



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FÍSICA
UNIDADE ACADÊMICA DE FÍSICA

Diego Giraldo Guzmán

Estudo das Biomoléculas do *Capsicum Annuum* via UV-Vis, PAS e TDDFT

Campina Grande, Paraíba, Brasil

18 de janeiro de 2022

Diego Giraldo Guzmán

**Estudo das Biomoléculas do *Capsicum Annuum* via
UV-Vis, PAS e TDDFT**

Dissertação realizada sob orientação do Prof. Dr. Kennedy Leite Agra, apresentada à Unidade Acadêmica de Física em complementação aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Professor Dr. Kennedy Leite Agra

Campina Grande, Paraíba, Brasil

18 de janeiro de 2022

G993e Guzmán, Diego Giraldo.
Estudo das biomoléculas do *Capsicum Annuum* via UV-Vis, PAS e TDDFT / Diego Giraldo Guzmán. – Campina Grande, 2022.
118 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2022.

“Orientação: Prof. Dr. Kennedy Leite Agra”.

Referências.

1. Espectroscopia Fotoacústica e UV-Visível Convencional.
2.. Carotenoides 3. Clorofilas. 4. Efeito Solvente. 5. Simulação Computacional da TDDFT. 6. *Capsicum Annuum* – Pimentão. I. Agra, Kennedy Leite. II. Título.

CDU 502.131.1:633.842(043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO EM FISICA

Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

DIEGO GIRALDO GUZMÁN

Estudo das Biomoléculas do Capsicum Annuum via UV-Vis, PAS e TDDFT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovada em: 31/08/2021

Kennedy Leite Agra

Presidente da Comissão e Orientador

Renilton Correia da Costa

Examinador Interno

Ubiratan Correia Silva

Examinador Externo



Documento assinado eletronicamente por **Ubiratan Correia Silva, Usuário Externo**, em 31/08/2021, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **KENNEDY LEITE AGRA, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/08/2021, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **RENILTON CORREIA DA COSTA, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/08/2021, às 19:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1703324** e o código CRC **09BC955C**.

Referência: Processo nº 23096.050784/2021-33

SEI nº 1703324



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO EM FISICA

Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

REGISTRO DE PRESENÇA E ASSINATURAS

REGISTRO DE PRESENÇA E ASSINATURAS

ATA DA DEFESA PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM FÍSICA, REALIZADA EM 31 DE AGOSTO DE 2021

Aos trinta e um dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e um, reuniram-se em caráter de solenidade pública, os membros da comissão designada para avaliar **DIEGO GIRALDO GUZMÁN** ao grau de Mestre em Física, área de concentração Física. Foram componentes da Banca Examinadora os especialistas: o professor **Kennedy Leite Agra** (Orientador) – Doutor em Física, o professor **Renilton Correia da Costa** – Doutor em Física, o professor **Ubiratan Correia Silva** – Doutor em Física, sendo os dois primeiros, integrantes do corpo docente da Universidade Federal de Campina Grande, e o terceiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. HORA DE INÍCIO: **14h00** – LOCAL: **Sala Virtual, em virtude da suspensão de atividades na UFCG decorrente do corona vírus**. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca, professor **Kennedy Leite Agra**, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **DIEGO GIRALDO GUZMÁN**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado, intitulado **"Estudo das Biomoléculas do Capsicum Annuum via UV-Vis, PAS e TDDFT"**. Após discorrer o referido tema, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Ato contínuo, passou a Comissão, em caráter secreto, a proceder a avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito Aprovado. Face à aprovação, declarou o Presidente estar o(a) avaliado(a), legalmente habilitado(a) a receber o Grau de Mestre em Física, cabendo à Universidade Federal de Campina Grande, providências para a expedição do Diploma a que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Hélio Pereira de Oliveira, secretário, lavrei a ata, que submeto a aprovação da Comissão Examinadora. Campina Grande, 31 de agosto de 2021.

Hélio Pereira de Oliveira
Secretário

Kennedy Leite Agra
Presidente da Comissão e Orientador

Renilton Correia da Costa
Examinador Interno

Ubiratan Correia Silva
Examinador Externo

Diego Giraldo Guzmán
Candidato(a)

João Rafael Lúcio dos Santos
Coordenador do Programa

2 - APROVAÇÃO

2.1. Segue a presente Ata de Defesa de Tese de Mestrado do(a) candidato(a) **DIEGO GIRALDO GUZMÁN**, assinada eletronicamente pela Comissão Examinadora acima identificada.

2.2. No caso de examinadores externos que não possuam credenciamento de usuário externo ativo no SEI, para igual assinatura eletrônica, os examinadores internos signatários certificam que os examinadores externos acima identificados participaram da defesa da tese e tomaram conhecimento do teor deste documento.



Documento assinado eletronicamente por **Ubiratan Correia Silva, Usuário Externo**, em 31/08/2021, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Giraldo Guzmán, Usuário Externo**, em 31/08/2021, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **KENNEDY LEITE AGRA, PROFESSOR 3 GRAU**, em 31/08/2021, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOAO RAFAEL LUCIO DOS SANTOS, COORDENADOR (A)**, em 31/08/2021, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **RENILTON CORREIA DA COSTA, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/08/2021, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1703313** e o código CRC **0E5658FC**.

Referência: Processo nº 23096.050784/2021-33

SEI nº 1703313

A minha companheira da vida, Vanessa.

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Kennedy, pela sua orientação, sugestão, estímulo e competência com que conduziu este trabalho.
- Aos professores Rodrigo e Suassuna pela colaboração que recebi durante a fase experimental deste trabalho de dissertação.
- A todos os professores da Unidade Acadêmica de Física que contribuíram com a minha formação.
- Aos meus familiares pelo apoio, confiança e incentivo.
- Aos colegas de pós-graduação, em especial aos meus colegas do Laboratório de Espectroscopia Fotoacústica, aos funcionários da Unidade Acadêmica de Física pela grata convivência durante a minha permanência nesta Unidade.
- Ao senhor Helio e ao Professor João por sempre estar a disposição para me auxiliar nos documentos e declarações requeridas.
- À CAPES pelo suporte financeiro o qual foi indispensável para minha permanência no país.
- A todos que direta ou indiretamente possibilitaram a conclusão deste trabalho.

*“A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo”
(Nelson Mandela)*

RESUMO

Neste trabalho são estudadas as biomoléculas presentes no *Capsicum Annuum* (pimentão) e os efeitos que alguns solventes provocam nelas. Os pimentões são frutos constituídos por um conjunto complexo de biomoléculas nas quais encontramos os carotenoides e as clorofilas, estes dois tipos de biomoléculas contribuem para que estes frutos apresentem diferentes cores. O estudo e análise destes conjuntos de biomoléculas foram realizadas com amostras *in-natura*, suco e soluções preparadas em água (H_2O), álcool (OH), álcool misturado com ácido clorídrico (OH-HCl) na proporção de 10:1, respectivamente, e hexano. Dentre a complexidades das cores dos pimentões foram escolhidos pimentões verdes, amarelos, laranja e vermelhos. Neste sentido, foram utilizadas técnicas experimentais de espectroscopia UV- Visível convencional e Fotoacústica, que possibilitam obter informações das transições eletrônicas entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO destas biomoléculas, estas técnicas tem princípios de detecção diferente possibilitando resultados experimentais mais robustos. Além disto, foram realizadas simulações computacionais mediante o método de TDDFT onde foram obtidos espectros de absorção de algumas destas biomoléculas, as informações obtidas nestes espectros de absorção são usadas para confrontar os resultados obtidos experimentalmente.

Palavras-chave: Espectroscopia Fotoacústica e UV-Visível Convencional, Carotenoides, Clorofilas, Efeito Solvente, Simulação Computacional da TDDFT.

ABSTRACT

In this work, the biomolecules present in *Capsicum Annuum* (pepper) and the effects that some solvents cause on them are studied. Peppers are fruits made up of a complex set of biomolecules in which we find carotenoids and chlorophylls, these two types of biomolecules contribute to these fruits having different colors. The study and analysis of these sets of biomolecules was carried out on samples *in-natura*, juice and solutions prepared in water (H_2O), alcohol (OH), alcohol mixed with hydrochloric acid (OH-HCl) in the proportion of 10:1, respectively, and hexane. Among the complexities of the colors of the peppers, green, yellow, orange and red peppers were chosen. In this sense, experimental techniques of conventional UV-Visible and Photoacoustic spectroscopy were used, which make it possible to obtain information on the electronic transitions between the HOMO-LUMO molecular orbitals of these biomolecules, these techniques have different detection principles enabling more robust experimental results. In addition, computational simulations were carried out using the TDDFT method, where absorption spectra of some of these biomolecules were obtained, the information obtained from these absorption spectra are used to compare the results obtained experimentally.

Keywords: Conventional UV-Visible and Photoacoustic Spectroscopy, Carotenoids, Chlorophylls, Solvent Effect, TDDFT Computational Simulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração da Morfologia dos Pimentões.	29
Figura 2 – Estrutura geral dos Carotenoides, com 8 unidades de Isopreno. Adaptado de [43].	37
Figura 3 – Diagrama da estrutura molecular de alguns Carotenoides: A - Carotenos: (a) licopeno, (b) β -caroteno e (c) α -caroteno; B - Xantofilas: (d) zeaxantina, (e) luteína, (f) astaxantina. Adaptado de [34].	38
Figura 4 – Estrutura química da clorofila A e B . Adaptado de [49].	39
Figura 5 – Espectro de absorção de alguns carotenoides (Solvente Acetona). Extraído de [57]	40
Figura 6 – Diagrama das forças de interações da molécula H_2 . Fonte própria.	41
Figura 7 – Diagrama de corpo livre da molécula H_2^+ . Extraído de [60].	42
Figura 8 – Representação de um orbital molecular ligante (σ_g) e antiligante (σ_u^*). Adaptado de [61].	43
Figura 9 – (a) Diagrama do orbital molecular do H_2 . (b) Variação da energia de ligação com a distância internuclear. Adaptado de [62].	43
Figura 10 – (a) Formação do MO $2p\sigma_g$ e $2p\sigma_u^*$ a partir da combinação de dois AO $2p_z$. (b) Formação do MO $2p_{x,y}\pi_u$ e $2p_{x,y}\pi_g^*$ a partir da combinação de dois AO $2p_{x,y}$. Adaptado de [63].	44
Figura 11 – Energia dos níveis eletrônicos moleculares com suas principais transições. Adaptado de [62].	45
Figura 12 – Região do espectro eletromagnético onde são observadas as principais transições dos MO. Adaptado de [62].	45
Figura 13 – Diagrama do correlação do MO para o butadieno. Adaptado de [62].	47
Figura 14 – Espectro de absorção UV-Vis dos polienos $CH_3(CH = CH)_n CH_3$, obtidos pela simulação computacional usando a TDDFT, onde A, B e C corresponde a $n = 3, 4, 5$ respectivamente. Fonte própria.	48

Figura 15 – Exemplo de solvatação, a parte negativa da molécula do solvente (esfera vermelha) é atraída pela parte positiva da molécula do soluto. Extraída de [67].	49
Figura 16 – Classificação geral dos solventes.	50
Figura 17 – Representação esquemática das ligações e o dipolo resultante, (a) - diagrama de molécula polar, (b) - diagrama de molécula apolar. Extraída de [71].	51
Figura 18 – Representação do solvatocromismo negativo e positivo. Adaptado de [69].	52
Figura 19 – Efeito dos solventes polares nas transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Adaptado de [62].	52
Figura 20 – Fluxograma do ciclo SCF de Kohn-Sham no calculo DFT e TDDFT. Adaptado de [92].	67
Figura 21 – Esquema das experiências de espectroscopia, a luz transmitida é luz que atravessou a amostra e que foi parcialmente absorvida pela amostra, a luz difundida resulta do espalhamento da luz incidente por colisão com a amostra, a luz emitida é luz com origem na própria amostra (em resultado de um processo físico desencadeado pela luz incidente). Fonte própria.	68
Figura 22 – Diagrama de Jablonski simplificado. Extraído de [95].	69
Figura 23 – Diagrama esquemático da Lei de Lambert-Beer, na qual se observa graficamente a absorção de radiação monocromática incidente λ com intensidade I_0 pela solução de comprimento l , absorção molar α e concentração C . Fonte própria.	70
Figura 24 – a) Ilustração da geração de ondas de pressão e calor, dentro da câmara fotoacústica fechada [33]. b) Seção transversal de uma câmara fotoacústica fechada simples, proposta por Rosencwaig e Gersho. Adaptado de [103].	73
Figura 25 – Distribuição espacial da temperatura dependente do tempo dentro da camada de gás adjacente à interface da amostra. Adaptada de [102]	78
Figura 26 – Pimentões utilizados, limpos, firmes e com casca brilhante. Fonte própria.	82
Figura 27 – Processamento para obtenção do suco dos pimentões. Fonte própria.	83
Figura 28 – Espectro de absorção de UV-Vis do suco do pimentão amarelo antes e depois da lavagem do processador de alimentos com sabão neutro e abundante água. Fonte própria.	84
Figura 29 – Esquema do diagrama em bloco do Espectrômetro Fotoacústico. Extraída de [103].	85
Figura 30 – Esquema do diagrama em bloco da Câmera Fotoacústica. Extraída de [103].	86

