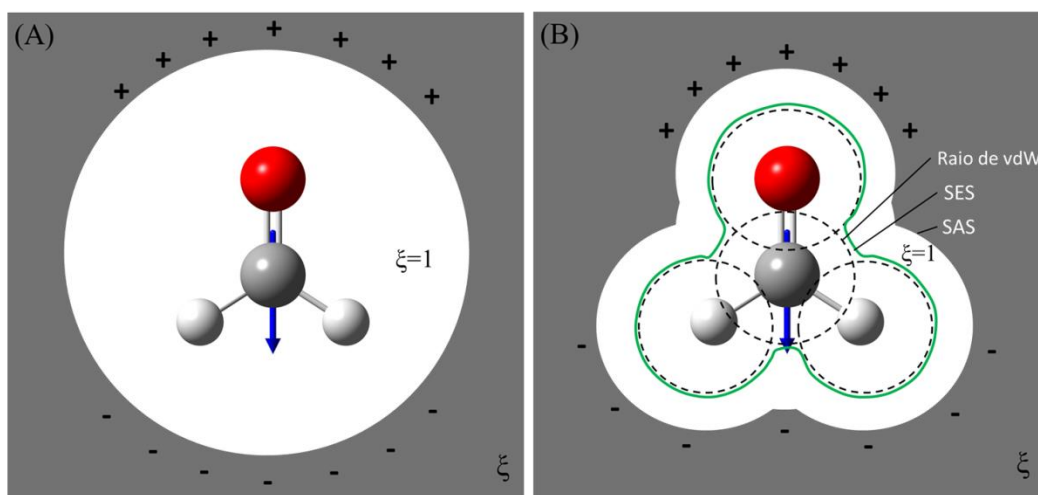
$$\nabla^2 \phi(r) = -\frac{4\pi\rho(r)}{\xi} \quad (\text{Eq 2.24})$$

Para isso, o soluto é colocado em uma cavidade com  $\xi=1$  delimitada por uma superfície de contorno, a qual é circundada por um dielétrico com valor de  $\xi$  constante (Figura 2.1). A equação de Poisson deve então ser resolvida nestas duas regiões distintas satisfazendo as condições de contorno.

O modelo contínuo mais simples é o de **Onsager** (Figura 2.1-A), onde o soluto com momento de dipolo  $\mu$  é introduzido numa cavidade esférica ou elipsoidal de raio  $a$  (raio de Bohr). Um dielétrico com  $\xi$  constante envolve a cavidade do soluto e sofre polarização devido ao momento de dipolo do soluto. Essa polarização causa uma distribuição de cargas no dielétrico e origina o *campo de reação*  $R$  (Morgon e Coutinho, 2007).

$$R = \frac{2(\xi - 1)}{2\xi + 1} \frac{\mu}{a^3} \quad (\text{Eq 2.25})$$

O campo de reação é sempre paralelo ao momento de dipolo. Assim,  $R$  atuará no soluto aumentando a assimetria em sua distribuição de cargas. Porém, como o campo de reação depende do momento de dipolo do soluto, quanto menor for  $\mu$ , menor será  $R$ . Desta forma, o campo elétrico sentido por solutos apolares será muito pequeno. Além da aproximação da Eq 2.25 para o primeiro momento de distribuição de cargas, outras implementações melhoraram essa representação com a utilização de multipolos (Morgon e Coutinho, 2007; Young, 2001).



**Figura 2.1.** Modelos contínuos de solvatação: (A) modelo de Onsager com cavidade esférica e (B) modelo PCM com a cavidade formada por esferas centradas nos átomos, adaptado de Pliego (2006) e Tomasi *et al.* (2005).

Como nos modelos contínuos o número de elétrons total do sistema se restringe apenas aos pertencentes ao soluto, torna-se possível uma descrição puramente quântica. Para descrever o potencial de interação soluto-solvente foi introduzido ao operador hamiltoniano um termo adicional dependente do campo de reação. Com isso, através da aproximação de Hartree-Fock, obtém-se:

$$\left\{ F_i - \left[ \frac{2(\xi - 1)}{2\xi + 1} \right] \frac{1}{a^3} \langle \Psi | \mu | \Psi \rangle^2 \right\} \chi_i = e_i \chi_i \quad (\text{Eq 2.26})$$

sendo  $\chi_i$  os orbitais moleculares. Observa-se o surgimento de um termo adicional ao operador de Fock que depende do momento de dipolo do soluto que, por sua vez, depende da função de onda total  $\Psi$ . Desta forma, um ciclo adicional de autoconsistência é criado, sendo denominado de Campo de Reação Autoconsistente (SCRf, do inglês *Self Consistent Reaction Field*) (Morgon e Coutinho, 2007).

Uma vantagem dos modelos contínuos é que a influência do solvente não se restringe apenas às proximidades do soluto. Por um lado isso é bom porque a perturbação causada pelo solvente a longas distâncias do soluto também é representada pela distribuição contínua de cargas. No entanto, há uma simplificação exagerada do efeito do solvente nas proximidades do soluto, o que impede a descrição de ligações hidrogênio, por exemplo. A adição de moléculas de

solvente junto ao soluto (dentro da cavidade do dielétrico) soluciona parte desse problema, porém, além do maior custo computacional, atrapalha a descrição do dipolo do soluto (Morgon e Coutinho, 2007).

Adicionalmente, os modelos contínuos são altamente dependentes da forma e tamanho da cavidade. Observa-se na Eq 2.25 e Eq 2.26 que o campo de reação é muito sensível à variação do raio da cavidade, sendo  $R \propto 1/a^3$ . Como poucas moléculas têm a forma da cavidade esférica ou elipsoidal, o modelo de Onsager não costuma ser adequado para descrever o efeito do solvente para a maioria dos solutos. Cavidades que tenham o mesmo formato do soluto são mais adequadas, as quais podem ser formadas unindo esferas centradas em cada átomo do soluto (Figura 2.1-B). O tamanho da cavidade dependerá, então, do raio da esfera para cada átomo. Uma escolha óbvia seria utilizar o raio de van der Waals (vdW) de cada átomo, mas na prática os raios ótimos diferem de um modelo para o outro (Morgon e Coutinho, 2007).

O primeiro conjunto de raios de vdW foi proposto por **Bondi** (1964) e classificado a partir de um banco de dados de estruturas moleculares, desconsiderando distâncias de interação não-covalentes. Um maior refinamento foi feito por **Pauling** ao comparar os raios de Bondi com o banco de dados de estruturas cristalográficas do CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Center*, [www.ccdc.cam.ac.uk](http://www.ccdc.cam.ac.uk)), baseando-se na secção transversal de colisão de gases e em propriedades dos líquidos. O conjunto de raios de Pauling está disponível em catalogações físico-químicas (*CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 2007-2008) e tem sido frequentemente utilizado, inclusive com boa reprodução da constante de tautomerização  $K_{Q-L}$  da fluoresceína e derivados halogenados (Król *et al.*, 2006). Um terceiro conjunto de raios foi elaborado através do **Campo de Força Universal (UFF)** baseando-se na hibridização e conectividade dos elementos, sendo escalonado pelo fator 1,1. Os raios UFF são parametrizados para todos os elementos, sendo o modelo padrão do Gaussian 09. Todos os conjuntos de raios citados – Bondi, Pauling e UFF – formam a cavidade a partir de esferas individuais centradas nos átomos do soluto (Gaussian 09 User's Reference; Tomasi *et al.*, 2005).

Dos métodos que usam o modelo de cavidade centrada nos átomos, o *Modelo do Contínuo Polarizável (PCM)* desenvolvido por Tomasi e colaboradores (Miertus, Scrocco e Tomasi, 1981) é o mais amplamente utilizado. No PCM a cavidade é formada através do raio de vdW de cada átomo acrescido de 20 %, formando a Superfície Acessível ao Solvente (SAS) (Figura 2.1-B). Uma superfície interna à SAS é criada sobre os átomos no raio vdW, suavizando seu contorno. Essa superfície é chamada de Superfície de Exclusão do Solvente (SES). O campo de reação é representado por cargas pontuais localizadas na SAS e calculado através de procedimento auto-consistente (SCRF) com o método da Superfície de Cargas Aparentes (ASC).

A convergência dos termos eletrostáticos feito pelo procedimento SCRF pode ser avaliada através do cálculo da energia de solvatação, usando o método do campo de reação de ordem infinita. Com a formação da cavidade do dielétrico, o modelo PCM calcula a energia livre do soluto em um sistema solvatado.

$$G(\Psi) = \langle \Psi | H_0 | \Psi \rangle + \frac{1}{2} \langle \Psi | H_{pol} | \Psi \rangle \quad (Eq\ 2.27)$$

Aqui, o primeiro termo representa o Hamiltoniano do soluto modificado pelo campo elétrico do solvente; o segundo representa o hamiltoniano polarizado ( $H_{pol}$ ), que inclui tanto a energia de interação soluto-solvente quanto o trabalho necessário para polarizar o solvente.  $H_{pol}$  descreve o acoplamento entre as cargas do soluto e o campo elétrico do solvente. Durante o procedimento SCRF, o Hamiltoniano polarizado é primeiramente avaliado com a densidade eletrônica do soluto na fase gasosa. Um novo cálculo SCF é então aplicado e a nova densidade do soluto é usada para atualizar  $H_{pol}$ . Este processo é repetido até não se observar mais mudanças nas cargas da superfície (Foresman *et al.*, 1996). Desta forma, a variação de energia livre de solvatação ( $\Delta G_{sol}$ ) pode ser apresentada como a soma de alguns termos:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{el} + G_{rep} + G_{dis} + G_{cav} + p\Delta V \quad (Eq\ 2.28)$$

onde  $\Delta G_{el} = G_{el} - G^0$ , sendo  $G^0$  e  $G_{el}$  a energia eletrônica da molécula do soluto em fase gasosa e em fase solvatada, respectivamente.  $G_{rep}$  é a energia de repulsão soluto-solvente,  $G_{dis}$  a

energia de dispersão da interação soluto-solvente e  $G_{cav}$  a energia de cavitação do soluto. Enquanto  $G_{dis}$  e  $G_{rep}$  são calculadas com a SAS,  $G_{el}$  utiliza SES e  $G_{cav}$  utiliza a superfície definida exclusivamente pelos raios de vdW dos elementos (Tomasi *et al.*, 2005).

No pacote Gaussian, o método SCRF padrão é uma variável do modelo PCM chamado de ***Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Method (IEF-PCM)*** (Gaussian 09 User's Reference). Através da redefinição de alguns potenciais feitos pelo novo formalismo IEF e com o uso do método da superfície de cargas aparentes (ASC), o IEF-PCM tornou-se um modelo mais geral e computacionalmente menos exigente que o PCM original. Estudos de validação do modelo mostraram boa performance do IEF-PCM na simulação de solventes isotrópicos para cálculo de energia de solvatação, momentos de dipolo e hiperpolarizabilidades de solutos moleculares, bem como gradientes de energia para otimizações da geometria (Tomasi *et al.*, 1999).

Partindo do formalismo IEF-PCM e baseando-se na densidade de cargas do soluto recentemente Truhlar e colaboradores desenvolveram o ***modelo contínuo universal SMD***, aplicado a qualquer soluto neutro ou iônico em meio líquido (Marenich *et al.*, 2009). O modelo SMD separa a energia livre de solvatação em duas principais variáveis. A primeira é a contribuição eletrostática do *bulk* da solução decorrente do tratamento SCRF em termos do IEF-PCM. A segunda é o chamado termo de dispersão-cavitação da estrutura do solvente, que é decorrente das interações de curto alcance entre soluto e solvente na primeira camada de solvatação. Essa contribuição é uma soma de termos proporcionais às áreas da SAS com átomos individuais do soluto.

O modelo SMD foi extensamente parametrizado em termos de  $\Delta G_{sol}$  com solutos neutros e iônicos (contendo H, C, N, O, F, Si, P, S, Cl e Br) em água e solventes orgânicos. O modelo emprega intrinsicamente o ***conjunto de raios atômicos de Coulomb*** (SMD-Coulomb) e os coeficientes de tensão superficial atômica, otimizados pelos métodos M05-2X, B3LYP e HF combinados com os conjuntos de base MIDI!6D, 6-31G(d), 6-31+G(d,p) e cc-pVTZ. Seu uso é

recomendado pelo Gaussian 09 para cálculos de  $\Delta G_{sol}$  devido aos baixos erros obtidos: 0,6 a 1,0 kcal/mol para solutos neutros e 4 kcal/mol para solutos iônicos (Marenich *et al.*, 2009; Gaussian 09 User's Reference, 2013).

### 3. OBJETIVO

Compreender os fenômenos de inversão de  $pK_a$  da Eritrosina B e Eosina Y juntamente com seus equilíbrios protolíticos e tautoméricos em diferentes meios.

#### **Ações específicas para atingir o objetivo proposto**

Calcular as constantes de equilíbrio de tautomerização experimentais para avaliar a estabilidade preferencial dos tautômeros em água, misturas de água/DMSO e meios aquoso-micelares e validar os resultados teóricos.

Testar diferentes níveis de teoria combinando os funcionais B3LYP e M06-2X com os conjuntos de funções de base DGDZVP, 6-311++G(d,p) e LANL2DZ(d,p), bem como, os modelos de solvatação SMD e IEF-PCM junto aos conjuntos de raios UFF, Pauling e SMD-Coulomb na reprodução do comportamento experimental das constantes de equilíbrio tautomérico e  $pK_a$ s.

Estudar as propriedades espectrofotométricas do estado singleto excitado das espécies protolíticas e tautoméricas testando diferentes níveis de teoria por TD-DFT e CIS.

Estudar as propriedades eletrostáticas das espécies protolíticas e tautoméricas através da distribuição de cargas e momentos de dipolo em diferentes meios.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Equilíbrio de Tautomerização: cálculos empíricos

Como citado antes, para o cálculo das constantes de equilíbrio tautomérico ( $K_T$ ) experimentais duas considerações anteriores (Mchedlov-Petrossyan e Mayorga, 1992; Mchedlov-Petrossyan e Kleshchevnikova, 1994) foram empregadas: (i) NEL é incolor devido à hibridização  $sp^3$  de C9 (Esquema 1.1) e (ii) o substituinte ligado a C2' influencia pouco na banda de absorção UV-Vis, de modo a assumir a equivalência espectral das espécies:  $CT \cong NEZ$ ,  $NEQ \cong MAC$  e  $MAF \cong DA$ , o que se deve à similaridade dos grupos cromofóricos (Mchedlov-Petrossyan e Mayorga, 1992; Mchedlov-Petrossyan e Kleshchevnikova, 1994). As formas tautoméricas do equilíbrio protolítico dos metil-ésteres xantênicos são invariavelmente neutra quinóide (MET-NE) e monoaniônica fenolato (MET-MA) em qualquer meio. Assim, pela comparação da EOS e ERI (Esquema 1.1) com seus derivados metil-ésteres (Esquema 1.2), considerou-se idêntica a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) das espécies:  $\epsilon_{MET-NE} = \epsilon_{NEQ} = \epsilon_{MAC}$  e  $\epsilon_{MET-MA} = \epsilon_{MAF} = \epsilon_{DA}$ .

Tomaram-se os trabalhos experimentais de Estevão (2012) e Pellosi (2012), respectivamente, para a EOS e ERI em água, misturas água/DMSO e meios aquosos micelares obtendo-se o  $\epsilon$  experimental das espécies tautoméricas de cada forma protolítica, o que permitiu calcular a fração molar ( $\chi$ ) de cada tautômero nos diferentes meios. Mchedlov-Petrossyan e Kleshchevnikova (1994) consideram que a presença do tautômero NEZ pode ser desconsiderada ( $\chi_{NEZ} = 0$ ) devido ao efeito dos átomos pesados de Bromo na Eosina Y. O efeito retirador do Bromo (EOS) e do Iodo (ERI) deve tornar os hidrogênios protolíticos da parte xantênica muito ácidos e improváveis de ocorrerem simultaneamente para formar NEZ (ver Esquema 1.1). Adotando esta prerrogativa para a EOS e ERI, o cálculo de  $\chi$  de cada tautômero neutro foi feito simplificando a Eq 1.1 na forma:

$$\epsilon_{NE} = \epsilon_{NEQ} \chi_{NEQ} \quad \text{onde } \chi_{NEQ} + \chi_{NEL} = 1 \quad (\text{Eq 4.1})$$

Para os tautômeros monoaniônicos,  $\chi$  foi calculado montando um sistema de equações lineares de duas variáveis considerando:

$$\varepsilon_{MA} = \varepsilon_{MAC}\chi_{MAC} + \varepsilon_{MAF}\chi_{MAF} \quad \text{onde } \chi_{MAC} + \chi_{MAF} = 1 \quad (\text{Eq 4.2})$$

Na Eq 4.1 e Eq 4.2,  $\varepsilon_{NE}$  e  $\varepsilon_{MA}$  representam, respectivamente, o  $\varepsilon$  total da mistura de tautômeros neutros (NE) e monoaniônicos (MA) em equilíbrio. A partir da  $\chi$  de cada espécie foram calculadas as constantes de equilíbrio tautomérico ( $K_T$ ) para as formas protolíticas neutras ( $K_{Q-L} = \chi_{NEL}/\chi_{NEQ}$ ) e monoaniônicas ( $K_M = \chi_{MAF}/\chi_{MAC}$ ) (Esquema 1.1), com as quais também se obteve a variação da energia livre de Gibbs padrão de reação ( $\Delta_r G_T^o$ ) para cada equilíbrio tautomérico (Levine, 2009).

$$\Delta_r G_T^o = -RT \ln K_T \quad (\text{Eq 4.3})$$

## 4.2 Cálculos Computacionais com as Estruturas Protolíticas e Tautoméricas

### 4.2.1 Estado Fundamental

As otimizações estruturais foram iniciadas com a espécie NEQ da ERI aplicando o método PM3 seguido de Hartree-Fock (HF) com o conjunto de base *DGauss Double-Zeta Valence Polarized* (DGDZVP) (Godbout *et al.*, 1992) no vácuo. Cálculos de SCAN no ângulo diedral formado por C7', O8', O9' e H ligado ao O9' (H–O9') (Esquema 1.1) foram feitos em HF/DGDZVP com 18 rotações de 20°. A estrutura com a conformação mais estável foi reotimizada com o funcional B3LYP combinado com DGDZVP, cuja ausência de frequências imaginárias (negativas) confirmou ser um mínimo real de energia. Esta otimização foi feita em duas possíveis estruturas NEQ: uma com H ligado ao O15 (H–O15) e outra com H–O16, sendo que a primeira mostrou-se ligeiramente mais estável. Assim, estruturas com o grupo cromofórico protonado foram otimizadas com H–O15. A escolha inicial do conjunto DGDZVP deve-se ao seu bom desempenho apontado nos trabalhos de Godbout *et al.* (1992) e Sosa *et al.* (1992), cuja comparação com 6-31G e 6-311G mostrou que, por serem otimizadas para DFT, as bases

*DGauss* requerem menor tempo computacional e apresentam maior eficiência para o estudo de geometrias e energias moleculares.

A partir da estrutura NEQ da ERI otimizada em vácuo foram montadas todas as outras formas protolíticas e tautoméricas da ERI e da EOS no vácuo, bem como seus derivados MET-NE e MET-MA, mantendo as mesmas coordenadas cartesianas. A otimização sem restrições das formas NEZ e MAC no vácuo formou ligação covalente O8'-C9, constituindo um anel lactona. Para estabilizar estas estruturas, fixou-se a distância de 2,50 Å entre O8' e C9, valor médio obtido nas outras espécies otimizadas, todas com ausência de frequências negativas.

Outros níveis de teoria foram empregados na otimização e cálculos de frequências das espécies da ERI, EOS, ERIMET e EOSMET: B3LYP/6-311++G(d,p), M06-2X/DGDZVP e M06-2X/LANL2DZ(d,p). Como o conjunto de base 6-311G é parametrizado apenas de H-Kr e não inclui o átomo de Iodo (presente na ERI), foi necessário incluir a descrição *extrabasis* deste elemento bem como as funções de polarização (d,p) (Glukhovtsev *et al.*, 1995), obtidas no *Basis Set Exchange v 1.2.2* ([www.bse.pnl.gov](http://www.bse.pnl.gov)). O conjunto de base LANL2DZ(d,p) (Check *et al.*, 2001) também foi adicionado da mesma forma (*extrabasis*), sendo que sua descrição para o iodo apenas está disponível na forma de pseudo-potencial (ECP). Assim, as palavras-chave *extrabasis* e *pseudo=read* foram adicionadas na linha de comando para utilizar a descrição do conjunto de base e dos pseudo-potenciais para o iodo, os quais foram copiados do *Basis Set Exchange* e adicionados logo abaixo do plano cartesiano no arquivo de entrada gaussiano.

Os níveis de teoria acima foram empregados também na otimização e cálculos de frequências das espécies em água e DMSO utilizando o modelo de solvente IEF-PCM a 298,15 K, sempre garantindo a ausência de frequências negativas. Com as espécies solvatadas otimizadas foram feitos cálculos de *Single Point* (SP) para a obtenção da Energia Eletrônica e  $\Delta G_{sol}$ . Para isso foram usados os modelos de solvatação IEF-PCM e SMD, ambos combinados com o conjunto de raios UFF, Pauling e SMD-Coulomb.

O modelo de solvatação implícito-explícito também foi testado adicionando três moléculas explícitas de água próximas aos grupos protolíticos (O15, O16 e O9', Esquema 1.1) da ERI e EOS, uma molécula de água para cada grupo. O cálculo de otimização de cada espécie foi submetido sem restrições com o nível de teoria B3LYP/DGDZVP e o modelo implícito de solvente IEF-PCM/UFF em água. A ausência de frequências negativas confirmou o mínimo global de energia para cada espécie.

Análises de NBO (*Natural Bond Orbital*) com B3LYP/DGDZVP em vácuo e SMD-Coulomb também foram feitas para estudar as cargas parciais de todas as espécies. Através da desconsideração da energia dos orbitais NBO não-ligantes (palavras-chave *pop=nbodel* e *nostar*) obteve-se a variação de energia do deslocamento eletrônico por ressonância dos tautômeros MAC e MAF em água para avaliar a estabilização preferencial.

Todos os cálculos foram feitos com o pacote computacional Gaussian 09 (Revisão A.01) para sistemas UNIX em dois micro-computadores Intel core i7 e um Core 2 Quad. Utilizou-se a versão Gaussian NBO 3.1.

#### **4.2.2 Estado Excitado**

O estudo no estado singlete excitado iniciou-se com testes para encontrar a metodologia mais adequada para a estimativa dos espectros de absorção, utilizando os seguintes níveis de teoria: CIS/DGDZVP, CIS/6-311++G(d,p), B3LYP/DGDZVP, B3LYP/6-311++G(d,p). Os modelos de solvente SMD e IEF-PCM e os raios de vdW UFF, Pauling e SMD-Coulomb também foram testados em água para a espécie DA, MET-NE e MET-MA da ERI e EOS. Visto que B3LYP/6-311++G(d,p) combinado com SMD-Coulomb levou aos menores erros em relação ao  $\lambda_{\text{máx}}$  experimental, este nível de teoria foi utilizado na estimativa dos espectros de absorção das espécies NEQ, NEL, MAC, MAF, DA, MET-NE e MET-MA da ERI e EOS em água, DMSO e no vácuo.

### **4.3 Equilíbrio de Tautomerização por Métodos de Química Computacional**

A forma usual de calcular experimentalmente a variação da energia livre de Gibbs padrão de uma reação ( $\Delta_r G^0$ ) é através da somatória das energias livres de formação dos produtos e reagentes. Contudo, ao invés das energias de formação, em estudos computacionais uma maneira fácil que minimiza erros é utilizar a soma das energias livres e eletrônicas ( $E_0 + G_{corr}$ ) fornecida pelo cálculo de frequências (Ochterski, 2000). As energias livres ( $G_{corr}$ ), além da energia de correção do ponto zero (ZPE), contém a energia de translação, rotação e vibração devido aos movimentos nucleares. Desta forma, os valores de  $\Delta_r G^0$  para os equilíbrios de tautomerização  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  ( $\Delta_r G^0_{Q-L}$ ) e  $MAC \rightleftharpoons MAF$  ( $\Delta_r G^0_M$ ) foram calculados no vácuo, em água e DMSO a 298,15 K com a equação:

$$\Delta_r G^0 = \sum(E_0 + G_{corr})_{prod} - \sum(E_0 + G_{corr})_{reag} \quad (\text{Eq 4.4})$$

Para verificar a validade da proposição de que a espécie NEZ contribui minimamente no equilíbrio das espécies neutras, o equilíbrio  $NEZ \rightleftharpoons NEQ$  e, adicionalmente,  $NEZ \rightleftharpoons NEL$  também foram calculados em água, DMSO e vácuo.

Para as espécies solvatadas, além do cálculo de frequência feito junto às otimizações estruturais com o modelo de solvente IEF-PCM/UFF, o modelo SMD também foi testado variando os raios UFF, Pauling e SMD-Coulomb em cálculos SP para melhorar a energia eletrônica ( $E_0$ ). Os valores de  $E_0$  foram aplicados à Eq 4.4 juntamente com  $G_{corr}$ , que foi calculada apenas com IEF-PCM/UFF, obtendo  $\Delta_r G^0_{Q-L}$  e  $\Delta_r G^0_M$  que permitiram o cálculo das constantes de equilíbrio de tautomerização  $K_{Q-L}$  e  $K_M$  a partir da Eq 4.3.

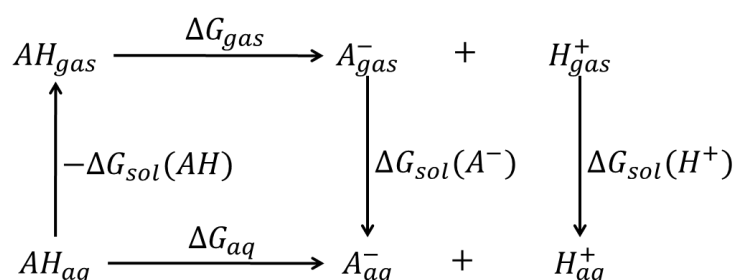
## 4.4 Cálculos de pKa

### 4.4.1 Cálculos de pKa com o método direto

Os cálculos de pKa dos equilíbrios protolíticos da ERI, ERIMET, EOS e EOSMET foram feitos com a Eq 4.5 que considera a variação da energia livre de Gibbs de desprotonação de HA em água ( $\Delta G_{aq}$ ) ou em DMSO (neste caso  $\Delta G_{dmsO}$  substitui  $\Delta G_{aq}$ ), obtida através do ciclo termodinâmico da Figura 4.1 (Liptak *et al.*, 2002; Ho e Coote, 2010). As energias livres de Gibbs

(G) em fase gasosa da espécie protonada ( $AH_{gas}$ ) e desprotonada ( $A^-_{gas}$ ) foram retiradas do cálculo de frequência feito em cada nível de teoria testado. Estudos teóricos com a fluoresceína e seus derivados clorados e fluorados feitos por Król *et al.* (2006) concluíram que a energia de relaxação entre a estrutura otimizada no vácuo e a otimizada em fase solvatada com modelo implícito é insignificante nos cálculos de  $pK_a$ . No entanto, como recomendado por Liptak *et al.* (2002) em estudos de fenóis, utilizou-se as estruturas otimizadas em água ou DMSO com IEF-PCM/UFF ao fazer os cálculos SP para obter os  $\Delta G_{sol}$  das espécies HA e  $A^-$ . Nestes cálculos foram testados os modelos implícitos de solvatação IEF-PCM e SMD junto aos conjuntos de raios UFF, Pauling e SMD-Coulomb.

$$pK_a = \frac{\Delta G_{aq}}{RT \ln 10} \quad (\text{Eq 4.5})$$



**Figura 4.1.** Ciclo termodinâmico para obter a variação da energia livre de Gibbs de desprotonação de HA em água ( $\Delta G_{aq}$ ) ou DMSO ( $\Delta G_{aq} = \Delta G_{dms}$ ).