Figura 31 – Metodologia realizada para obter o espectro de absorção PAS para o suco dos pimentões Amarelo, Vermelho e Laranja. Fonte própria.	87
Figura 32 – Esquematização do espectrômetro Cary 50 Bio, mostrando o trajeto percorrido pelo feixe de luz passando pela amostra ate atingir o fotodetector. Adaptada de [103].	88
Figura 33 – Metodologia da preparação para obter os espectros de absorção UV-Vis dos sucos dos pimentões, no circulo vermelho (na figurinha da direita) é destacada a cubeta que teve ser fabricada e adaptada na montagem do espectrômetro para fazer as medidas. Fonte própria.	90
Figura 34 – Espectro de absorção UV-Vis obtidos dos sucos dos pimentões, os quais foram preparados e realizados nos anos 2020 e 2021. (a) Suco pimentão verde, (b) Suco pimentão amarelo, (c) Suco pimentão laranja, (d) Suco pimentão vermelho.	92
Figura 35 – Espectro de absorção UV-Vis de soluções realizadas com pimentões <i>in-natura</i> e suco com água. (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho.	95
Figura 36 – Espectro de absorção UV-Vis das soluções realizadas com pimentões <i>in-natura</i> e suco com hexano. (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho.	98
Figura 37 – Espectro de absorção UV-Vis das soluções realizadas com pimentões <i>in-natura</i> e suco com álcool. (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho.	100
Figura 38 – Comparação entre os espectro de absorção UV-Vis do suco puro de cada pimentão e as diferentes soluções preparadas com os pimentões <i>in-natura</i> . (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho.	102
Figura 39 – Comparação entre os espectro de absorção UV-Vis do suco puro de cada pimentão e as diferentes soluções preparadas com os sucos dos pimentões. (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho	105
Figura 40 – Espectro de absorção fotoacústico do suco dos pimentões amarelo, laranja e vermelho, também se apresentam suas respectivas deconvoluções gaussianas para cada uma das bandas de absorção, as quais ao realizar a convolução reproduz o espectro de absorção fotoacústico.	108
Figura 41 – Espectro de absorção UV-Vis obtidos pela simulação computacional de algumas biomoléculas pertencentes ao grupo dos carotenoides e que segundo as informações da tabela 2 estão presentes nos pimentões utilizados.	112

Figura 42 – Diagrama dos Orbitais Moleculares HOMO e LUMO das biomoléculas dos carotenoides, as quias foram obtidos no Software Gaussian 09 a partir dos cálculos do TDDFT de cada uma delas. 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fitoquímicos bioativos em pimentões [20].	29
Tabela 2 – Alguns carotenoides presentes nos pimentões [21, 22, 23, 24, 25, 26, 27].	30
Tabela 3 – Teor de micronutrientes minerais presentes nos pimentões [28, 14, 15, 16, 17].	31
Tabela 4 – Teor de micronutrientes vitaminas presentes nos pimentões [28, 14, 15, 16, 17].	31
Tabela 5 – Solventes polares próticos comuns [74]	53
Tabela 6 – Solventes polares apróticos comuns [75]	53
Tabela 7 – Solventes apolares comuns [76]	54
Tabela 8 – Parâmetros considerados na teoria proposta por Rosencwaig e Gersho.	73
Tabela 9 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis do suco do pimentão verde, amarelo, laranja e vermelho.	94
Tabela 10 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis das soluções correspondentes aos pimentões <i>in-natura</i> e suco em água.	97
Tabela 11 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis das soluções correspondentes aos pimentões <i>in-natura</i> e suco em hexano.	99
Tabela 12 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis das soluções em álcool com os pimentões <i>in-natura</i> e em suco.	101
Tabela 13 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis das soluções realizadas em diferentes solventes com os pimentões <i>in-natura</i> e em suco.	107
Tabela 14 – Informações das bandas de absorção dos espectros PAS do suco do pimentão amarelo, laranja e vermelho.	110
Tabela 15 – Informações obtidas a partir das simulações computacionais de cada uma das biomoléculas selecionadas para fazer os cálculos.	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UAF	Unidade Acadêmica de Física
PPGF	Programa de Pós-Graduação em Física
PAS	Espectroscopia Fotoacústica
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
TDDFT	Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo
HOMO	Orbital Molecular mais Alto Ocupado (em inglês, Highest Occupied Molecular Orbital)
LUMO	Orbital Molecular mais Baixo Desocupado (em inglês, Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
MO	Orbital Molecular (em inglês, Molecular Orbital)
AO	Orbital Atômico (em inglês, Atomic Orbital)
CLOA	Combinação Lineal de Orbitais Atômicos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Motivação e delimitação do problema	31
1.2	Objetivo	32
1.3	Organização do Trabalho	32
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	35
2.1	Carotenoides e Clorofilas	35
2.1.1	Propriedades dos Carotenoides e as Clorofilas	37
2.1.2	Solubilidade	39
2.1.3	Absorbância	40
2.2	Teoria dos Orbitais Moleculares	40
2.2.1	Tipos de Transições Eletrônicas	44
2.2.2	Efeito da Conjugação	47
2.3	Solventes	49
2.3.1	Polaridade dos Solventes	49
2.3.1.1	Classificação dos Solventes	50
2.3.2	Efeito do Solvente	51
2.3.3	Constante dielétrica e momento dipolar	53
2.4	Simulação Computacional	54
2.4.1	Aproximação de Born - Oppenheimer	54
2.4.2	Método de Hartree-Fock	56
2.4.3	Teoria do Funcional de Densidade	61
2.4.3.1	Funcional e Base	64
2.4.3.2	Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo	66
2.5	Teoria da Espectroscopia UV-Vis e PAS	67
2.5.1	Interação radiação-matéria	67
2.5.2	Lei de Lambert-Beer	70
2.5.3	Modelo da PAS	71
2.5.3.1	Método de detecção PAS	72
2.5.3.2	Fundamentação teórica da PAS	72
3	MATERIAIS E MÉTODOS	81

3.1	 Materiais	81
3.1.1	Preparo das amostras	82
3.2	 Espectroscopia Fotoacústica (PAS)	85
3.2.1	Elementos e Funcionamento do Espectrômetro Fotoacústico	85
3.2.2	Medidas das amostras na PAS	87
3.3	 Espectroscopia UV-Visível Convencional	88
3.3.1	Elementos e Funcionamento do Espectrômetro UV-Visível Convencional	88
3.3.2	Medidas das amostras - UV-Vis	89
3.4	 Simulação computacional	90
4	 RESULTADOS	91
4.1	Espectros de Absorção UV-Vis Convencional	91
4.2	Espectros de Absorção PAS	108
4.3	Cálculo Computacional	111
5	 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	115
	REFERÊNCIAS	117

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As biomoléculas são compostos químicos que formam a matéria viva e resultam da união dos bioelementos¹ por ligações químicas, entre as quais se destacam as covalentes. As biomoléculas podem ser classificadas em dois grupos, *orgânicas* e *inorgânicas*. As biomoléculas *orgânicas* são constituídas por átomos de carbono, os quais se unem pelo menos com alguns átomos de hidrogênio e/ou oxigênio, em muitos casos também com átomos de nitrogênio, fósforo e enxofre, este grupo de moléculas são exclusivas dos seres vivos; As biomoléculas inorgânicas são aquelas que podem estar presentes em seres vivos, mas também podem estar em elementos inertes como por exemplo a água [1].

Entre a grande variedade de biomoléculas orgânicas que temos na natureza, se encontram os carotenoides e as clorofilas. Os carotenoides são divididos em dois grupos: carotenos, que são hidrocarbonetos; e xantofilas, que são hidrocarbonetos oxigenados [2]. Enquanto que a clorofila presente nos frutos está dividida em clorofila **a** e **b**. Esses dois tipos de biomoléculas propiciam nos seres vivos uma complexa combinação de cores, ou seja, pigmentações naturais, determinadas pela concentração das biomoléculas constituintes. As clorofilas absorvem comprimentos de onda de luz em torno do azul (400 – 500) nm e vermelho (600 – 800) nm, enquanto refletem a faixa do espectro eletromagnético (500 – 600) nm correspondente na sua maioria a cor verde [3]. Por outro lado, os carotenoides são biomoléculas responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha, e suas combinações [4]. Os carotenoides estão presentes em tecidos fotossintéticos em que desempenham a função de proteger a clorofila e o aparelho fotossintético contra a fotodegradação. Além disso, os carotenoides absorvem luz mais eficientemente numa faixa de comprimentos de ondas onde a clorofila não absorve com eficiência, proporcionando uma absorção de luz mais ampla na região visível do espectro eletromagnético, a energia luminosa absorvida é

¹ bioelementos são elementos químicos (mais de 60 elementos da tabela periódica) que fazem parte dos seres vivos. Cerca de 96,2% da massa da maioria das células é composta por seis elementos, carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S) [1]

transferida para as clorofilas onde será transformada durante a fotossíntese [5].

Do ponto de vista de obtenção dessas biomoléculas, os carotenoides e as clorofilas são compostos que normalmente podem ser extraídos por vários métodos usando diversos solventes orgânicos [6]. De acordo com as escalas da polaridade, que dependem principalmente dos valores da constante dielétrica e do momento dipolar dos solventes, estes podem ser classificados em solventes polares e apolares. Exemplos de solventes polares são: a água, o etanol, o metanol, o éter dietílico, o clorofórmio e a acetona. Enquanto, o hexano, o ciclohexano, o benzeno, o dioxano, o éter de petróleo são exemplos de solventes apolares. Devido ao uso desses solventes para a extração de biomoléculas, as posições, intensidades e formas das bandas espectrais de absorção das biomoléculas absorventes de luz podem sofrer deslocamentos possivelmente pela natureza do solvente, e muitas vezes, devido também à polaridade deste [7, 8, 9].

Entretanto, a água além de ser denominado solvente universal é a biomolécula mais abundante nas frutas e legumes, tanto assim que mais de 75% da massa é devido à presença dela [10]. Durante a fotossíntese, a água é a biomolécula que reage com o dióxido de carbono das plantas verdes, algas e bactérias fotossintéticas, para formar alimentos e também o oxigênio contido no ar que respiramos. Seus átomos de hidrogênio são incorporados a muitos compostos orgânicos como por exemplo aos carboidratos [11], os quais estão presentes em muitos frutos incluindo os pimentões que por sua vez também contêm biomoléculas de carotenoides e clorofilas.

Um sistema composto por uma complexidade de biomoléculas e cores são os pimentões (*Capsicum Annuum*), este fruto têm variedades que amadurecem em tons vibrantes de amarelo, laranja e vermelho, que são bem conhecidos por seu conteúdo de carotenoides, enquanto os pimentões verdes têm alto conteúdo das clorofilas **a** e **b**. Os pimentões amarelos devem sua coloração principalmente à violaxantina, embora outros carotenoides como a luteína² e o beta-caroteno³, também estão presentes na variedade de pimentões de pigmentos laranja-amarelo. A coloração vermelha se deve à produção dos carotenóides capsantina e capsorubina, que são encontrados quase que exclusivamente na pimenta vermelha, já que a maioria das outras plantas não consegue sintetizá-los [12, 13].

Se tratando da morfologia, o pimentão é constituído das partes ilustradas na [figura 1](#), é estimado que para cada porção de 100 *gramas* de pimentão existem aproximadamente 92 *gramas* de água, os quais indica que mais do 90% deste fruto é composto por esta biomolécula [14, 15, 16, 17].

² A luteína também contribui para a cor amarela das gemas dos ovos.

³ O beta-caroteno é bem conhecido como o composto por trás da cor laranja brilhante das cenouras.

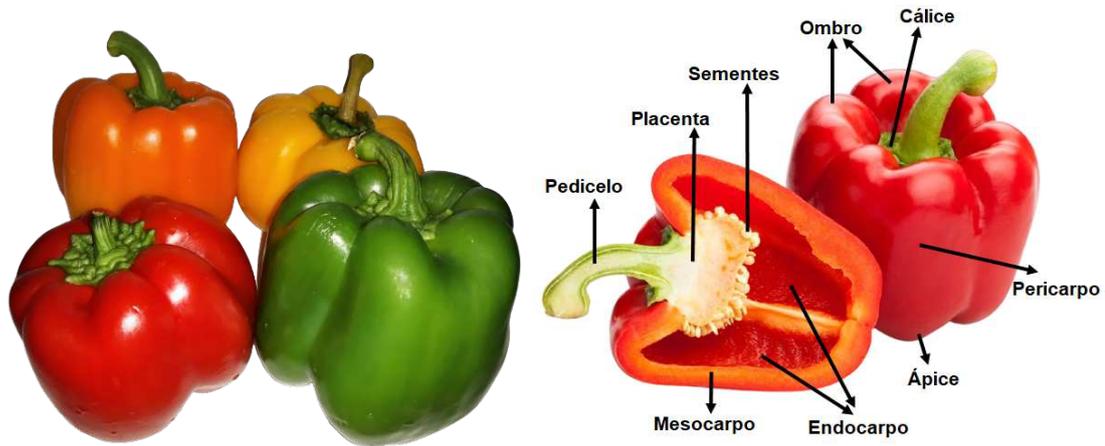


Figura 1 – Ilustração da Morfologia dos Pimentões.