A resolução do ciclo termodinâmico (Anexo 8.1) em água leva à expressão de  $\Delta G_{aq}$ , inserida na Eq 4.5 para o cálculo de  $pK_a$ :

$$\Delta G_{aq} = G_{gas}(A^-) + G_{gas}(H^+) - G_{gas}(HA) + RT \ln(24,46) + \Delta G_{sol}(A^-) + \Delta G_{sol}(H^+) - \Delta G_{sol}(HA) \quad (\text{Eq 4.6})$$

Utilizando os valores da literatura de  $G_{gas}(H^+) = -6,28$  kcal/mol e  $\Delta G_{sol}(H^+) = -265,9$  kcal/mol (Tissandier *et al.*, 1998; Tuttle *et al.*, 2002; Palascak e Shields, 2004; Camaioni e Schwerdtfeger, 2005; Kelly *et al.*, 2006), ambos a 298,15 K,  $R = 1,987$  cal/K mol,  $T = 298,15$  K e fazendo a correção do  $\Delta G_{gas}(1atm)$  para  $\Delta G_{gas}(1M)$  com o fator  $RT \ln(24,46)$  (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2007-2008) temos:

$$\Delta G_{aq} = G_{gas}(A^-) - G_{gas}(HA) + \Delta G_{sol}(A^-) - \Delta G_{sol}(HA) - 270,3 \quad (\text{Eq 4.7})$$

Após fazer a correção de  $\Delta G_{sol}$  para a transferência do íon  $H^+$  de água para DMSO, a 298,15 K, de acordo com o manual da IUPAC preparado por Marcus (1983), obteve-se o valor de  $\Delta G_{sol}(H^+) = -268,63$  kcal/mol. Assim, com a Eq 4.6 chega-se a expressão de  $\Delta G_{dmsO}$  (Eq 4.8) que é substituída na Eq 4.5 para o cálculo de  $pK_a$ .

$$\Delta G_{dmsO} = G_{gas}(A^-) - G_{gas}(HA) + \Delta G_{sol}(A^-) - \Delta G_{sol}(HA) - 273,0 \quad (\text{Eq 4.8})$$

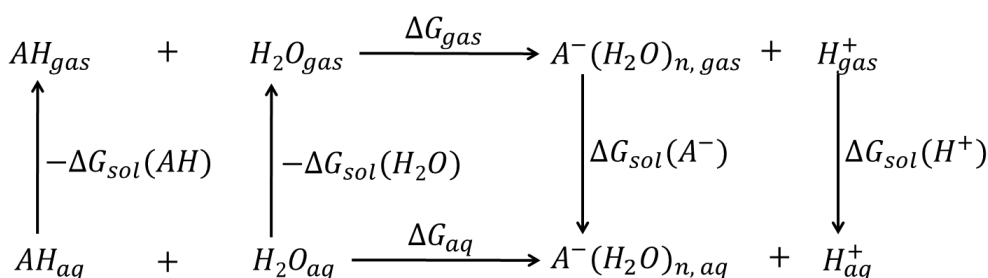
Também foi possível estimar o  $pK_a$  em fase gasosa calculando o  $\Delta G_{gas}$ :

$$\Delta G_{gas} = G_{gas}(A^-) - G_{gas}(HA) - 6,28 \quad (\text{Eq 4.9})$$

#### 4.4.2 Cálculos de $pK_a$ com o modelo de solvatação implícito-explícito

Os cálculos de  $pK_a$  também foram feitos testando o modelo de solvatação implícito-explícito com três moléculas explícitas de água. Um novo ciclo termodinâmico (Figura 4.2) foi resolvido para considerar este modelo, obtendo o valor de  $\Delta G_{aq}$  que foi substituído na Eq 4.10 para cálculo do  $pK_a$ , de acordo com a metodologia relatada por Kelly *et al.* (2006) e Ho e Coote (2010). O termo  $\log[H_2O]$  da Eq 4.10 é necessário para corrigir o estado padrão da água líquida, cuja concentração é 55 mol/L.

$$pK_a = \frac{\Delta G_{aq}}{RT \ln 10} - \log[H_2O] \quad (\text{Eq 4.10})$$



**Figura 4.2.** Ciclo termodinâmico para obter a variação da energia livre de Gibbs de desprotonação de HA em água ( $\Delta G_{aq}$ ) através do modelo de solvatação implícito-explícito

A resolução do ciclo termodinâmico com moléculas de água explícitas (Anexo 8.2) leva à seguinte expressão de  $\Delta G_{aq}$ :

$$\Delta G_{aq} = G_{gas}(A^-(H_2O)_n) + G_{gas}(H^+) - G_{gas}(HA) - G_{gas}(nH_2O) + \Delta G_{sol}(A^-(H_2O)_n) + \Delta G_{sol}(H^+) - \Delta G_{sol}(HA) - \Delta G_{sol}(H_2O) \quad (\text{Eq 4.11})$$

Utilizando os valores da literatura de  $G_{gas}(H^+) = -6,28$  kcal/mol,  $\Delta G_{sol}(H^+) = -265,9$  kcal/mol e  $\Delta G_{sol}(H_2O) = -6,32$  kcal/mol (Tissandier *et al.*, 1998; Tuttle *et al.*, 2002; Palascak e Shields, 2004; Camaioni e Schwerdtfeger, 2005; Kelly *et al.*, 2006), todos a 298,15 K, temos:

$$\Delta G_{aq} = G_{gas}(A^-(H_2O)_n) - G_{gas}(HA) - G_{gas}(nH_2O) + \Delta G_{sol}(A^-(H_2O)_n) - \Delta G_{sol}(HA) - 265,9 \quad (\text{Eq 4.12})$$

Esta expressão foi então substituída na Eq 4.10 para o cálculo de  $pK_a$  em água.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Equilíbrio de Tautomerização Empírico

Partindo dos estudos experimentais de  $pK_a$  de Estevão (2012) e Pellosi (2012) com a Eosina (EOS) e Eritrosina (EIR) feitos por espectrofotometria UV-Vis e metodologias quimiométricas de análise multivariada (Março e Scarmínio, 2007) foram estimadas as constantes de equilíbrio de tautomerização ( $K_T$ ). Primeiramente ressalta-se que a consideração de  $\chi_{NEZ} = 0$  no equilíbrio tautomérico das formas neutras de EOS e ERI, como feito por Mchedlov-Petrossyan e Kleshchevnikova (1994), é coerente com seus valores negativos de  $pK_{a0}$  em água, enquanto para a Fluoresceína  $pK_{a0} = 2,50$ . Além disso, o  $pK_{a-OH}$  para EOS (2,02) e ERI (3,79) em água é muito menor que para a Fluoresceína (6,10) (Batistela *et al.*, 2011), evidenciando o quanto Bromo e Iodo tornam ácidos os -OH fenólicos, desfavorecendo NEZ.

Tanto para a ERI quanto para a EOS foram tomados os valores de  $\epsilon$  referentes ao  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de absorção ao invés de fixar um  $\lambda$  analítico. Apesar de discutível, essa medida se mostrou necessária diante da grande complexidade do sistema. Além das várias possibilidades de equilíbrios tautoméricos, também ocorrem efeitos solvatocrômicos em certos ambientes micelares ou ao aumentar a proporção de DMSO, levando a variações de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (Anexo 8.3, Figura 8.3 e 8.4), tornando impraticável a escolha de um único comprimento de onda analítico. Apesar disso, os cálculos da fração molar dependem apenas do  $\epsilon$ , o qual não deve sofrer grandes alterações em espécies com grupos cromofóricos idênticos. Assim para os cálculos de  $K_T$  tomaram-se as absorvidades molares aparentes ( $\epsilon$ ) das formas protolíticas da ERI, ERIMET, EOS e EOSMET nos diversos meios (Anexo 8.3, Tabela 8.1 e 8.2). Para o equilíbrio  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  considerou-se  $\epsilon_{NEQ} = \epsilon_{MET-NE}$  e com as Eq 4.1 e 4.3 calculou-se  $\chi_{NEQ}$ ,  $\chi_{NEL}$ ,  $K_{Q-L}$  e  $\Delta_r G^{\circ}_{Q-L}$  (Tabela 5.1 e 5.2). Os resultados de  $\chi_{MAC}$ ,  $\chi_{MAF}$ ,  $K_M$  e  $\Delta_r G^{\circ}_M$  do equilíbrio  $MAC \rightleftharpoons MAF$  foram obtidos pelas Eq 4.2 e 4.3 considerando  $\epsilon_{MAC} = \epsilon_{MET-NE}$  e  $\epsilon_{MAF} = \epsilon_{MET-MA}$ . Dessa forma, os

resultados obtidos (Tabela 5.1 e 5.2) são aproximações válidas na análise dos equilíbrios tautoméricos do sistema.

**Tabela 5.1.** Absortividade molar aparente ( $\epsilon$ ) junto ao  $\lambda_{\text{máx}}$ , fração molar ( $\chi$ ) dos tautômeros neutros (NE) e monoaniônicos (MA) da ERI, constantes de equilíbrio tautomérico (KQ-L e KM) e energia livre padrão de reação ( $\Delta_r G^\circ$ ) em misturas de água-DMSO e meio aquoso micelar a 30 °C, calculados com dados de Pellosi (2012).

	% DMSO (v/v)					SDS <sup>a</sup>	CTAB <sup>b</sup>	P-123 <sup>c</sup>	
	0	20	40	60	70				
NE	$\epsilon_{\text{NE}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	15,6; 491	15,8; 493	10,5; 492	5,3; 490	3,2; 494	14,2; 519	7,8; 491	0,0
	$\epsilon_{\text{NEQ}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	19,8; 491	20,1; 492	18,8; 494	19,3; 494	20,6; 493	26,8; 489	22,5; 491	20,7; 484
	$\chi_{\text{NEQ}}$	0,79	0,79	0,56	0,28	0,16	0,16	0,35	0,00
	$\chi_{\text{NEL}}$	0,21	0,21	0,44	0,72	0,84	0,84	0,65	1,00
	$K_{Q-L} = \chi_{\text{NEL}}/\chi_{\text{NEQ}}$	0,27	0,27	0,79	2,64	5,51	0,89	1,88	↑↑
	$\Delta_r G_{Q-L}^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	0,78	0,77	0,14	-0,57	-1,01	0,071	-0,38	↓↓
MA	$\epsilon_{\text{MA}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	41,2; 529	31,7; 533	84,9; 535	93,6; 540	95,6; 543	25,2; 529	108,7; 535	102,0; 547
	$\epsilon_{\text{MAF}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	92,8; 527	95,6; 531	97,6; 535	99,7; 539	101,4; 541	96,9; 535	106,4; 543	104,2; 545
	$\epsilon_{\text{MAC}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	19,8; 491	20,1; 492	18,8; 494	19,3; 494	20,6; 493	26,8; 489	22,5; 491	20,7; 484
	$\chi_{\text{MAF}}$	0,29	0,15	0,84	0,84	0,93	0,00	1,00	0,97
	$\chi_{\text{MAC}}$	0,71	0,85	0,16	0,16	0,07	1,00	0,00	0,03
	$K_M = \chi_{\text{MAF}}/\chi_{\text{MAC}}$	0,41	0,18	5,21	5,17	12,89	0,00	↑↑	37,46
$\Delta_r G_M^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	0,52	1,01	-0,98	-0,97	-1,52	--	↓↓	-2,15	

<sup>a</sup>[SDS]=  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; <sup>b</sup>[CTAB]=  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; <sup>c</sup>[P-123]=  $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Na Tabela 5.1 observa-se que a ERI em água (0% DMSO) tem o equilíbrio tautomérico das espécies neutras deslocado para NEQ ( $\Delta_r G_{Q-L}^\circ > 0$  e  $\chi_{\text{NEQ}} = 0,79$ ) e, na forma monoaniônica, deslocado para MAC ( $\Delta_r G_M^\circ > 0$  e  $\chi_{\text{MAC}} = 0,71$ ). Portanto, essas espécies contribuem mais significativamente no equilíbrio protolítico em água, ficando:  $\text{NEQ} \rightleftharpoons \text{MAC} \rightleftharpoons \text{DA}$ , assim como proposto por Pellosi (2012) e Batistela *et al.* (2011). Além disso, os valores positivos de  $\Delta_r G^\circ$  mostram que NEQ e MAC possuem energia livre de Gibbs menor do que NEL e MAF em água, tornando-as mais estáveis.

Para a ERI, conforme a constante dielétrica ( $\xi$ ) do meio diminui com o aumento da % DMSO, os valores de  $\Delta_r G_{Q-L}^\circ$  e  $\Delta_r G_M^\circ$  tornam-se negativos e maior é a fração molar de NEL e MAF, sendo estas as espécies predominantes em 70% DMSO. Neste meio menos polar o

equilíbrio protolítico da ERI é representado por:  $NEL \rightleftharpoons MAF \rightleftharpoons DA$ , com inversão de  $pK_a$  (Batistela *et al.*, 2011; Pellosi, 2012). Contudo, para MAF ser formada a partir de NEL com o aumento do pH há duas possibilidades: (i) ocorrer abertura do anel lactona devido à desprotonação de O16 (Esquema 1.1) formando MAC e, imediatamente a seguir a transferência de próton de O15 para O9' formando MAF, ou; (ii) ocorrer o deslocamento do equilíbrio  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  favorecendo NEQ, que rapidamente tem o O15 desprotonado para formar MAF. O favorecimento de NEL em 70% de DMSO se repetiu em todos os meios micelares, indicando que a menor  $\xi$  deste micro ambiente em relação à água causa a estabilização preferencial deste tautômero (Mchedlov-Petrosyan *et al.*, 2006 [a] e [b]). A princípio, isso vai de encontro com a possibilidade (i), no entanto, mesmo em meios menos polares, a elevação do pH pode desfavorecer NEL e favorecer NEQ (possibilidade (ii)).

Assim como em 70% DMSO/água, o tautômero MAF da ERI também é majoritário em CTAB (micela catiônica) e em P-123 (micela polimérica). Isso sugere que o micro ambiente de baixa  $\xi$  das micelas estabiliza preferencialmente MAF devido à maior dispersão da carga negativa por ressonância no grupo cromofórico (parte xantênica). Além disso, também deve haver contribuição de efeitos eletrostáticos da repulsão de prótons pela superfície positiva da micela que influenciam no equilíbrio protolítico. Este efeito é ainda mais pronunciado em CTAB, cujo valor de  $\chi_{MAF} \cong 1,00$  leva a valores altíssimos de  $K_M$  ( $\uparrow\uparrow$ ) e baixíssimos de  $\Delta_r G_M^o$  ( $\downarrow\downarrow$ ). Um fato importante é que a inversão de  $pK_a$  da ERI ocorreu nos mesmos meios onde MAF foi estabilizado, pois isso leva a desprotonação da forma neutra no  $-OH$  fenólico ( $pK_{a1-OH}$ ) ao invés do  $-COOH$  carboxílico.

Por outro lado, tal como em água pura, MAC é amplamente majoritário ( $\chi_{MAC} \cong 1,00$ ) em SDS (micela aniônica). Isso se deve à repulsão de cargas entre a espécie monoaniônica da ERI com a superfície micelar (cargas negativas de sulfatos), “expulsando” o corante para o *bulk* da solução, ou seja, para a água onde MAC é preferencial à MAF. Ressalte-se que isso impede a

inversão de  $pK_a$  já que neste caso o  $pK_{a1}$  refere-se à desprotonação do grupo carboxílico (Pellosi, 2012).

**Tabela 5.2.** Absortividade molar aparente ( $\epsilon$ ) junto ao  $\lambda_{\text{máx}}$ , fração molar ( $\chi$ ) dos tautômeros neutros (NE) e monoaniônicos (MA) da **EOS**, constantes de equilíbrio de tautomerização ( $K_{Q-L}$  e  $K_M$ ) e energia livre padrão de reação ( $\Delta_r G^\circ$ ) em meio aquoso micelar a 30 °C, calculados com dados de Estevão (2012).

	ÁGUA	SDS <sup>a</sup>	P-123 <sup>b</sup>	CTAB <sup>c</sup>
$\epsilon_{\text{NE}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	7,5; 470	10,7; 482	0,00	0,00
$\epsilon_{\text{NEQ}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	16,8; 470	28,5; 479	24,5; 477	30,1; 483
$\chi_{\text{NEQ}}$	0,45	0,38	0,00	0,00
$\chi_{\text{NEL}}$	0,55	0,62	1,00	1,00
$K_{Q-L} = \chi_{\text{NEL}}/\chi_{\text{NEQ}}$	1,24	1,67	↑↑	↑↑
$\Delta_r G^\circ_{Q-L}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-0,13	-0,30	↓↓	↓↓
$\epsilon_{\text{MA}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	51,7; 519	33,4; 519	83,8; 538	102,9; 540
$\epsilon_{\text{MAF}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	97,2; 517	81,3; 530	91,1; 540	109,3; 540
$\epsilon_{\text{MAC}}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	16,8; 470	28,5; 479	24,5; 477	30,1; 483
$\chi_{\text{MAF}}$	0,43	0,09	0,89	0,92
$\chi_{\text{MAC}}$	0,57	0,91	0,11	0,08
$K_M = \chi_{\text{MAF}}/\chi_{\text{MAC}}$	0,77	0,10	8,09	11,35
$\Delta_r G^\circ_M$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	0,16	1,35	-1,24	-1,44

<sup>a</sup>[SDS]=  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; <sup>b</sup>[CTAB]=  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; <sup>c</sup>[P-123]=  $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Efeitos semelhantes foram observados em diversos trabalhos com corantes xantênicos em misturas água/solvente orgânico (Amat-Guerri *et al.*, 1990; Mchedlov-Petrossyan e Mayorga, 1992; Mchedlov-Petrossyan *et al.*, 2003; Mchedlov-Petrossyan *et al.*, 2006 [a] e [b]). O comportamento de MAC e MAF de acordo com o meio está relacionado com a capacidade de solvatação de ácidos carboxílicos, fenóis e suas bases conjugadas. Discute-se que os ácidos carboxílicos são mais dependentes de solventes que fazem ligações hidrogênio do que os fenóis (Bates, 1964; Mukerjee, P.; Ostrow, 1998), o que pode contribuir para a maior estabilidade de MAC em água. Assim, a maior fração molar de MAF em altas proporções de DMSO/água pode estar ligada à menor capacidade da mistura destes solventes em estabelecer ligações hidrogênio com o soluto. Então MAF acaba predominando devido à estabilização intrínseca desta espécie causada pela dispersão de carga por ressonância eletrônica. Nas micelas de CTAB e P-123

ocorre a inclusão do FS à micela, cujo ambiente desprovido de grande quantidade de água (e baixo  $\xi$ ) dificulta a ocorrência de ligações hidrogênio. A dificuldade em estabelecer ligações hidrogênio no interior da micela dificulta a estabilização do grupo carboxilato, desfavorecendo MAC e, em contrapartida, favorecendo MAF.

Para a EOS (Tabela 5.2), o valor de  $K_{Q-L}$  encontrado em água a 30°C está de acordo com o valor da literatura (1,3), a 25 °C (Vodolazkaya *et al.*, 2009), fazendo  $\Delta_r G^{\circ}_{Q-L}$  próximo a zero. Como citado anteriormente, mesmo em água pura observou-se experimentalmente que a EOS apresenta inversão de  $pK_a$ . Desta forma NEQ e NEL coexistem em água aproximadamente na mesma proporção, o que também ocorre com os tautômeros MAC e MAF. Porém, comparativamente, a EOS estabiliza maior quantidade de MAF do que a ERI em água. A maior estabilidade de MAF parece ser o principal fator que causa a inversão de  $pK_a$  apresentada pela EOS, mesmo em água (Batistela *et al.*, 2011). Com isso, Batistela *et al.* (2011) propõem que o equilíbrio protolítico da EOS em água é representado pelos tautômeros:  $NEQ \rightleftharpoons MAF \rightleftharpoons DA$ . Apesar de observarmos que  $\chi_{NEQ} \cong \chi_{NEL}$ , a formação de MAF deve consumir primeiramente a forma neutra NEQ (ver Esquema 1.1), deslocando rapidamente o equilíbrio  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  para a forma quinóide, o que sustenta a proposição dos autores. Como neste caso  $\chi_{NEQ}$  é grande comparado à ERI em 70% DMSO (Tabela 5.1), a hipótese (ii) do deslocamento de  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  para a esquerda é mais apropriada do que a hipótese (i) de NEL formar MAC e, por transferência de próton, formar MAF.

Dentre os meios micelares, pode ser observado que na Tabela 5.2 apenas em SDS tem-se  $\chi_{MAC} > \chi_{MAF}$ , sendo este o único meio em que a EOS não apresentou inversão de  $pK_a$ . Nos outros meios em que  $\chi_{MAF} > \chi_{MAC}$  a inversão de  $pK_a$  foi verificada, ou seja, o grupo fenólico foi mais ácido que o carboxílico (Estevão, 2012). Como NEL predominou em todos os meios, novamente tem-se a hipótese de formação de MAC com transferência de prótons para formar MAF ou o deslocamento do pré-equilíbrio  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  para a esquerda.

Em geral, desconsiderando os efeitos específicos de micelas iônicas, dentre as formas neutras NEQ tende a ser estabilizado em água e NEL predomina em ambientes de menor  $\xi$ . Dentre as formas monoaniônicas da ERI, MAC é favorável em água e MAF em meios de menores  $\xi$ , enquanto para EOS a forma MAF tende a prevalecer em qualquer meio, causando as inversões de  $pK_a$  (exceto em SDS).

## 5.2 Equilíbrio de Tautomerização por Métodos de Química Computacional

Após corrigir as energias eletrônicas obtidas com os modelos de solvatação IEF-PCM e SMD e os conjuntos de raio UFF, Pauling e SMD-Coulomb somando  $G_{corr}$  do cálculo de frequência (em IEF-PCM/UFF), foram calculados os valores da variação da energia livre padrão de reação para o equilíbrio  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  ( $\Delta_r G_{Q-L}^o$ ) e  $MAC \rightleftharpoons MAF$  ( $\Delta_r G_M^o$ ) e as respectivas constantes de tautomerização  $K_{Q-L}$  ( $= \chi_{NEL}/\chi_{NEQ}$ ) e  $K_M$  ( $= \chi_{MAF}/\chi_{MAC}$ ). Os resultados são apresentados na Tabela 5.3 e 5.4 para a Eritrosina e Tabela 5.5 para a Eosina.

Apesar de não haver valores experimentais da constante de equilíbrio  $NEZ \rightleftharpoons NEQ$ , no estudo teórico se constatou um enorme deslocamento para a direita, assim como no possível equilíbrio  $NEZ \rightleftharpoons NEL$  considerado. Apesar da dificuldade em obter a forma NEZ, visto que sua otimização sem restrições levava à forma lactona, tanto em vácuo quanto em água (IEF-PCM), a fixação da distância entre C9–O8' em 2,50 Å permitiu o cálculo das constantes de equilíbrio, tanto para a EOS quanto para a ERI. Os valores de  $K_T$  destes dois equilíbrios obtidos com B3LYP/6-311++G(d,p) em vácuo, IEF-PCM/UFF e SMD-Coulomb (água e DMSO) variam desde  $5,19 \times 10^7$  em água até  $1,25 \times 10^{17}$  no vácuo, considerando EOS e ERI. Ou seja, estes enormes valores mostram total deslocamento do equilíbrio para a forma NEL. Isso confirma a validade da proposição de que NEZ contribui minimamente para o equilíbrio tautomérico das espécies neutras e pode ser desconsiderado. Além disso, este resultado mostra-se em concordância com outros estudos experimentais e teóricos de halo-derivados da fluoresceína (Mchedlov-Petrossyan e Mayorga, 1992; Mchedlov-Petrossyan e Kleshchevnikova, 1994; Orte *et al.*, 2005; Król *et al.*, 2006).

Neste trabalho, a comparação direta dos resultados teóricos com os empíricos é impraticável, primeiramente, devido à diferença de temperatura. Além disso, os desvios consideráveis que os níveis de teoria utilizados fornecem aos valores termodinâmicos, especialmente para compostos contendo elementos tão volumosos quanto bromo e iodo (Ho e Coote, 2010; Ferreira e Silva, 2013), podem tornar discrepantes os resultados numéricos das

constantes de equilíbrio teóricas. A dificuldade do uso de funções de base – sem pseudo-potenciais – grandes o bastante para descrever corretamente estes elementos também prejudicaram os resultados termodinâmicos. A limitação no uso de funções difusas também foi um fator agravante devido a grande quantidade de espécies aniônicas. No entanto é possível avaliar as tendências no deslocamento do equilíbrio químico através do estudo comparativo entre as espécies, que acaba cancelando parte dos erros e fornecendo resultados qualitativos importantes.

Os testes com o funcional M06-2X junto aos conjuntos de base DGDZVP e LANL2DZ(d,p) foram feitos apenas com as espécies protolíticas e tautoméricas da ERI em água e vácuo, de modo a analisar se as tendências experimentais foram reproduzidas. Como se observa na Tabela 5.3, os valores de  $\Delta_r G_{Q-L}^o < 0$  e  $K_{Q-L} \gg 1$  (notar que todos os resultados de  $K_T$  desta tabela estão multiplicados por  $10^4$ ) em água indicam que o equilíbrio das espécies neutras está deslocado no sentido de NEL, ao contrário do que se observou experimentalmente. Este comportamento foi idêntico para os dois conjuntos de base testados com M06-2X e para todos os modelos de solventes e conjuntos de raios de vdW testados.

A tendência experimental para as espécies monoaniônicas também não foi reproduzida, sendo que tanto M06-2X/DGDZVP quanto M06-2X/LANL2DZ(d,p) em qualquer modelo de solvatação forneceu  $\Delta_r G_M^o < 0$  e  $K_M \gg 1$ , sugerindo erroneamente que MAF prevalece no equilíbrio químico. Contudo, o comportamento em vácuo tanto das espécies neutras quanto monoaniônicas indicam que NEL e MAF prevalecem onde  $\xi = 0$  (ou muito baixo). Esses tautômeros são os que se mostraram majoritários em 70% DMSO/água e meios micelares (ambientes com  $\xi$  menor que da água) e, portanto, confirmam a previsão dos modelos teóricos no vácuo.

Analisando os níveis de teoria B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p) (Tabela 5.4) observa-se que a tendência experimental das espécies neutras da ERI em água foi descrita corretamente, com deslocamento do equilíbrio para NEQ ( $\Delta_r G_{Q-L}^o > 0$  e  $K_{Q-L} < 1$ ). O conjunto de



base DGDZVP com o conjunto de raio UFF destacou-se pelo valor próximo ao experimental. No entanto para as espécies monoaniônicas  $K_M$  teve valores extremamente altos que sugerem maior estabilidade de MAF em água, ao contrário do observado experimentalmente ( $\chi_{MAC} = 0,71$ ). Este fato tem provável ligação com a limitação enfrentada pela maioria dos conjuntos de funções de base para a adição de funções difusas ao Iodo e outros elementos volumosos. Isso permitiria uma descrição melhor de ânions devido ao uso de funções gaussianas aumentadas na camada de valência. O conjunto DGDZVP não possui funções difusas associadas em sua descrição e também não permite adicioná-las (Gaussian 09 User's Reference, 2013). Apesar da inclusão de duas funções difusas no 6-311++G(d,p), sua parametrização é somente de H a Kr, sendo que a adição da descrição *extrabasis* para o iodo contou apenas com funções de polarização d e p, mas não com difusas.

**Tabela 5.3.** Variação de energia livre padrão de reação ( $\Delta_r G^\circ$ ) e constante de equilíbrio de tautomerização ( $K_T$ ) da **Eritrosina em água e vácuo** obtidos com os modelos de solvente IEF-PCM e SMD combinados com modelos de raio UFF, Pauling e SMD-Coulomb, a 298,15 K, em **M06-2X/DGDZVP e M06-2X/LANL2DZ(d,p)**.

M06-2X		NEQ $\rightleftharpoons$ NEL				MAC $\rightleftharpoons$ MAF				
		IEF-PCM		SMD		IEF-PCM		SMD		
		$\Delta_r G^\circ_{Q-L}$ (kcal/mol)	$K_{Q-L}$ ( $10^4$ )	$\Delta_r G^\circ_{Q-L}$ (kcal/mol)	$K_{Q-L}$ ( $10^4$ )	$\Delta_r G^\circ_M$ (kcal/mol)	$K_M$ ( $10^4$ )	$\Delta_r G^\circ_M$ (kcal/mol)	$K_M$ ( $10^4$ )	
DGDZVP	ÁGUA	UFF	-5,533	1,137	-5,533	1,137	-9,849	1656,093	-9,849	1656,093
		Paul	-3,299	0,0262	-3,299	0,0262	-6,372	4,682	-6,372	4,682
		Coul	-	-	-4,906	0,394	-	-	-4,317	0,146
	VÁCUO	$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = -9,034$		$K_{Q-L} = 18,888 \times 10^4$		$\Delta_r G^\circ_M = -3,747$		$K_M = 0,0558 \times 10^4$		
LANL2DZ (d,p)	ÁGUA	UFF	-6,731	8,589	-6,887	11,164	-7,201	18,993	-7,368	25,167
		Paul.	-4,296	0,141	-4,412	0,171	-4,269	0,135	-3,604	0,044
		Coul.	-	-	-5,762	1,672	-	-	-2,163	0,0038
	VÁCUO	$\Delta_r G^\circ = -10,347$		$K_{Q-L} = 3840,095 \times 10^4$		$\Delta_r G^\circ = -12,099$		$K_{Q-L} = 73885,764 \times 10^4$		
<sup>a</sup> Exp. (ÁGUA)		$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = 0,78$		$K_{Q-L} = 0,27$		$\Delta_r G^\circ_M = 0,52$		$K_M = 0,41$		
<sup>b</sup> Exp.(DMSO)		$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = -1,01$		$K_{Q-L} = 5,51$		$\Delta_r G^\circ_M = -1,52$		$K_M = 12,89$		

<sup>a,b</sup>Valores experimentais a 303,15 K; <sup>b</sup>70% DMSO/água (v/v).

**Tabela 5.4.** Variação de energia livre padrão de reação ( $\Delta_r G^\circ$ ) e constante de equilíbrio de tautomerização ( $K_T$ ) da **Eritrosina no vácuo, em água e DMSO** obtidos com os modelos de solvente IEF-PCM e combinados com modelos de raio UFF, Pauling e SMD-Coulomb, a 298,15 K, em **B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p)**.

B3LYP		NEQ $\rightleftharpoons$ NEL				MAC $\rightleftharpoons$ MAF					
		IEF-PCM		SMD		IEF-PCM		SMD			
		$\Delta_r G^\circ_{Q-L}$ (kcal/mol)	$K_{Q-L}$	$\Delta_r G^\circ_{Q-L}$ (kcal/mol)	$K_{Q-L}$	$\Delta_r G^\circ_M$ (kcal/mol)	$K_M$ (10 <sup>4</sup> )	$\Delta_r G^\circ_M$ (kcal/mol)	$K_M$ (10 <sup>4</sup> )		
DGDZVP	ÁGUA	UFF	0,905	0,217	0,905	0,217	-10,016	2198,028	-10,016	2198,028	
		Paul.	3,422	0,0031	3,423	0,0031	-7,062	15,005	-7,0629	15,005	
		Coul.	-	-	1,822	0,046	-	-	-4,943	0,420	
	DMSO	UFF	0,714	0,300	0,712	0,301	-10,834	8734,296	-10,833	8718,584	
		Paul.	3,153	0,0049	3,153	0,0049	-7,927	64,584	-7,927	64,584	
		Coul.	-	-	-0,093	1,169	-	-	-11,544	28973,357	
	<b>VÁCUO</b>		$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = -3,420$		$K_{Q-L} = 321,205$		$\Delta_r G^\circ_M = -9,777$		$K_M = 1466,346 \times 10^4$		
	6-311++G(d,p)	ÁGUA	UFF	2,156	0,0263	2,157	0,0263	-8,302	121,683	-7,781	50,482
			Paul.	4,803	0,0003	4,803	0,0003	-5,669	1,428	-4,642	0,2528
Coul.			-	-	3,177	0,0047	-	-	-2,360	0,0054	
DMSO		UFF	1,827	0,0458	1,826	0,046	-8,300	121,207	-8,639	215,124	
		Paul.	-	-	4,391	0,0006	-	-	-6,043	2,687	
		Coul.	-	-	0,955	0,199	-	-	-9,211	564,866	
<b>VÁCUO</b>		$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = -1,8135$		$K_{Q-L} = 21,345$		$\Delta_r G^\circ_M = -12,387$		$K_M = 120131,4 \times 10^4$			
<sup>a</sup> Exp. (ÁGUA)		$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = 0,78$		$K_{Q-L} = 0,27$		$\Delta_r G^\circ_M = 0,52$		$K_M = 0,41$			
<sup>b</sup> Exp.(DMSO)		$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = -1,01$		$K_{Q-L} = 5,51$		$\Delta_r G^\circ_M = -1,52$		$K_M = 12,89$			

<sup>a,b</sup>Valores experimentais a 303,15 K; <sup>b</sup>70% DMSO/água (v/v).

Apesar da falha na descrição do equilíbrio das espécies monoaniônicas, os níveis de teoria B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p) descreveram adequadamente o equilíbrio das espécies neutras, diferentemente de M06-2X/DGDZVP e M06-2X/LANL2DZ(d,p). Isso levou à continuação do estudo das constantes de equilíbrio tautoméricas apenas com o consagrado funcional B3LYP.