O Pedicelo tem como função permitir a passagem de nutrientes para o fruto quando ainda está conectado à planta. O exterior do fruto é constituído pelo pericarpio, o qual é composto por três partes. A camada mais externa é o epicarpo e ela constitui a casca, uma fina película que se parece com um filme plástico o que garante a proteção da fruta. O mesocarpo é a porção média do pericarpio e inclui a polpa. A camada mais interna é o endocarpo, esta camada envolve a placenta e as sementes do pimentão. A placenta é a parte onde se encontram as sementes do pimentão e permite a troca de substâncias no fruto [18, 19].

Na [tabela 1](#) pode-se observar alguns fotoquímicos bioativos que são encontrados em algumas variedades de pimentões. Em seguida, a [tabela 2](#) se apresentam alguns dos carotenoides que segundo a literatura estão presentes nas diferentes variedades de cores dos pimentões, além disso, também são mostrados as respectivas bandas de absorção máximas na região do UV-Visível de algumas extrações realizadas por vários autores utilizando diferentes solventes. Não menos importante, na [tabela 3](#) e [tabela 4](#) é apresentado o teor dos principais micronutrientes dos minerais e vitaminas que estão presentes nos pimentões classificados pelas cores dos pimentões, segundo foram informadas na literatura.

Tabela 1 – Fitoquímicos bioativos em pimentões [20].

Pimentão	Ácido ascórbico (mg/100g)	Antocianinas totais (mg/100g)	Flavonóides totais (mg/100g)	Carotenóides totais (mg/100g)*	Fenólicos totais** (mg/100g)
Verde	115,94	ND	6,50	0,28	90
Amarelo	125,99	0,16	8,46	4,48	177
Laranja	129,49	0,98	6,18	6,01	149
Vermelho	118,79	3,11	6,08	7,72	156

*expresso em β -caroteno;

** expresso em equivalente de catequina; ND: Não detectado

Tabela 2 – Alguns carotenoides presentes nos pimentões [21, 22, 23, 24, 25, 26, 27].

Carotenoides	Solvente	Absorção máxima λ_{max} (nm)
β - Caroteno	Clorofórmio	435 ; 461 ; 485
	Acetona	429 ; 452 ; 478
	Etanol	425 ; 450 ; 478
	Hexano	425 ; 470 ; 477
α - Caroteno	Clorofórmio	433 ; 457 ; 484
	Acetona	424 ; 448 ; 478
	Etanol	423 ; 444 ; 473
	Hexano	422 ; 445 ; 473
Zeaxantina	Clorofórmio	433 ; 452 ; 479
	Acetona	430 ; 452 ; 479
	Etanol	428 ; 450 ; 478
	Éter de petróleo	424 ; 449 ; 476
Luteína	Clorofórmio	435 ; 458 ; 485
	Acetona	444.5 ; 472.4
	Etanol	422 ; 445 ; 475
	Éter de petróleo	421 ; 445 ; 474
β-Criptoxantina	Clorofórmio	435 ; 459 ; 485
	Etanol	428 ; 450 ; 478
	Éter de petróleo	425 ; 449 ; 476
	Hexano	422 ; 447 ; 476
Violaxantina	Clorofórmio	424 ; 452 ; 482
	Acetona	411.8 ; 426.7 ; 434.4
	Benzeno	424 ; 450 ; 483
	Hexano	443 ; 472
Capsantina	Acetona	474,8
	Benzeno	363 ; 483 ; 510
Capsorubina	Benzeno	457 ; 488 ; 522
	Hexano	452 ; 477 ; 510
Neoxantina	Clorofórmio	421 ; 447 ; 477
	Benzeno	420 ; 446 ; 470
	Hexano	415 ; 437 ; 466

Tabela 3 – Teor de micronutrientes minerais presentes nos pimentões [28, 14, 15, 16, 17].

Micronutrientes				
Minerais (mg)	Pimentão			
	Verde (149 gr)	Amarelo (186 gr)	Laranja (186 gr)	Vermelho (119 gr)
Cálcio (Ca)	14.9	20.5	20.5	8.3
Ferro (Fe)	0.5	0.9	0.9	0.5
Magnésio (Mg)	14.9	22.3	22.3	14.3
Fósforo (P)	29.8	44.6	44.6	30.9
Potássio (K)	260.8	394.3	394	251.1
Sódio (Na)	4.5	3.7	3.7	4.8
Zinco (Zn)	0.2	0.3	0.3	0.3
Cobre (Cu)	0.1	0.2	0.2	–
Manganês (Mn)	0.2	0.2	0.2	0.1
Selênio (Se)	–	0.6 μg	0.6 μg	0.1 μg

Tabela 4 – Teor de micronutrientes vitaminas presentes nos pimentões [28, 14, 15, 16, 17].

Micronutrientes				
Vitaminas (mg)	Pimentão			
	Verde (149 gr)	Amarelo (186 gr)	Laranja (186 gr)	Vermelho (119 gr)
Vitamina A	26.8 μg	18.6 μg	111.7 μg	186.8 μg
Vitamina C	119.8	341.3	341	152
Tiamina	0.1	0.1	0.1	0.1
Niacina	0.7	1.7	1.7	1.2
Vitamina B5	0.1	0.3	–	0.4
Vitamina B6	0.3	0.3	0.3	0.3
Folato	14.9 μg	48.4 μg	48.4 μg	54.7 μg
Colina	8.2	–	–	6.7

1.1 Motivação e delimitação do problema

Uma vasta gama de aplicações são encontradas para estes tipos de biomoléculas que estão presentes nos pimentões, a exemplo das utilizadas nas indústrias: farmacêutica, como complexo nutricional por serem precursores de algumas vitaminas, de alimentos e rações introduzidas na dieta de humanos e animais por fornecer vários minerais, a têxtil e cosmética tem aplicações como corantes naturais [29, 28, 8, 30]. Todavia, a procura de compostos formados pelas biomoléculas dos carotenoides tem aumentado nos últimos anos, devido principalmente aos benefícios biológicos que trazem para a saúde, tais como: imunomoduladoras, anti-carcinogênicas e prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas [31, 28, 32], os carotenoides também conferem proteção ao DNA (ácido

desoxirribonucleico) de alguns microrganismos contra os efeitos da exposição a luz solar [29].

Devido à complexidade que os pimentões apresentam, quanto no que diz respeito às biomoléculas funcionais e ao conjunto de cores, que dificilmente é encontrado naturalmente em outros vegetais ou frutos, isto faz com que o pimentão seja muito interessante para fazer uma investigação detalhada, não apenas do ponto de vista da identificação de algumas das suas biomoléculas, mais também o efeito que os solventes tem sobre a extração destas biomoléculas visto que estas geralmente são estudadas somente após a extração em solventes e na maioria dos casos não são comparadas com a amostra *in-natura*, tentando assim entender se há algum tipo de ligação ou interação da água com estas biomoléculas e se isto tem a ver com as propriedades hidrofóbicas delas, ainda não menos importante, estudar a formação das cores neste fruto.

No mais, um estudo apoiado na física fundamental, mais exatamente na mecânica quântica, tendo em vista as técnicas espectroscópicas (UV-Visível e PAS) e de simulações computacionais, para tentar entender os questionamentos que ainda estão em aberto, como por exemplo: qual é o poder do solvente para separar biomoléculas com estruturas semelhantes? E assim de certa forma dar uma contribuição em termos da física para esse tipo de estudo que ainda é incipiente.

1.2 Objetivo

O objetivo principal deste estudo é a identificação, caracterização e efeito do solvente no conjunto de biomoléculas pertencentes aos grupos dos carotenoides e clorofilas presentes na polpa e no suco extraído dos pimentões, verde, amarelo, laranja e vermelho, por meio de técnicas experimentais de espectroscopia UV-Vis convencional, Fotoacústica e simulações computacionais.

1.3 Organização do Trabalho

A dissertação divide-se em cinco capítulos, estes estão distribuídos da seguinte forma:

No **capítulo 1** da Introdução foi apresentado o assunto a ser estudado neste trabalho mostrando a motivação e delimitação dos problemas, assim como os objetivos que serão seguidos e por fim como os capítulos estarão organizados

No **capítulo 2** da Fundamentação Teórica é exposta a revisão bibliográfica da literatura com os conceitos que deram embasamento para o desenvolvimento do trabalho.

Sendo assim, neste capítulo foram revisados os assuntos sobre: as biomoléculas de carotenoides e clorofilas e suas propriedades; a teoria dos orbitais moleculares e tipos de transições eletrônicas; a teoria de solventes, suas propriedades e classificações. Seguindo com os fundamentos da simulação computacional onde são descritos os métodos computacionais utilizados; e finalizando este capítulo com a teoria das técnicas de espectroscopia utilizadas neste trabalho.

No **capítulo 3** de Materiais e Métodos são mostrados e descritos de forma sucinta os equipamentos, materiais e métodos utilizados para realizar nossas medidas experimentais e simulações computacionais. Portanto, foi descrito desde como as amostras foram adquiridas, acondicionadas e preparadas para fazer as medições em diferentes técnicas de espectroscopia, como as técnicas espectroscópicas foram usadas para identificar as biomoléculas dos carotenoides e as clorofilas através das transições eletrônicas entre os orbitais, que podem ser identificados como HOMO e LUMO e assim também prever os efeitos do solvente sobre as amostras. Por outro lado, é especificado o sistema computacional, tanto do ponto de vista do hardware como do software além dos métodos computacionais utilizados para realizar as simulações das geométricas moleculares de cada uma das biomoléculas e as configurações escolhidas para obter os espectros UV-Vis mediante a **TDDFT**, os quais foram usados como base para compará-los com os resultados experimentais tornando-os mais robustos.

No **capítulo 4** em Resultados e Discussões são apresentados os espectros de absorção das biomoléculas de interesse, da amostra de suco e da polpa do pimentão e o efeito que têm os solventes utilizados para a extração destas biomoléculas, onde alguns desses resultados são vistos pela primeira vez.

No **capítulo 5** são apresentadas as conclusões baseadas nos resultados dos experimentos e os cálculos feitos computacionalmente, onde foi possível obter algumas conclusões ainda não observadas na literatura, principalmente devido à forma de como foram realizados os experimentos e obtidos os resultados, a exemplo de obter espectros das amostras sem usar solvente.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo serão apresentados os conceitos fundamentais das biomoléculas de interesse e algumas de suas principais propriedades. Além disso, para facilitar a compreensão do comportamento quântico dessas moléculas, serão introduzidos os conceitos básicos da Teoria dos Orbitais Moleculares. Em seguida apresenta-se o conceito de solvente, suas classificações e o efeito do solvente. Também, serão apresentados alguns dos fundamentos teóricos que auxiliam na compreensão dos cálculos computacionais. Por fim, uma breve explicação dos conceitos fundamentais sobre a Teoria da Espectroscopia UV-Vis e PAS.

2.1 Carotenoides e Clorofilas

A presença das cores em vegetais e frutas ocorre devido à concentração de diferentes moléculas, que absorvem radiação eletromagnética em diferentes regiões no espectro visível. Algumas destas moléculas pertencem aos grupos funcionais das clorofilas, dos carotenoides e dos flavonoides [33].

Os carotenoides são pigmentos naturais biossintetizados por plantas, algas, cianobactérias, por alguns fungos, leveduras e bactérias [34], sendo encontrados em vegetais, folhas, frutas, raízes, flores, peixes, invertebrados e pássaros. Alguns carotenoides apresentam importante função nutricional na dieta dos humanos como precursores da vitamina A, que é essencial para a visão, diferenciação das células⁴, desenvolvimento embriológico e outros processos fisiológicos [35, 36]. Atualmente está bem estabelecido que os carotenoides desempenham duas importantes funções na fotossíntese [37]. Eles atuam absorvendo luz

⁴ A diferenciação celular consiste em um conjunto de processos que transformam e especializam as células embrionárias. Após estas transformações, sua morfologia e fisiologia são definidas, o que as tornam capazes de realizar determinada função.

em regiões do espectro visível onde a clorofila não absorve eficientemente, e também atuam como fotoprotetores do sistema fotossintético [37, 38].

Atualmente, mais de 750 carotenoides estruturalmente diferentes foram isolados de fontes naturais [39, 40], destes ao menos 50 têm uma atividade biológica significativa [34]. Os principais carotenoides encontrados em alimentos são: β -caroteno e α -caroteno (abóbora, cenoura, espinafre, milho, dentre outros), β -criptoxantina (pimenta, cajá, nectarina, mamão, pêssego), licopeno (tomate, goiaba vermelha, melancia, mamão vermelho), luteína (espinafre, alface, couve) e violaxantina (manga, pimentão amarelo). Com a exceção de violaxantina, é comum encontrar os carotenoides no plasma humano [36].