Em relação às espécies neutras da ERI em DMSO apenas DGDZVP com SMD-Coulomb descreveu a tendência experimental com  $\Delta_r G^\circ_{Q-L} < 0$  e  $K_{Q-L} > 1$ , favorecendo NEL. Contudo, para as espécies monoaniônicas os dois níveis de teoria descreveram corretamente a tendência

experimental em todos os conjuntos de raios, cujos valores altos de  $K_M$  confirmaram o favorecimento de MAF em DMSO. Isso corrobora com o fenômeno de inversão de  $pK_a$  observado em altas proporções de DMSO, visto que a estabilização de MAF provoca a desprotonação no  $-OH$  fenólico ( $pK_{a1-OH}$ ). No vácuo ( $\xi = 0$ ), ambos os níveis de teoria mostraram o favorecimento de NEL e MAF. Este cálculo está de acordo com os resultados empíricos em altas proporções de DMSO e nos meios micelares de P-123 e CTAB, onde a  $\xi$  é menor que da água e ocorre inversão de  $pK_a$ .

Os níveis de teoria empregados mostraram que em um mesmo equilíbrio a utilização do modelo de solventes IEF-PCM ou SMD causa pouquíssimas variações dos resultados de  $K_T$  se o mesmo conjunto de raios for empregado. Por exemplo, o uso de B3LYP/DGDZVP com IEF-PCM/UFF leva a resultados similares aos de SMD/UFF. Isso provavelmente se deve à parametrização do SMD feita e recomendada principalmente para cálculos de  $\Delta G_{sol}$  (Marenich, 2009; Gaussian 09 User's Reference, 2013). Como no estudo de  $K_T$  o modelo SMD somente foi empregado para cálculos da energia eletrônica no solvente, houve pouca influência nos resultados. A diferença mais marcante entre SMD e IEF-PCM deve-se à parametrização do conjunto de raios de Coulomb, que é padrão do SMD e somente está disponível nele. Desta forma, para a ERI em DMSO e a EOS (Tabela 5.5) apenas o UFF foi avaliado com o IEF-PCM, enquanto para o modelo SMD empregou-se UFF, Pauling e SMD-Coulomb.

A Eosina (Tabela 5.5) em água mostrou que somente o conjunto de bases DGDZVP juntamente com o conjunto de raios UFF (com IEF-PCM ou SMD) descreveu o equilíbrio das espécies neutras deslocado levemente para NEL, com o valor de  $K_{Q-L}$  próximo ao valor empírico. O restante dos conjuntos de raio apontam NEQ como favorável, o que está de acordo com a proposição de Batistela *et al.* (2011) e com o dado experimental de  $\chi_{NEQ} = 0,45$  em água, reforçando a hipótese de um pré-equilíbrio  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  deslocando-se para a esquerda para ocorrer a inversão de  $pK_a$ . Dentre as espécies monoaniônicas, apesar da discrepância com o  $K_M$  empírico, os resultados apontam que MAF é amplamente favorecido em água. Tendências

semelhantes foram observadas com os dois níveis de teoria no vácuo, favorecendo NEL e MAF. Isso simula o comportamento experimental da EOS observado em micro-ambientes de baixa  $\xi$  tal como em P-123 e CTAB e onde a inversão de  $pK_a$  também existe (Estevão, 2012).

**Tabela 5.5.** Variação de energia livre padrão de reação ( $\Delta_r G^\circ$ ) e constante de equilíbrio de tautomerização ( $K_T$ ) da **Eosina no vácuo e em água** obtidos com os modelos de solvente IEF-PCM e SMD combinados com modelos de raio UFF, Pauling e SMD-Coulomb, a 298,15 K, em B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p).

B3LYP		NEQ $\rightleftharpoons$ NEL				MAC $\rightleftharpoons$ MAF				
		IEF-PCM		SMD		IEF-PCM		SMD		
		$\Delta_r G^\circ_{Q-L}$ (kcal/mol)	$K_{Q-L}$	$\Delta_r G^\circ_{Q-L}$ (kcal/mol)	$K_{Q-L}$	$\Delta_r G^\circ_M$ (kcal/mol)	$K_M$ ( $10^4$ )	$\Delta_r G^\circ_M$ (kcal/mol)	$K_M$ ( $10^4$ )	
<b>DGDZVP</b>	<b>ÁGUA</b>	UFF	-0,320	1,717	-0,322	1,721	-9,755	1415,077	-9,755	1412,682
		Paul.	-	-	2,030	0,033	-	-	-6,757	8,975
		Coul.	-	-	1,677	0,0590	-	-	-6,421	5,086
	<b>VÁCUO</b>	$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = -4,148$		$K_{Q-L} = 1097,313$		$\Delta_r G^\circ_M = -11,904$		$K_M = 53155,092 \times 10^4$		
<b>6-311++G (d,p)</b>	<b>ÁGUA</b>	UFF	0,957	0,199	0,955	0,199	-7,912	62,970	-7,913	63,076
		Paul.	-	-	3,420	0,0031	-	-	-5,193	0,6397
		Coul.	-	-	3,074	0,0056	-	-	-4,985	0,4501
	<b>VÁCUO</b>	$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = -2,692$		$K_{Q-L} = 94,025$		$\Delta_r G^\circ_M = -11,427$		$K_M = 23765,098 \times 10^4$		
<b><sup>a</sup>Exp. (ÁGUA)</b>		$\Delta_r G^\circ_{Q-L} = -0,13$		$K_{Q-L} = 1,24$		$\Delta_r G^\circ_M = 0,16$		$K_M = 0,77$		

<sup>a</sup>Valores experimentais a 303,15 K.

Apesar das falhas na descrição das espécies monoaniônicas da ERI em água, a análise dos equilíbrios tautoméricos da EOS e ERI indicou que o funcional B3LYP e conjunto de bases DGDZVP são mais eficientes para descrever as espécies neutras, principalmente com o conjunto de raios UFF e SMD-Coulomb. O nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) também teve alguns destaques mas, em geral, várias discrepâncias foram observadas. Cálculos de  $K_T$  considerando o modelo implícito-explícito de solvente (com três moléculas explícitas de água ao redor do soluto) não tiveram sucesso. Apesar de manter as tendências de deslocamento de equilíbrio do modelo implícito, a adição explícita de água aumentou o erro numérico. Desta forma, os resultados teóricos de  $K_T$  não permitiram eleger um nível de teoria mais adequado para o sistema.

Sendo assim, os estudos de  $pK_a$  na sequencia também foram feitos com análise comparativa entre funcionais, conjuntos de funções de base, modelos de solventes e conjuntos de raios.

## 5.3 Estudo de pK<sub>a</sub> por Métodos de Química Computacional

### 5.3.1 pK<sub>a</sub> da ERI e ERIMET em água e testes de diferentes níveis de teoria

Os resultados de pK<sub>a</sub> para a ERI e ERIMET em água obtidos com os níveis de teoria B3LYP/DGDZVP, B3LYP/6-311++G(d,p), M06-2X/DGDZVP e M06-2X/LANL2DZ(d,p) juntamente com os modelos implícitos de solvatação IEF-PCM e SMD e os raios de vdW UFF, Pauling e SMD-Coulomb são apresentados nas tabelas 5.6 e 5.7. Para avaliar o comportamento experimental da ERI em água dois equilíbrios protolíticos foram analisados com destaque:  $\text{NEQ} \rightleftharpoons \text{MAC} + \text{H}^+$  (pK<sub>a1-COOH</sub>) e  $\text{MAC} \rightleftharpoons \text{DA} + \text{H}^+$  (pK<sub>a2-OH</sub>), apresentados em negrito nas tabelas (o H<sup>+</sup> foi omitido para maior praticidade). A passagem preferencial pela forma MAC é necessária para não ocorrer a inversão de pK<sub>a</sub>. Esta afirmação é sustentada pelos valores experimentais de *K<sub>M</sub>*, que favorecem a forma carboxilato em água. Além disso, lembrando que a **não** inversão de pK<sub>a</sub> significa pK<sub>a1-COOH</sub> < pK<sub>a2-OH</sub>, a única possibilidade do pK<sub>a1</sub> ser referente ao grupo -COOH é se MAC for o intermediário no equilíbrio protolítico  $\text{NEQ} \rightleftharpoons \text{MAC} \rightleftharpoons \text{DA}$ .

Na Tabela 5.6 observa-se que o comportamento experimental com valores de pK<sub>a1-COOH</sub> < pK<sub>a2-OH</sub> para os equilíbrios em negrito na tabela foram descritos corretamente apenas quando utilizado o conjunto de raios SMD-Coulomb, em ambos os conjuntos de base. Com os raios UFF e Pauling tanto B3LYP/DGDZVP quanto B3LYP/6-311++G(d,p) não reproduziram o comportamento experimental. Observa-se um comportamento semelhante na Tabela 5.7, porém o nível de teoria M06-2X/DGDZVP forneceu valores de pK<sub>a1-COOH</sub> < pK<sub>a2-OH</sub> em todos os conjuntos de raios, inclusive em UFF e Pauling. Entretanto o funcional M06-2X torna os resultados numéricos muito discrepantes: enquanto B3LYP/DGDZVP com SMD-Coulomb fornece resultados com erros menores que uma unidade de pK<sub>a</sub>, em M06-2X/DGDZVP os valores de pK<sub>a1-COOH</sub> são subestimados em ~8 unidades de pK<sub>a</sub> (negativos, inclusive) e de pK<sub>a2-OH</sub> superestimados em ~2,5 unidades. O teste feito com M06-2X/LANL2DZ(d,p) e SMD-Coulomb também forneceu ótimos resultados, com erros menores que uma unidade de pK<sub>a</sub>. No entanto, apesar de *double-zeta*, o conjunto de base LANL2DZDP teve tempo de máquina oito

vezes maior que DGDZVP e, também, superior ao 6-311++G(d,p), tornando inviável sua utilização em todos os estudos do sistema.

**Tabela 5.6.** Valores de  $pK_a$  para possíveis equilíbrios protolíticos entre diferentes tautômeros da **ERI** e **ERIMET em água** obtidos com os modelos de solvente IEF-PCM e SMD combinados com modelos de raio UFF, Pauling e SMD-Coulomb, a 298,15 K, em **B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p)**.

B3LYP	ERI	Grupo Prot.	IEF-PCM		SMD			
			UFF	Paul.	UFF	Paul.	Coul.	
DGDZVP		MET-NE $\rightleftharpoons$ MET-MA	OH	-2,29	-0,91	-0,89	0,48	1,86
	$pK_{a1}$	NEQ $\rightleftharpoons$ MAC	COOH	<b>3,84</b>	<b>3,11</b>	<b>3,86</b>	<b>3,07</b>	<b>2,95</b>
		NEQ $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-1,63	-0,24	-1,59	-0,21	1,22
		NEL $\rightleftharpoons$ MAC	OH	4,30	1,55	4,54	1,89	2,95
	$pK_{a2}$	NEL $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-1,17	-1,80	-0,92	-1,39	1,22
		MAC $\rightleftharpoons$ DA	OH	<b>1,31</b>	<b>1,53</b>	<b>1,39</b>	<b>1,55</b>	<b>3,06</b>
		MAF $\rightleftharpoons$ DA	COOH	6,78	4,89	6,84	4,82	4,79
6-311++G(d,p)		MET-NE $\rightleftharpoons$ MET-MA	OH	0,20	1,51	0,21	1,50	2,88
	$pK_{a1}$	NEQ $\rightleftharpoons$ MAC	COOH	<b>4,90</b>	<b>4,32</b>	<b>4,97</b>	<b>4,34</b>	<b>4,17</b>
		NEQ $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-0,19	1,09	0,60	2,27	3,78
		NEL $\rightleftharpoons$ MAC	OH	4,26	1,60	4,50	1,93	2,95
	$pK_{a2}$	NEL $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-0,83	-1,64	0,14	-0,14	2,56
		MAC $\rightleftharpoons$ DA	OH	<b>2,50</b>	<b>2,85</b>	<b>2,55</b>	<b>2,86</b>	<b>4,36</b>
		MAF $\rightleftharpoons$ DA	COOH	7,59	6,09	6,92	4,93	4,76
<sup>a</sup> Exp.	ERI	$pK_{a1-COOH}=2,35 \pm 0,09$			$pK_{a2-OH}=3,79 \pm 0,08$			
	ERIMET	$pK_{a1-OH}=3,74 \pm 0,07$						

<sup>a</sup>Valores experimentais a 303,15 K (Pellosi, 2012).

Em relação aos modelos de solvatação, a boa descrição do SMD-Coulomb em detrimento dos outros conjuntos de raios deve estar ligada à ampla parametrização deste modelo, inclusive com o funcional B3LYP (Marenich *et al.*, 2009). Além disso, o fato de o SMD considerar a contribuição eletrostática tanto do *bulk* da solução quanto da primeira camada de solvatação nos cálculos de  $\Delta G_{sol}$  coopera para os melhores resultados de  $pK_a$ .

Tal como observado nos estudos dos equilíbrios tautoméricos, os raios de Coulomb parecem ser o principal fator do bom desempenho do SMD, visto que seus resultados com UFF e Pauling tiveram pouquíssimas melhorias em relação ao IEF-PCM. Apesar dos resultados entre

IEF-PCM e SMD serem parecidos em um mesmo conjunto de raios, a comparação entre estes modelos de solvatação mostra diferenças mais significativas nos resultados de  $pK_a$  do que as ocorridas nos cálculos de  $K_T$ . Isso se deve aos bons resultados que o modelo SMD proporciona principalmente aos  $\Delta G_{sol}$ , que são necessários para os cálculos de  $pK_a$  mas não para os cálculos de  $K_T$ . Diferenças mais significativas ocorrem em DMSO (Tabela 5.8). Mesmo assim as tendências continuam sendo as mesmas observadas em SMD-Coulomb e de acordo com os resultados empíricos. Assim tornou-se irrelevante continuar os estudos com o modelo IEF-PCM em todos os casos e optou-se por utilizá-lo somente em parte do estudo com a ERI em DMSO e com a EOS.

**Tabela 5.7.** Valores de  $pK_a$  para possíveis equilíbrios protolíticos entre diferentes tautômeros da ERI em água obtidos com os modelos de solvente IEF-PCM e SMD combinados com modelos de raio UFF, Pauling e SMD-Coulomb, a 298,15 K, em M06-2X/DGDZVP e M06-2X/LANL2DZ(d,p).

M06-2X	ERI	Grupo Prot.	IEF-PCM		SMD			
			UFF	Paul.	UFF	Paul.	Coul.	
DGDZVP	$pK_{a1}$	NEQ $\rightleftharpoons$ MAC	COOH	<b>-5,26</b>	<b>-6,58</b>	<b>-5,18</b>	<b>-6,50</b>	<b>-6,61</b>
		NEQ $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-3,56	-2,42	-3,49	-2,26	-0,86
		NEL $\rightleftharpoons$ MAC	OH	-0,62	-3,71	-0,72	-3,68	-2,61
		NEL $\rightleftharpoons$ MAF	OH	1,07	0,44	0,97	0,56	3,14
	$pK_{a2}$	MAC $\rightleftharpoons$ DA	OH	<b>6,01</b>	<b>6,42</b>	<b>6,05</b>	<b>6,40</b>	<b>7,91</b>
		MAF $\rightleftharpoons$ DA	COOH	4,31	2,26	4,36	2,17	2,17
LANL2DZ(d,p)	$pK_{a1}$	NEQ $\rightleftharpoons$ MAC	COOH	<b>3,82</b>	<b>2,59</b>	<b>3,23</b>	<b>1,13</b>	<b>2,60</b>
		NEQ $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-0,48	0,16	-0,69	-0,02	1,84
		NEL $\rightleftharpoons$ MAC	OH	9,26	6,20	8,04	4,13	7,19
		NEL $\rightleftharpoons$ MAF	OH	4,97	3,77	4,12	2,97	6,42
	$pK_{a2}$	MAC $\rightleftharpoons$ DA	OH	<b>1,44</b>	<b>1,25</b>	<b>-0,38</b>	<b>-0,32</b>	<b>2,97</b>
		MAF $\rightleftharpoons$ DA	COOH	5,73	3,67	3,54	0,83	3,74
<sup>a</sup> Exp.	ERI	$pK_{a1-COOH}=2,35 \pm 0,09$			$pK_{a2-OH}=3,79 \pm 0,08$			

<sup>a</sup>Valores experimentais a 303,15 K (Pellosi, 2012).

Considerando os grandes erros de  $pK_a$  do nível de teoria M06-2X/DGDZVP e sua descrição ruim dos equilíbrios tautoméricos e que, apesar dos bons valores de  $pK_a$ , o M06-2X/LANL2DZ(d,p) com SMD-Coulomb demandou muito tempo de máquina e não descreveu



adequadamente os equilíbrios tautoméricos, estes dois níveis de teoria foram abandonados para o restante dos estudos. Tanto B3LYP/DGDZVP quanto B3LYP/6-311++G(d,p) descreveram corretamente os equilíbrios tautoméricos das espécies neutras e os valores de  $pK_a$  com SMD-Coulomb, portanto, ambos foram mantidos nos estudos subsequentes.

### 5.3.2 $pK_a$ da ERI e ERIMET em DMSO e vácuo

Para a ERI em DMSO (Tabela 5.8) o comportamento experimental proposto com os equilíbrios protolíticos  $NEL \rightleftharpoons MAF + H^+$  ( $pK_{a1-OH}$ ) e  $MAF \rightleftharpoons DA + H^+$  ( $pK_{a2-COOH}$ ), apresentando inversão de  $pK_a$ , foi descrito adequadamente tanto por B3LYP/DGDZVP quanto por B3LYP/6-311++G(d,p) (destaques em negrito na tabela) utilizando os modelos implícitos de solvatação. Adicionalmente, se por acaso MAC fosse a espécie monoaniônica predominante, teríamos que considerar os equilíbrios  $NEQ \rightleftharpoons MAC$  ou  $NEL \rightleftharpoons MAC$  (ambos referentes à desprotonação da espécie neutra,  $pK_{a1}$ ); no entanto esses teriam valores de  $pK_a$  maiores que  $MAC \rightleftharpoons DA$  (desprotonação da espécie monoaniônica,  $pK_{a2}$ ). Então nessa hipótese  $pK_{a1} > pK_{a2}$ , o que é incongruente, confirmando que em DMSO a espécie monoaniônica não pode ser MAC e sim MAF.

Observa-se ainda que os resultados de  $NEQ \rightleftharpoons MAF$  também podem representar  $pK_{a1-OH}$ . Isso reforça a hipótese de um pré-equilíbrio tautomérico  $NEQ \rightleftharpoons NEL$ , sendo que ambas as espécies podem contribuir para a formação de MAF ou o pré-equilíbrio pode ser deslocado para a esquerda com o aumento do pH. Apesar de todos os modelos de raio terem descrito corretamente a tendência observada em DMSO, o modelo SMD-Coulomb se destacou por sempre apresentar valores positivos e resultados de  $pK_{a1-OH}$  próximos aos experimentais, reforçando a maior confiança no modelo.

Atendo-se aos resultados obtidos com 6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb para os equilíbrios protolíticos em negrito da Tabela 5.6 e 5.8, observa-se a seguinte variação de  $pK_a$  ao passar da água para DMSO ( $\Delta pK_a = pK_{a-DMSO} - pK_{a-água}$ ):  $\Delta pK_{a-COOH} = 7,23$  e  $\Delta pK_{a-OH} = -1,48$ , enquanto os valores experimentais em relação a 70% DMSO são  $\Delta pK_{a-COOH} = 3,58$  e  $\Delta pK_{a-OH} =$

0,79 (Pellosi, 2012). Estes valores evidenciam uma maior sensibilidade do grupo –COOH com a variação da polaridade do meio, visto que sofre grande variação nos valores de pK<sub>a</sub> ao comparar um meio de alta  $\xi$  (água) com outro de  $\xi$  menor. Já o grupo –OH mostra-se menos sensível, sendo que uma grande variação de  $\xi$  causa pequenas variações de pK<sub>a</sub>. É importante destacar que, apesar dos erros de até 3,65 un. de pK<sub>a</sub>, os valores de  $\Delta pK_a$  foram bem reproduzidos pelo modelo teórico. A reprodução exata de valores experimentais tão pequenos como o  $\Delta pK_{a-OH}=0,79$  ainda é um desafio para os funcionais da DFT, especialmente para moléculas tão grandes como os Xantenos (Król *et al.*, 2006; Ho e Coote, 2010).

**Tabela 5.8.** Valores de pK<sub>a</sub> para possíveis equilíbrios protolíticos entre diferentes tautômeros da ERI e ERIMET em DMSO e vácuo obtidos com os modelos de solvente IEF-PCM e SMD combinados com modelos de raio UFF, Pauling e SMD-Coulomb, a 298,15 K, em B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p).

B3LYP	ERI	Grupo Prot.	IEF-PCM		SMD			VÁCUO		
			UFF	Paul.	UFF	Paul.	Coul.			
DGDZVP	pK <sub>a1</sub>	MET-NE $\rightleftharpoons$ MET-MA	OH	-3,34	-1,62	-3,32	-1,59	1,18	294,27	
		NEQ $\rightleftharpoons$ MAC	COOH	12,01	1,48	2,25	1,50	7,31	307,16	
		NEQ $\rightleftharpoons$ MAF	OH	6,41	-1,99	-3,32	-1,94	1,23	294,65	
		NEL $\rightleftharpoons$ MAC	OH	2,71	0,05	2,92	0,37	8,56	310,58	
		NEL $\rightleftharpoons$ MAF	OH	<b>-2,89</b>	<b>3,43</b>	<b>-2,66</b>	<b>-3,07</b>	<b>2,48</b>	<b>298,08</b>	
	pK <sub>a2</sub>	MAC $\rightleftharpoons$ DA	OH	-0,14	0,09	-0,05	0,09	4,54	349,21	
		MAF $\rightleftharpoons$ DA	COOH	<b>5,46</b>	<b>3,56</b>	<b>5,52</b>	<b>3,53</b>	<b>10,62</b>	<b>361,71</b>	
	6-311++G(d,p)	pK <sub>a1</sub>	MET-NE $\rightleftharpoons$ MET-MA	OH	-	-	-1,50	-0,21	3,10	297,83
			NEQ $\rightleftharpoons$ MAC	COOH	-	-	3,36	2,75	8,36	309,14
			NEQ $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-	-	-1,88	-0,59	2,70	296,75
NEL $\rightleftharpoons$ MAC			OH	-	-	2,89	0,41	8,54	311,18	
NEL $\rightleftharpoons$ MAF			OH	-	-	<b>-2,35</b>	<b>-2,94</b>	<b>2,88</b>	<b>298,80</b>	
pK <sub>a2</sub>		MAC $\rightleftharpoons$ DA	OH	-	-	1,11	1,42	5,73	350,48	
		MAF $\rightleftharpoons$ DA	COOH	-	-	<b>6,35</b>	<b>4,76</b>	<b>11,40</b>	<b>362,87</b>	
<sup>a</sup> Exp.	ERI	pK <sub>a1-OH</sub> =4,58 ± 0,10			pK <sub>a2-COOH</sub> =5,93 ± 0,08					
	ERIMET	pK <sub>a1-OH</sub> =4,64 ± 0,03								

<sup>a</sup>Valores experimentais em 70% de DMSO/água a 303,15 K (Pellosi, 2012).

No vácuo nota-se um grande aumento de  $pK_a$  em relação aos estados solvatados para todos os equilíbrios da ERI e ERIMET (Tabela 5.8) e, também, da EOS e EOSMET (Tabela 5.9). Essa tendência é similar ao  $pK_a$  da ERI em 70% DMSO ser maior que em água, tanto experimental (Pellosi, 2012) quanto teórico. A alta  $\xi$  da água torna o processo de desprotonação energeticamente favorável, levando a baixos valores de  $pK_a$ . Em meios de baixa  $\xi$  a estabilização de espécies iônicas é pouco favorecida, fazendo com que a acidez das espécies diminua ( $pK_a$ s altos) (Safarik e Stránský, 1986), sendo que no vácuo ( $\xi=0$ ) potencializa-se este efeito, aumentando drasticamente os  $pK_a$ . Estes resultados reforçam a confiabilidade dos dados.

Os cálculos de  $pK_a$  para os derivados EOSMET (Tabela 5.9) e ERIMET (Tabela 5.6 e 5.8) em água e DMSO apresentaram resultados mais próximos aos valores empíricos em B3LYP/6-311++G(d,p) do que em B3LYP/DGDZVP. Aliás, este nível de teoria mostrou bons resultados de  $pK_a$  em todos os casos, descrevendo tendências de equilíbrios corretamente e, em geral, valores de  $pK_a$  ligeiramente mais próximos dos experimentais do que DGDZVP. Apesar de não ter sido imperativo no estudo das constantes de tautomerização, a adição de funções difusas (++) e de polarização (d,p) deve ter colaborado para o bom desempenho do conjunto de base 6-311G nos cálculos de  $pK_a$ . Como neste caso a boa descrição dos Hidrogênios é fundamental, a adição de funções de polarização p e difusa + para estes átomos auxilia na descrição do comportamento dos grupos protolíticos.

### 5.3.3 $pK_a$ da EOS e EOSMET em água e vácuo

A análise do comportamento experimental da EOS feita por métodos de química computacional baseou-se principalmente nos equilíbrios protolíticos:  $NEQ \rightleftharpoons MAF + H^+$  ( $pK_{a1-OH}$ ) e  $MAF \rightleftharpoons DA + H^+$  ( $pK_{a2-COOH}$ ), os mesmos verificados nos resultados experimentais onde há inversão de  $pK_a$  (em negrito na Tabela 5.9). Tal como ocorre para a ERI em DMSO, a passagem pela forma monoaniônica MAF é necessária para garantir essa inversão de  $pK_a$  observada experimentalmente. Os resultados teóricos de  $pK_a$  mostram que a condição de  $pK_{a1-OH}$

<  $pK_{a2-COOH}$  foi reproduzida pelo B3LYP em ambos os conjuntos de base (DGDZVP e 6-311++G(d,p)) em todos os modelos implícitos de solvente e conjuntos de raios empregados para os equilíbrios destacados, tanto em água quanto em vácuo. Desta forma, os equilíbrios propostos se mantêm tanto em meios de alta quanto de baixa constante dielétrica.

**Tabela 5.9.** Valores de  $pK_a$  para possíveis equilíbrios protolíticos entre diferentes tautômeros da **EOS** e **EOSMET** em água e vácuo obtidos com os modelos de solvente IEF-PCM e SMD combinados com modelos de raio UFF, Pauling e SMD-Coulomb, a 298,15 K, em B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p).

B3LYP	EOS	Grupo Prot.	SMD			VÁCUO			
			UFF	Paul.	Coul.				
DGDZVP		MET-NE $\rightleftharpoons$ MET-MA	OH	-2,31	-1,32	-1,06	296,59		
	$pK_{a1}$		NEQ $\rightleftharpoons$ MAC	COOH	4,72	3,99	3,69	308,44	
			<b>NEQ<math>\rightleftharpoons</math>MAF</b>	<b>OH</b>	<b>-1,25</b>	<b>0,23</b>	<b>0,16</b>	<b>296,54</b>	
			NEL $\rightleftharpoons$ MAC	OH	5,25	2,80	2,76	312,60	
			NEL $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-0,71	-0,96	-0,77	300,69	
		$pK_{a2}$		MAC $\rightleftharpoons$ DA	OH	0,96	1,42	1,42	351,04
			<b>MAF<math>\rightleftharpoons</math>DA</b>	<b>COOH</b>	<b>6,92</b>	<b>4,92</b>	<b>4,95</b>	<b>362,95</b>	
	6-311++G(d,p)		MET-NE $\rightleftharpoons$ MET-MA	OH	0,69	2,02	1,85	299,68	
		$pK_{a1}$		NEQ $\rightleftharpoons$ MAC	COOH	5,49	4,93	4,52	309,77
				<b>NEQ<math>\rightleftharpoons</math>MAF</b>	<b>OH</b>	<b>0,13</b>	<b>1,57</b>	<b>1,31</b>	<b>298,34</b>
			NEL $\rightleftharpoons$ MAC	OH	4,81	2,45	2,29	312,46	
			NEL $\rightleftharpoons$ MAF	OH	-0,54	-0,91	-0,92	301,03	
$pK_{a2}$				MAC $\rightleftharpoons$ DA	OH	2,47	2,87	2,90	352,32
			<b>MAF<math>\rightleftharpoons</math>DA</b>	<b>COOH</b>	<b>7,83</b>	<b>6,23</b>	<b>6,11</b>	<b>363,75</b>	
<sup>a</sup> Exp.		EOS	$pK_{a1-OH}=2,02 \pm 0,05$			$pK_{a2-COOH}=3,80 \pm 0,06$			
		EOSMET	$pK_{a1-OH}=2,11 \pm 0,03$						

<sup>a</sup>Valores experimentais a 303,15 K (Estevão, 2012).

Se acaso MAC fosse a espécie monoaniônica predominante, ter-se-iam os equilíbrios NEQ $\rightleftharpoons$ MAC ou NEL $\rightleftharpoons$ MAC ( $pK_{a1}$ ) com valores de  $pK_a$  maiores do que MAC $\rightleftharpoons$ DA ( $pK_{a2}$ ), situação equivocada uma vez que o correto é  $pK_{a1-OH} < pK_{a2-COOH}$ . Portanto, a espécie monoaniônica MAF da EOS existe em detrimento da MAC tanto em água quanto no vácuo. Semelhante ao que ocorre com a ERI em DMSO (mas não em água pura), observa-se para a EOS

que além de  $\text{NEQ} \rightleftharpoons \text{MAF}$  o equilíbrio  $\text{NEL} \rightleftharpoons \text{MAF}$  também fornece resultados de  $\text{pK}_{\text{a1-OH}} < \text{pK}_{\text{a2-COOH}}$  (inversão de  $\text{pK}_{\text{a}}$ ), sendo que no último caso, adicionalmente, considera-se a hipótese do pré-equilíbrio tautomérico  $\text{NEQ} \rightleftharpoons \text{NEL}$  para a esquerda ou a passagem por MAC (transferência de próton) precedendo a formação de MAF.

Comparando cada equilíbrio protolítico referente ao grupo  $-\text{OH}$  da EOS com os mesmos equilíbrios da ERI em água observa-se que os valores de  $\text{pK}_{\text{a-OH}}$  da EOS são menores que da ERI, tal como os resultados experimentais (Estevão, 2012; Pellosi, 2012). O mesmo ocorre ao comparar os derivados metil-ésteres em água. Destaca-se que este fato experimental, anteriormente relatado (Mchedlov-Petrosyan e Kleshchevnikova, 2004; Mchedlov-Petrosyan *et al.*, 2006; Batistela *et al.*, 2011), foi reproduzido fidedignamente pelos resultados computacionais de  $\text{pK}_{\text{a-OH}}$ . A diferença entre ERI e EOS é causada pelos halogênios; a maior eletronegatividade do Bromo comparado ao Iodo (Brown *et al.*, 2005; *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 2007-2008) causa maior acidez dos  $-\text{OH}$  da EOS. O efeito contribui também para a inversão de  $\text{pK}_{\text{a}}$ .