Por outro lado, existem seis diferentes tipos da clorofila, sendo os principais tipos encontrados em plantas e frutos verdes de duas formas, clorofila **a** e **b** [41]. O principal pigmento na fotossíntese é a clorofila **a**. A clorofila **b** é um pigmento acessório porque não é necessário para que ocorra a fotossíntese. Todos os organismos que fotossintetizam possuem clorofila **a**, mas nem todos os organismos contêm clorofila **b**. A clorofila **a** absorve luz nas regiões do vermelho-laranja e azul-violeta do espectro eletromagnético. A clorofila **a** transfere energia para o centro de reação e doa dois elétrons excitados para a cadeia de transporte de elétrons. O papel central da clorofila **a** é como um doador de elétrons primário na cadeia de transporte de elétrons. A partir daí, a energia do sol será finalmente convertida em energia química que o organismo pode usar para processos celulares [42]. Por outro lado, a clorofila **b** absorve a luz azul, o papel central da clorofila **b** é expandir o espectro de absorção dos organismos. Dessa forma, os organismos podem absorver mais energia da parte de frequência mais alta do espectro de luz azul. A presença de clorofila **b** nas células ajuda aos organismos converterem uma gama mais ampla de energia solar em energia química [3].

2.1.1 Propriedades dos Carotenoides e as Clorofilas

Os carotenoides são compostos constituídos por oito unidades isoprenóides (ver [figura 2](#)) cuja ordem é invertida no centro da molécula. Todos os carotenoides podem ser considerados como derivados do Licopeno ($C_{40}H_{56}$) por reações que envolvem: hidrogenação, desidrogenação, ciclização⁵, inserção de oxigênio, migração de ligação dupla, migração de metila, alongamento da cadeia, encurtamento da cadeia [43] (como pode ser visto na [figura 3](#)), ocorrem em várias formas isoméricas, quando isso acontece coloca-se uma letra grega antes do seu nome para distingui-lo, como por exemplo alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) e zeta (ζ), sendo os principais o α e β -caroteno [36].

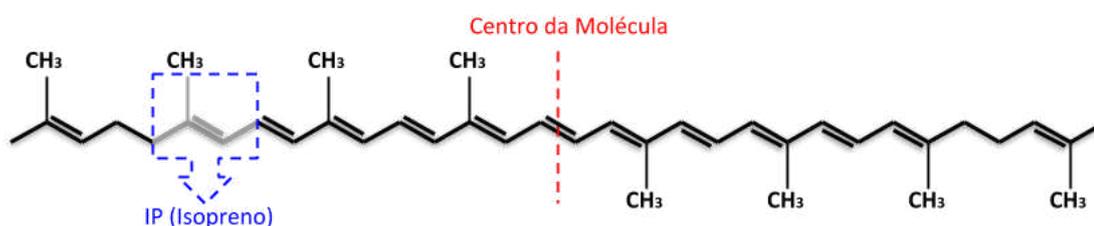


Figura 2 – Estrutura geral dos Carotenoides, com 8 unidades de Isopreno. Adaptado de [43].

A maioria dos carotenoides são hidrocarbonetos contendo 40 átomos de carbono e dois anéis terminais [44]. Dois tipos de carotenoides são encontrados na natureza: (a) carotenos como o β -caroteno, que consistem em hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma extremidade ou nas duas extremidades da molécula; e (b) derivados oxigenados de carotenos como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, conhecidas como xantofilas [45]. O sistema de ligação dupla conjugada fornece a esses pigmentos uma alta reatividade química que pode ser facilmente isomerizada⁶ e oxidada [34]. A [figura 3](#) mostra a estrutura química de alguns carotenoides.

⁵ Ação de ciclizar, ou seja, transformar o composto linear em um anel.

⁶ Quando a ligação entre dois átomos de carbono não permite que haja rotação entre eles, a posição que os ligantes assumem, em relação aos ligantes do outro átomo de carbono no espaço dá origem a moléculas diferentes (ver [figura 3](#)).

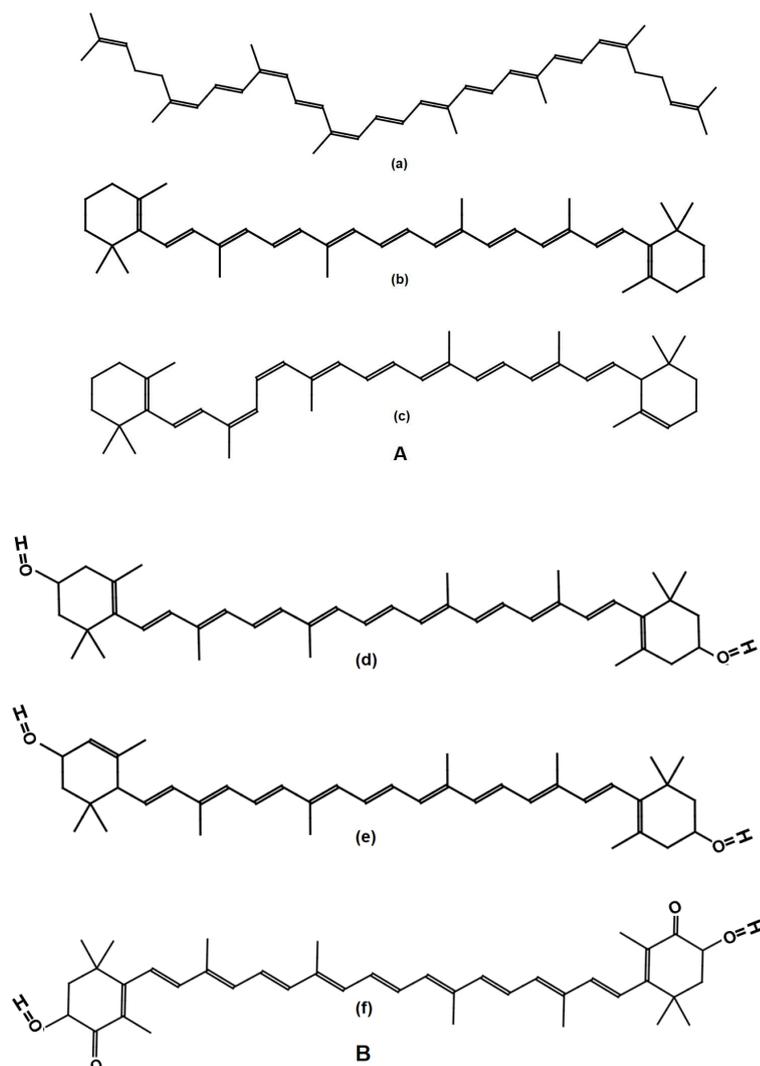


Figura 3 – Diagrama da estrutura molecular de alguns Carotenoides: **A** - Carotenos: (a) licopeno, (b) β -caroteno e (c) α -caroteno; **B** - Xantofilas: (d) zeaxantina, (e) luteína, (f) astaxantina. Adaptado de [34].

A organização das ligações duplas nas moléculas determina quais comprimentos de onda serão absorvidos ou refletidos no espectro UV-Visível, isso se deve ao cromóforo que nos carotenoides é caracterizado por ligações duplas conjugadas, assim, desta forma definem a cor do pigmento, ou seja, a molécula presente numa substância [46, 33, 47]. Os carotenoides possuem geralmente três bandas de máxima absorção eletrônica no espectro visível, elas aparecem na faixa de 400 - 510 nm [21], e geralmente pode-se dizer que é a impressão digital dos carotenoides. Os carotenoides são hidrofóbicos, lipofílicos, insolúveis em água, desta forma, solventes como acetona, álcool, hexano, clorofórmio são utilizados para solubilizar e analisar a presença dos carotenoides [48, 33].

No que se refere a estrutura das biomoléculas de clorofila é possível identificar duas partes: um anel de porfirina que contém magnésio no centro, cuja função é absorver luz; e uma cadeia hidrofóbica de fitol, cuja função é manter a clorofila integrada na membrana

fotossintética [49]. A figura 4 mostra a estrutura química das clorofilas **a** e **b** com estruturas muito semelhantes diferenciando em apenas um átomo em uma cadeia lateral no terceiro carbono. Na clorofila **a**, o terceiro carbono está ligado a um grupo metila, enquanto na clorofila **b**, o terceiro carbono está ligado a um grupo aldeído. Estas biomoléculas não absorvem nas regiões verdes do espectro eletromagnético, produzindo assim a cor verde característica nos tecidos que contêm clorofila.

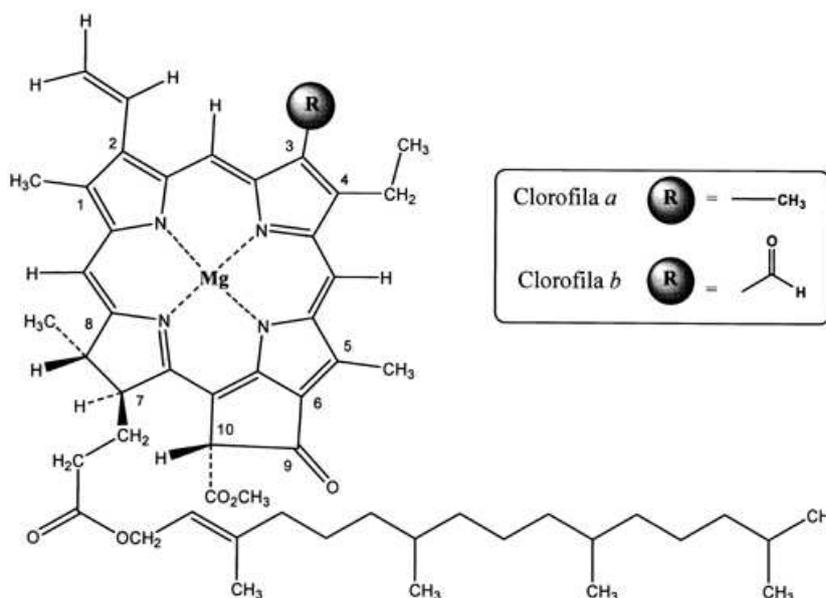


Figura 4 – Estrutura química da clorofila **A** e **B**. Adaptado de [49].

2.1.2 Solubilidade

Os carotenoides são compostos lipofílicos, com poucas exceções (por exemplo, crocina), portanto, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como acetona, álcool, éter dietílico, clorofórmio e acetato de etila. A solubilidade dos carotenoides difere dependendo de serem carotenos ou xantofilas, de modo que os carotenos serão mais solúveis em solventes mais apolares, como hexano, tolueno e éter de petróleo e xantofilas, em solventes mais polares, como etanol e metanol. É interessante notar que os carotenoides no estado cristalino são difíceis de dissolver, exceto em benzeno e diclorometano [50, 51]. Devido ao seu caráter lipofílico, são encontrados em ambientes deste tipo como são as membranas, embora também estejam em ambientes aquosos por meio de associações a proteínas ou reações de glicosilação [52, 50].

No caso das clorofilas, como já foi dito, estas biomoléculas tem na sua estrutura uma cadeia hidrofóbica pelo qual não são hidrossolúveis, assim, os solventes mais adequados para a extração de clorofilas de vegetais ou frutos frescos são aqueles miscíveis com água, como piridina, metanol, etanol, acetona e acetona misturado com acetato de etila [53].

2.1.3 Absorbância

O sistema de dupla ligação conjugada, que constitui o cromóforo que absorve a luz e dá aos carotenoides sua cor atrativa, também fornece uma boa ferramenta para sua identificação: seu espectro de absorção na região do visível [54]. Os comprimentos de onda de absorção máxima, assim como a forma de seu espectro são característicos de cada cromóforo (ver figura 5). A maioria dos carotenoides têm espectros de absorção máxima de três bandas, pois eles correspondem a três comprimentos de onda diferentes. As características estruturais de cada um dos carotenoides tais como a ciclização, a introdução de grupos hidroxilo e metoxilo e a formação de epóxidos, assim como o número de ligações duplas conjugadas são as causas das diferenças entre os seus espectros de absorção [55, 56].

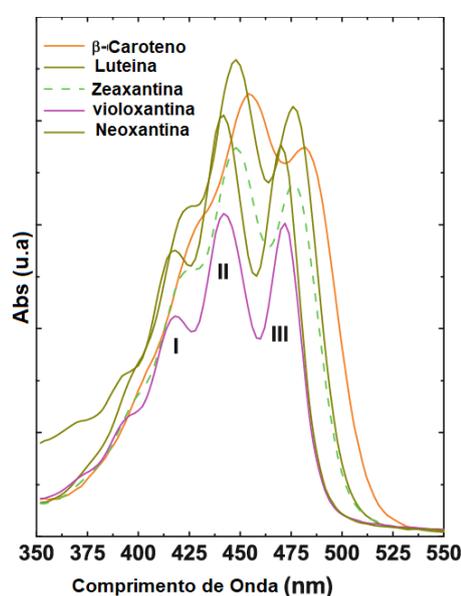


Figura 5 – Espectro de absorção de alguns carotenoides (Solvente Acetona). Extraído de [57]

2.2 Teoria dos Orbitais Moleculares

A teoria dos orbitais moleculares (MO) constitui uma alternativa na representação das ligações que fazem os átomos para formar uma molécula. De acordo com este enfoque, todos os elétrons de valência têm uma influência na estabilidade da molécula, elétrons dos níveis inferiores também podem contribuir para a ligação, mas para muitas moléculas simples o efeito é demasiado pequeno. Além disso, a teoria MO considera que os orbitais atômicos (AO), do nível de valência, deixam de existir quando a molécula se forma, sendo substituídos por um novo conjunto de níveis energéticos que correspondem a novas distribuições da nuvem eletrônica (densidade de probabilidade). Esses novos níveis energéticos constituem uma propriedade da molécula como um todo e são chamados,

consequentemente de orbitais moleculares [58].

Os orbitais moleculares são geralmente descritos como combinações lineares de orbitais atômicos (CLOA). Uma vantagem dessa forma de descrição é que a visualização dos orbitais moleculares é mais intuitiva, uma vez que estamos mais familiarizados com as formas dos orbitais atômicos. A base física para descrever MO em termos de uma combinação de AO é que quando um elétron está próximo ao núcleo de um determinado átomo, sua função de onda deve se assemelhar a um orbital atômico desse átomo [59].

O entendimento do conceito de orbitais moleculares só é possível usando a teoria da mecânica quântica, levando em consideração a equação de Schrödinger, apesar que nenhuma solução exata é possível para qualquer molécula devido principalmente as correlações quânticas que existem entre, núcleo-núcleo, elétrons-núcleos, elétron-elétron (ver figura 6).

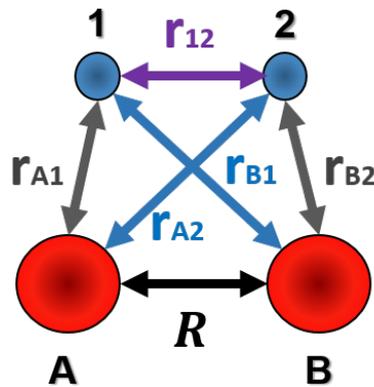


Figura 6 – Diagrama das forças de interações da molécula H_2 . Fonte própria.

A equação de onda da molécula proposta no diagrama da figura 6 mostra equações acopladas umas a outras, isto torna muito difícil a obtenção de soluções exatas, por esta razão é necessário implementar métodos de cálculos computacionais que resolvem equações deste tipo com uma boa aproximação.

Considerando uma das moléculas mais simples H_2^+ , a qual consiste de três partículas (dois núcleos e um elétron). Portanto, devemos adotar a aproximação de Born-Oppenheimer na qual os núcleos, sendo muito mais pesados do que um elétron, se movem relativamente devagar e podem ser tratados como estacionários enquanto os elétrons se movem ao seu redor. Assim, podemos pensar que os núcleos estão fixos em localizações arbitrárias, então pode-se resolver a equação de Schrödinger apenas para a função de onda dos elétrons [60].

O Hamiltoniano para o único elétron em H_2^+ é:

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_1^2 - \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \left(\frac{1}{r_{A1}} + \frac{1}{r_{B1}} - \frac{1}{R} \right) \quad (2.1)$$

onde o primeiro termo desta equação corresponde à energia cinética do elétron e o segundo é a energia potencial eletrostática do sistema completo, os dois primeiros termos dentro dos parenteses são a contribuições atrativas do elétron com os núcleos atômicos, o último termo corresponde a interação repulsiva dos núcleos que estão a uma distância R (ver figura 7).

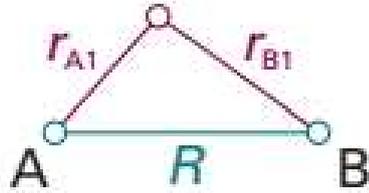


Figura 7 – Diagrama de corpo livre da molécula H_2^+ . Extraído de [60].

As funções de onda mono-eletrônica ψ obtidas da solução da equação de Schrödinger ($H\psi = E\psi$) são os orbitais moleculares, assim, podemos formar a partir das combinações lineares dos orbitais de ambos os átomos de hidrogênio

$$\psi_{\pm} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\psi_{1sA} \pm \psi_{1sB}) \quad (2.2)$$

A densidade de probabilidade é dada pelo quadrado da função de onda e vai nos dar a distribuição do elétron na molécula.

$$\psi_{\pm}^2 = \frac{1}{2} (\psi_{1sA}^2 + \psi_{1sB}^2 \pm 2\psi_{1sA}\psi_{1sB}) \quad (2.3)$$

Onde ψ_{1sA}^2 , é a densidade de probabilidade do elétron confinado no orbital atômico A e ψ_{1sB}^2 , é a densidade de probabilidade do elétron confinado no orbital atômico B, finalmente $\pm 2\psi_{1sA}\psi_{1sB}$, é uma contribuição extra à densidade.

Esta última contribuição é a que define se o orbital molecular é ligante (ψ_+ no caso do H_2^+) ou antiligante (ψ_- no caso do H_2^+). O primeiro possui a forma de um elipsoide simétrico e é conhecido como $1\sigma_g$, já que é formado por orbitais $1s$, da mesma forma, o orbital antiligante é chamado de $1\sigma_u^*$, o asterisco serve para indicar que o orbital é antiligante (figura 8).

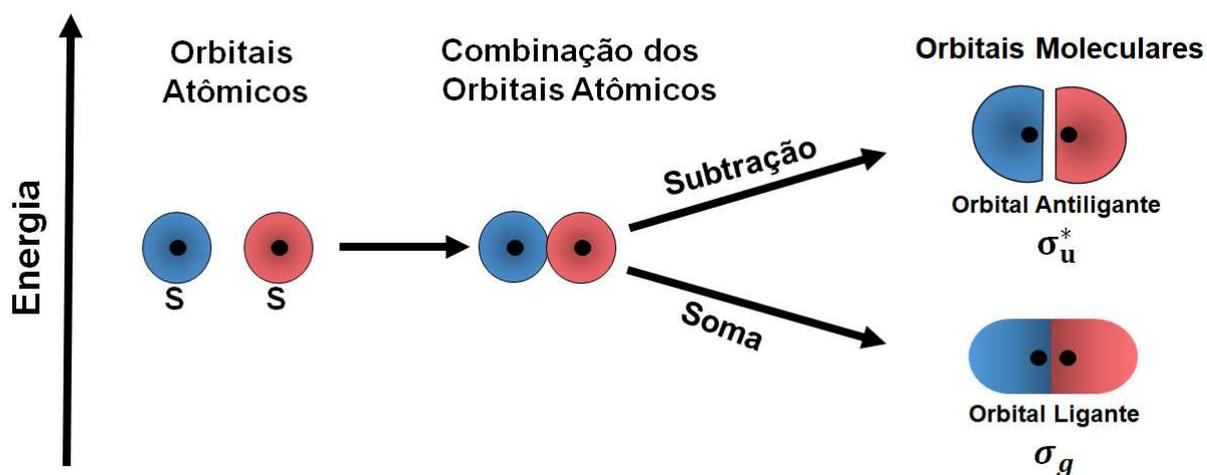


Figura 8 – Representação de um orbital molecular ligante (σ_g) e antiligante (σ_u^*). Adaptado de [61].

Quando dois orbitais de mesma simetria interagem, eles geram dois níveis de energia, sendo um com mais baixa energia e o outro com maior energia do que os orbitais constituintes. A redução na energia do orbital ligante acontece porque agora o elétron sente a atração de dois núcleos ao invés de apenas um, como no caso de orbitais atômicos, o fato de um dos níveis de energia dos orbitais moleculares ser mais baixo que o nível fundamental do orbital atômico é o que faz com que os átomos prefiram ficar ligados formando a molécula. É importante perceber que dois orbitais atômicos se combinam gerando o mesmo número de orbitais moleculares [33], tal como é mostrado na figura 9.

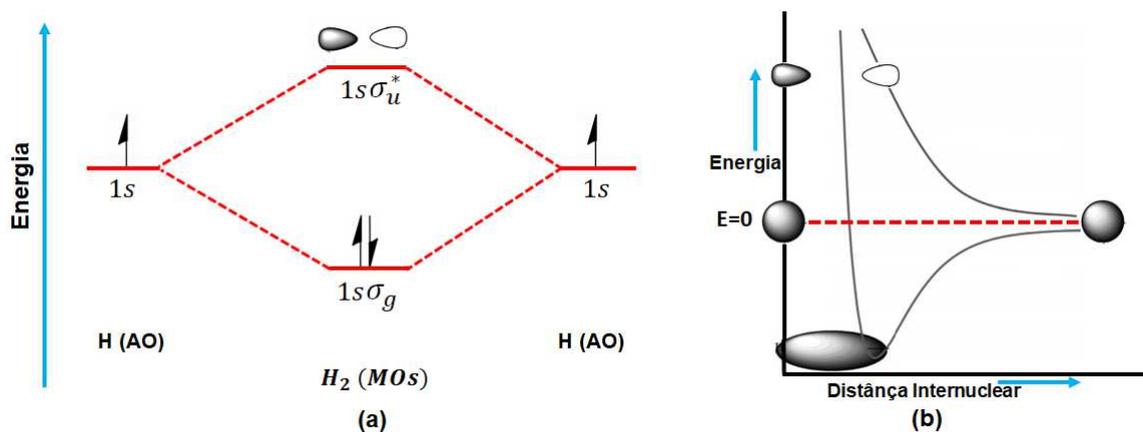


Figura 9 – (a) Diagrama do orbital molecular do H_2 . (b) Variação da energia de ligação com a distância internuclear. Adaptado de [62].

A interação dos orbitais 2s produz similarmente os orbitais $2s\sigma_g$ e $2s\sigma_u^*$ devido principalmente ao fato dos orbitais 2s terem a mesma simetria que os orbitais 1s, por esta razão o diagrama dos orbitais 2s é da mesma forma que na figura 9. A interação

de orbitais atômicos 2p, podem gerar dois tipos de orbitais moleculares, um MO que encontra-se ao longo do eixo internuclear ($2p\sigma_g$ e $2p\sigma_u^*$), comumente escolhido no eixo z, e os outros são MOs que estão perpendiculares ao eixo internuclear, os quais são os eixos **X** e **Y** ($2p_{x,y}\pi_u$ e $2p_{x,y}\pi_g^*$), dando como resultado seis orbitais moleculares (três MOs ligantes e três antiligantes).

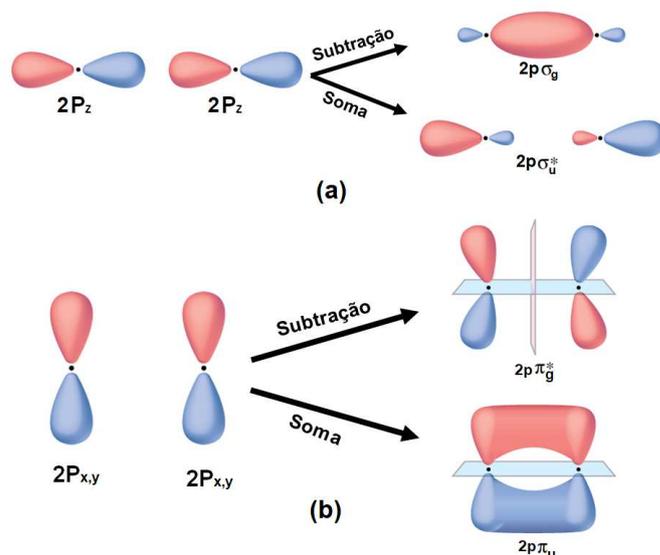


Figura 10 – (a) Formação do MO $2p\sigma_g$ e $2p\sigma_u^*$ a partir da combinação de dois AO $2p_z$. (b) Formação do MO $2p_{x,y}\pi_u$ e $2p_{x,y}\pi_g^*$ a partir da combinação de dois AO $2p_{x,y}$. Adaptado de [63].

Da figura 10 é importante destacar que os AO $2p_z$ ao se encontrarem ao longo do eixo internuclear vai formar um MO horizontalmente, assim, a forma deste MO é semelhante ao do orbital $1s$, é por esta razão que este orbital é chamado de $2p\sigma$, devemos levar em consideração que neste caso o sinal de subtração (-), quer dizer, ψ_- constrói o orbital ligante. Por outro lado, para os outros dois orbitais, acontece apenas uma sobreposição vertical (lateral), aqui o sinal da soma (+), ou seja, ψ_+ constrói o orbital ligante. Uma confusão comum é que as vezes é assumido que os orbitais **g** são considerados como ligantes e os **u** como antiligantes. A característica de que um orbital seja ligante ou antiligante vai depender se a sobreposição é positiva ou negativa, assim os termos **g** (“*gerade*”) se refere às funções de ondas dos orbitais simétricos em relação ao eixo e o **u** (“*ungerade*”) se referem as funções de ondas dos orbitais assimétricos em relação ao eixo.

2.2.1 Tipos de Transições Eletrônicas

As moléculas orgânicas distribuem seus elétrons em orbitais moleculares. Os orbitais moleculares de menor energia são σ , seguidos por os orbitais π . Quando na molécula existem átomos com pares eletrônicos livres (como por exemplo, oxigênio, enxofre, nitrogênio, halogênios) existiram níveis de orbitais não-ligantes **n**, os quais são orbitais atômicos. Na

região antiligante encontramos os orbitais moleculares π^* e σ^* . Uma molécula em seu estado fundamental tem ocupados os orbitais ligantes e não-ligantes e desocupados os orbitais antiligantes.

Do exposto neste capítulo até agora, deduz-se que as transições eletrônicas devem começar desde os orbitais ligantes terminando nos antiligantes ou começar nos orbitais não-ligantes terminando nos ligantes, também pode-se apresentar transições que começam nos orbitais **n** e terminam num orbital antiligante. Assim, as quatro transições mais importantes e as mais prováveis de ocorrer são $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, tal como se mostra na figura 11.