#### **5.3.4 $\text{pK}_{\text{a}}$ da ERI e EOS através do modelo implícito-explícito**

Todos os resultados de  $\text{pK}_{\text{a}}$  mostrados até aqui foram obtidos com a resolução do ciclo termodinâmico simples (Figura 4.1) considerando apenas o modelo implícito de solvatação. Na tentativa de melhorar esses resultados, foi testado também o ciclo termodinâmico implícito-explícito da Figura 4.2, adicionando três moléculas de água para a espécie protolítica desprotonada de cada equilíbrio considerado. Todos os cálculos do modelo implícito-explícito foram feitos com o nível de teoria B3LYP/DGDZVP (inclusive para as águas explícitas de solvatação) e o modelo implícito SMD-Coulomb.

Comparativamente ao modelo implícito, o modelo implícito-explícito para o equilíbrio  $\text{NEQ} \rightleftharpoons \text{MAC}$  da ERI em água resultou num valor ruim de  $\text{pK}_{\text{a1-COOH}} = 6,60$ . Porém, o valor de  $\text{pK}_{\text{a2-OH}} = 4,42$  foi muito bom, tal como o obtido com o modelo implícito em SMD-Coulomb (Tabela 5.6). Para a EOS em água o resultado de  $\text{pK}_{\text{a1-OH}} = -45,57$  para o equilíbrio  $\text{NEQ} \rightleftharpoons$

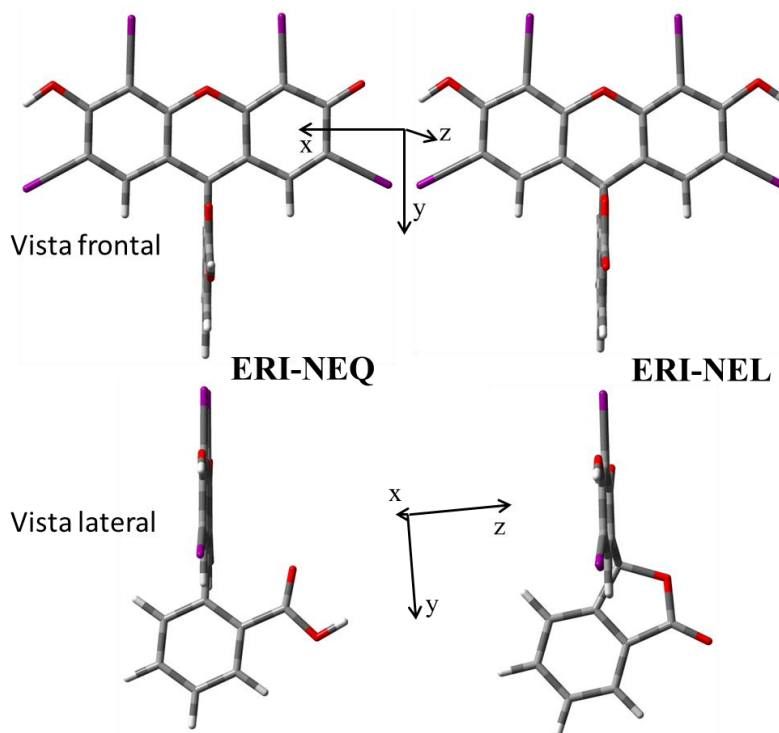
MAF foi extremamente ruim. No entanto, para o equilíbrio  $\text{MAF} \rightleftharpoons \text{DA}$  obteve-se  $\text{pK}_{\text{a}2\text{-COOH}} = 4,43$ , valor muito melhor do que o fornecido pelo modelo implícito em SMD-Coulomb (Tabela 5.9).

Apesar de melhorar alguns valores de  $\text{pK}_{\text{a}}$ , outros tornaram-se piores e os testes com o modelo implícito-explícito de solvatação não permitiram nenhuma conclusão a respeito. No entanto, os estudos com este modelo ainda são preliminares e necessitam refinamentos na metodologia de cálculo para a obtenção de resultados mais adequados.

## 5.4 Análise Estrutural e Comportamento Eletrostático

### 5.4.1. Otimização das estruturas

As estruturas otimizadas de NEQ e NEL da ERI são mostradas na Figura 5.1, sendo idênticas às da EOS. Dentre todas as espécies, exceto NEL, o ângulo diedral médio entre a parte xantênica e o anel benzênico (C13-C9-C1'-C2', Esquema 1.1) foi  $\sim 91^\circ$ , enquanto entre o grupo carboxílico e o anel benzênico (C1'-C2'-C7'-O8') foi  $\sim 1^\circ$ , tanto para ERI quanto EOS. Os dois níveis de teoria avaliados (B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p)) forneceram conformações idênticas, cujos valores dos ângulos diedrais concordam com a literatura (Jang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Batistela *et al.*, 2010; Slyusareva *et al.*, 2012). Os valores individuais dos ângulos diedrais para cada espécie encontram-se na Tabela 5.10 e os planos cartesianos das espécies otimizadas são apresentadas no Anexo 8.4, Tabela 8.4. Diferenças significativas em relação às outras espécies foram observadas em NEL, com ângulos C13-C9-C1'-C2' de  $\sim 115^\circ$ . Isso se deve à formação do anel lactona, que desloca o anel benzênico em relação à parte xantênica (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Vista frontal e lateral dos tautômeros NEQ e NEL da Eritrosina otimizados com B3LYP/DGDZVP e IEF-PCM/UFF em água.

**Tabela 5.10.** Ângulos diedrais entre os átomos C13-C9-C1'-C2' e C1'-C2'-C7'-O8' para as espécies da ERI e EOS obtidos com B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p) em água com o modelo de solventes IEF-PCM/UFF, a 298,15 K.

		Ângulo Diedral (°)			
		ERI		EOS	
		C13-C9-C1'-C2'	C1'-C2'-C7'-O8'	C13-C9-C1'-C2'	C1'-C2'-C7'-O8'
<b>B3LYP/ DGDZVP</b>	NEQ	-88,45	2,09	-88,47	1,90
	NEL	-115,37	0,00	-115,60	0,00
	MAC	-91,17	1,38	-91,26	1,49
	MAF	-92,38	0,00	-92,43	0,00
	DA	-94,49	0,00	-94,49	0,00
	MET-NE	-89,33	2,56	-89,39	2,64
	MET-MA	-92,59	-0,02	-92,83	0,32
<b>B3LYP/ 6-311++G(d,p)</b>	NEQ	-87,62	1,48	-87,56	0,97
	NEL	-115,13	0,04	-115,38	0,00
	MAC	-90,20	1,38	-90,43	1,58
	MAF	-90,82	-1,92	-90,71	-2,24
	DA	-94,20	0,00	-94,27	-0,01
	MET-NE	-88,50	1,64	-88,81	2,02
	MET-MA	-91,17	-2,27	-91,28	-2,05

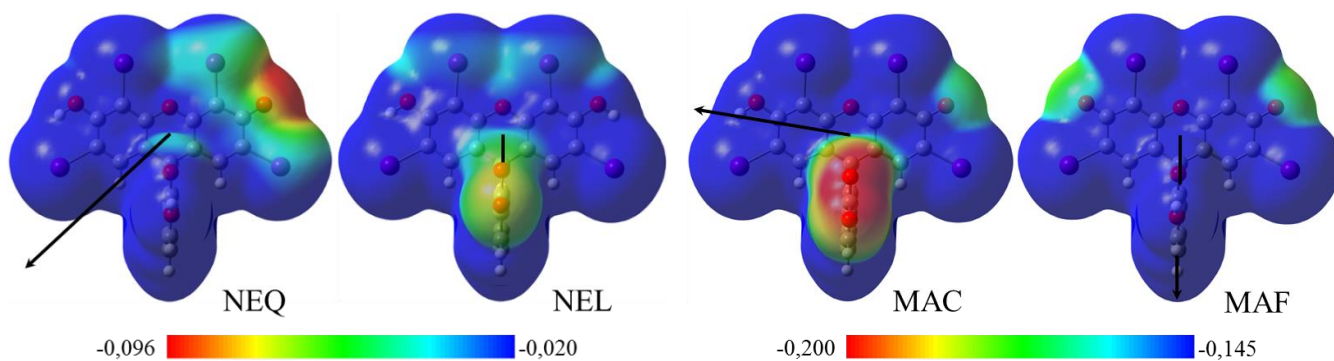
#### 5.4.2. Análise eletrostática

As análises eletrostáticas (e, posteriormente, orbitales) que necessitam dos arquivos *checkpoint* (.chk) foram feitas com os resultados obtidos pelo conjunto de bases *Double Zeta* DGDZVP. Estes, além de serem mais leves em relação ao 6-311G e facilitarem a geração e manipulação dos Mapas de Potencial Eletrostático (MEP), também são adequados por terem descrito corretamente grande parte dos equilíbrios tautoméricos e  $pK_a$ s. Os MEP para os tautômeros neutros NEQ e NEL e monoaniônicos MAC e MAF em água são mostrados na Figura 5.2 para a ERI e Figura 5.3 para a EOS. Os momentos de dipolo de cada espécie no vácuo, em água e DMSO são apresentadas na Tabela 5.11, obtidas com B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb.

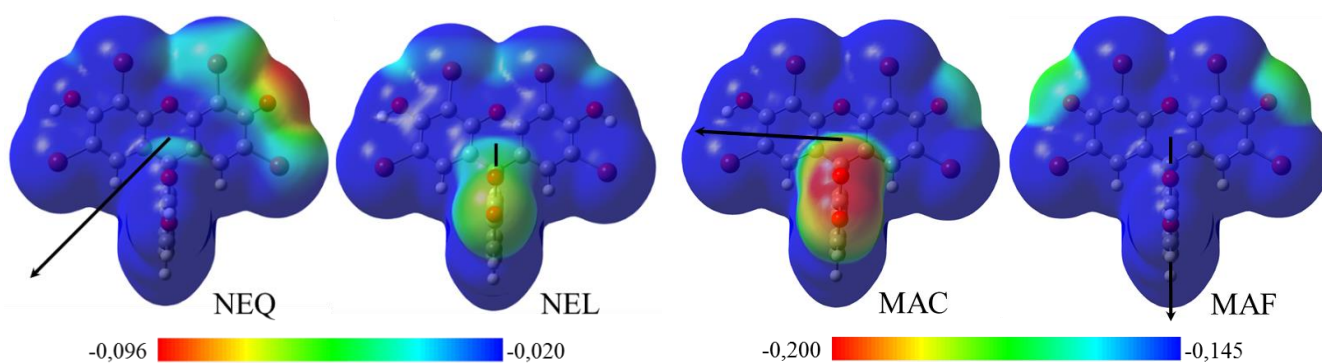
Nas Figuras 5.2 e 5.3 a comparação dos MEP de NEQ e NEL da ERI e da EOS gerados na mesma faixa de cargas mostra a ocorrência de uma região mais negativa (vermelha) em NEQ do que em NEL. Mesmo a parte mais eletronegativa de NEL não adquire cargas tão negativas



quanto às de NEQ. Isso além de tornar o momento de dipolo ( $\mu$ ) de NEQ  $>$  NEL (Tabela 5.11) também altera a direção do seu vetor, que em NEL passa a ter valor nulo no eixo x e uma grande contribuição do eixo z (apontando para trás da figura). Este efeito, tanto para ERI quanto para EOS, deixa evidente a estabilização preferencial de NEL em meios de baixa  $\xi$  e de NEQ em água. Isso justifica o resultado experimental de  $\chi_{NEL} > \chi_{NEQ}$  ( $K_{Q-L} > 1$ ) em misturas DMSO/água e meios micelares.



**Figura 5.2** Mapas de Potencial Eletrostático dos tautômeros neutros e monoaniônicos da ERI obtidos com B3LYP/DGDZVP e SMD-Coulomb em água e isovalor de densidade de  $0,0004 \text{ e}/\text{\AA}^3$ , a 298,15 K. As setas representam metade do tamanho do vetor momento de dipolo ( $\mu$ ) e apontam para o polo positivo.



**Figura 5.3.** Mapas de Potencial Eletrostático dos tautômeros neutros e monoaniônicos da EOS obtidos com B3LYP/DGDZVP e SMD-Coulomb em água e isovalor de densidade de  $0,0004 \text{ e}/\text{\AA}^3$ , a 298,15 K. As setas representam metade do tamanho do vetor momento de dipolo ( $\mu$ ) e apontam para o polo positivo.

Analisando os MEP das formas MAC e MAF gerados na mesma faixa de cargas, observa-se que MAC tem uma grande concentração de cargas negativas no grupo carboxílico, a qual é mais negativa do que qualquer região de MAF. Além disso,  $\mu_{MAC} > \mu_{MAF}$  sendo que enquanto ocorre grande contribuição dos eixos x e z em  $\mu_{MAC}$ , para  $\mu_{MAF}$  o vetor é quase paralelo

ao eixo y (Tabela 5.11, Figura 5.1). Sabendo que o vetor momento dipolar  $\mu$  aponta para o polo positivo, nas Figuras 5.2 e 5.3 vemos que a direção tomada em MAC (apontando para a esquerda) deve-se à grande concentração de cargas negativas no grupo carboxilato e à região menos negativa sobre o O16, à direita. Ou seja, ocorre uma distribuição de cargas assimétrica localizada principalmente no lado direito, o que justifica a orientação de  $\mu$ . Para MAF, cargas similares localizam-se sobre O15 (esquerda) e O16 (direta), tornando a distribuição de cargas mais simétrica do que MAC e fazendo  $\mu$  apontar para baixo. Portanto, esses fatores cooperam para a maior estabilização de MAC da ERI em água e por MAF em 70% DMSO.

Outros autores que observaram tais efeitos (Pellosi, 2012; Batistela *et al.*, 2011; Mchedlov-Petrossyan *et al.*, 2003 e 2006) discutem que a grande distribuição (ou diluição) da carga negativa de MAF na parte xantênica o faz mais estável em solventes pouco polares. Por outro lado, MAC concentra mais carga no grupo carboxilato e interage melhor com a água, não só por causa da maior  $\xi$ , mas também porque provavelmente ocorre maior contribuição das ligações hidrogênio no grupo carboxilato do que seria no fenolato (Bates, 1964; Mukerjee e Ostrow, 1998).

A existência de ligações hidrogênio depende do solvente em questão e sua capacidade de estabelecer este tipo de interação, favorecendo MAC ou MAF. No entanto o modelo implícito de solvatação não considera as ligações hidrogênio, fazendo com que os valores de  $\Delta G_{sol}$  não mostrem tendências distintas para a ERI entre água e DMSO (Anexo 8.4, Tabela 8.3). Além disso, o fato de MAF da EOS ser estabilizado em água, levando a inversão de  $pK_a$ , também não se justifica por sua energia de solvatação. Na Tabela 8.3 (Anexo 8.4) temos ainda que a comparação do modelo implícito-explícito – que considera as ligações hidrogênio – também não mostrou alterações nas tendências obtidas no modelo implícito, tanto para a EOS quanto para a ERI. Porém o estudo com adição de moléculas explícitas do solvente ainda é preliminar neste trabalho e não permite nenhuma conclusão a respeito. No entanto a investigação da estabilidade

de MAC e MAF, feita analisando os orbitais naturais de ligação, revelaram alguns aspectos interessantes.

**Tabela 5.11.** Momentos de dipolo ( $\mu$ ) obtidos com B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb em água e DMSO para as espécies protolíticas e tautoméricas da ERI, ERIMET, EOS e EOSMET, a 298,15 K.

		$\mu$ (debye)							
		Eixo	NEQ	NEL	MAC	MAF	DA	MET-NE	MET-MA
ERI	ÁGUA	x	14,55	0,00	14,43	0,00	0,00	14,71	0,28
		y	12,96	5,04	-2,80	15,75	-0,32	13,12	17,04
		z	-1,93	-8,00	-14,75	-1,72	-14,68	-1,82	-1,15
		Total	19,59	9,46	20,82	15,85	14,68	19,80	17,09
	DMSO	x	12,81	0,00	12,96	-0,14	-0,04	12,99	0,23
		y	12,28	5,29	-2,85	14,91	-1,23	12,48	15,65
		z	-1,92	-7,28	-13,16	-1,58	-13,10	-1,53	-0,75
		Total	17,85	9,00	18,69	14,99	13,16	18,08	15,67
	VÁCUO	x	7,33	0,00	8,61	0,00	0,00	7,20	0,36
		y	8,26	2,88	-1,75	9,32	-3,42	8,62	9,99
		z	-0,89	4,86	-7,88	-0,53	-8,71	-0,41	0,07
		Total	11,08	5,65	11,80	9,34	9,36	11,24	9,99
EOS	ÁGUA	x	12,81	0,00	12,77	0,23	0,00	12,90	0,35
		y	13,13	4,78	-1,67	17,31	1,62	13,30	18,05
		z	-2,21	-7,65	-14,59	-1,69	-14,43	-2,23	-1,61
		Total	18,47	9,02	19,46	17,40	14,52	18,66	18,13
	VÁCUO	x	7,16	0,00	7,11	0,00	0,00	6,94	1,97
		y	8,58	3,00	-2,46	10,82	-1,25	8,98	11,18
		z	-1,10	4,87	-8,67	-0,70	-8,62	-0,74	-0,21
		Total	11,22	5,72	11,48	10,84	8,71	11,37	11,36

#### 5.4.3. Análise dos Orbitais Naturais de Ligação: Energia de Deslocalização Eletrônica

Através de análises de NBO (do inglês *Natural Bond Orbitals*) obteve-se a energia de deslocalização eletrônica ( $E_{desl}$ ) entre orbitais ligantes e antiligantes, que representa a energia de ressonância. Utilizando as palavras-chave *NBOdel* e *nostar* todos os orbitais NBO de Lewis

tornam-se duplamente ocupados, cuja energia  $E_L$  é maior que a energia original da molécula ( $E_{total}$ ). Subtraindo  $E_{total}$  de  $E_L$  obtêm-se a energia de deslocalização ( $E_{desl}$ ) entre os orbitais de Lewis ligantes e os orbitais antiligantes (Glendening *et al.*, 2014). Quanto maior  $E_{desl}$ , maior a estabilização da espécie por ressonância.

Os valores de  $E_{desl}$  foram calculados por NBO para MAC e MAF da EOS e ERI em água e DMSO (Tabela 5.12). Para a forma MAF da ERI os altos valores de  $E_{desl}$  evidenciam sua grande capacidade de deslocalização eletrônica por ressonância, tanto em água quanto em DMSO. Em DMSO observa-se um aumento de 181 kcal/mol na  $E_{desl}$  em relação à água, evidenciando que a menor constante dielétrica do meio tende a contribuir para a estabilização de MAF por ressonância. Isso pode ser causado por pequenos aumentos da energia dos orbitais ligantes e/ou estabilização de orbitais antiligantes. Além disso, o efeito do solvente também acarreta em pequenas alterações estruturais. Foram verificadas leves variações nos ângulos diedrais (não mostradas) envolvendo os átomos de iodo e oxigênios O15 ou O16, que foram menores (mais próximos de  $0^\circ$ ) em DMSO do que em água. Estes efeitos estéricos podem permitir uma maior sobreposição de orbitais ligantes e antiligantes de MAF em DMSO, o que contribui – apesar de ser muito pouco – para a maior  $E_{desl}$  verificada em DMSO.

Nota-se para a ERI que a  $E_{desl}$  da espécie MAC foi menor do que de MAF, tanto em água quanto em DMSO. Isso sugere que a maior estabilidade de MAC em água (Tabela 5.1) não se deve à sua ressonância eletrônica, mas sim a efeitos estéricos e interações distintas com o solvente. O maior momento de dipolo de MAC em relação à MAF provavelmente provoca interações diferenciadas destas espécies com o solvente, indicando que o efeito de solvatação pela água é um fator muito importante para a estabilização de MAC. Apesar da ressonância de MAC aumentar muito em DMSO ( $\Delta E_{desl} = 17320$  kcal/mol em relação à água), a maior  $E_{desl}$  e o menor momento de dipolo de MAF devem contribuir para sua maior estabilização em relação à MAC (Tabela 5.1), causando a inversão de  $pK_a$  neste meio. Desta forma, a estabilização de MAF em DMSO deve ser influenciada tanto por seu menor momento de dipolo (em relação à MAC)

quanto pelo aumento da ressonância eletrônica. Extrapolando o efeito da constante dielétrica, observa-se que em  $\xi = 0$  (vácuo)  $\mu_{\text{MAF}} < \mu_{\text{MAC}}$  (Tabela 5.11), o que é condizente com a estabilidade de MAF em 70% DMSO/água e em meios micelares.

**Tabela 5.12.** Energia de deslocalização eletrônica ( $E_{\text{desl}}$ ) obtida por NBO em B3LYP/DGDZVP e SMD-Coulomb em água e DMSO, a 298,15 K.

	$E_{\text{desl}}$ (kcal/mol)			
	EOS		ERI	
	Água	DMSO	Água	DMSO
<b>MAC</b>	34064,0	19819,7	23534,3	40853,9
<b>MAF</b>	26540,8	26656,5	46329,4	46510,5

Para a EOS obteve-se um resultado contrário ao da ERI:  $E_{\text{desl}}$  de MAC maior que de MAF. Este efeito mostra que a ressonância eletrônica contribui muito para a estabilização da forma MAC e pouco para a forma MAF da EOS. Isso sugere que a estabilidade de MAF em água deve-se a outros fatores, como efeitos estéricos e de solvatação. Analisando o momento de dipolo (Tabela 5.11), verifica-se um alto valor de  $\mu_{\text{MAF}}$  para EOS em água, apenas 2 debyes menor do que  $\mu_{\text{MAC}}$ . Comparando com a ERI,  $\mu_{\text{MAF}(\text{EOS})} > \mu_{\text{MAF}(\text{ERI})}$ . Desta forma, o grande momento de dipolo contribui para que a forma MAF da EOS seja estável em água, tanto quanto a forma MAC. Isso é coerente com as frações molares similares de MAC e MAF da EOS em água (Tabela 5.2), sendo que a presença significativa de MAF justifica a inversão de  $\text{pK}_a$  que ocorre neste solvente.

Adicionalmente, a alta  $E_{\text{desl}}$  de EOS-MAC em água parece ser um fator desfavorável para a espécie neste meio. Tendo em vista que a grande ressonância causa alta distribuição da carga negativa, talvez isso contribua para o menor momento de dipolo de EOS-MAC em relação à ERI-MAC (onde  $E_{\text{desl}}$  é pequena). Outro ponto que se nota nas Tabelas 5.11 e 5.12 é que os baixos valores de  $E_{\text{desl}}$  das espécies ERI-MAC e EOS-MAF em água coincidem com os altos momentos de dipolo destas espécies. Sabendo que ambas as espécies tem grande estabilidade em

água, é possível que estes efeitos estejam relacionados e, porventura, contribuam para a melhor solvatação da água em detrimento de outros solventes com  $\xi$  menor.

Apesar de não termos o comportamento experimental da EOS em misturas de água/DMSO, a análise NBO de MAC e MAF permite avaliar o efeito de um solvente de menor  $\xi$  que a água na ressonância eletrônica. Assim, observa-se na Tabela 5.12 que  $E_{\text{desl}}$  da forma MAF da EOS em DMSO aumentou 115 kcal/mol em relação à água. Isso evidencia que a menor  $\xi$  do meio contribui para aumentar a estabilização por ressonância eletrônica desta espécie, tal como ocorreu com ERI-MAF. Em contra partida, a  $E_{\text{desl}}$  de MAC da EOS foi menor em DMSO do que água, ocorrendo desestabilização por ressonância, o que é coerente com sua baixa estabilidade em DMSO. Em relação ao momento de dipolo da EOS, quando extrapolado para  $\xi = 0$  (vácuo) temos que  $\mu_{\text{MAF}} < \mu_{\text{MAC}}$ , em concordância com a maior estabilidade observada para MAF em meios micelares (Tabela 5.2). Como a micela proporciona um *core* (região interna) de baixa polaridade, quanto menor o momento de dipolo da espécie maior a interação com a micela.

#### ***5.4.4. Análise dos Orbitais Naturais de Ligação: Distribuição de cargas e interações orbitales***

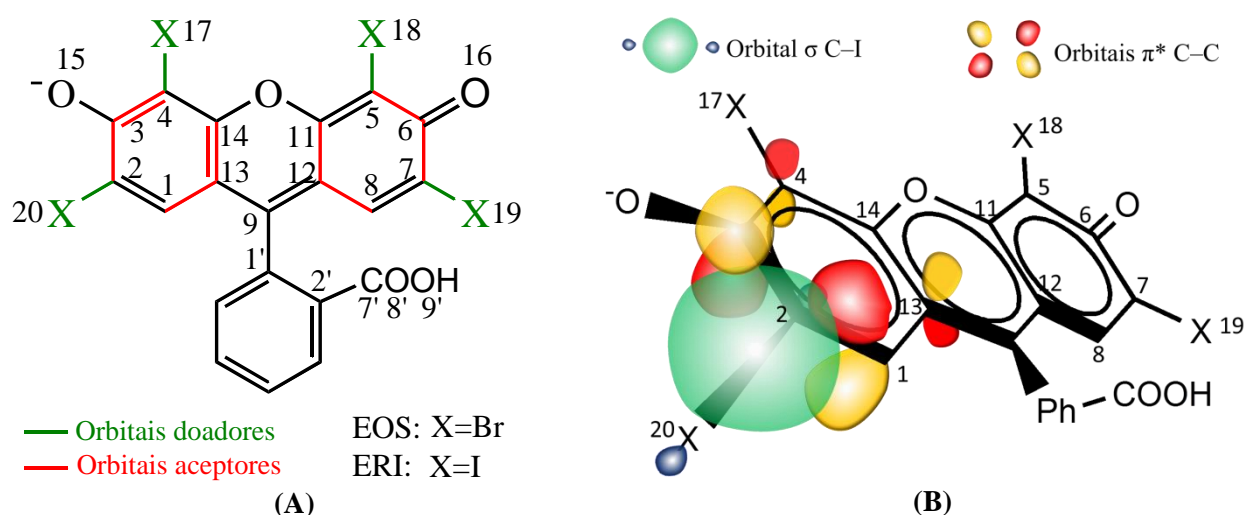
Um dos fatores que contribuem para que a forma MAF da ERI tenha maior ressonância (maior  $E_{\text{desl}}$ ) em água do que a EOS é a maior sobreposição entre os orbitais  $\sigma$  ligantes (doadores) da ligação C–I com orbitais  $\pi$  antiligantes (aceptores) das ligações C–C na porção xantênica. Através de cálculos de energia utilizando a teoria da perturbação de segunda-ordem, foram obtidas as energias das interações hiperconjugativas,  $E^{(2)}$ , referentes à sobreposição orbitalar (Nataraj *et al.*, 2013; Glendening e Landis, 2014). Estes valores podem ser mais convenientemente chamados de energia de estabilização eletrônica ( $E_{\text{estab}}$ ), mostrados na Tabela 5.13.

Na Tabela 5.13 se observam valores de  $E_{\text{estab}}$  maiores para a ERI do que para a EOS. No Esquema 5.1(A) têm-se as ligações cujos orbitais  $\sigma$  ligantes (X–C em verde) e  $\pi$  antiligantes ( $\pi^*$ ,

C–C em vermelho) participam, respectivamente, com doação e aceção de densidade eletrônica devido à sobreposição orbitalar. O Esquema 5.1(B) ilustra a sobreposição entre o orbital  $\sigma$  ligante C2–X20 com os orbitais  $\pi^*$  de C1–C13 e C2–C4. Quanto maior  $E_{\text{estab}}$  maior é a sobreposição orbitalar, permitindo maior deslocalização eletrônica e contribuindo para a ressonância eletrônica (Huheey *et al.*, 1993; Glendening e Landis, 2014).

**Tabela 5.13.** Energia de estabilização eletrônica ( $E_{\text{estab}}$ ) da interação entre orbital  $\sigma$  ligante (doador) e  $\pi$  antiligante ( $\pi^*$ , aceptor), obtido para a forma MAF da EOS (X=Br) e ERI (X=I) através de NBO em B3LYP/DGDZVP e SMD-Coulomb em água a 298,15 K.

Doador ( $\sigma$ )	Aceptor ( $\pi^*$ )	$E_{\text{estab}}$ (kcal/mol)	
		EOS	ERI
C4–X17	C2–C3	4,58	6,00
	C13–C14	5,97	7,19
C5–X18	C11–C12	5,97	7,19
	C6–C7	4,58	6,00
C7–X19	C8–C12	5,94	7,24
	C5–C6	4,42	5,77
C2–X20	C1–C13	5,94	7,24
	C3–C4	4,42	5,77



**Esquema 5.1.** Estrutura da forma MAF da ERI (X=I) e EOS (X=Br) numerada de acordo com a IUPAC. (A) Ligações cuja energia é tratada na Tabela 5.13. (B) Exemplo da interação entre o orbital  $\sigma$  ligante da ligação C2–X20 com os orbitais  $\pi$  antiligantes ( $\pi^*$ ) de C1–C13 e C3–C4.

Na Tabela 5.14 tem-se também a polarização sofrida pelas ligações C–I na ERI e C–Br na EOS, medida em termos da localização percentual do par de elétrons ligantes sobre cada um

dos átomos da ligação. Nela se observa que na EOS a ligação C–Br é mais negativamente polarizada no sentido do bromo, deixando o átomo de carbono mais positivo. Isso era esperado visto que a eletronegatividade de Pauling é maior para o bromo (2,96) do que para o carbono (2,55) (*CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 2007-2008). No entanto, para a ERI, apesar da eletronegatividade do iodo (2,66) ser ligeiramente maior que do carbono, a ligação C–I é deslocalizada para C, deixando I mais positivo. Este fenômeno tem provável relação com o raio atômico de  $I > Br$ . Por serem maiores, os orbitais  $\sigma$  de C–I interagem mais facilmente com os orbitais  $\pi^*$  de C–C do que os orbitais  $\sigma$  de C–Br interagem com  $\pi^*$  (C–C), o que contribui para a maior  $E_{\text{estab}}$  da ERI frente a EOS.

**Tabela 5.14.** Polarização das ligações químicas C–X na EOS (X=Br) e ERI (X=I) obtidas para a forma MAC e MAF através de NBO em B3LYP/DGDZVP e SMD-Coulomb em água.