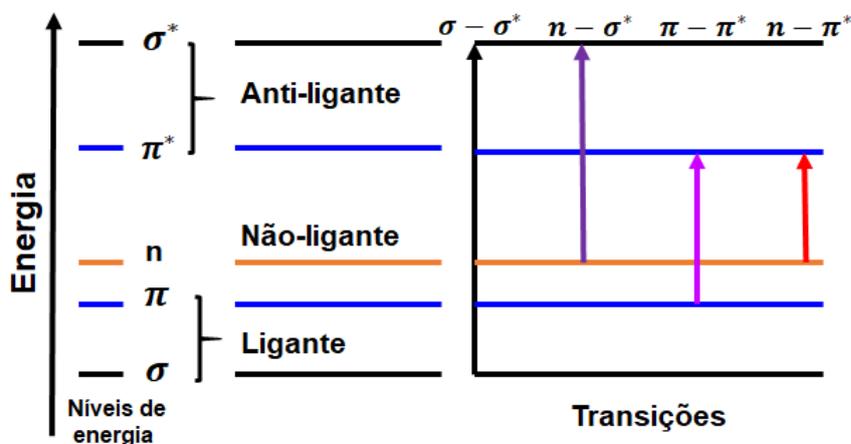


Figura 11 – Energia dos níveis eletrônicos moleculares com suas principais transições. Adaptado de [62].

A transição eletrônica mais importante é geralmente de HOMO (orbital molecular mais alto ocupado) para LUMO (orbital molecular mais baixo desocupado) que corresponde à menor diferença da energia a qual tem um comprimento de onda grande. Levando em consideração as transições mostradas na figura 11, suas regiões aproximadas no espectro eletromagnético são:

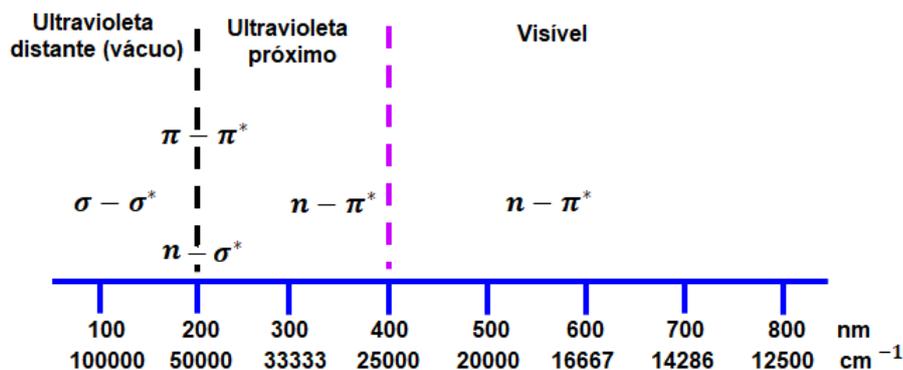


Figura 12 – Região do espectro eletromagnético onde são observadas as principais transições dos MO. Adaptado de [62].

Transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Segundo os dados apresentados na [figura 11](#) e [figura 12](#) esses tipos de transições são as que precisam de maior quantidade de energia em comparação as outras transições mencionadas anteriormente, assim, comprimentos de onda $\lambda < 150 \text{ nm}$ são necessários para realizar esses tipos de transições. Esta região não é acessível para os equipamentos de espectroscopia de UV-Vis convencional, uma vez que tanto o vidro como o quartzo absorvem radiação nesta região. Além disso, a região abaixo de 200 nm é frequentemente chamada de região UV do vácuo devido à absorção pelo oxigênio molecular nesta região, portanto, por esta razão câmaras de vácuo são necessárias.

Transições $n \rightarrow \sigma^*$

Essas transições ocorrem na sua maioria em compostos heteroátomos promovendo um elétron do orbital não-ligante até um orbital σ^* . Os comprimentos de onda de transição estão entre os 150 e 250 nm . Os coeficientes de absorção molar são baixos. Os solventes polares estabilizam os elétrons não ligados, dissolvendo-os por meio da ligação de hidrogênio, aumentando assim a energia de absorção. Esta transição também é pouco observada já que ainda se encontra no limite de trabalho prático dos espectrômetros convencionais (abaixo de 200 nm) [62].

Transições $n \rightarrow \pi^*$

Estas transições estão presentes em compostos insaturados com heteroátomos como o oxigênio, o nitrogênio e o enxofre, que dão origem a bandas fracas geralmente na região UV próxima entre $(270 - 300) \text{ nm}$.

Transições $\pi \rightarrow \pi^*$

A absorção por uma ligação dupla ($\text{C}=\text{C}$) resulta na excitação de um elétron π até um orbital π^* . Sua energia é de 7 eV para uma ligação dupla não conjugada, que corresponde a uma absorção a 180 nm (no ultravioleta). Quando a ligação dupla faz parte de uma cadeia conjugada, as energias dos orbitais moleculares estão mais próximas e a transição passa para um comprimento de onda mais longo que pode estar na região visível se o sistema conjugado for suficientemente longo [60].

Uma molécula que contem vários orbitais π , existem muitas possibilidades para transições $\pi \rightarrow \pi^*$, e o grau em que cada transição é permitida ou proibida varia. Por exemplo as regras de seleção [62], nas quais temos, a **regra de Laporte** e a **regra de Spin**, a primeira afirma que uma transição eletrônica entre orbitais envolve a mudança no número quântico principal do momento angular (L) tal que $\Delta L = \pm 1$, e a segunda diz que as transições permitidas devem envolver a promoção de elétrons sem uma mudança em seu

spin, portanto $\delta S = 0$. Além disso outras regras devem ser levadas em consideração, como aquelas baseadas na **simetria de orbital**, esta regra afirma que uma transição eletrônica irá ocorrer mais rapidamente quando o estado final e inicial estiverem mais próximos ou semelhantes um do outro, isto é quando o acoplamento entre estes estados for forte. Assim, a consideração destas regras faz que os espectros apresentem várias bandas de diferentes intensidades [64].

2.2.2 Efeito da Conjugação

Um sistema conjugado ocorre em um composto orgânico onde os átomos estão ligados por ligação covalente com ligações simples e múltiplas alternadas (por exemplo, $C = C - C = C - C$) e com influência mútua para produzir uma região chamada deslocalização de elétrons. Nessa região, os elétrons não pertencem a uma única ligação ou átomo, mas sim a um grupo.

A interação conjugativa entre grupos insaturados tem um efeito marcante nas bandas de absorção UV, em particular nas de origem $\pi - \pi^*$. Em geral, o efeito batocrômico está associado ao aumento da conjugação. A conjugação produz uma diminuição na separação energética entre o orbital HOMO e LUMO, tal e como pode ser visto no diagrama de correlação para butadieno mostrado na figura 13.

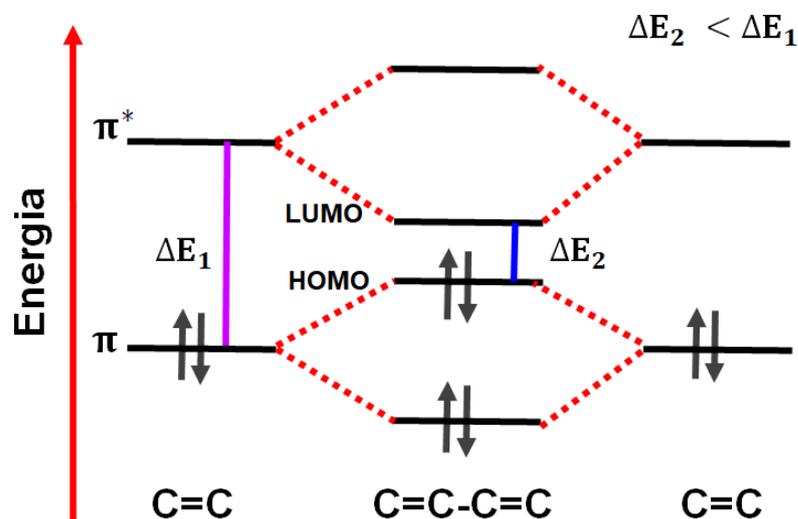


Figura 13 – Diagrama do correlação do MO para o butadieno. Adaptado de [62].

Como pode ser visto na figura 13, o efeito da conjugação diminui a diferença de energia entre os níveis $\pi - \pi^*$, assim, a medida que o número de ligações duplas conjugadas aumenta, a diferença de energia destes MO diminui. Um claro exemplo disto são as moléculas dos polienos da forma $CH_3(CH = CH)_n CH_3$, onde pode ser observado que conforme aumenta o número das ligações duplas, o espectro de absorção vai ter um

deslocamento maior para energias menores (maior comprimento de onda) nas suas bandas, tal e como se mostra na figura 14.

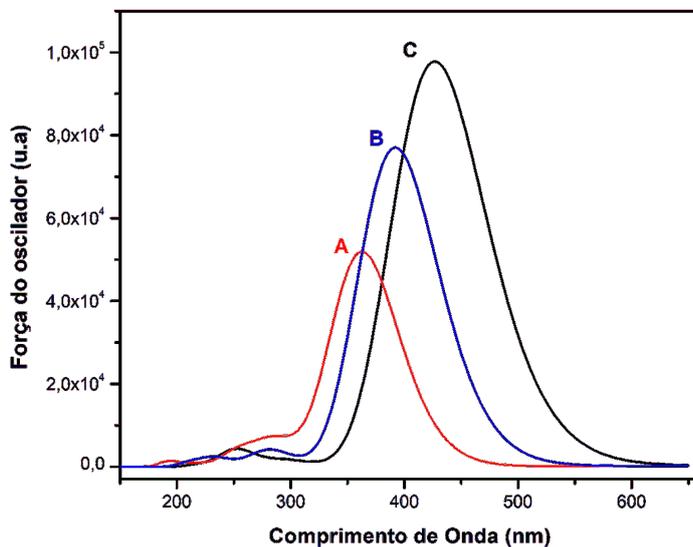


Figura 14 – Espectro de absorção UV-Vis dos polienos $CH_3(CH = CH)_n CH_3$, obtidos pela simulação computacional usando a TDDFT, onde A, B e C corresponde a $n = 3, 4, 5$ respetivamente. Fonte própria.

Uma das propriedades importantes dos sistemas conjugados é que quando esses sistemas começam a absorver seletivamente a radiação na região visível, podem apresentar coloração nos compostos. Os sistemas conjugados formam a base dos cromóforos, que são partes das moléculas que absorvem luz no visível e podem ser a causa para que um composto seja colorido. Esses cromóforos estão geralmente presentes em vários compostos orgânicos como por exemplo a longa cadeia conjugada do hidrocarboneto β -caroteno, que resulta em uma forte cor laranja [65, 26].

2.3 Solventes

Um solvente é uma substância química na qual um soluto (um sólido, líquido ou gás quimicamente diferente) é diluído, suspenso ou extraído, resultando em uma dissolução [66]. As moléculas de solvente exercem sua ação interagindo e envolvendo as moléculas de soluto. Isso é conhecido como solvatação [7] (ver figura 15).

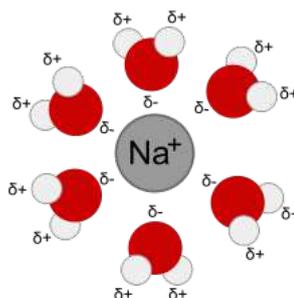


Figura 15 – Exemplo de solvatação, a parte negativa da molécula do solvente (esfera vermelha) é atraída pela parte positiva da molécula do soluto. Extraída de [67].

2.3.1 Polaridade dos Solventes

Embora a polaridade de um solvente dependa de muitos fatores, ela pode ser definida como sua capacidade de solvatar e estabilizar cargas. [68, 69]. Assim, é chamado de polaridade de um solvente ao parâmetro que lhe confere propriedades de solubilização de diferentes solutos. O solvente deve atuar sobre o soluto, dissolvendo-o e superando as forças intermoleculares que o mantêm unido, mas sem causar a reação. Dependendo da natureza do soluto e do solvente, as forças de solvatação entre eles podem ser de diferentes tipos: ligações de hidrogênio, interações polares e forças de London. O solvente ideal geralmente tem características químicas e estruturais semelhantes às do composto a ser dissolvido [7, 69, 68].

2.3.1.1 Classificação dos Solventes

No diagrama da [figura 16](#) apresenta-se de modo geral a classificação dos solventes:

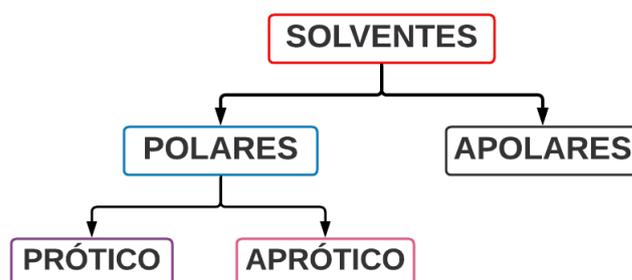


Figura 16 – Classificação geral dos solventes.