		Polarização da ligação (%)			
		C4 – X17	C5 – X18	C7 – X19	C2 – X20
EOS	MAC	48,94 – 51,06	47,74 – 52,26	47,12 – 52,88	47,27 – 52,73
	MAF	47,34 – 52,66	47,34 – 52,66	46,65 – 53,35	46,65 – 53,35
ERI	MAC	56,51 – 43,49	54,99 – 45,01	54,42 – 5,58	55,35 – 44,65
	MAF	54,55 – 45,45	54,55 – 45,45	53,92 – 46,08	53,92 – 46,08

Na Tabela 5.15 são apresentadas as cargas parciais obtidas por NBO para alguns elementos de cada espécie. Pode-se notar que, apesar da maior eletronegatividade do bromo e iodo frente ao carbono, ambos adquirem cargas parciais positivas. Isso se justifica pelo efeito doador dos orbitais  $\sigma$  ligantes de C–Br e C–I que se sobrepõem aos orbitais  $\pi^*$  de C–C (Tabela 5.13), contribuindo para o efeito de ressonância eletrônica no anel xantênico. Sendo assim, esse efeito parece ser maior que o efeito indutivo retirador do bromo e do iodo. No entanto, as cargas parciais dos átomos de bromo são menos positivas que do iodo, estando de acordo com a polarização das ligações C–Br e C–I verificadas na Tabela 5.14. Isso novamente pode ser justificado pela maior eletronegatividade do bromo em relação ao iodo.



**Tabela 5.15.** Cargas parciais de alguns elementos (unidade de carga elementar,  $e$ ) obtidas por NBO no nível de teoria B3LYP/DGDZVP em vácuo e água com o modelo de solvente SMD-Coulomb.

	NEQ		MAC		MAF		DA		MET-NE		MET-MA		
	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	
ERI	<b>O15</b>	-0,721	-0,598	-0,725	-0,713	-0,783	-0,665	-0,792	-0,705	-0,723	-0,699	-0,783	-0,666
	<b>O16</b>	-0,736	-0,597	-0,754	-0,647	-0,783	-0,665	-0,792	-0,705	-0,721	-0,599	-0,783	-0,666
	<b>H-O15</b>	0,529	0,496	0,528	0,490	-	-	-	-	0,527	0,496	-	-
	<b>I17</b>	0,225	0,241	0,219	0,201	0,163	0,159	0,157	0,114	0,225	0,240	0,163	0,158
	<b>I18</b>	0,186	0,215	0,176	0,161	0,163	0,159	0,157	0,114	0,190	0,213	0,163	0,158
	<b>I19</b>	0,180	0,203	0,166	0,143	0,150	0,118	0,143	0,074	0,185	0,201	0,149	0,117
	<b>I20</b>	0,214	0,172	0,208	0,139	0,150	0,118	0,143	0,074	0,209	0,171	0,149	0,117
	<b>O9'</b>	-0,744	-0,739	-0,856	-0,759	-0,747	-0,754	-0,868	-0,794	-0,585	-0,586	-0,585	-0,598
	<b>H-O9'</b>	0,544	0,514	-	-	0,543	0,508	-	-	-	-	-	-
EOS	<b>O15</b>	-0,704	-0,694	-0,708	-0,710	-0,756	-0,662	-0,766	-0,703	-0,704	-0,694	-0,757	-0,663
	<b>O16</b>	-0,702	-0,588	-0,721	-0,537	-0,756	-0,662	-0,766	-0,703	-0,703	-0,590	-0,757	-0,663
	<b>H-O15</b>	0,519	0,501	0,518	0,495	-	-	-	-	0,519	0,501	-	-
	<b>Br17</b>	0,083	0,108	0,079	0,073	0,031	0,037	0,026	-0,001	0,083	0,107	0,031	0,036
	<b>Br18</b>	0,051	0,087	0,043	0,041	0,031	0,037	0,026	-0,001	0,051	0,085	0,031	0,036
	<b>Br19</b>	0,045	0,078	0,033	0,027	0,016	0,003	0,010	-0,033	0,044	0,076	0,015	0,002
	<b>Br20</b>	0,051	0,041	0,046	0,012	0,016	0,003	0,010	-0,033	0,050	0,040	0,015	0,002
	<b>O9'</b>	-0,743	-0,739	-0,856	-0,760	-0,747	-0,755	-0,868	-0,799	-0,582	-0,586	-0,586	-0,599
	<b>H-O9'</b>	0,544	0,514	-	-	0,543	0,508	-	-	-	-	-	-

As cargas parciais calculadas por NBO mostram ainda que o Hidrogênio protolítico da parte xantênica (H-O15) é mais positivo para ERI e EOS em água do que no vácuo, justificando o aumento do  $pK_{a-OH}$  quanto menor a constante dielétrica do meio (70% DMSO/água e meios micelares) (Pellosi, 2012; Estevão, 2012). As cargas dos átomos de I, Br, O15 e O16 mostram também que as propriedades eletrostáticas de MAF, DA e MET-MA da ERI e EOS são muito parecidas (com diferenças na forma dianiônica DA) devido à similaridade da porção xantênica dessas espécies. Além disso, as cargas parciais adquirem valores idênticos para elementos em lados opostos da molécula devido à simetria destas espécies. As propriedades eletrostáticas também são muito parecidas entre MET-NE, NEQ e MAC (com relativas discrepâncias para MAC), porém, por terem O15 protonado estas espécies apresentam distribuição de cargas assimétrica. Provavelmente as distribuições análogas de cargas entre estas espécies permitem

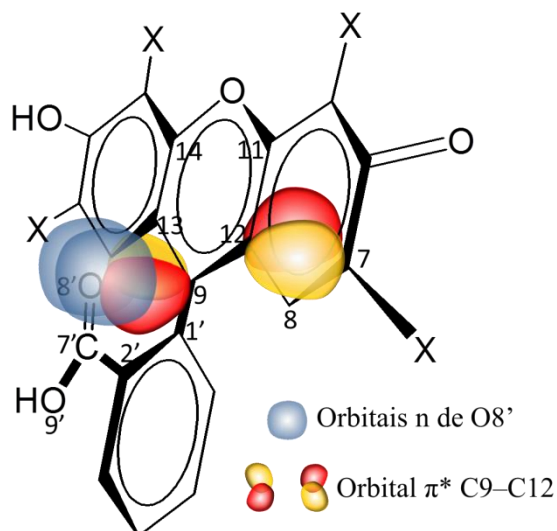
que seus espectros de absorção também sejam compatíveis, tal como as considerações feitas para o cálculo empírico das frações molares (Seção 5.1). Este mesmo tipo de comparação também pode ser feito com as cargas parciais de Mulliken apresentadas no Anexo 8.4, Tabela 8.5, porém com menos confiabilidade que a análise por NBO.

As relativas discrepâncias observadas na distribuição de cargas pela espécie MAC em relação à NEQ e MET-NE e da forma dianiônica DA em relação à MAF e MET-MA podem ter origem no grupo carboxílico. Nota-se que a carga parcial no O9' de MAC e DA é mais negativa do que nas outras espécies devido à carga em COO<sup>-</sup> (Tabela 5.15). Ou seja, a carga negativa do grupo carboxilato causa diferenças na distribuição de cargas na parte xantênica. É importante notar que estas diferenças acontecem mesmo sem o efeito de ressonância entre a parte xantênica e benzênica da molécula por serem ortogonais (Jang *et al.*, 2001; Batistela *et al.*, 2010).

Para compreender este efeito procurou-se por interações específicas nos orbitais NBO de O7' e O8' com átomos da parte xantênica. Para as espécies MAC, NEQ e MET-NE os únicos valores de energias de estabilização ( $E_{\text{estab}}$ ) significativos (maiores que 0,50 kcal/mol) foram encontrados entre os orbitais NBO dos dois pares de elétrons não-ligantes (n) do O8' e os orbitais  $\pi$  antiligantes ( $\pi^*$ ) de C9–C12 (Tabela 5.16). A interação entre estes orbitais está ilustrada no Esquema 5.2. Já para as formas DA, MAF e MET-MA as únicas interações significativas com elementos da parte xantênica ocorrem entre orbitais n do O8' e o orbital  $n^*$  do C9 (Tabela 5.16). Isso evidencia que apesar de não ocorrer ressonância eletrônica entre o anel benzênico e a parte xantênica, o grupo carboxílico influencia na deslocalização eletrônica do grupo cromofórico devido às interações orbitais. Este fenômeno também pode estar relacionado às diferenças significativas no  $\lambda_{\text{máx}}$  observadas nas Tabelas 5.1 e 5.2 entre MAC e MAF ou MAC e NEQ, por exemplo.

Temos ainda na Tabela 5.16 que a  $E_{\text{estab}}$  de MAC é muito maior do que NEQ e MET-NE, tanto da ERI quanto da EOS. O mesmo também acontece com a forma dianiônica DA em relação à MAF e MET-MA. Assim, ocorre uma interação mais efetiva entre os orbitais n de O8' com os

orbitais  $\pi^*$  de C9–C12 (ou  $n^*$  de C9) para as espécies MAC e DA por terem o grupo aniônico  $\text{COO}^-$ . As outras espécies que possuem  $-\text{COOH}$  ou  $-\text{COO}-\text{CH}_3$  (derivado metil-éster) têm sobreposição orbitalar fraca devido à ausência de carga negativa nesta região da molécula. Este fenômeno muito provavelmente influencia nos espectros eletrônicos e será utilizado adiante juntamente com os orbitais moleculares HOMO e LUMO para a discussão das diferenças espectrais de MAC e DA em relação às outras espécies.



**Esquema 5.2.** Estrutura de NEQ da ERI (X=I) e EOS (X=Br) ilustrando a interação entre os orbitais dos pares não-ligantes (n) de O8' com o orbital  $\pi^*$  de C9–C12.

**Tabela 5.16.** Energia de estabilização eletrônica ( $E_{\text{estab}}$ ) da interação entre os orbitais dos pares não-ligantes (n) de O8' com o orbital  $\pi^*$  de C9–C12 ou  $n^*$  de C9 obtidas através de análise NBO com B3LYP/DGDZVP e SMD-Coulomb em água.

Doador	Aceptor		$E_{\text{estab}}$ (kcal/mol)		
			MAC	NEQ	MET-NE
n	$\pi^*$	ERI	7,82	2,18	2,17
O8'	C9 – C12	EOS	7,88	2,21	2,35
			DA	MAF	MET-MA
n	$n^*$	ERI	9,90	4,10	4,37
O8'	C9	EOS	9,61	4,05	4,27

## 5.5 Espectros Eletrônicos de Absorção

### 5.5.1 Escolha do nível de teoria

O estudo do estado singleto excitado foi feito através de TD-DFT e comparado com os espectros de absorção experimentais de cada forma protolítica da EOS, EOSMET, ERI e ERIMET. Estes foram obtidos por métodos quimiométricos de análise multivariada (Março e Scarmínio, 2007) por Estevão (2012) e Pellosi (2012) e são apresentados na Tabela 5.17 e nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6.

**Tabela 5.17. Valores experimentais** de comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e absorvidade molar ( $\epsilon$ ) das espécies protolíticas da ERI, ERIMET, EOS e EOSMET em água, a 303,15 K, obtidos de Pellosi (2012) e Estevão (2012).

		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
EOS (água)	EOSMET-NE	470	16,8
	EOSMET-MA	517	97,2
	DA	517	96,7
	MA	519	51,7
	NE	470	7,5
ERI (água)	ERIMET-NE	491	19,8
	ERIMET-MA	527	92,8
	DA	527	96,5
	MA	529	41,2
	NE	491	15,6
ERI (70% DMSO)	ERIMET-NE	493	20,6
	ERIMET-MA	541	101,4
	DA	532	100,5
	MA	543	95,6
	NE	494	3,2

Os testes com diferentes níveis de teoria e modelos de solvatação foram feitos com a forma dianiônica DA da ERI e suas formas ésteres ERIMET-NE (neutra) e ERIMET-MA (monoaniônica) em água e encontram-se nas Tabelas 5.18 e 5.20. Os mesmos testes também foram feitos com a forma DA da EOS, EOSMET-NE e EOSMET-MA em água (Tabela 5.19

e 5.20). Este estudo permitiu a escolha do nível de teoria e modelo de solvatação mais adequado para o estudo espectral das formas tautoméricas MAC, MAF, NEQ e NEL.

Nas Tabelas 5.18 e 5.19 podemos perceber que os valores de comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) teóricos são subestimados em relação aos experimentais (Tabela 5.17) em qualquer nível de teoria e modelo de solvatação. Porém, enquanto as formas neutras ERIMET-NE e EOSMET-NE têm valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  teóricos entre 20 e 30 nm menores que os experimentais, as espécies monoaniônicas ERIMET-MA, EOSMET-MA e dianiônica DA (ERI e EOS) chegam a valores de ~60 nm menores. Os maiores erros para espécies aniônicas evidenciam o prejuízo obtido por não ser possível adicionar funções difusas para todos os elementos e, também, funções de polarização suficientemente grandes para descrever adequadamente as ligações químicas com os átomos de bromo e iodo. Apesar da discrepância em relação aos valores experimentais, ocorrem algumas diferenças ao comparar os níveis de teoria B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p), sendo que o último fornece valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  ligeiramente maiores (erros menores) que o primeiro, tanto para ERI quanto para EOS. Entretanto o maior tempo de máquina requerido pela base 6-311++G(d,p) (~4 vezes maior que DGDZVP) não justifica a leve melhoria dos resultados.

Em relação aos modelos de solvatação testados (IEF-PCM e SMD), novamente se observa que no mesmo raio de vdW ambos produzem resultados idênticos. Diferenças significativas ocorrem ao comparar diferentes conjuntos de raios de vdW devido às alterações no raio da cavidade do soluto. Para a ERI (Tabela 5.18), apesar do conjunto de raios SMD-Coulomb fornecer resultados bastante parecidos aos do UFF, seus valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  são ligeiramente maiores, sendo mais adequados ao sistema. O inverso ocorreu para a EOS (Tabela 5.19), onde UFF forneceu valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  maiores que SMD-Coulomb, porém com diferença insignificante. Os raios de Pauling mostraram-se os menos adequados para ERI e EOS devido aos menores valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  em relação aos outros conjuntos.

**Tabela 5.18.** Comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e a respectiva força do oscilador ( $f$ ) da **ERI** e **ERIMET** nos diferentes modelos de solvatação e conjuntos de raios de vdW testados em água, a 298,15 K, com os níveis de teoria **B3LYP/DGDZVP** e **B3LYP/6-311++G(d,p)**.

		<b>UFF</b>		<b>Pauling</b>		<b>SMD-Coulomb</b>		
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$f$	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$f$	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	F	
<b>B3LYP/ DGDZVP</b>	ERIMET-NE	IEF-PCM	460,5	0,3416	446,0	0,4354	--	--
		SMD	460,5	0,3416	446,0	0,4354	461,4	0,3478
	ERIMET-MA	IEF-PCM	466,3	0,8566	458,9	0,8790	--	--
		SMD	466,3	0,8566	458,9	0,8790	467,2	0,8634
	DA	IEF-PCM	456,2	0,8206	453,0	0,8545	--	--
		SMD	456,2	0,8206	453,0	0,8545	459,6	0,8422
<b>B3LYP/ 6-311++G(d,p)</b>	ERIMET-NE	IEF-PCM	460,7	0,3358	445,8	0,4292	--	--
		SMD	460,7	0,3358	445,8	0,4292	461,9	0,3382
	ERIMET-MA	IEF-PCM	467,0	0,8492	459,1	0,8702	--	--
		SMD	467,0	0,8492	459,1	0,8702	467,9	0,8523
	DA	IEF-PCM	457,4	0,8233	453,d5	0,8497	--	--
		SMD	457,4	0,8233	453,5	0,8497	460,6	0,8354

**Tabela 5.19.** Comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e a respectiva força do oscilador ( $f$ ) da **EOS** e **EOSMET** nos diferentes modelos de solvatação e conjuntos de raios de vdW testados em água, a 298,15 K, com as metodologias **B3LYP/DGDZVP** e **B3LYP/6-311++G(d,p)**.

		<b>UFF</b>		<b>Pauling</b>		<b>SMD-Coulomb</b>		
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$f$	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$f$	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$f$	
<b>B3LYP/ DGDZVP</b>	EOSMET-NE	IEF-PCM	447,9	0,3773	438,0	0,4519	--	--
		SMD	447,9	0,3773	438,0	0,4519	446,8	0,3469
	EOSMET-MA	IEF-PCM	458,8	0,8338	453,1	0,8589	--	--
		SMD	458,8	0,8338	453,1	0,8589	457,4	0,8039
	DA	IEF-PCM	450,3	0,7950	447,7	0,8345	--	--
		SMD	450,3	0,7950	447,7	0,8345	451,6	0,7848
<b>B3LYP/ 6-311++G(d,p)</b>	EOSMET-NE	IEF-PCM	449,0	0,3874	437,9	0,4627	--	--
		SMD	448,0	0,3874	437,9	0,4627	446,4	0,3592
	EOSMET-MA	IEF-PCM	460,5	0,8494	454,2	0,8713	--	--
		SMD	460,5	0,8494	454,2	0,8713	458,8	0,8218
	DA	IEF-PCM	451,2	0,8137	449,0	0,8414	--	--
		SMD	451,2	0,8137	449,0	0,8414	452,8	0,7969

Além da TD-DFT com o funcional B3LYP, o método CIS (*Single-excitation Configuration Interaction*) também foi testado para ERI e EOS em água utilizando o modelo de solvatação SMD-Coulomb juntamente com os conjuntos de base DGDZVP e 6-311++G(d,p) (Tabela 5.20). Contudo, o método CIS mostrou-se muito ruim, subestimando os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  com erros que variam de 140 a 180 nm em relação aos valores experimentais. Isso mostra que apesar dos erros obtidos com o funcional B3LYP e os conjuntos de base utilizados, a TD-DFT é mais adequada para o estudo deste sistema e, de forma geral, está entre as melhores opções para moléculas grandes. Como os grandes desvios em relação aos dados experimentais são observados para todas as espécies, isso não prejudica a compreensão do sistema. Assim, dadas as evidências, o nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) e o modelo de solvatação SMD-Coulomb foram escolhidos para simular os espectros de cada espécie protolítica e tautomérica da ERI, ERIMET, EOS e EOSMET.

**Tabela 5.20.** Comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e a respectiva força do oscilador (F) no método CIS com as funções de base DGDZVP e 6-311++G(d,p), em IEF-PCM/UFF em água a 298,15 K.

		DGDZVP		6-311++G(d,p)	
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$f$	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$f$
	ERIMET-NE	329,7	1,6061	328,7	1,5787
ERI	ERIMET-MA	362,6	1,6868	362,0	1,662
	DA	349,5	1,6628	349,8	1,6386
	EOSMET-NE	327,8	1,5283	327,6	1,5215
EOS	EOSMET-MA	361,8	1,6135	364,6	1,6015
	DA	349,3	1,5878	349,1	1,5761

### 5.5.2 Estudo das transições eletrônicas das espécies protolíticas e tautoméricas

As transições eletrônicas para o estado singleto excitado das espécies monoaniônicas MA, compostas pelos tautômeros MAC e MAF, e as neutras NE, compostas por NEL e NEQ, juntamente com as formas protolíticas dianiônica DA da Eosina e Eritrosina, e dos ésteres MET-NE (neutro) e MET-MA (monoaniônico), são apresentadas nas Tabelas 5.21 e 5.22 e Figuras 5.4,

5.5 e 5.6 para ERI e EOS em água e DMSO obtidas com B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb. Nas Tabelas 5.21 (ERI) e 5.22 (EOS) são apresentados os comprimentos de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) para as transições HOMO→LUMO mais representativas (com maior coeficiente de transição) e a respectiva força do oscilador harmônico ( $f$ ). Nas figuras 5.4, 5.5 e 5.6 observa-se as principais transições de todas as formas protolíticas e tautoméricas da ERI e EOS, juntamente com os espectros experimentais das formas protolíticas obtidos por quimiometria por Pellosi (2012) e Estevão (2012). Sabe-se que  $f = 1$  é o limite superior das transições eletrônicas permitidas, cujo valor equivale a  $\epsilon = 100 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (o limite inferior é  $f = 0,01$ ) (Harris e Bertolucci, 1989; Turro, 1991). Tendo isso em vista, todos os espectros são apresentados na mesma escala, com força do oscilador ( $f$ ) de 0 a 1 e valores experimentais de  $\epsilon$  de 0 a  $100 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para que  $f$  e  $\epsilon$  possam ser diretamente comparados.

Analisando primeiramente os tautômeros neutros NEQ e NEL da ERI em água (Tabela 5.21 e Figura 5.4-A) observa-se que a força do oscilador de NEQ é maior do que o espectro experimental da mistura de tautômeros neutros, NE(exp) (Figura 5.4-A, Tabela 5.17). Para NEL, deve-se notar que os valores altos de  $f$  apresentados na Tabela 5.21 correspondem à transição no UV e que na região de  $\lambda_{\text{máx}}$  das outras espécies  $f_{\text{NEL}} = 0$ . Sendo  $f_{\text{NEL}} = 0$  na região de  $\lambda_{\text{máx}}$  de NEQ, o valor experimental de  $\lambda_{\text{máx}}$  das formas neutras NE próximo ao valor teórico de NEQ sugere que o espectro experimental refere-se principalmente a forma quinóide. Além disso, o valor de  $\epsilon_{\text{NE}}$  não-nulo em 491 nm ( $\epsilon = 15,6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ou  $f = 0,156$ , Tabela 5.17) confirma a grande presença da forma NEQ, como de fato obtido nos resultados experimentais de  $K_T$  (Tabela 5.1). Isso mostra que, apesar do erro em relação ao  $\lambda_{\text{máx}}$ , a descrição em termos da força do oscilador por TD-DFT é adequada.

Efeito semelhante também se observa para as formas monoaniônicas MAC e MAF da ERI (Figura 5.4-B, Tabela 5.21). Visto que teoricamente  $\lambda_{\text{máx}}$  de MAF é 17 nm maior que de MAC, a banda experimental de maior absorvidade em  $\lambda_{\text{máx}} = 529 \text{ nm}$  provavelmente



corresponde à MAF enquanto o ombro em  $\lambda$  menor deve corresponder a MAC. Como a fração molar de MAF em água é pequena ( $\chi_{\text{MAF}} = 0,29$ ), a banda de MAC ( $\chi_{\text{MAC}} = 0,71$ ) deve sobrepor-se à de MAF, fazendo a absortividade molar ser mais próxima à MAC do que MAF. De fato o valor de  $\epsilon$  em  $\lambda_{\text{máx}}$  do espectro experimental é equivalente à MAC e inferior à MAF, indicando o predomínio da forma carboxilato em água, tal como o resultado experimental na Tabela 5.1.

**Tabela 5.21.** Transições HOMO→LUMO, seus coeficientes e energias de transição ( $\Delta E$ ), comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e força do oscilador ( $f$ ) das **espécies protolíticas e tautoméricas da ERI e ERIMET em água e DMSO**, obtidas com B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb, a 298,15 K.

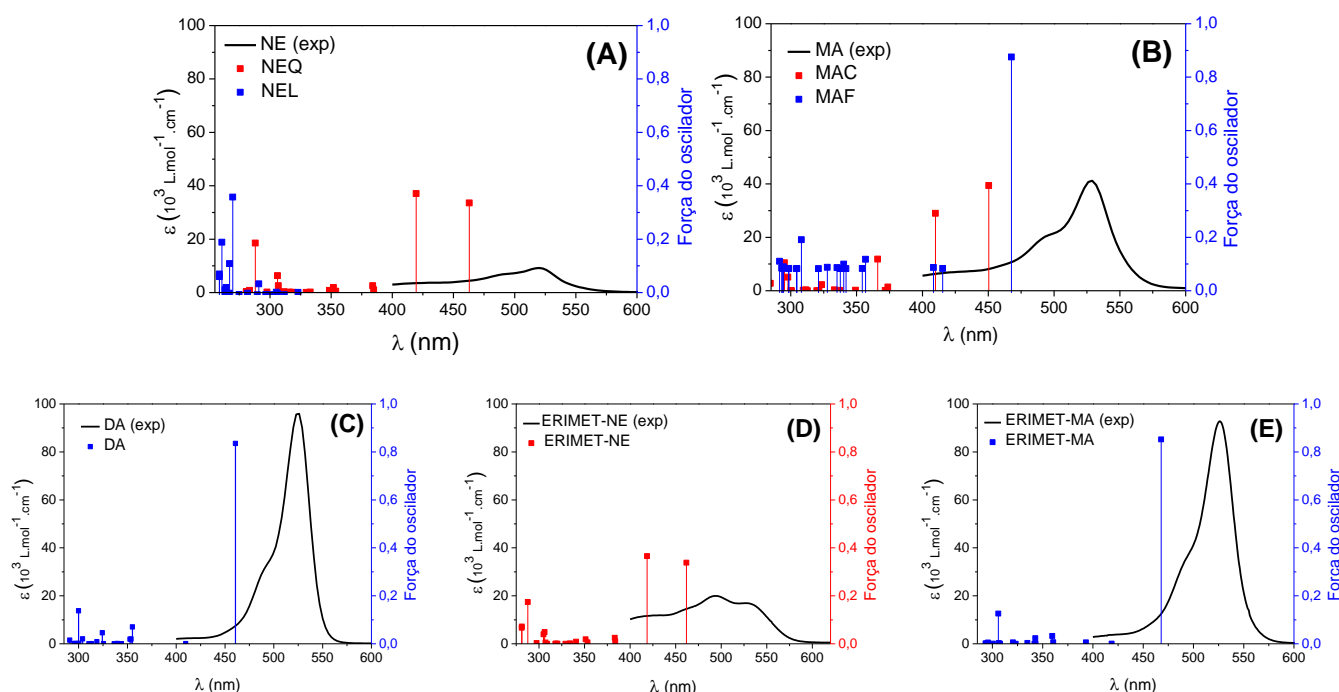
	Água					DMSO					$\Delta\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	$\Delta E$ (eV)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Orbitais*	Coef. de transição	$f$	$\Delta E$ (eV)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Orbitais*	Coef. de transição	$f$	
<b>NEQ</b>	2,679	462,9	H→L	0,6355	0,336	2,686	461,6	H→L	0,6479	0,385	-1,3
			H-1→L	0,2988				H-1→L	0,2665		
<b>NEL</b>	4,598	269,6	H→L+4	0,4658	0,366	4,591	270,1	H→L+4	0,4815	0,422	0,5
			H→L+5	0,2629				H→L+5	0,2201		
			H-2→L+3	0,1989				H-2→L+4	0,2186		
<b>MAC</b>	2,753	450,4	H→L	0,6498	0,394	2,720	455,8	H→L	0,6711	0,386	5,4
			H-1→L	0,2620				H-1→L	-0,1440		
								H-2→L	-0,1134		
<b>MAF</b>	2,652	467,6	H→L	0,7020	0,872	2,627	472,0	H→L	0,7020	0,902	4,4
<b>DA</b>	2,692	460,6	H→L	0,7016	0,835	2,689	461,0	H→L	0,7010	0,862	0,4
<b>MET-NE</b>	2,684	461,9	H→L	0,6347	0,338	2,695	460,0	H→L	0,6510	0,391	-1,9
			H-1→L	0,2964				H-1→L	-0,2581		
<b>MET-MA</b>	2,650	467,9	H→L	0,7018	0,852	2,633	470,9	H→L	0,7021	0,898	3,0

\* H=HOMO; L=LUMO

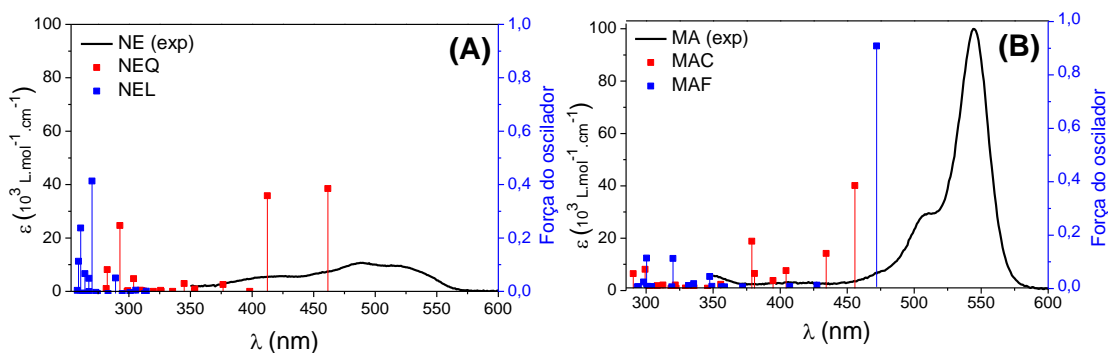
Para a ERI em DMSO (Tabela 5.21 e Figura 5.5-A) na região de  $\lambda_{\text{máx}}$  de NEQ observa-se  $f_{\text{NEQ}} = 0,385$  enquanto  $f_{\text{NEL}} = 0$ . Levando em conta que o valor experimental é  $\epsilon_{\text{NE}} = 3,2 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $f = 0,032$ ) em 494 nm (Tabela 5.17), estes resultados sugerem que a fração molar de NEQ em 70% DMSO deve ser pequena, o que confirma o valor encontrado de  $\chi_{\text{NEQ}} = 0,16$  (Tabela 5.1). Para as formas monoaniônicas, os valores na Tabela 5.21 e Figura 5.5-B mostram que o espectro experimental das formas MA tem a banda referente à MAF (à direita) com  $\epsilon$

muito maior que a banda de MAC (ombro à esquerda). Visto que o espectro das espécies individuais apresentou força do oscilador muito maior para MAF do que MAC, o espectro experimental indica que há grande proporção de MAF na mistura tautomérica, confirmando o valor de  $\chi_{\text{MAF}} = 0,93$  em 70% DMSO na Tabela 5.1.

Em termos espectrais observa-se na Tabela 5.17 (e também na 5.1) que a ERI sofre efeito solvatocrômico ao passar de água para 70% DMSO/água, principalmente as formas monoaniônicas MA. A descrição teórica deste efeito empírico pode ser avaliada com a variação do  $\lambda_{\text{máx}}$  descrito como  $\Delta\lambda_{\text{máx}} = \lambda_{\text{máx}}(\text{DMSO}) - \lambda_{\text{máx}}(\text{água})$ , cujos valores encontram-se Tabela 5.21. Experimentalmente temos que  $\Delta\lambda_{\text{máx}}(\text{NE}) = 3$  nm e  $\Delta\lambda_{\text{máx}}(\text{MA}) = 14$  nm. Observando a Tabela 5.21 para as formas neutras NEQ, NEL e MET-NE temos  $\Delta\lambda_{\text{máx}}$  de -1,3, 0,5 e -1,9, respectivamente. Enquanto isso, as formas monoaniônicas MAC, MAF e MET-MA mostraram uma variação maior, com  $\Delta\lambda_{\text{máx}}$  de 5,4, 4,4 e 3,0, respectivamente, mostrando que o efeito solvatocrômico foi descrito adequadamente pelo modelo teórico.



**Figura 5.4.** Espectros de absorção em água das formas protolíticas e tautoméricas da ERI e ERIMET determinadas experimentalmente (quimiometria) e estimadas por TD-DFT com B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb. (A) NE; (B) MA; (C) DA; (D) ERIMET-NE; (E) ERIMET-MA.



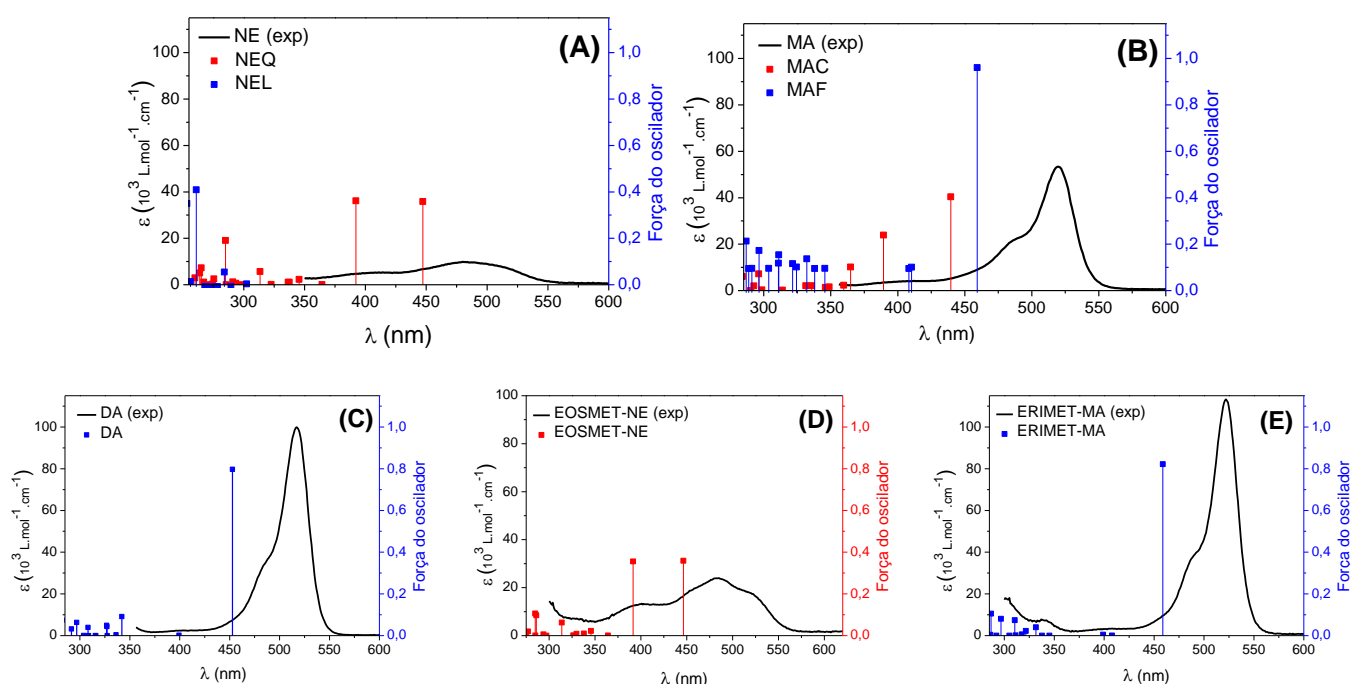
**Figura 5.5.** Espectros de absorção em 70% DMSO/água das formas protolíticas e tautoméricas da ERI determinadas experimentalmente (quimiometria) e estimadas por TD-DFT com B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb. (A) NE; (B) MA.

Analisando as espécies neutras da EOS em água (Tabela 5.22 e Figura 5.6-A) na região de  $\lambda_{\text{máx}}$  de NEQ tem-se  $f_{\text{NEQ}} = 0,358$  e  $f_{\text{NEL}} = 0$ . Como  $\epsilon_{\text{NE}} = 7,5 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $f = 0,075$ ) (Tabela 5.17), os resultados indicam a presença de NEQ, que no cálculo empírico mostrou  $\chi_{\text{NEQ}} = 0,45$  em água (Tabela 5.1). Os resultados das espécies monoaniônicas da EOS em água (Tabela 5.22 e Figura 5.6-B) mostram que a força do oscilador de MAF ( $f = 0,828$ ) é maior do que em MAC ( $f = 0,404$ ) e  $\lambda_{\text{máx}}$  de MAF > MAC, tal como ocorre para a ERI. Assim, no espectro experimental a banda de maior absorvância deve ser referente à MAF e o ombro à esquerda deve referir-se à MAC. Como a fração molar de MAF ( $\chi_{\text{MAF}} = 0,43$ ) é similar à de MAC ( $\chi_{\text{MAC}} = 0,57$ ) (Tabela 5.2), o espectro experimental de MAF sobrepõe-se ao de MAC, o que se reflete também no maior valor de  $\epsilon_{\text{MA}}$  da EOS que da ERI (Tabela 5.17). Apesar de estes resultados mostrarem que MAF não é o componente majoritário da mistura tautomérica na EOS, sua fração molar é consideravelmente mais expressiva que MAF da ERI em água ( $\chi_{\text{MAF}} = 0,29$ ), o que justifica a inversão de  $\text{pK}_a$  observada pela EOS em água (Batistela *et al.*, 2011).

**Tabela 5.22.** Transições HOMO→LUMO, seus coeficientes e energias de transição ( $\Delta E$ ), comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e força do oscilador ( $f$ ) das **espécies protolíticas e tautoméricas da EOS e EOSMET em água**, obtidas com B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb, a 298,15 K.

Água					
	$\Delta E$ (eV)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Orbitais*	Coef. de transição	$f$
<b>NEQ</b>	2,772	447,2	H→L	0,6440	0,358
			H-1→L	-0,2755	
<b>NEL</b>	4,750	261,0	H→L+4	0,4295	0,364
			H-2→L+3	0,1883	
			H-3→L+1	0,1471	
<b>MAC</b>	2,821	439,6	H→L	0,6585	0,404
			H-1→L	-0,2337	
<b>MAF</b>	2,699	459,3	H→L	0,7015	0,828
<b>DA</b>	2,738	452,8	H→L	0,7010	0,797
<b>MET-NE</b>	2,777	446,4	H→L	0,6448	0,359
			H-1→L	0,2735	
<b>MET-MA</b>	2,703	458,8	H→L	0,6985	0,822

\* H=HOMO; L=LUMO



**Figura 5.6.** Espectros de absorção em água das formas protolíticas e tautoméricas da **EOS e EOSMET** determinadas experimentalmente (quimiometria) e estimadas por TD-DFT com B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb. (A) NE; (B) MA; (C) DA; (D) EOSMET-NE; (E) EOSMET-MA.

Com a mesma metodologia empregada no cálculo de  $K_T$  experimental (Seção 4.1), utilizaram-se as forças do oscilador (no lugar de  $\epsilon$ ) de cada espécie tautomérica obtidas por TD-DFT (Tabela 5.21 e 5.22) para calcular novamente valores de  $K_{Q-L}$  e  $K_M$  teóricos. Os valores de força do oscilador para a mistura de tautômeros neutros ( $f_{NE}$ ) e monoaniônicos ( $f_{MA}$ ) foram calculados a partir dos valores de  $\epsilon_{NE}$  e  $\epsilon_{MA}$  experimentais (Tabela 5.1 e 5.2) considerando a equivalência entre  $f = 1$  e  $\epsilon = 100 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Harris e Bertolucci, 1989; Turro, 1991). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.23.

**Tabela 5.23.** Constante de equilíbrio tautomérico das formas neutras ( $K_{Q-L}$ ) e monoaniônicas ( $K_M$ ) em água e DMSO calculadas com a força do oscilador obtida por TD-DFT em B3LYP/6-311++G(d,p) e SMD-Coulomb, a 298,15 K.

	EOS	ERI	
	Água	Água	DMSO
$K_{Q-L}$	3,78	1,15	11,05
$K_M$	0,02	0,04	↑↑

Ao comparar os resultados da Tabela 5.23 com os valores experimentais (Tabela 5.1 e 5.2) percebe-se que apesar de ocorrerem erros significativos, em geral os valores teóricos não se distanciam dos experimentais. Não foi possível reproduzir as tendências do equilíbrio das espécies neutras da ERI em água, porém o valor de  $K_{Q-L}=1,15$  estima que uma fração considerável de NEQ (46%) compõe a mistura tautomérica, o que não representa um erro exagerado em relação ao valor experimental (79%). O único erro grave foi obtido em  $K_M$  da EOS, indicando que MAC compõe 98% da mistura das espécies monoaniônicas, enquanto experimentalmente a fração molar de MAF também é muito significativa (43%), a qual é responsável pela inversão de  $pK_a$  da EOS em água (Batistela *et al.*, 2011).

Comparando aos resultados de  $K_T$  obtidos por TD-DFT com a metodologia que utiliza as energias livres de Gibbs da seção 4.3 (apresentados nas Tabelas 5.4 e 5.5), vemos que os cálculos das constantes de equilíbrio através dos espectros de absorção teóricos destacaram-se principalmente em fornecer erros menores para o equilíbrio das espécies monoaniônicas, além de

não prejudicar os valores das espécies neutras. Apesar de ser possível estudar os equilíbrios de tautomerização por diferentes metodologias teóricas, o cálculo a partir de dados empíricos é fundamental para dar segurança às conclusões. Contudo é necessário averiguar se as considerações de equivalência espectral tomadas para o cálculo experimental são adequadas. Para isso os espectros por TD-DFT nos auxiliam enormemente.

Voltando às Figuras 5.4 e 5.6, observamos que os espectros teóricos em azul dos quadros B (MAF), C (DA) e E (MET-MA) são similares, bem como os orbitais moleculares envolvidos nas transições HOMO→LUMO e os relativos coeficientes de transição destas espécies (Tabela 5.21 e 5.22). Além disso, os espectros em vermelho nos quadros A (NEQ), B (MAC) e D (MET-NE) também são muito parecidos, sendo que os orbitais que participam das transições HOMO→LUMO tem contribuições similares para estas espécies, tanto da EOS quanto da ERI. São notadas diferenças razoavelmente significativas nos espectros de MAC em relação à NEQ e MET-NE e de DA em relação à MAF e MET-MA (discussão adiante). O mais importante, porém, é que as semelhanças espectrais destacadas também ocorrem na força do oscilador (Tabelas 5.21 e 5.22). Tanto para EOS quanto para ERI em água e DMSO os valores de  $f_{NEQ} \cong f_{MAC} \cong f_{MET-NE}$  e  $f_{MAF} \cong f_{DA} \cong f_{MET-MA}$ , o que valida as considerações feitas no cálculo de  $K_T$  experimental:  $\epsilon_{MET-NE} = \epsilon_{NEQ} = \epsilon_{MAC}$  e  $\epsilon_{MET-MA} = \epsilon_{MAF}$ . Ou seja, de fato, espécies com grupos cromofóricos (parte xantênica) iguais têm comportamento espectral idêntico. Este resultado mostra ainda que apesar de não ser possível tomar os valores de  $\epsilon$  de todas as espécies em um único  $\lambda_{analítico}$ , tomá-los nos respectivos  $\lambda_{máx}$  não prejudicou os resultados. Isso porque, apesar das diferenças nos  $\lambda_{máx}$ , em geral, os valores de absorvidade molar – que de fato importam no cálculo de  $K_T$  – sofreram variações irrisórias.

No entanto, uma ressalva deve ser feita para a espécie MAC: apesar de  $f_{NEQ} \cong f_{MAC} \cong f_{MET-NE}$ , ocorre diferença razoável de  $f_{MAC}$  em relação à  $f_{NEQ}$  e  $f_{MET-MA}$  (~0,05 unidades, que corresponde a  $\sim 5 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), tal como em relação ao  $\lambda_{máx}$ , cuja discussão se fará adiante. Isso certamente causou erros no cálculo de  $K_M$  experimental na Seção 5.1, porém não o bastante

para prejudicar a descrição qualitativa do equilíbrio tautomérico e tampouco para levar a erros graves nos resultados quantitativos.

Adicionalmente, o bom resultado nos cálculos de  $K_T$  a partir dos espectros teóricos por TD-DFT são reflexo da descrição correta da força do oscilador. Como as relações experimentais de  $\epsilon$  (por similaridade do grupo cromofórico) foram confirmadas, se as relações entre  $\epsilon$  e  $f$  são corretas é justo que os resultados teóricos de  $K_T$  sejam semelhantes aos experimentais.

### **5.5.3 Orbitais HOMO e LUMO e o efeito da carga de COO<sup>-</sup> no grupo cromofórico**

Sabe-se que as transições eletrônicas dependem dos orbitais moleculares HOMO e LUMO e suas energias definem o comprimento de onda de absorção, que em certa extensão pode ser avaliada pelo formato e sobreposição dos orbitais. Nas Tabelas 5.21 e 5.22 observa-se que apesar de as transições HOMO-1→LUMO contribuir para os espectros de absorção das espécies NEQ, MAC e MET-NE, as transições mais significativas para estas espécies e também para MAF, DA e MET-MA são do tipo HOMO→LUMO. Assim, os orbitais HOMO e LUMO para todas as espécies protolíticas e tautoméricas da ERI e EOS em água foram gerados e são apresentados na Figura 5.7 e 5.8.

É possível notar que os orbitais HOMO e LUMO das espécies NEQ, MAC e MET-NE são muito semelhantes entre si, assim como MAF, DA e MET-MA. Isso justifica a similaridade espectral observada entre estas espécies, que dão origem às transições eletrônicas com energias ( $\lambda$ ) e intensidades ( $f$  ou  $\epsilon$ ) semelhantes, como discutido anteriormente (item 5.5.2). Para o tautômero NEL foram gerados os orbitais HOMO e LUMO+4 por corresponder à transição mais significativa. Apesar do formato dos orbitais da transição HOMO→LUMO+4 de NEL permitir grande sobreposição orbitalar, a grande diferença de energia faz com que ocorra na região UV.

Em relação às outras espécies na Figura 5.7 observa-se a deslocalização de densidade eletrônica das extremidades do grupo cromofórico para o anel central da parte xantênica. Além disso, observando a grande sobreposição de orbitais  $\pi$  da parte xantênica, a transição

HOMO→LUMO envolve principalmente orbitais  $\pi\rightarrow\pi^*$ , o que é condizente com a região de ~500 nm (Valeur, 2002; Turro, 1991; Slyusareva *et al.*, 2012).

Nos estudos do estado excitado, apesar da similaridade dos grupos cromofóricos e o comportamento espectral semelhante, foram notadas diferenças importantes de MAC em relação à NEQ e MET-NE e da espécie DA em relação à MAF e MET-MA – deve-se notar que o que distingue MAC e DA das outras espécies é o grupo carboxílico desprotonado ( $\text{COO}^-$ ). Fenômenos similares foram anteriormente discutidos em outros trabalhos. Em estudos com a Fluoresceína, Batistela *et al.* (2010) concluíram que apesar da carga negativa do carboxilato em DA aumentar a ressonância no anel benzênico, este participa minimamente nas transições eletrônicas. Para a ERI, Pellosi (2012) discute que apesar de não interferir significativamente nos valores de absorvidade molar, o grupo  $\text{COO}^-$  pode influenciar na parte cromofórica e causar diferenças espectrais de até 10 nm no  $\lambda_{\text{max}}$  entre DA e MAF, fato já reportado anteriormente (Kibblewhite *et al.*, 1989).

No estudo das propriedades eletrostáticas (momentos de dipolo e distribuição de cargas) ocorreram diferenças importantes de MAC em relação à NEQ e MET-NE e de DA em relação à MAF e MET-MA que foram atribuídas à maior interação entre orbitais n de O8' e  $\pi^*$  de C9–C12 devido à carga negativa do grupo  $\text{COO}^-$ . Esta interação que modifica o comportamento eletrostático de MAC e DA também pode influenciar nos orbitais HOMO e LUMO e conseqüentemente nos espectros eletrônicos. Na Figura 5.8 alguns dos orbitais da Figura 5.7 são mostrados lateralmente para visualizar melhor o grupo carboxílico.



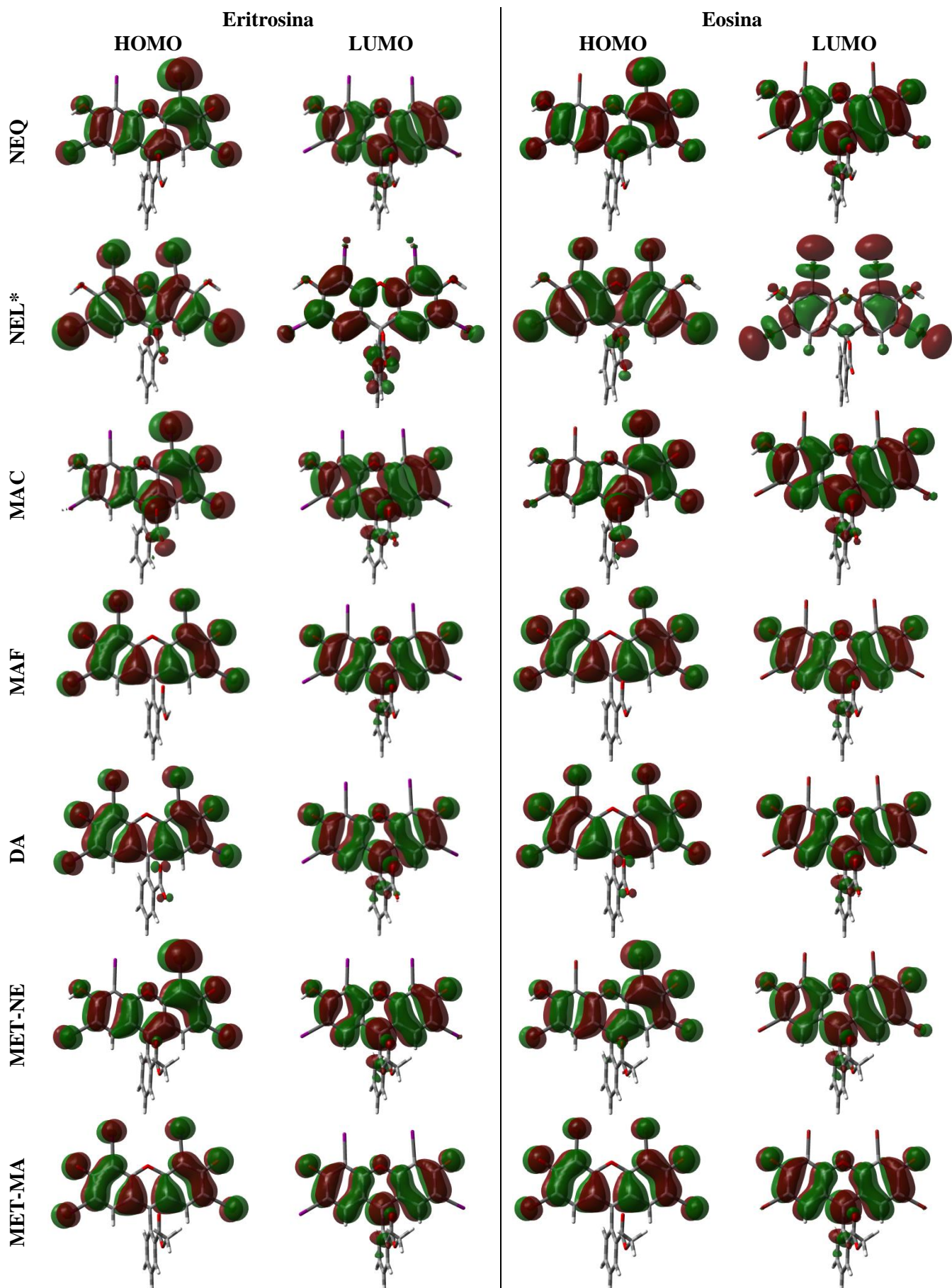
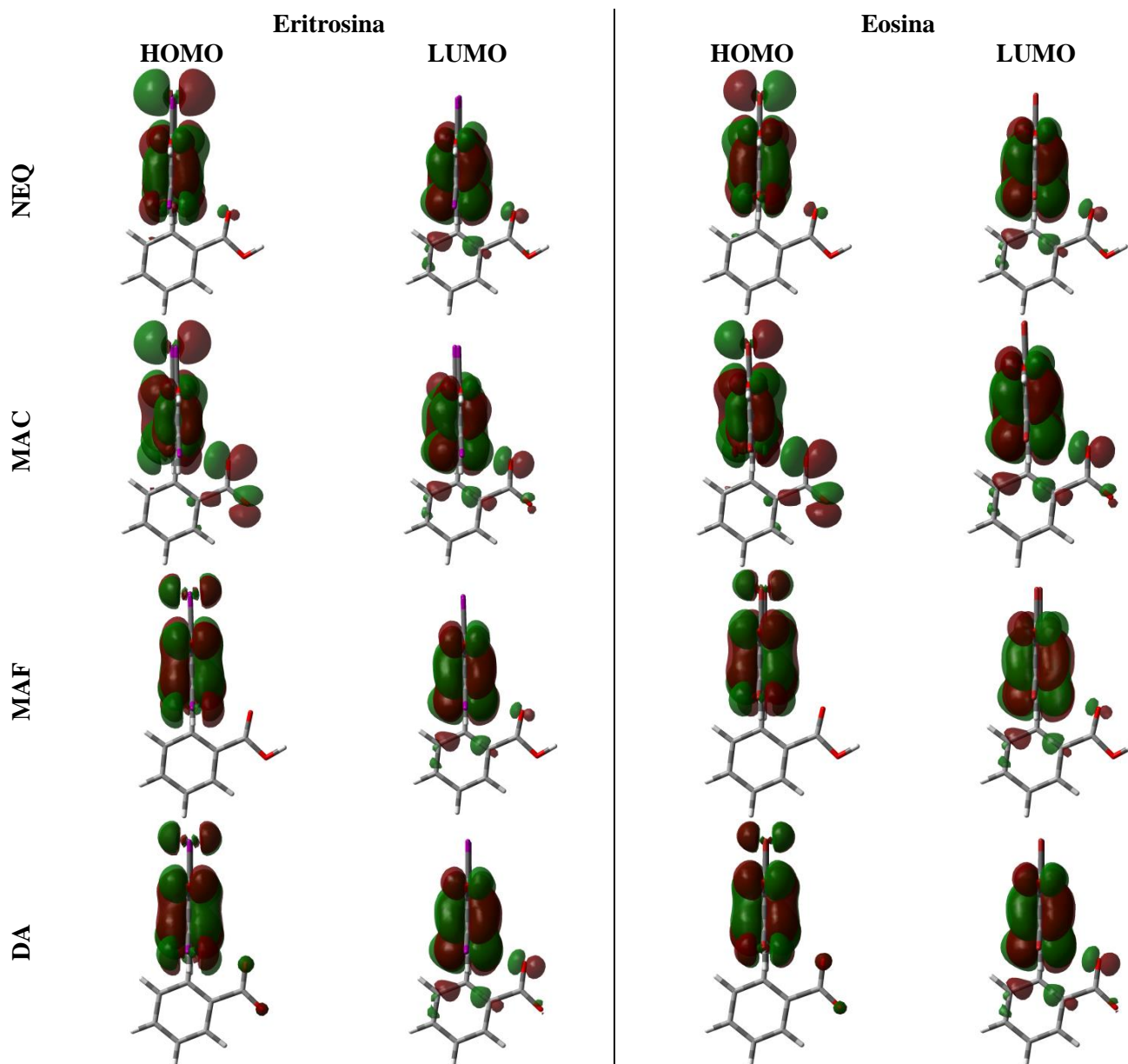


Figura 5.7. Vista frontal dos orbitais HOMO e LUMO ( $0,0004 \text{ e}/\text{\AA}^3$ ) da ERI e EOS em água obtidos com o B3LYP/DGDZVP e IEF-PCM/UFF. \*HOMO+4 para NEL.



**Figura 5.8.** Vista lateral dos orbitais HOMO e LUMO ( $0,0004 \text{ e}/\text{\AA}^3$ ) da ERI e EOS em água obtidos com o B3LYP/DGDZVP e IEF-PCM/UFF.

A Figura 5.8 evidencia que os orbitais HOMO do grupo  $-\text{COOH}$  em NEQ e MAF são pequenos ou inexistentes e não influenciam nos orbitais LUMO da parte xantênica da molécula, ou seja, praticamente não participam da transição eletrônica HOMO $\rightarrow$ LUMO. Enquanto isso os orbitais HOMO do grupo  $\text{COO}^-$  de MAC são grandes o bastante para se sobreporem aos orbitais LUMO, indicando a participação do grupo  $\text{COO}^-$  na transição eletrônica. Este fenômeno aliado às diferenças no grupo cromofórico de MAC e MAF causa diferenças de mais de 15 nm no valor de  $\lambda_{\text{máx}}$  destas espécies (Tabelas 5.21 e 5.22). O mesmo também ocorre com a forma DA, onde se observa a participação de orbitais HOMO e LUMO de  $\text{COO}^-$  na transição eletrônica.

Além disso, em relação à força do oscilador temos que  $f_{MAC}$  é ~0,05 unidades maior do que  $f_{NEQ}$  ou  $f_{MET-NE}$ . Portanto, a interação entre orbitais n do O8' (doador) com  $\pi^*$  de C9–C12 (aceptor) transfere densidade eletrônica para a parte xantênica da molécula, o que provavelmente contribui para a deslocalização eletrônica e aumenta a absorvidade molar de MAC em relação à NEQ ou MET-MA. Curiosamente para DA tem-se uma leve diminuição de  $f_{DA}$  em relação a  $f_{MAF}$  ou  $f_{MET-MA}$  (~0,02 unidades), indicando que a interação do orbital n do O8' com  $n^*$  do C9 não contribui para a deslocalização eletrônica da forma DA.

Portanto, a carga negativa em  $COO^-$  além de causar maior interação entre os orbitais n do O8' com orbitais antiligantes de C9–C12, alterando a absorvidade molar, também interferem na transição HOMO→LUMO causando deslocamentos de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  entre espécies com o mesmo grupo cromofórico.

## 6. CONCLUSÕES

Em geral, os cálculos de equilíbrio tautomérico experimental da ERI mostraram que as espécies tautoméricas mais representativas do equilíbrio protolítico em água são  $NEQ \rightleftharpoons MAC \rightleftharpoons DA$ , o que também ocorreu em SDS, onde MAC é favorável frente a MAF. Em altas proporções DMSO/água e meios micelares de CTAB e P-123, onde o corante encontra-se em um ambiente de constante dielétrica menor do que a água, o equilíbrio protolítico da ERI é representado principalmente pelas espécies  $NEL \rightleftharpoons MAF \rightleftharpoons DA$ . Para a EOS, apesar de NEL ter predominado em todos os meios, a forma MAF foi mais estabilizada frente a MAC em água, CTAB e P-123. Estes fenômenos sugeriram duas hipóteses: (i) com o aumento do pH, a formação de MAF a partir de NEL ocorre com a abertura do anel lactona formando MAC e, com posterior transferência de próton, forma-se MAF ou; (ii) ocorre deslocamento do equilíbrio tautomérico  $NEQ \rightleftharpoons NEL$  favorecendo a forma quinóide, da qual forma-se MAF. Assim, pela hipótese (ii), o equilíbrio  $NEQ \rightleftharpoons MAF \rightleftharpoons DA$  pode ser representativo para a EOS em todos os meios, exceto em SDS onde MAC prevaleceu. A inversão de  $pK_a$  ocorre em altas proporções de DMSO/água, em CTAB e P-123 para a ERI e, além destes meios, para a EOS também ocorre em água. Ou seja, nos meios em que a estabilidade de MAF prevalece sobre MAC ocorre o fenômeno de inversão de  $pK_a$ .

Em geral, os cálculos teóricos de  $K_T$  e  $pK_a$  confirmaram os fenômenos experimentais, sendo que as divergências ocorridas devem-se às limitações da aplicação de conjuntos de base adequados para moléculas grandes e contendo elementos volumosos como iodo e bromo. Dos níveis de teoria testados, verificou-se que apesar do M06-2X/DGDZVP e M06-2X/LANL2DZ(d,p) serem bons para o cálculo de  $pK_a$  da Eritrosina em água, principalmente com o modelo de solvatação SMD-Coulomb, as descrições dos equilíbrios de tautomerização foram totalmente inadequadas. Já os níveis B3LYP/DGDZVP e B3LYP/6-311++G(d,p) descreveram adequadamente tanto os valores de  $pK_a$  (quando usado SMD-Coulomb) quanto os

equilíbrios tautoméricos. Apesar do 6-311++G(d,p) proporcionar algumas melhorias nos resultados, elas não justificam o maior custo computacional em relação a DGDZVP.

Os modelos de solvente IEF-PCM e SMD causam diferenças irrelevantes nos resultados de  $K_T$  e algumas variações nos dados de  $pK_a$ , porém os conjuntos de raios de van der Waals fazem enorme diferença. O conjunto de raios SMD-Coulomb se destacou nos cálculos de  $pK_a$  por ser adequado aos cálculos de  $\Delta G_{sol}$  e também descreveu adequadamente a maioria dos equilíbrios tautoméricos, mas UFF reproduziu melhor os valores de  $K_{Q-L}$ .

A análise eletrostática mostrou que os altos momentos de dipolo e a maior concentração de cargas negativas de NEQ e MAC justificam suas maiores estabilidades em água em relação à NEL e MAF. A grande distribuição de cargas de MAF da ERI o faz mais estável em solventes pouco polares, causando a inversão de  $pK_a$ . No entanto, o grande momento de dipolo de MAF da EOS contribui para sua estabilidade em água, fazendo  $pK_{a-OH} < pK_{a-COOH}$ .

Foi visto ainda que a deslocalização de cargas NBO contribui significativamente para a estabilização da espécie MAF de EOS e ERI em DMSO. No entanto, a baixa deslocalização de cargas de ERI-MAC e EOS-MAF em água sugerem que a estabilidade destas espécies neste meio deve-se a efeitos estéricos e de solvatação, sendo então influenciada pelo momento de dipolo. Adicionalmente, verificou-se que a deslocalização de cargas diferenciada da espécie MAF de EOS e ERI é influenciada pela sobreposição de orbitais NBO  $\sigma$  de C-I ou C-Br com  $\pi^*$  de C-C, a qual é maior para a ERI do que para a EOS.

Nos cálculos de TD-DFT o nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) junto ao modelo de solvatação SMD-Coulomb mostrou menores erros, mas seu alto custo computacional não justifica seu uso, visto que apresentou valores muito parecidos ao B3LYP/DGDZVP. O modelo CIS mostrou-se inadequado ao sistema devido aos erros maiores de 140 nm. A análise dos espectros individuais de cada espécie tautomérica confirmou os resultados de frações molares e constantes de equilíbrio tautomérico calculados a partir dos espectros experimentais. Além disso, os espectros por TD-DFT mostraram que a suposição de  $\epsilon_{MET-NE} = \epsilon_{NEQ} = \epsilon_{MAC}$  e  $\epsilon_{MET-MA} = \epsilon_{MAF}$  é

adequada e permite confiabilidade nos cálculos de  $K_T$  para a descrição do deslocamento dos equilíbrios tautoméricos.