- **Solventes Polares:** são substâncias em cujas moléculas a distribuição da nuvem eletrônica é assimétrica, contendo ligações entre átomos com eletronegatividades muito diferentes (como O-H); portanto, a molécula tem um polo positivo e um polo negativo separados por uma certa distância. Ou seja, existe um dipolo permanente. O exemplo clássico de solvente polar é a água. Os álcoois de baixo peso molecular também pertencem a este tipo. Os solventes polares podem ser subdivididos em [70, 7]:
 - **Solventes polares próticos:** contêm uma ligação O-H ou N-H. Água (H-O-H), etanol e ácido acético são alguns solventes polares próticos.
 - **Solventes polares apróticos:** são solventes polares que não possuem ligações O-H ou N-H. Este tipo de solvente não dá nem aceita prótons. Acetona, acetonitrila, dimetilformamida ou THF (Tetra-hidrofurano) são alguns exemplos de solventes apróticos polares.
- **Solventes Apolares:** em geral, são substâncias de tipo orgânico, onde a distribuição da nuvem eletrônica de suas moléculas são simétricas, contendo ligações entre átomos com eletronegatividades semelhantes (por exemplo C-H); portanto, essas substâncias carecem de polos positivos e negativos em suas moléculas. Eles não podem ser considerados dipolos permanentes. Se os momentos dipolares individuais de suas ligações forem compensados, a molécula como um todo será apolar. Alguns solventes deste tipo são: éter dietílico, clorofórmio, benzeno, tolueno, xileno, cetonas, hexano, ciclohexano, tetracloreto de carbono [7, 69].

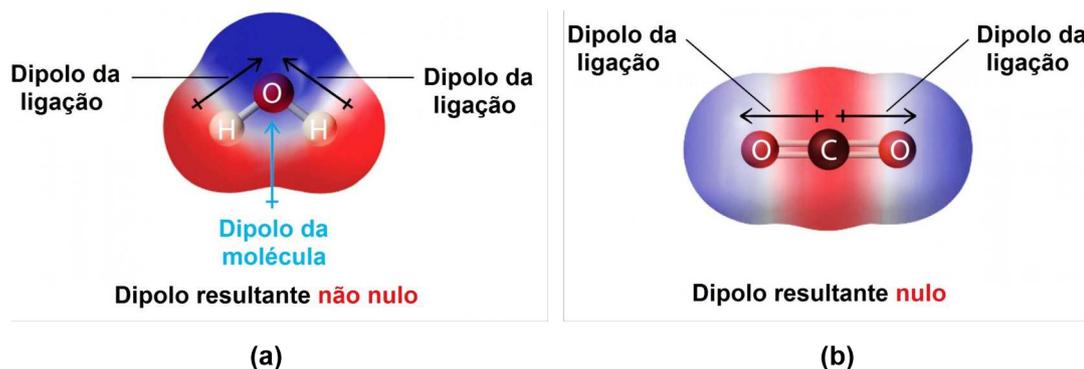


Figura 17 – Representação esquemática das ligações e o dipolo resultante, (a)- diagrama de molécula polar, (b)- diagrama de molécula apolar. Extraída de [71].

2.3.2 Efeito do Solvente

É sabido que o espectro eletrônico de absorção de um soluto medido em solventes de diferentes polaridades pode apresentar mudanças na sua posição, intensidade e na forma das bandas de absorção [68]. O termo de solvatocromismo é utilizado para descrever as mudanças na posição das bandas de absorção (λ_{abs}), devido principalmente à mudança na polaridade do meio [72]. O solvatocromismo é o resultado da solvatação diferencial entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado da molécula que absorve luz, essa diferença ocorre devido a uma alteração na distribuição de carga nestes estados, que pode ser acompanhada por uma mudança no momento de dipolo, sendo essa solvatação dependente da interação soluto-solvente [69, 7].

Existem dois tipos solvatocromismo, que podem afetar as moléculas e por consequência seu espectro de absorção:

- **O solvatocromismo negativo**, geralmente, ocorre do aumento da polaridade do meio (aumento da polaridade do solvente), isto dá como resultado um estado fundamental mais estabilizado do que o estado excitado, e assim é apresentado um deslocamento hipsocrômico (para o azul) da banda de absorção, ou seja, para comprimentos de onda menores [73].
- **O solvatocromismo positivo**, geralmente, ocorre quando se observa uma melhor estabilização do estado excitado do soluto, em comparação com o estado fundamental da molécula, em consequência do aumento da polaridade do solvente, constituindo uma mudança batocrômica, ou para o vermelho [9, 69].

Como forma de ilustrar os tipos de solvatocromismo apresenta-se na figura 18 uma representação do solvatocromismo negativo e do positivo.

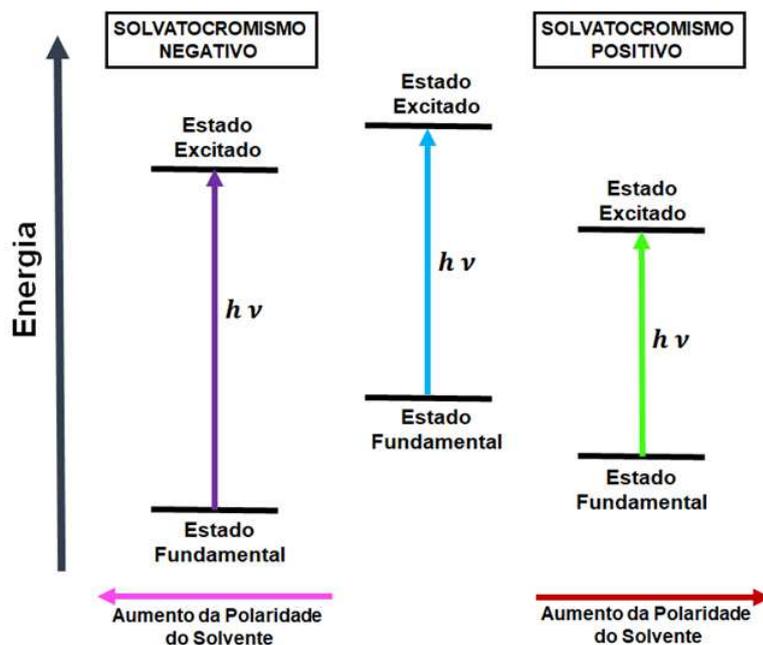


Figura 18 – Representação do solvatocromismo negativo e positivo. Adaptado de [69].

Como exemplo e considerando as informações mostradas na figura 19 para uma representação arbitrária de certas transições eletrônicas entre os orbitais moleculares, pode-se observar que um solvente mais polar causa um deslocamento batocrômico nas bandas $\pi \rightarrow \pi^*$. Isso se deve principalmente ao fato de que um solvente hidrolítico estabiliza mais o estado excitado do que o estado fundamental. O efeito do solvente na posição das bandas devido às transições $n \rightarrow \pi^*$ é geralmente oposto ao das transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Os solventes hidrolíticos estabilizam o orbital n , causando um deslocamento hipsocrômico. O efeito é mais pronunciado se o solvente tiver uma constante dielétrica mais alta, podem ser observadas alterações no comprimento de onda de até 30 nm nas bandas de absorção máximas [62].

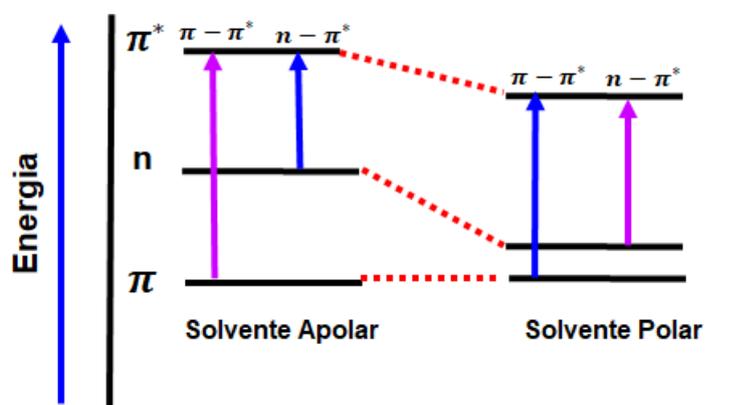


Figura 19 – Efeito dos solventes polares nas transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Adaptado de [62].

Desta maneira, o fato dos carotenoides apresentassem três bandas de absorção máximas em comprimentos de onda diferentes, encontramos que estas bandas de absorção podem se deslocar dependendo do solvente utilizado para extrair estas biomoléculas. Os comprimentos de onda nos quais ocorre a absorção máxima no solvente de hexano, éter de petróleo, éter dietílico, etanol, metanol e acetonitrila são muito semelhantes, e pode se encontrar deslocamentos entre 2-6 *nm* em acetona, 10-20 *nm* em clorofórmio e em diclorometano, e entre 18-24 *nm* em tolueno [50].

2.3.3 Constante dielétrica e momento dipolar

A constante dielétrica e o momento dipolar são propriedades complementares de uma substância. Ambas as constantes físicas são frequentemente usadas para caracterizar sua polaridade, embora o momento dipolar não representa a polaridade de um solvente. Quando se diz que uma molécula é polar, significa que ela tem um alto momento dipolar. No entanto, quando um solvente é considerado polar, isso significa que tem uma constante dielétrica alta. Em outras palavras, a polaridade de um solvente ou constante dielétrica é uma propriedade macroscópica (no nível macroscópico), assim, quanto maior for a constante dielétrica, maior será a polaridade. Solventes com constantes dielétricas inferiores a cinco são “considerados” apolares, enquanto a polaridade molecular ou momento de dipolo é uma propriedade de moléculas isoladas [7, 69, 70].

Tabela 5 – Solventes polares próticos comuns [74]

Solvente	Constante dielétrica	Momento de dipolo	Ponto de ebulição (°C)
Água	80.1	1.85	100
Metanol	33.0	1.69	64.5
Amoníaco	31.6	1.42	-33.34
Etanol	25.3	1.69	78.3

Tabela 6 – Solventes polares apróticos comuns [75]

Solvente	Constante dielétrica	Momento de dipolo	Ponto de ebulição (°C)
Dimetilsulfóxido DMSO	46.68	3.96	189
Dimetilformamida DMF	36.71	3.86	153
Acetonitrila MeCN	38.8	3.92	81.6
Acetona	20.7	2.88	56

Tabela 7 – Solventes apolares comuns [76]

Solvente	Constante dielétrica	Momento de dipolo	Ponto de ebulição (°C)
Clorofórmio	4.81	1.15	61.7
Éter Dietílico	4.33	1.15	34.6
Tolueno	2.38	0.375	110.6
Hexano	1.88	1.08	69

2.4 Simulação Computacional

2.4.1 Aproximação de Born - Oppenheimer

Em um sistema molecular, elétrons e núcleos estão confinados em um volume correspondente ao tamanho da molécula. Como a massa nuclear é pelo menos 1.840 vezes maior que a do elétron, o princípio da incerteza nos leva ao fato de que a velocidade do elétron é da ordem de 1.000 vezes a do núcleo [77]. É por isso que os núcleos são de fato muito mais localizados nas moléculas do que nos elétrons, já que as velocidades nucleares são consideravelmente menores do que os elétrons. Enquanto que a equação de Schrödinger para um átomo de hidrogênio pode ser resolvida exatamente. Uma solução exata não é possível para nenhuma molécula porque a molécula mais simples consiste em três partículas (dois núcleos e um elétron) [78]. Se assumirmos que os núcleos e elétrons são massas pontuais e sem levar em conta as interações de spin-órbita e outras interações relativísticas, então o Hamiltoniano molecular é:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{\alpha} \frac{1}{m_{\alpha}} \nabla_{\alpha}^2 - \frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_{\alpha} \sum_{\beta > \alpha} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta} e'^2}{r_{\alpha\beta}} - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e'^2}{r_{i\alpha}} + \sum_j \sum_{i > j} \frac{e'^2}{r_{ij}} \quad (2.4)$$

onde α e β se referem a núcleos e i e j se referem a elétrons. O primeiro termo da [Equação 2.4](#) é o operador para a energia cinética dos núcleos. O segundo termo é o operador da energia cinética dos elétrons. O terceiro termo é a energia potencial das repulsões entre os núcleos (V_{NN}), sendo $r_{\alpha\beta}$ a distância entre os núcleos α e β com números atômicos Z_{α} e Z_{β} . O quarto termo é a energia potencial das atrações entre os elétrons e os núcleos, $r_{i\alpha}$ sendo a distância entre o elétron i e o núcleo α . O último termo é a energia potencial das repulsões entre os elétrons, r_{ij} sendo a distância entre os elétrons i e j . O nível zero de energia potencial para [Equação 2.4](#) corresponde a ter todas as cargas (elétrons e núcleos) infinitamente distantes umas das outras.

As funções de onda e as energias de uma molécula são encontradas a partir da equação de Schrödinger:

$$\hat{H}\Psi(q_i, q_{\alpha}) = E\Psi(q_i, q_{\alpha}) \quad (2.5)$$

onde q_i e q_α simbolizam as coordenadas eletrônicas e nucleares, respectivamente.