Através da análise espectral (experimental e por TD-DFT), dos orbitais NBO e dos orbitais HOMO-LUMO se verificou que a carga negativa do grupo  $\text{-COO}^-$  influencia na parte xantênica devido à interação orbitalar  $n\text{-}\pi^*$ . Elas originam alterações espectrais e no comportamento eletrostático em relação às espécies que possuem o grupo  $\text{-COOH}$  protonado.

Desta forma, a análise dos equilíbrios tautoméricos e protolíticos e o comportamento estrutural, eletrostático e orbitalar permitiu uma melhor compreensão do fenômeno de inversão de  $\text{pK}_a$  e a previsão da forma preferencial da Eosina e Eritrosina em determinado meio. Além disso, deve-se ter em vista que muitos dos resultados em meio homogêneo deste trabalho também podem ser estendidos na análise de sistemas micelares, usados como biomimetizadores e sistemas carreadores em TFD e IFDMO. Isso porque os microambientes com constante dielétrica e pH particulares das micelas induzem diferentes formas protolíticas e tautoméricas, tornando determinado meio adequado ou não ao uso do FS nestas modalidades terapêuticas.

## 7. REFERÊNCIAS

- Amat-Guerri, F.; López-Gonzalez, M. M. C.; Martínez-Utrila, R.; Sastre, R. Spectrophotometric determination of ionization and isomerization constants of Rose Bengal, eosin Y and some derivatives. *Dyes and Pigments* **1990**, 12, 249-272.
- Barnett, J.R.; Miller, S.; Pearce, E. Colour and art: A brief history of pigments. *Optics & Laser Technology* **2006**, 38, 445–453.
- Bates, R. G. *Determination of pH. Theory and practice*. New York: Wiley, **1964**.
- Batistela, V. R.; Cedran, J. C.; Oliveira, H. P. M.; Scarminio, I. S.; Ueno, L. T. Machado, A. E. H.; Hioka, N. Protolytic fluorescein species evaluated using chemometry and DFT studies. *Dyes and Pigments* **2010**, 86, 15-24.
- Batistela, V. R.; Pellosi, D. S.; Souza, F. D.; Costa, W. F.; Santin, S. M. O.; Souza, V. R.; Caetano, W.; Oliveira, H. P. M.; Scarminio, I. S.; Hioka, N. pK<sub>a</sub> determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV–Vis spectrophotometric data. *Spectrochimica Acta Part A* **2011**, 79, 889-897.
- Becke, A. D. Density-Functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A* **1988**, 38, 3098-3100.
- Bondi, A. van der Waals Volumes and Radii. *Journal of Physical Chemistry* **1964**, 68(3), 441-451.
- Brown, T. L.; LeMay, H. E.; Bursten, B. E.; Burdge, J. R. *Química: A Ciência Central*, 9 ed., São Paulo: Pearson Prentice Hall, **2005**.
- Bryantsev, V. S.; Diallo, M. S.; Goddard, W. A. Calculation of solvation free energies of charged solutes using mixed cluster/continuum models. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, 112(32) 9709-9719.
- Camaioni, D. M.; Schwerdtfeger, C. A. Comment on “Accurate experimental values for the free energies of hydration of H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>, and H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>”. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, 109, 10795-10797.
- Casida, M.E.; Huix-Rotllant, M. Progress in Time-Dependent Density-Functional Theory. *Annual Review of Physical Chemistry* **2012**, 63, 287–323.
- Celli, J. P.; Spring, B. Q.; Rizvi, I.; Evans, C. L.; Samkoe, K. S.; Verma, S.; Pongue, B. W.; Hasan, T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring and optimization. *Chemical Reviews* **2010**, 110(5), 2797-2838.

Check, C.E.; Faust, T.O.; Bailey, J.M.; Wright, B.J.; Gilbert, T.M.; Sunderlin, L.S. Addition of polarization and diffuse functions to the LANL2DZ basis set for p-block elements. *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, 105, 8111-8116.

Cohen, A. J.; Mori-Sánchez, P.; Yang, W. Challenges for Density Functional Theory. *Chemical Reviews* **2012**, 112, 289-320.

*CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 88. ed. David R. Lide (Ed.), **2007-2008**.

Estevão, B. M. Estudos físico-químicos da Eosina Y e derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Maringá, **2012**.

Fayter, D.; Corbett, M.; Heirs, M.; Fox, D.; Eastwood, A. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. *Health Technology Assessment* **2010**, 14(37), 1-129.

Ferreira, A. I. M. C. L.; Silva, M. A. V. R. Experimental and computational study of the thermochemistry of the three iodinitrobenzene isomers. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2013**, 59, 94-106.

Fiolhais, C.; Nogueira, F.; Marques, M. (Eds.). *A Primer in Density Functional Theory*. Heidelberg: Springer, **2003**.

Foresman, J. B.; Frisch, Æ. *Exploring chemistry with electronic structure methods*, 2 ed., Pittsburgh: Gaussian, Inc., **1996**.

Gatenby, R.A.; Gawlinski, E.T. A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Research* **1996**, 56(24), 5745-5753.

*Gaussian 09 User's Reference*: [http://www.gaussian.com/g\\_tech/g\\_ur/g09help.htm](http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/g09help.htm), acesso em 27/09/2013.

Gaussian 09, Revision A.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.



- Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 1793-1873.
- Gerola, A. P.; Santana, A.; França, P. B.; Tsubone, T. M.; Oliveira, H. P. M.; Caetano, W.; Kimura, E.; Hioka, N. Effects of Metal and the Phytyl Chain on Chlorophyll Derivatives: Physicochemical Evaluation for Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Photochemistry and Photobiology* **2011**, *87*, 884–894 [a].
- Gerola, A. P.; Tsubone, T. M.; Santana, A.; França, P. B.; Oliveira, H. P. M.; Hioka, N.; Caetano, W. Properties of Chlorophyll and Derivatives in Homogeneous and Microheterogeneous Systems. *Journal Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 7364-7373 [b].
- Glendenning, E.; Landis, C. R.; Weinhold, F. (Site Eds). *Tutorial on Energetic Analysis with NBO Deletions (\$DEL Keylist)*. Theoretical Chemistry Institute of the University of Wisconsin. {HYPERLINK “[http://www.chem.wisc.edu/~nbo5/TUT\\_DEL.HTM](http://www.chem.wisc.edu/~nbo5/TUT_DEL.HTM)”}, acesso em 06/02/2014.
- Glukhovtsev, M.N.; Pross, A.; McGrath, M.P.; Radom, L. Extension of Gaussian-2 (G2) theory to bromine- and iodine-containing molecules: Use of effective core potentials. *The Journal of Chemical Physics* **1995**, *103*, 1878.
- Godbout, N., Salahub, D.R., Andzelm, J., e Wimmer, E. Optimization of Gaussian-Type Basis-Set for Local Spin-Density Functional Calculations. 1. Born through Neon, optimization technique and validation. *Canadian Journal of Chemistry* **1992**, *70*, 560-571.
- Harris, D. C.; Bertolucci, M. D. *Symmetry and spectroscopy: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy*. New York: Dover, **1989**.
- Hehre, W. J. *A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations*. USA: Wavefunction, Inc., **2003**.
- Ho, J.; Coote, M. L. A universal approach for continuum solvent pK<sub>a</sub> calculations: are we there yet? *Theoretical Chemistry Accounts* **2010**, *125*, 3-21.
- Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review* **1964**, *3B*, 136, 865-871.
- Hohenstein, E. G.; Chill, S. T.; Sherrill, C. D. Assessment of the performance of the M05-2X and M06-2X exchange-correlation functionals for noncovalent interactions in biomolecules. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2008**, *4*, 1996-2000.
- Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L. *Inorganic Chemistry. principles of structure and reactivity*. 4 ed. New York: HarperCollins College Publishers, **1993**.
- Jang, Y. H.; Hwang, S.; Chung, D. S. Tautomeric equilibrium of Fluorescein in solution: *ab initio* calculations. *Chemistry Letters* **2001**, *30*, 1316- 1317.

- Jensen, F. Introduction to computational chemistry, 2 ed. England: John Wiley & Sons Ltd, **2007**.
- Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Adding explicit solvent molecules to continuum solvent calculations for the calculation of aqueous acid dissociation constants. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, 110(7), 2493-2499.
- Kibblewhite J. Drummond G .G. Grieser F. Thistlethwaite P. J. Lipoidal Eosin and Fluorescein derivatives as probes of the electrostatic characteristics of self-assembled surfactant/water interfaces. *Journal of Physical Chemistry* **1989**, 93, 7464.
- Kohn, W.; Sham, L. J. Self consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review* **1965**, 140, 420-A, 1133- 1138.
- Król, M.; Wrona, M.; Page, C. S.; Bates, P. A. Macroscopic  $pK_a$  calculations for Fluorescein and its derivatives. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2006**, 2, 1520-1529.
- Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3 ed., New York: Springer, **2006**.
- Lee, C.T.; Yang, W.T.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 1988 37, 785-789.
- Levine, I. N. *Physical Chemistry*, 6. ed. New York: McGraw-Hill, Inc., **2009**.
- Liptak, M. D.; Gross, K. C.; Seybold, P. G.; Feldgus, S.; Shields, G. C. Absolute  $pK_a$  determinations for substituted phenols. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 6421-6427.
- Março, P. H.; Scarmínio, I. S. Q-mode curve resolution of UV-vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 583(1), 138-146.
- Marcus, Y. Thermodynamic functions of transfer of single ions from water to nonaqueous and mixed solvents: Part I— Gibbs free energies of transfer to nonaqueous solvents. *Pure & Applied Chemistry* **1983**, 55(6), 977-1021.
- Marenich, A.V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, 113, 6378-6396.
- Marques, M.A.L.; Botti, S. O que é e para que serve a Teoria dos Funcionais da Densidade. *Gazeta de Física* **2006**, 29, 10-15.
- Mchedlov-Petrossyan, N. O.; Kleshchevnikova, V. N. Influence of the cetyltrimethylammonium chloride micellar pseudophase on the protolytic equilibria of oxyxanthene dyes at high bulk

- phase ionic strength. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions* **1994**, 90(4), 629-640.
- Mchedlov-Petrossyan, N. O.; Kukhitk, V. I.; Egorova, S. I. Protolytic equilibria of Fluorescein halo derivatives in aqueous-organic systems. *Russian Journal of General Chemistry* **2006**, 76, 1607-1617.
- Mchedlov-Petrossyan, N. O.; Kukhtik, V. I.; Bezugliy, V. D. Dissociation, tautomerism and electroreduction of xanthene and sulfonephthalein dyes in N,N-dimethylformamide and other solvents. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2003**, 16, 380-397.
- Mchedlov-Petrossyan, N. O.; Mayorga, R. S. Extraordinary character of the solvent influence on protolytic equilibria: inversion of the Fluorescein ionization constants in H<sub>2</sub>O-DMSO mixtures. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions* **1992**, 88(20), 3025-3032.
- Mchedlov-Petrossyan, N. O.; Vodolazkaya, N. A.; Surov, Y. N.; Samoylov, D. V. 2,4,5,7-Tetranitrofluorescein in solutions: novel type of tautomerism in hydroxyxanthene series as detected by various spectral methods. *Spectrochimica Acta Part A* **2005**, 61, 2747-2760.
- Mchedlov-Petrossyan, N. O.; Salamanova, N. V.; Vodolazkaya, N.A.; Gurina, Y.A.; Borodenko, V.I. A dibasic acid with reversed order of the stepwise ionization constants: 2,7-dichlorofluorescein in the ternary solvent mixture benzene-ethanol-water. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2006**, 19, 365-375.
- Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of *Ab initio* molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chemical Physics* **1981**, 55, 117-129.
- Morgon, N. H.; Coutinho, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. São Paulo: Livraria da Física, 2007.
- Mroz, P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G.B.; Hamblin, M.R. Cell death pathways in Photodynamic Therapy of cancer. *Cancers* **2011**, 3, 2516-2539.
- Mukerjee, P.; Ostrow, D. Effects of added dimethylsulfoxide on pK<sub>a</sub> values of uncharged organic acids and pH values of aqueous buffers. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 422-426.
- Nagata, J. Y.; Hioka, N.; Kimura, E.; Batistela, V. R.; Terada, R. S. T.; Graciano, A. X.; Baesso, M. L.; Hayacibara, M. F. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2012**, 9, 122-131.
- Nataraj, A.; Balachandran, V.; Karthick, T. Molecular orbital studies (hardness, chemical potential, electrophilicity, and first electron excitation), vibrational investigation and

- theoretical NBO analysis of 2-hydroxy-5-bromobenzaldehyde by density functional method. *Journal of Molecular Structure* **2013**, 1031, 221-233.
- Nunes, S. M. T.; Sguilla, F. S.; Tedesco, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2004**, 37, 273-284.
- Ochterski, J. W. *Thermochemistry in Gaussian*. Gaussian, 2000. Disponível em [http://www.gaussian.com/g\\_whitepap/thermo/thermo.pdf](http://www.gaussian.com/g_whitepap/thermo/thermo.pdf), acesso em 17/05/2013.
- Orte, A.; Crovetto, L.; Talavera, E. M.; Boens, N.; Alvarez-Pez, J. M. Absorption and emission study of 2*ϕ*,7*ϕ*-Difluorofluorescein and its excited-state buffer-mediated proton exchange reactions. *The Journal of Physical Chemistry A* **2005**, 109, 734-747.
- Palascak, M. W.; Shields, G. C. Accurate experimental values for the free energies of hydration of H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>, and H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. *Journal of Physical Chemistry A* **2004**, 108, 3692-3694.
- Pellosi, D. S. Estudos Físico-Químicos do corante Eritrosina B e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Maringá, **2012**.
- Pellosi, D. S.; Estevão, B. M.; Freitas, C. F.; Tsubone, T. M.; Caetano, W.; Hioka, N. Photophysical properties of Erythrosin ester derivatives in ionic and non-ionic micelles. *Dyes and Pigments* **2013**, 99, 705-712.
- Perdew, J. P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Physical Review B* **1986**, 33, 8822-8824.
- Perdew, J. P.; Schmidt, K. Jacob's Ladder of density functional approximations for the exchange-correlation energy. In *Density Functional Theory and Its Application to Materials*. Van Doren, V.; Van Alsenoy, C.; Geerlings, P. (Eds), **2001**, 577, 1-20.
- Perdew, J.P.; Zunger, A. Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. *Physical Review B* **1981**, 23, 5048-5079.
- Perussi, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos, *Química Nova* **2007**, 30(4), 988-994.
- Pervaiz, S.; Olivo, M. Art and science of Photodynamic Therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2006**, 33, 551-556.
- Pliego J. R. Modelos contínuos do solvente: fundamentos. *Química Nova* **2006**, 29(3), 535-342.
- Riccardi, D.; Guo, H-B.; Parks, J. M.; Gu, B.; Liang, L.; Smith, J. C. Cluster-continuum calculations of hydration free energies of anions and group 12 divalent cations. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2013**, 9, 555-569.

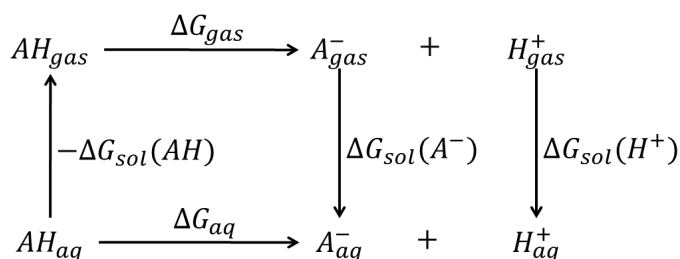
- Safarik, L.; Stránský, Z. Titrimetric analysis in organic solvents. Vol. XXII of *Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry*. Amsterdam: Elsevier Science Publ., **1986**.
- Savino, A.; Angeli, G. Photodynamic inactivation of *E. Coli* by immobilized or coated dyes on insoluble supports. *Water Research* **1985**, 19(12), 1465-1469.
- Shahid, M.; Shahid-ul-Islam, Mohammad. F. Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production* **2013**, 53, 310-331.
- Silva, E. F.; Svendsen, H. F.; Merz, K. M. Explicitly representing the solvation shell in continuum solvent calculations. *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, 113(22), 6404-6409.
- Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova* **2002**, 25(5), 801-807.
- Slyusareva E. A.; Tomilin, F. N.; Sizykh, A. G.; Tankevich, E. Y.; Kuzubov, A. A.; Ovchinnikov, S. G. The effect of halogen substitution on the structure and electronic spectra of fluorone dyes. *Spectroscopy of Atoms and Molecules* **2012**, 112(5), 671-678.
- Sosa, C.; Andzelm, J.; Elkin, B. C.; Wimmer, E.; Dobbs, K. D.; e Dixon, D. A. A Local Density Functional-Study of the Structure and Vibrational Frequencies of Molecular Transition-Metal Compounds. *Journal of Physical Chemistry* **1992**, 96, 6630-6636.
- Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *Ab initio* calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, 98(45), 11623-11627.
- Szabo, A. e Ostlund, N.S. *Modern Quantum Chemistry, Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Mineola, Nova York: Dover Publications, **1996**.
- Tissandier, M. D.; Cowen, K. A.; Feng, W. Y.; Gundlach, E.; Cohen, M. H.; Earhart, A. D.; Coe, J. V.; Tuttle, T. R., Jr. The proton's absolute aqueous enthalpy and Gibbs free energy of solvation from cluster-ion solvation data. *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, 102 (40), 7787-7794.
- Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical Reviews* **2005**, 105, 2999-3093.
- Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cancès, E. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **1999**, 464, 211-226.
- Trsic, M.; Pinto. M.F.S. *Química Quântica: Fundamentos e Aplicações*. Barueri, SP: Manole, **2009**.

- Turro, N. J. *Modern molecular photochemistry*. New York: University Science Books, **1991**.
- Tuttle, T. R.; Malaxos, S.; Coe, J. V. A new cluster pair method of determining absolute single ion solvation energies demonstrated in water and applied to Ammonia. *Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106* (6), 925-932.
- Valeur, B. *Molecular fluorescence: principles and applications*. Verlag GmbH: Wiley-VCH, **2002**.
- Vodolazkaya, N. A.; Gurina, Y. A.; Salamanova, N. V.; Mchedlov-Petrosyan, N. O. Spectroscopic study of acid–base ionization and tautomerism of fluorescein dyes in direct microemulsions at high bulk ionic strength. *Journal of Molecular Liquids* **2009**, *145*, 188-196 [a].
- Vodolazkaya, N. A.; Shakhova, P. V.; Mchedlov-Petrosyan, N. O. Acid–base and tautomeric equilibria of Fluorescein dyes in water micellar solutions of zwitterionic sulfobetaine surfactant. *Russian Journal of General Chemistry* **2009**, *79*(7), 1437-1445 [b].
- Wainwright, M. The emerging chemistry of blood product disinfection, *Chemical Society Reviews* **2002**, *31*, 128-136.
- Wang, X.; Song, M. Long, Y. Synthesis, Characterization, and Crystal Structure of the Lactone Form of Rhodamine B. *Journal of Solid State Chemistry* **2001**, *156*, 325-330.
- Wood, S.; Metcalf, D.; Devine, D.; Robinson, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *57*, 680-684.
- Young, D. C. *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real-world problems*. New York: John Wiley & Sons, **2001**.
- Zhao, Y.; Truhlar, D. G. Density functionals with broad applicability in chemistry. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*(2), 157-167 [a].
- Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts* **2008**, *120*, 215-241 [b].

## 8. ANEXOS

### Anexo 8.1. Resolução do ciclo termodinâmico para cálculo de pK<sub>a</sub>

A partir da resolução do ciclo termodinâmico (Figura 8.1), obtém-se  $\Delta G_{aq}$  a ser substituído na Eq 8.1 para calcular o pK<sub>a</sub>.



**Figura 8.1.** Ciclo termodinâmico para obter a variação da energia livre de Gibbs de desprotonação de HA em água ( $\Delta G_{aq}$ ) ou DMSO ( $\Delta G_{aq} = \Delta G_{dmsO}$ ).

$$pK_a = \frac{\Delta G_{aq}}{RT \ln 10} \quad (\text{Eq 8.1})$$

O ciclo termodinâmico é resolvido somando as variações das energias livres de Gibbs das espécies gasosas corrigidas para a condição padrão em solução de 1 mol/L ( $\Delta G_{gas}(1M)$ ) e a variação das energias de solvatação de cada espécie ( $\Delta \Delta G_{sol}$ ).

$$\Delta G_{aq} = \Delta G_{gas}(1M) + \Delta \Delta G_{sol} \quad (\text{Eq 8.2})$$

$$\text{Onde} \quad \Delta \Delta G_{sol} = \Delta G_{sol}(A^-) + \Delta G_{sol}(H^+) - \Delta G_{sol}(HA) \quad (\text{Eq 8.3})$$

Na fase gasosa a Energia livre de Gibbs ( $G_{gas}$ ) é calculada no estado padrão a 1 atm.

$$\Delta G_{gas}(1atm) = [G_{gas}(A^-) + G_{gas}(H^+)] - G_{gas}(HA) \quad (\text{Eq 8.4})$$

Mas como os valores de  $\Delta G_{sol}$  são calculados no estado de referência a 1 mol/L (1M) é necessário fazer a correção do  $\Delta G_{gas}(1atm)$  para  $\Delta G_{gas}(1M)$ . Isso é feito convertendo o  $\Delta G_{gas}$  para um gás ideal no estado de referência (24,46 L a 298,15 K) de 1 atm para 1M com a equação:

$$\Delta G_{gas}(1M) = \Delta G_{gas}(1atm) + RT \ln(24,46) \quad (\text{Eq 8.5})$$

Substituindo a Eq 8.4 em 8.5 temos:

$$\Delta G_{gas}(1M) = G_{gas}(A^-) + G_{gas}(H^+) - G_{gas}(HA) + RT \ln(24,46) \quad (\text{Eq 8.6})$$

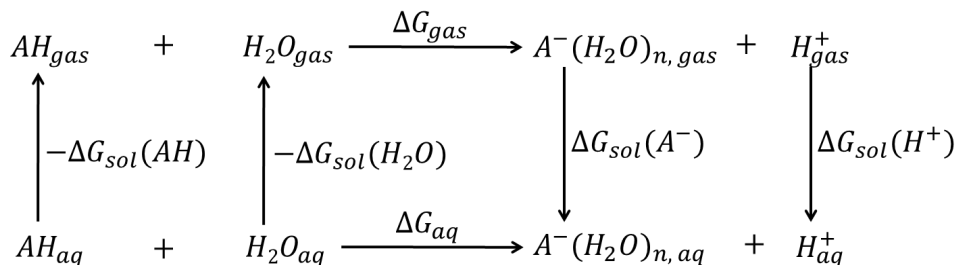
Combinando as Eq 8.3 e 8.6 em 8.2, obtemos a Eq 8.7 (igual à Eq 4.6), que é a mesma utilizada na metodologia de cálculos de  $pK_a$ .

$$\Delta G_{aq} = G_{gas}(A^-) + G_{gas}(H^+) - G_{gas}(HA) + RT \ln(24,46) + \Delta G_{sol}(A^-) + \Delta G_{sol}(H^+) - \Delta G_{sol}(HA) \quad (\text{Eq 8.7})$$



## **Anexo 8.2. Resolução do ciclo termodinâmico implícito-explicito para cálculo de $pK_a$**

A partir da resolução do ciclo termodinâmico (Figura 8.2), obtém-se  $\Delta G_{aq}$  a ser substituído na Eq 8.8 para calcular o  $pK_a$ .



**Figura 8.2.** Ciclo termodinâmico para obter a variação da energia livre de Gibbs de desprotonação de HA em água ( $\Delta G_{aq}$ ) através do modelo de solvatação implícito-explicito.

$$pK_a = \frac{\Delta G_{aq}}{RT \ln 10} - \log[H_2O] \quad (\text{Eq 8.8})$$

O ciclo termodinâmico é resolvido somando as variações das energias livres de Gibbs das espécies gasosas ( $\Delta G_{gas}$ ) e a variação das energias de solvatação de cada espécie ( $\Delta \Delta G_{sol}$ ). Neste caso não é necessário fazer a correção do estado padrão gasoso (1 atm) para o estado padrão em solução (1 mol/L) porque o número de mols de produtos e reagentes gasosos é igual, cancelando a correção (Kelly *et al.*, 2006).

$$\Delta G_{aq} = \Delta G_{gas} + \Delta \Delta G_{sol} \quad (\text{Eq 8.9})$$

Onde

$$\Delta \Delta G_{sol} = \Delta G_{sol}(A^-(H_2O)_n) + \Delta G_{sol}(H^+) - \Delta G_{sol}(HA) - \Delta G_{sol}(H_2O) \quad (\text{Eq 8.10})$$

$$\Delta G_{gas} = G_{gas}(A^-(H_2O)_n) + G_{gas}(H^+) - G_{gas}(HA) - G_{gas}(nH_2O) \quad (\text{Eq 8.11})$$

Assim, obtém-se a expressão de  $\Delta G_{aq}$  a ser substituída na Eq 8.8:

$$\Delta G_{aq} = G_{gas}(A^-(H_2O)_n) + G_{gas}(H^+) - G_{gas}(HA) - G_{gas}(nH_2O) + \Delta G_{sol}(A^-(H_2O)_n) + \Delta G_{sol}(H^+) - \Delta G_{sol}(HA) - \Delta G_{sol}(H_2O) \quad (\text{Eq 8.12})$$

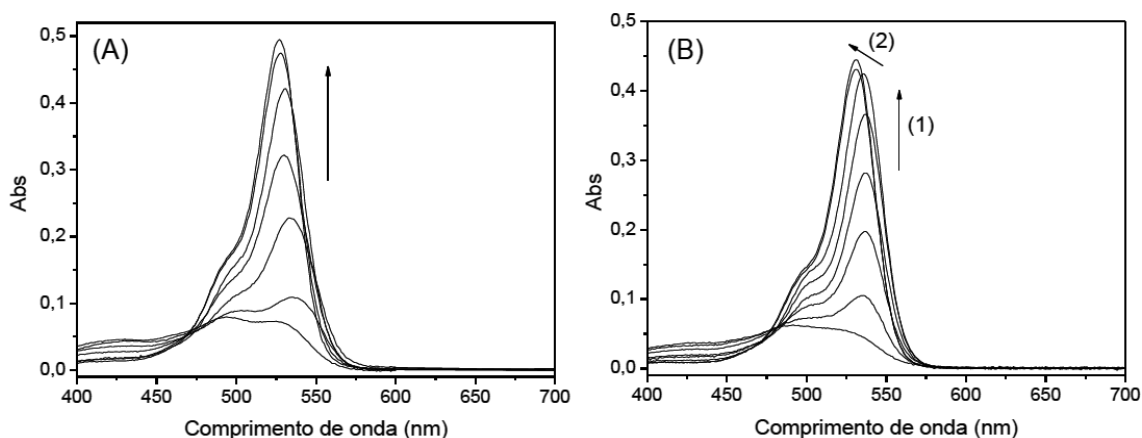
**Anexo 8.3. Resultados da Eritrosina e Eosina apresentados na dissertação de Pellosi (2012) e Estevão (2012)**

**Tabela 8.1.** Valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) das espécies protolíticas nos comprimentos de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\max}$ ) em misturas de água/DMSO, meio aquoso micelar de SDS ( $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), CTAB ( $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e P-123 ( $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos com o método quimiométrico da Matriz-K por Pellosi (2012).

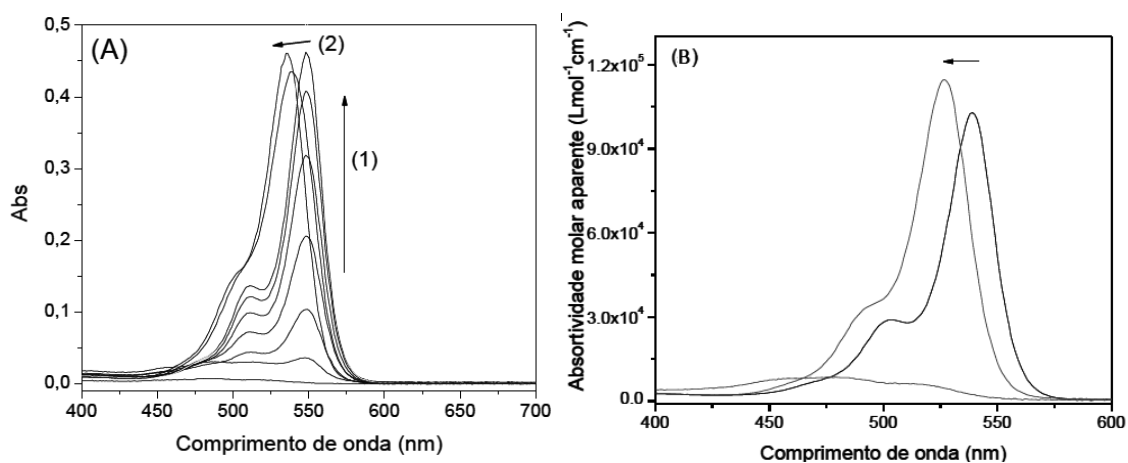
		$\lambda_{\max} \text{ (nm)}; \epsilon \text{ (} 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$							
		% DMSO					SDS	CTAB	P-123
		0	20	40	60	70			
ERI	NE	491 ; 15,6	493; 15,8	492; 10,5	490; 5,3	494; 3,2	519; 14,2	491; 7,8	0
	MA	529 ; 41,2	533; 31,7	535; 84,9	540; 93,6	543; 95,6	529; 25,2	535; 108,7	547; 102,0
	DA	527 ; 96,5	527; 99,0	530; 93,3	531; 98,5	532; 100,5	527; 95,1	543; 112,2	537; 109,3
ERIMET	NE	491; 19,8	492; 20,1	494; 18,8	494; 19,3	493; 20,6	489; 26,8	491; 22,5	484; 20,7
	MA	527; 92,8	531; 95,6	535; 97,6	539; 99,7	541; 101,4	535; 96,9	543; 106,4	545; 104,2

**Tabela 8.2.** Valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) das espécies protolíticas nos comprimentos de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\max}$ ) em misturas de água/DMSO, meio aquoso micelar de SDS ( $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), CTAB ( $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e P-123 ( $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos com o método quimiométrico da Matriz-K por Pellosi (2012).

		$\lambda_{\max} \text{ (nm)}; \epsilon \text{ (} 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$			
		Água	SDS	CTAB	P-123
EOS	NE	470; 7,5	482; 10,7	0	0
	MA	519; 51,7	519; 33,4	540; 102,9	538; 83,8
	DA	517; 96,7	517; 95,9	524; 114,6	528; 84,3
EOSMET	NE	470; 16,8	479; 28,5	483; 30,1	477; 24,5
	MA	517; 97,2	530; 81,3	540; 109,3	540; 91,1

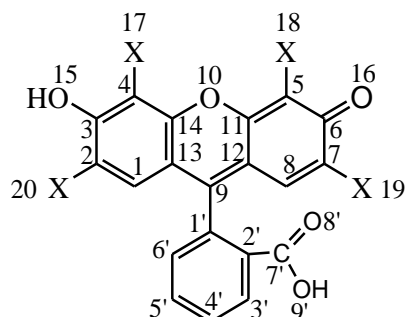


**Figura 8.3.** Espectros da ERI em diferentes proporções (v/v) de água/DMSO. (A) 20% DMSO. (B) 40% DMSO. As setas indicam a variação de absorvância com o aumento do pH,  $[FS]=5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $[NaCl]=0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , (pHs de 0 a 8) (Pellosi (2012)).



**Figura 8.4.** Espectros de absorção em diferentes pHs. A) ERI em solução aquosa de P-123 ( $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e B) EOS em solução aquosa de CTAB ( $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). As setas indicam a variação de absorvância com o aumento do pH,  $[FS]=5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $[NaCl]=0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , (pHs de 0 a 8) (Pellosi (2012) e Estevão (2012)).

**Anexo 8.4. Resultados adicionais da análise estrutural e eletrostática da Eritrosina B, Eosina e seus derivados metil-ésteres**



**Figura 8.5.** Estrutura neutra quinóide (NEQ) numerada de acordo com a IUPAC.

**Tabela 8.3.** Variação da energia livre de solvatação ( $\Delta G_{\text{sol}}$ ), em kcal/mol, obtidas com B3LYP/DGDZVP em água com o modelo implícito SMD-Coulomb e implícito-explicito de solvatação para os tautômeros neutros e monoaniônicos da EOS e ERI, a 298,15 K.

		$\Delta G_{\text{sol}}$ (kcal/mol)							
		ERI				EOS			
		NEQ	NEL	MAC	MAF	NEQ	NEL	MAC	MAF
Implícito	Água	-26,01	-22,59	-65,07	-54,93	-13,58	-8,16	-52,97	-45,88
	DMSO	-16,83	-15,11	-47,29	-43,09	-	-	-	-
Ímplicito-explicito*	Água	-31,33	-28,81	-64,94	-56,23	-20,81	-16,65	-56,14	-47,46

\*o valor de  $\Delta G_{\text{sol}}(\text{H}_2\text{O}) = -6,32$  kcal/mol foi subtraído do resultado.

**Tabela 8.4.** Plano cartesiano (x, y, z) das espécies otimizadas da Eosina Y e Eritrosina B em B3LYP/DGDZVP e IEF-PCM/UFF em água a 298,15 K.

ERITROSINA Y	
<b>ERI-NEZ</b>	<b>ERI-NEL</b>
1 1	0 1
C 3.66747 0.57995 -0.03186	C 3.66388 0.59042 -0.05040
C 2.50575 1.33268 0.07444	C 2.50279 1.34110 0.05990
C 1.24653 0.72614 0.16093	C 1.24730 0.72832 0.15787
C 1.18303 -0.67160 0.12706	C 1.18627 -0.66976 0.12866
C 2.34823 -1.44829 0.02534	C 2.35337 -1.44491 0.02369
C 3.60939 -0.83137 -0.05294	C 3.60794 -0.82069 -0.06442
C 0.00004 1.55545 0.37096	C -0.00000 1.55305 0.38258
C -1.18904 -0.66502 0.12669	C -1.18626 -0.66977 0.12866
C -1.24890 0.73062 0.16090	C -1.24730 0.72832 0.15786
C -2.50883 1.34170 0.07504	C -2.50279 1.34110 0.05989
H -2.58092 2.42672 0.09868	H -2.56613 2.42342 0.07700
C -3.66895 0.59197 -0.03109	C -3.66387 0.59041 -0.05041
C -3.61599 -0.82043 -0.05432	C -3.60793 -0.82070 -0.06442
C -2.35810 -1.44104 0.02335	C -2.35336 -1.44491 0.02369
H 2.57981 2.41751 0.09728	H 2.56612 2.42343 0.07701
C 0.00208 2.87755 -0.37669	C -0.00000 2.88800 -0.34314
C 0.00204 3.11996 -1.74925	C -0.00000 3.15885 -1.71066
C 0.00337 3.93146 0.53323	C -0.00001 3.92398 0.58660
C 0.00365 4.45532 -2.17496	C -0.00001 4.50159 -2.11004
H 0.00074 2.30456 -2.47307	H 0.00000 2.36235 -2.44959
C 0.00501 5.26819 0.12215	C -0.00002 5.26762 0.20128
C 0.00519 5.51941 -1.25260	C -0.00002 5.54677 -1.16747
H 0.00359 4.67518 -3.24277	H -0.00001 4.74153 -3.16987
H 0.00599 6.07992 0.84968	H -0.00002 6.06132 0.94288
H 0.00638 6.54611 -1.61794	H -0.00002 6.57719 -1.51136
O -0.00517 -1.35270 0.19089	O 0.00000 -1.35287 0.20197
O -4.78992 -1.48087 -0.15774	O 4.70431 -1.60891 -0.16568
O 4.68803 -1.63981 -0.15084	H 5.50808 -1.05386 -0.21797
H 5.53601 -1.14034 -0.19548	C -0.00001 3.34034 1.94352
C 0.00213 3.37233 1.89877	O -0.00001 1.97760 1.82304
O 0.00049 2.00920 1.80651	O -0.00002 3.88858 3.03083
O 0.00208 3.93982 2.97868	I 2.25231 -3.56266 -0.00474
I 2.23294 -3.56664 -0.01434	I -2.25230 -3.56267 -0.00471
I -2.22225 -3.55984 -0.01851	I -5.54908 1.57568 -0.19420
I -5.54935 1.57856 -0.15758	I 5.54908 1.57569 -0.19419
I 5.53863 1.58935 -0.15959	O -4.70430 -1.60892 -0.16568
H -4.67907 -2.46009 -0.15622	H -5.50808 -1.05387 -0.21796
<b>ERI-NEQ</b>	<b>ERI-MAC</b>
0 1	-1 1
C 3.62552 0.55840 -0.20419	C 3.62541 0.56892 -0.17052
C 2.45917 1.29651 -0.24255	C 2.45967 1.30991 -0.17815
C 1.19903 0.66427 -0.18328	C 1.19981 0.68082 -0.11870
C 1.16439 -0.74531 -0.09056	C 1.16235 -0.72791 -0.05604
C 2.33835 -1.50534 -0.04776	C 2.33717 -1.49125 -0.04378
C 3.58509 -0.85734 -0.10142	C 3.58468 -0.84747 -0.09967
C -0.04305 1.38807 -0.20962	C -0.04034 1.41829 -0.11125
C -1.21640 -0.75672 -0.09073	C -1.21658 -0.73445 -0.05645
C -1.23675 0.68432 -0.18413	C -1.23570 0.70083 -0.13380

C -2.52441 1.32605 -0.22604 H -2.55286 2.40762 -0.29107 C -3.67298 0.60427 -0.18466 C -3.69187 -0.87209 -0.09155 C -2.37222 -1.49786 -0.04882 H 2.50265 2.37637 -0.32003 C -0.02619 2.87611 -0.37294 C -0.09325 3.38066 -1.67894 C 0.06408 3.78258 0.70910 C -0.07080 4.75846 -1.91854 H -0.16237 2.68912 -2.51388 C 0.08242 5.16503 0.45631 C 0.01766 5.65365 -0.84887 H -0.12368 5.12620 -2.93950 H 0.14770 5.85449 1.29050 H 0.03440 6.72460 -1.02893 O -0.01949 -1.41361 -0.03855 O -4.75167 -1.52084 -0.05245 O 4.69215 -1.62317 -0.05349 H 5.49320 -1.06136 -0.09326 C 0.13356 3.27758 2.11038 O 0.15583 2.09589 2.42557 O 0.17180 4.26667 3.03222 H 0.21873 3.84057 3.91120 I 2.26794 -3.61695 0.09875 I -2.32736 -3.61235 0.08179 I -5.55987 1.57732 -0.25292 I 5.50844 1.54849 -0.30174	C -2.51970 1.33919 -0.18242 H -2.54601 2.42172 -0.23217 C -3.67097 0.61579 -0.16007 C -3.69552 -0.85636 -0.07926 C -2.37664 -1.47689 -0.03114 H 2.50100 2.39150 -0.22687 C -0.02155 2.89786 -0.33117 C -0.08770 3.36835 -1.65349 C 0.07347 3.81289 0.73403 C -0.05616 4.74069 -1.91944 H -0.16200 2.66028 -2.47520 C 0.10124 5.18616 0.45278 C 0.03965 5.65405 -0.86242 H -0.10738 5.09147 -2.94698 H 0.17046 5.87623 1.28849 H 0.06307 6.72196 -1.06503 O -0.02140 -1.39867 -0.00397 O -4.75834 -1.50862 -0.05480 O 4.69303 -1.61721 -0.08575 H 5.49243 -1.05379 -0.12934 C 0.13726 3.30881 2.17529 O 0.12563 2.04365 2.30533 O 0.19523 4.16542 3.09883 I 2.26396 -3.60660 0.05681 I -2.33122 -3.59508 0.07878 I -5.55754 1.59708 -0.23787 I 5.51000 1.55940 -0.26255
<b>ERI-MAF</b> -1 1 C 3.65085 0.57481 -0.18679 C 2.49587 1.30134 -0.23392 C 1.21759 0.66601 -0.18832 C 1.19592 -0.76169 -0.09343 C 2.36077 -1.50374 -0.04705 C 3.67992 -0.88958 -0.08565 C 0.00000 1.37170 -0.21796 C -1.19590 -0.76169 -0.09342 C -1.21758 0.66600 -0.18835 C -2.49586 1.30133 -0.23400 H -2.53113 2.38254 -0.30744 C -3.65084 0.57478 -0.18685 C -3.67990 -0.88960 -0.08562 C -2.36075 -1.50375 -0.04698 H 2.53113 2.38257 -0.30731 C -0.00000 2.86073 -0.38804 C 0.00004 3.35204 -1.70137 C -0.00005 3.78255 0.68496 C 0.00003 4.72627 -1.95908 H 0.00007 2.64856 -2.52930 C -0.00005 5.16313 0.41426 C -0.00001 5.63612 -0.89772 H 0.00007 5.08039 -2.98638 H -0.00009 5.86411 1.24124	<b>ERI-DA</b> -2 1 C 3.64921 0.58361 -0.15714 C 2.49340 1.31184 -0.18689 C 1.21614 0.67873 -0.14428 C 1.19472 -0.74700 -0.06892 C 2.36195 -1.49072 -0.03850 C 3.68079 -0.87997 -0.07618 C -0.00000 1.39527 -0.14825 C -1.19471 -0.74701 -0.06892 C -1.21613 0.67872 -0.14427 C -2.49340 1.31183 -0.18688 H -2.52536 2.39426 -0.24050 C -3.64921 0.58359 -0.15713 C -3.68079 -0.87998 -0.07621 C -2.36193 -1.49073 -0.03853 H 2.52535 2.39427 -0.24052 C -0.00000 2.87895 -0.35622 C 0.00000 3.33101 -1.68805 C -0.00003 3.81533 0.69786 C -0.00000 4.69702 -1.98303 H 0.00001 2.60556 -2.49819 C -0.00003 5.18409 0.38352 C -0.00002 5.63052 -0.93981 H 0.00000 5.02612 -3.01918 H -0.00004 5.88951 1.20877

H -0.00002 6.70525 -1.08975 O 0.00001 -1.42559 -0.04545 O -4.74587 -1.54538 -0.03830 O 4.74589 -1.54536 -0.03837 C -0.00009 3.30657 2.09884 O -0.00011 2.13523 2.44905 O -0.00010 4.31940 2.99950 H -0.00014 3.91094 3.88784 I 2.31034 -3.62291 0.08565 I -2.31031 -3.62291 0.08591 I -5.53698 1.56326 -0.26228 I 5.53699 1.56330 -0.26214	H -0.00002 6.69572 -1.15856 O 0.00001 -1.41464 -0.02440 O -4.74850 -1.53825 -0.04433 O 4.74851 -1.53823 -0.04431 C -0.00003 3.38126 2.16994 O -0.00000 2.13219 2.38469 O -0.00006 4.30087 3.03842 I 2.31062 -3.61302 0.06535 I -2.31061 -3.61304 0.06526 I -5.53587 1.57624 -0.22835 I 5.53587 1.57625 -0.22839
<b>EOSINA Y</b>	
<b>EOS-NEZ</b> 1 1 C 3.66504 0.32816 0.02173 C 2.51302 1.09058 0.11182 C 1.25005 0.48312 0.15515 C 1.18243 -0.91272 0.09700 C 2.34945 -1.68906 0.00280 C 3.61056 -1.08042 -0.03467 C -0.00001 1.31962 0.32572 C -1.18231 -0.91280 0.09700 C -1.25002 0.48305 0.15516 H -2.59263 2.17126 0.15377 C -3.66500 0.32793 0.02170 C -3.61043 -1.08065 -0.03467 C -2.34929 -1.68921 0.00284 H 2.59254 2.17142 0.15386 C -0.00006 2.59389 -0.50294 C -0.00001 2.75366 -1.88725 C -0.00027 3.69949 0.34243 C -0.00016 4.06034 -2.39230 H 0.00014 1.89962 -2.55885 C -0.00043 5.00840 -0.14874 C -0.00037 5.17720 -1.53543 H -0.00012 4.21556 -3.46775 H -0.00058 5.85890 0.52698 H -0.00048 6.17695 -1.96018 O 0.00008 -1.60020 0.12373 O -4.70775 -1.86610 -0.12849 O 4.70793 -1.86580 -0.12851 H 5.50761 -1.30426 -0.14865 C -0.00026 3.22221 1.74023 O -0.00007 1.85252 1.72465 O -0.00039 3.85076 2.78260 Br 2.23580 -3.58977 -0.07958 Br -2.23552 -3.58991 -0.07944 Br -5.38278 1.18262 -0.02680 Br 5.38277 1.18295 -0.02671 H -5.50748 -1.30461 -0.14861 C -2.51303 1.09042 0.11178	<b>EOS-NEL</b> 0 1 C 3.66500 0.32804 0.02140 C 2.51302 1.09051 0.11151 C 1.25004 0.48309 0.15502 C 1.18237 -0.91277 0.09700 C 2.34936 -1.68915 0.00282 C 3.61048 -1.08054 -0.03485 C 0.00000 1.31957 0.32573 C -1.18237 -0.91277 0.09700 C -1.25004 0.48309 0.15502 C -2.51302 1.09051 0.11151 H -2.59258 2.17136 0.15341 C -3.66500 0.32804 0.02140 C -3.61048 -1.08054 -0.03485 C -2.34936 -1.68915 0.00282 H 2.59258 2.17136 0.15341 C 0.00000 2.59404 -0.50263 C -0.00000 2.75414 -1.88692 C 0.00000 3.69945 0.34297 C -0.00000 4.06094 -2.39166 H -0.00000 1.90027 -2.55873 C 0.00000 5.00848 -0.14789 C -0.00000 5.17760 -1.53453 H -0.00000 4.21640 -3.46708 H 0.00000 5.85882 0.52804 H -0.00000 6.17745 -1.95908 O 0.00000 -1.60019 0.12387 O 4.70782 -1.86597 -0.12871 H 5.50753 -1.30446 -0.14889 C 0.00000 3.22187 1.74068 O 0.00000 1.85215 1.72480 O 0.00000 3.85018 2.78318 Br 2.23566 -3.58986 -0.07930 Br -2.23566 -3.58986 -0.07930 Br -5.38276 1.18278 -0.02722 Br 5.38276 1.18278 -0.02723 O -4.70782 -1.86597 -0.12871 H -5.50753 -1.30446 -0.14889

<p><b>EOS-NEQ</b></p> <p>O 1</p> <p>C 3.60689 0.30498 -0.22464</p> <p>C 2.44597 1.04720 -0.27380</p> <p>C 1.18698 0.41115 -0.20700</p> <p>C 1.15689 -0.99655 -0.09327</p> <p>C 2.33425 -1.74990 -0.04563</p> <p>C 3.58059 -1.10835 -0.10938</p> <p>C -0.06098 1.12610 -0.24828</p> <p>C -1.21534 -1.02460 -0.08725</p> <p>C -1.24954 0.41393 -0.20752</p> <p>C -2.54406 1.04125 -0.25761</p> <p>H -2.59307 2.12081 -0.34062</p> <p>C -3.68018 0.30288 -0.19962</p> <p>C -3.69267 -1.17183 -0.08280</p> <p>C -2.36443 -1.77330 -0.02911</p> <p>H 2.49703 2.12579 -0.36435</p> <p>C -0.05571 2.60937 -0.44960</p> <p>C -0.13109 3.07752 -1.76868</p> <p>C 0.03041 3.54525 0.60717</p> <p>C -0.12070 4.44844 -2.04545</p> <p>H -0.19760 2.36307 -2.58431</p> <p>C 0.03670 4.92052 0.31713</p> <p>C -0.03623 5.37291 -1.00062</p> <p>H -0.17998 4.78791 -3.07583</p> <p>H 0.09867 5.63294 1.13204</p> <p>H -0.02915 6.43871 -1.20972</p> <p>O -0.01787 -1.67456 -0.02719</p> <p>O -4.74439 -1.83123 -0.03502</p> <p>O 4.69304 -1.86363 -0.06000</p> <p>H 5.48363 -1.29045 -0.11982</p> <p>C 0.10776 3.07806 2.02102</p> <p>O 0.13680 1.90511 2.36703</p> <p>O 0.14517 4.09138 2.91594</p> <p>H 0.19784 3.68928 3.80582</p> <p>Br 2.26190 -3.64522 0.10323</p> <p>Br -2.27375 -3.67226 0.12659</p> <p>Br -5.38460 1.16563 -0.26599</p> <p>Br 5.31095 1.17658 -0.31296</p>	<p><b>EOS-MAC</b></p> <p>-1 1</p> <p>C 3.60677 0.32005 -0.19955</p> <p>C 2.44651 1.06574 -0.21593</p> <p>C 1.18778 0.43345 -0.14316</p> <p>C 1.15489 -0.97381 -0.05836</p> <p>C 2.33278 -1.73070 -0.03919</p> <p>C 3.57997 -1.09372 -0.10790</p> <p>C -0.05835 1.16278 -0.14566</p> <p>C -1.21546 -0.99750 -0.05705</p> <p>C -1.24843 0.43583 -0.15652</p> <p>C -2.53964 1.05908 -0.21450</p> <p>H -2.58686 2.14016 -0.27814</p> <p>C -3.67819 0.31799 -0.18344</p> <p>C -3.69581 -1.15311 -0.08586</p> <p>C -2.36839 -1.74871 -0.02350</p> <p>H 2.49529 2.14622 -0.28157</p> <p>C -0.05109 2.63844 -0.38997</p> <p>C -0.12339 3.08654 -1.71974</p> <p>C 0.03720 3.57142 0.66008</p> <p>C -0.10450 4.45466 -2.00782</p> <p>H -0.19291 2.36466 -2.52980</p> <p>C 0.05206 4.94015 0.35668</p> <p>C -0.01556 5.38589 -0.96590</p> <p>H -0.16044 4.78833 -3.04080</p> <p>H 0.11565 5.64419 1.18111</p> <p>H -0.00236 6.45052 -1.18593</p> <p>O -0.01965 -1.65426 0.00818</p> <p>O -4.75034 -1.81718 -0.06065</p> <p>O 4.69340 -1.85352 -0.08758</p> <p>H 5.48271 -1.27882 -0.14484</p> <p>C 0.10678 3.09139 2.10917</p> <p>O 0.10809 1.82835 2.25964</p> <p>O 0.15610 3.96326 3.01864</p> <p>Br 2.25703 -3.63012 0.07574</p> <p>Br -2.27444 -3.65301 0.10610</p> <p>Br -5.38334 1.18917 -0.26197</p> <p>Br 5.31253 1.19157 -0.29978</p>
<p><b>EOS-MAF</b></p> <p>-1 1</p> <p>C 3.64640 0.29378 -0.21391</p> <p>C 2.49886 1.02967 -0.26925</p> <p>C 1.21773 0.40051 -0.21234</p> <p>C 1.19203 -1.02476 -0.09341</p> <p>C 2.35523 -1.76716 -0.03835</p> <p>C 3.67860 -1.16880 -0.09495</p> <p>C 0.00000 1.10632 -0.25303</p> <p>C -1.19208 -1.02473 -0.09340</p> <p>C -1.21774 0.40054 -0.21233</p> <p>C -2.49886 1.02973 -0.26923</p> <p>H -2.54724 2.10931 -0.35790</p> <p>C -3.64641 0.29387 -0.21389</p> <p>C -3.67866 -1.16871 -0.09493</p>	<p><b>EOS-DA</b></p> <p>-2 1</p> <p>C 3.64471 0.30559 -0.18802</p> <p>C 2.49653 1.04384 -0.22062</p> <p>C 1.21628 0.41716 -0.16426</p> <p>C 1.19090 -1.00669 -0.06765</p> <p>C 2.35612 -1.75150 -0.03291</p> <p>C 3.67910 -1.15664 -0.09144</p> <p>C -0.00000 1.13410 -0.17631</p> <p>C -1.19086 -1.00672 -0.06765</p> <p>C -1.21627 0.41713 -0.16427</p> <p>C -2.49653 1.04377 -0.22063</p> <p>H -2.54178 2.12499 -0.28797</p> <p>C -3.64470 0.30550 -0.18803</p> <p>C -3.67905 -1.15673 -0.09145</p>



<p> C -2.35530 -1.76710 -0.03834  H 2.54727 2.10924 -0.35792  C 0.00002 2.59211 -0.44832  C -0.00002 3.06067 -1.76994  C 0.00009 3.53215 0.60874  C 0.00001 4.43029 -2.05117  H -0.00007 2.34308 -2.58567  C 0.00013 4.90793 0.31438  C 0.00008 5.35821 -1.00555  H -0.00002 4.76677 -3.08440  H 0.00018 5.62308 1.12912  H 0.00011 6.42389 -1.21595  O -0.00003 -1.68953 -0.03022  O -4.74131 -1.82916 -0.04870  O 4.74124 -1.82927 -0.04872  C 0.00013 3.08058 2.03062  O 0.00003 1.91551 2.40119  O 0.00028 4.10894 2.91356  H 0.00029 3.71595 3.80884  Br 2.26903 -3.67307 0.11783  Br -2.26914 -3.67301 0.11785  Br -5.34541 1.18634 -0.29384  Br 5.34541 1.18620 -0.29387 </p>	<p> C -2.35606 -1.75156 -0.03291  H 2.54175 2.12506 -0.28794  C -0.00003 2.61518 -0.40057  C 0.00002 3.05280 -1.73727  C -0.00011 3.56291 0.64341  C -0.00003 4.41552 -2.04705  H 0.00009 2.31866 -2.53953  C -0.00017 4.92818 0.31405  C -0.00013 5.36026 -1.01400  H 0.00000 4.73348 -3.08669  H -0.00024 5.64232 1.13172  H -0.00018 6.42304 -1.24429  O 0.00003 -1.67495 -0.00571  O -4.74327 -1.82021 -0.06462  O 4.74334 -1.82009 -0.06461  C -0.00013 3.14677 2.12084  O -0.00005 1.90064 2.35198  O -0.00017 4.07775 2.97716  Br 2.26740 -3.66168 0.09456  Br -2.26729 -3.66175 0.09454  Br -5.34481 1.20185 -0.26997  Br 5.34480 1.20198 -0.26995 </p>
<p> <b>EOSMET-NE</b>  O 1  C 3.60503 0.17634 -0.35110  C 2.44617 0.91677 -0.45092  C 1.18531 0.29056 -0.34195  C 1.15111 -1.10610 -0.13305  C 2.32636 -1.85796 -0.03465  C 3.57465 -1.22587 -0.14006  C -0.06029 1.00583 -0.43031  C -1.22084 -1.12585 -0.12176  C -1.25081 0.30101 -0.34001  C -2.54338 0.92747 -0.43090  H -2.58832 1.99882 -0.58901  C -3.68177 0.19877 -0.31836  C -3.69863 -1.26407 -0.09917  C -2.37230 -1.86498 -0.01031  H 2.49978 1.98669 -0.61374  C -0.04989 2.47092 -0.73786  C -0.10902 2.84027 -2.08946  C 0.02493 3.48036 0.24899  C -0.09360 4.18662 -2.46632  H -0.16681 2.06769 -2.85113  C 0.03633 4.83013 -0.14218  C -0.02021 5.18470 -1.49035  H -0.13970 4.44982 -3.51946  H 0.09052 5.59968 0.61945  H -0.00860 6.23250 -1.77664  O -0.02551 -1.77472 -0.02087  O -4.75216 -1.91513 -0.00053  O 4.68484 -1.97955 -0.03799  C 0.09016 3.11254 1.69679 </p>	<p> <b>EOSMET-MA</b>  -1 1  C 3.64758 0.18031 -0.32522  C 2.49878 0.90812 -0.43615  C 1.21853 0.28189 -0.34122  C 1.19501 -1.13198 -0.12585  C 2.35949 -1.86677 -0.01861  C 3.68189 -1.27074 -0.10721  C -0.00015 0.98191 -0.43303  C -1.18870 -1.13595 -0.12680  C -1.21662 0.27788 -0.34206  C -2.49881 0.89990 -0.43822  H -2.54825 1.97089 -0.60003  C -3.64532 0.16836 -0.32826  C -3.67514 -1.28281 -0.11046  C -2.35089 -1.87458 -0.02079  H 2.54482 1.97930 -0.59773  C -0.00247 2.44824 -0.74432  C 0.00046 2.80657 -2.10084  C -0.00822 3.47045 0.23279  C -0.00208 4.14786 -2.49391  H 0.00466 2.02441 -2.85503  C -0.01088 4.81690 -0.17468  C -0.00777 5.15779 -1.52704  H 0.00029 4.39861 -3.55125  H -0.01526 5.59564 0.57931  H -0.00976 6.20291 -1.82358  O 0.00421 -1.79367 -0.02140  O -4.73641 -1.94019 -0.01374  O 4.74515 -1.92473 -0.00938  C -0.01112 3.13216 1.69022 </p>

O 0.13038 1.96129 2.11185	O -0.00322 1.99442 2.13998
O 0.10254 4.18721 2.50521	O -0.02366 4.22883 2.47410
C 0.17360 3.91654 3.92721	C -0.02770 3.99077 3.90246
Br 2.24843 -3.73909 0.23968	Br 2.27709 -3.75921 0.25657
Br -2.28776 -3.74980 0.27002	Br -2.26275 -3.76694 0.25376
Br -5.38428 1.06030 -0.43894	Br -5.34604 1.05185 -0.46076
Br 5.31121 1.03653 -0.49590	Br 5.34560 1.06928 -0.45637
H 0.17243 4.89491 4.40531	H -0.03724 4.97990 4.35819
H 1.09204 3.37508 4.16221	H 0.86873 3.44139 4.19696
H -0.69318 3.33316 4.24362	H -0.91803 3.42765 4.18949
H 5.47736 -1.41298 -0.12761	

**Tabela 8.5.** Cargas de Mulliken obtidas com B3LYP/6-311++G(d,p) e modelo de solvente SMD-Coulomb em água e DMSO de alguns elementos representativos (numeração na Figura 1.1) dos tautômeros NEQ, NEL e MAF da Eritrosina (ERI) e Eosina (EOS) e seus derivados metil-éster neutros (MET-NE) e monoaniônicos (MET-MA), a 298,15 K.

	NEQ		MAC		MAF		DA		MET-NE		MET-MA		
	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	ÁGUA	VÁCUO	
<b>ERI</b>	<b>O15</b>	-0,132	-0,046	-0,137	-0,065	-0,420	-0,198	-0,449	-0,223	-0,132	-0,048	-0,439	-0,199
	<b>O16</b>	-0,377	-0,138	-0,397	-0,186	-0,420	-0,198	-0,449	-0,223	-0,378	-0,140	-0,439	-0,199
	<b>H-O15</b>	0,297	0,218	0,297	0,209	-	-	-	-	0,297	0,218	-	-
	<b>I17</b>	0,066	0,072	0,061	0,021	-0,002	-0,029	-0,006	-0,085	0,066	0,071	-0,001	-0,030
	<b>I18</b>	0,023	0,036	0,014	-0,043	-0,002	-0,029	-0,006	-0,085	0,023	0,034	-0,001	-0,031
	<b>I19</b>	0,020	0,021	0,009	-0,060	-0,012	-0,075	-0,016	-0,132	0,020	0,020	-0,010	-0,077
	<b>I20</b>	0,061	-0,009	0,056	-0,052	-0,012	-0,076	-0,016	-0,132	0,061	-0,011	-0,010	-0,078
	<b>O9'</b>	-0,215	-0,188	-0,590	-0,395	-0,231	-0,179	-0,598	-0,379	-	-	-	-
	<b>H-O9'</b>	0,343	0,288	-	-	0,339	0,280	-	-	-	-	-	-
<b>EOS</b>	<b>O15</b>	-0,089	-0,055	-0,096	-0,076	-0,389	-0,238	-0,400	-0,278	-0,090	-0,056	-0,389	-0,236
	<b>O16</b>	-0,320	-0,157	-0,340	-0,208	-0,388	-0,238	-0,400	-0,278	-0,321	-0,159	-0,389	-0,237
	<b>H-O15</b>	0,303	0,265	0,302	0,250	-	-	-	-	0,303	0,265	-	-
	<b>Br17</b>	-0,004	0,022	-0,008	-0,032	-0,074	-0,092	-0,078	-0,150	-0,004	0,021	-0,074	-0,092
	<b>Br18</b>	-0,054	-0,056	-0,051	-0,091	-0,073	-0,092	-0,078	-0,158	-0,055	0,028	-0,074	-0,092
	<b>Br19</b>	-0,107	-0,078	-0,119	-0,149	-0,136	-0,174	-0,143	-0,231	-0,106	-0,078	-0,134	-0,175
	<b>Br20</b>	-0,143	-0,157	-0,150	-0,205	-0,135	-0,174	-0,143	-0,231	-0,142	-0,156	-0,134	-0,160
	<b>O9'</b>	-0,211	-0,158	-0,586	-0,407	-0,220	-0,178	-0,595	-0,444	-	-	-	-
	<b>H-O9'</b>	0,342	0,287	-	-	0,329	0,280	-	-	-	-	-	-