A aproximação de Born - Oppenheimer consiste em separar os movimentos dos elétrons e núcleos, o princípio desta aproximação está no fato de que os núcleos são muito mais pesados que os elétrons ($m_\alpha \gg m_e$). Conseqüentemente, os elétrons se movem muito mais rápido do que os núcleos, e com uma boa aproximação no que diz respeito aos elétrons, podemos considerar os núcleos fixos enquanto os elétrons realizam seus movimentos [78]. Classicamente, durante o tempo de um ciclo de movimento eletrônico, a mudança na configuração nuclear é insignificante [79]. Assim, considerando os núcleos fixos, omitimos os termos da energia cinética nuclear da Equação 2.4 para obter o Hamiltoniano puramente eletrônico:

$$\hat{H}_{el} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_\alpha \sum_i \frac{Z_\alpha e'^2}{r_{i\alpha}} + \sum_j \sum_{i>j} \frac{e'^2}{r_{ij}} \quad (2.6)$$

O Hamiltoniano eletrônico incluindo a repulsão nuclear é $\hat{H}_{el} + V_{NN}$ deste modo, a equação do movimento eletrônico é descrita por:

$$(\hat{H}_{el} - V_{NN})\Psi_{el} = U\Psi_{el} \quad (2.7)$$

A energia U em Equação 2.7 é a energia eletrônica incluindo repulsão internuclear. As distâncias internucleares $r_{\alpha\beta}$ não são variáveis, mas são fixada em algum valor constante. Obviamente, há um número infinito de configurações nucleares possíveis e, para cada uma delas, podemos resolver a equação eletrônica de Schrödinger (Equação 2.7) para obter um conjunto de funções de onda eletrônicas e suas correspondentes energias eletrônicas; cada membro do conjunto corresponde a um estado eletrônico molecular diferente [79]. As funções e energias das ondas eletrônicas, portanto, dependem parametricamente da configuração nuclear, quer dizer:

$$\Psi_{el} = \Psi_{el,n}(q_i; q_\alpha) \quad e \quad U = U_n(q_\alpha)$$

onde n simboliza os números quânticos eletrônicos.

As variáveis na equação de Schrödinger eletrônica são as coordenadas eletrônicas. A quantidade V_{NN} é independente dessas coordenadas e é uma constante para uma determinada configuração nuclear, assim que a omissão de um termo constante C do Hamiltoniano não afeta as funções de onda e simplesmente diminui cada autovalor de energia em C . Portanto, se V_{NN} for omitido da Equação 2.7, obtemos

$$\hat{H}_{el}\Psi_{el} = E_{el}\Psi_{el} \quad (2.8)$$

onde a energia puramente eletrônica E_{el} (que depende parametricamente das coordenadas nucleares q_α) está relacionada à energia eletrônica incluindo repulsão internuclear por

$$U = E_{el} + V_{NN} \quad (2.9)$$

Podemos, portanto, omitir a repulsão internuclear da equação de Schrödinger eletrônica. Depois de encontrar E_{el} para uma configuração particular dos núcleos resolvendo a [Equação 2.8](#), calculamos U usando a [Equação 2.9](#), onde a constante V_{NN} é calculada usando as localizações nucleares assumidas.

2.4.2 Método de Hartree-Fock

A teoria Hartree-Fock (HF) é fundamental para grande parte da teoria da estrutura eletrônica. É a base da teoria orbital molecular (MO), que postula que o movimento de cada elétron pode ser descrito por uma função de partícula única (orbital) que não depende explicitamente dos movimentos instantâneos dos outros elétrons. No entanto, é importante lembrar que esses orbitais são construções matemáticas que apenas se aproximam da realidade. Apenas para o átomo de hidrogênio (ou outros sistemas de um elétron, como He^+) os orbitais são autofunções exatas do hamiltoniano eletrônico completo. Enquanto ao considerar as moléculas perto de sua geometria de equilíbrio, a teoria de HF muitas vezes fornece um bom ponto de partida para métodos teóricos mais elaborados que são melhores aproximações da equação eletrônica de Schrödinger (por exemplo, teoria de perturbação de muitos corpos, referência única interação de configuração).

A teoria HF foi desenvolvida para resolver a equação de Schrödinger eletrônica que resulta da equação de Schrödinger independente do tempo após de levar em consideração a aproximação de Born-Oppenheimer ([Equação 2.6](#)), neste caso vamos utilizar o sistema de unidades atômicas, onde a distância é dada em raios de Bohr e a energia em Hartree, podemos reescrever o Hamiltoniano eletrônico como:

$$\hat{H}_{el} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}} + \sum_j \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.10)$$

Sabendo que o princípio de Pauli para férmions (elétrons) exige que a função de onda que descreve um sistema de muitos elétrons seja antissimétrica perante uma troca das coordenadas de dois desses elétrons. Como a antissimetria é uma característica dos determinantes, uma forma conveniente é expandir a função de onda eletrônica num conjunto completo de funções determinantes, conhecidas como determinantes de Slater [[80](#), [81](#), [79](#)]. Esta é a essência do método de HF e, de acordo com este modelo, a função de onda de muitos elétrons pode ser escrita como:

$$\Psi_0 = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \xi_1(\mathbf{x}_1) & \xi_2(\mathbf{x}_1) & \cdots & \xi_N(\mathbf{x}_1) \\ \xi_1(\mathbf{x}_2) & \xi_2(\mathbf{x}_2) & \cdots & \xi_N(\mathbf{x}_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \xi_1(\mathbf{x}_N) & \xi_2(\mathbf{x}_N) & \cdots & \xi_N(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (2.11)$$

onde $\frac{1}{\sqrt{N!}}$ é uma constante de normalização para Ψ_0 , e os ξ são as soluções dos spin-orbitais moleculares os quais são ortonormais.

A Equação 2.11 pode-se rescrever como:

$$\Psi_0 = \frac{1}{\sqrt{N!}} \sum_{i=1}^{N!} (-1)^{p_i} P_i \{ \xi_1(\mathbf{x}_1) \xi_2(\mathbf{x}_2) \cdots \xi_N(\mathbf{x}_N) \} \quad (2.12)$$

onde P_i é o operador que gera a i -ésima permutação dos índices \mathbf{x} , o p_i é o número de trocas necessárias para transformar a sequência original 1, 2, 3, \dots , N , na i -ésima permutação. Esta forma é equivalente à Equação 2.11.

Ao fim de calcular o valor esperado do operador \hat{H}_{el} , nós repararemos em duas partes:

$$\hat{H}_{el} = H_1 + H_2 \quad (2.13)$$

onde

$$H_1 = \sum_{i=1}^N h(i) \quad \text{com} \quad h(i) = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{\alpha=1}^Z \frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}}$$

$$H_2 = \sum_{i=1}^N \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}}$$

assim, considerando o valor esperado de H_1 :

$$\langle \Psi_0 | H_1 | \Psi_0 \rangle = \langle \Psi_0 | h(1) + \cdots + h(N) | \Psi_0 \rangle \quad (2.14)$$

como os elétrons são indistinguíveis, temos que:

$$\langle \Psi_0 | h(1) | \Psi_0 \rangle = \langle \Psi_0 | h(2) | \Psi_0 \rangle = \cdots = \langle \Psi_0 | h(N) | \Psi_0 \rangle$$

de forma que

$$\begin{aligned} \langle \Psi_0 | H_1 | \Psi_0 \rangle &= N \langle \Psi_0 | h(1) | \Psi_0 \rangle \\ &= N \times \frac{1}{N!} \sum_{i=1}^{N!} \sum_{j=1}^{N!} (-1)^{p_i} (-1)^{p_j} \\ &\quad \times \langle P_i \{ \xi_1(1) \xi_2(2) \cdots \xi_N(N) \} | h(1) | P_j \{ \xi_1(1) \xi_2(2) \cdots \xi_N(N) \} \rangle \end{aligned} \quad (2.15)$$

considerando que a integração sobre as coordenadas dos elétrons 2, 3, \dots , N só será diferente de zero se cada um desses elétrons ocupar o mesmo spin-orbital nas permutações P_i e P_j . Mas se os elétrons 2, 3, \dots , N ocuparam os mesmos spin-orbitais em ambas as permutações, o elétron 1 também terá que ocupar o mesmo spin-orbital (o que sobrou). Assim as permutações P_i e P_j terão que ser iguais, e portanto

$$\begin{aligned} \langle \Psi_0 | H_1 | \Psi_0 \rangle &= \frac{1}{(N-1)!} \\ &\quad \times \sum_{j=1}^{N!} \langle P_i \{ \xi_1(1) \xi_2(2) \cdots \xi_N(N) \} | h(1) | P_i \{ \xi_1(1) \xi_2(2) \cdots \xi_N(N) \} \rangle \end{aligned} \quad (2.16)$$

se consideramos a soma de todas as perturbações, o elétron 1 ocupa $(N-1)!$ vezes o spin-orbital a , onde $a = 1, 2, \dots, N$, se as integrais dos elétrons 2, 3, \dots , N são iguais a 1. Assim

$$\langle \Psi_0 | H_1 | \Psi_0 \rangle = (N-1)! \times \frac{1}{(N-1)!} \sum_{a=1}^N \langle \xi_a(1) | h(1) | \xi_a(1) \rangle \quad (2.17)$$

Definindo a notação

$$\langle a | h | a \rangle = \langle \xi_a | h | \xi_a \rangle = \langle \xi_a(1) | h(1) | \xi_a(a) \rangle$$

Deste modo, podemos rescrever a [Equação 2.17](#) como:

$$\langle \Psi_0 | H_1 | \Psi_0 \rangle = \sum_{a=1}^N \langle a | h | a \rangle \quad (2.18)$$

Considerando agora o valor esperado do segundo termo da [Equação 2.13](#)

$$\langle \Psi_0 | H_2 | \Psi_0 \rangle = \left\langle \Psi_0 \left| \frac{1}{r_{12}} + \frac{1}{r_{13}} + \cdots + \frac{1}{r_{1N}} \right| \Psi_0 \right\rangle \quad (2.19)$$

como os elétrons são indistinguíveis, pode-se considerar que

$$\left\langle \Psi_0 \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \Psi_0 \right\rangle = \left\langle \Psi_0 \left| \frac{1}{r_{13}} \right| \Psi_0 \right\rangle = \cdots = \left\langle \Psi_0 \left| \frac{1}{r_{1N}} \right| \Psi_0 \right\rangle$$

desta forma temos que

$$\langle \Psi_0 | H_2 | \Psi_0 \rangle = \frac{N(N-1)}{2} \left\langle \Psi_0 \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \Psi_0 \right\rangle = \quad (2.20)$$

onde $\frac{N(N-1)}{2}$ é o número de elementos que aparecem na [Equação 2.19](#), assim

$$\begin{aligned} \langle \Psi_0 | H_2 | \Psi_0 \rangle &= \frac{N(N-1)}{2} \frac{1}{N!} \times \sum_{i=1}^{N!} \sum_{j=1}^{N!} (-1)^{p_i} (-1)^{p_j} \\ &\times \left\langle P_i \{ \xi_1(1) \xi_2(2) \cdots \xi_N(N) \} \left| \frac{1}{r_{12}} \right| P_j \{ \xi_1(1) \xi_2(2) \cdots \xi_N(N) \} \right\rangle \end{aligned} \quad (2.21)$$

uma vez que o operador $1/r_{12}$ só envolve os elétrons 1 e 2, assim, os elétrons 3, 4, ..., N devem ocupar os mesmos spin-orbitais nas duas permutações. Se os elétrons 1 e 2 ocuparem, respectivamente, os orbitais a e b , onde $\{a, b = 1, 2, \dots, N\}$. Na permutação P_i existiram duas possibilidades para a permutação P_j , a primeira, o elétron 1 ocupa o orbital a e o elétron 2 ocupa o orbital b , de forma que $P_j = P_i$; a segunda, o elétron 1 ocupa o orbital b e o elétron 2 ocupa o orbital a , de forma que $P_j \neq P_i$ pela troca das coordenadas dos elétrons 1 e 2. Como existem $(N-2)!$ maneiras diferentes de arranjar os elétrons 3, 4, ..., N nos N-2 spin-orbitais restantes e como as integrais sobre as coordenadas desses elétrons são iguais a 1, pode-se escrever

$$\begin{aligned} \langle \Psi_0 | H_2 | \Psi_0 \rangle &= (N-2)! \frac{N(N-1)}{2} \\ &\times \frac{1}{N!} \sum_{a=1}^N \sum_{b=1}^N \left\langle \xi_a(1) \xi_b(2) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \xi_a(1) \xi_b(2) - \xi_b(1) \xi_a(2) \right\rangle \end{aligned} \quad (2.22)$$

levando em consideração a seguinte notação

$$\langle ab|cd\rangle = \left\langle \xi_a(1)\xi_b(2) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \xi_c(1)\xi_d(2) \right\rangle$$

assim, a [Equação 2.22](#) pode ser reescrita como

$$\langle \Psi_0 | H_2 | \Psi_0 \rangle = \frac{1}{2} \sum_{a=1}^N \sum_{b=1}^N \{ \langle ab|ab\rangle - \langle ab|ba\rangle \} \quad (2.23)$$

considerando a seguinte notação

$$\langle ab| | ab \rangle = \langle ab|ab\rangle - \langle ab|ba\rangle$$

finalmente a [Equação 2.23](#) fica

$$\langle \Psi_0 | H_2 | \Psi_0 \rangle = \frac{1}{2} \sum_{a=1}^N \sum_{b=1}^N \langle ab| | ab \rangle \quad (2.24)$$

Tendo em conta a [Equação 2.18](#) e a [Equação 2.24](#), podemos escrever o valor esperado do operador \hat{H} como

$$E = \langle \Psi_0 | \hat{H} | \Psi_0 \rangle = \sum_{a=1}^N \langle a | h | b \rangle + \frac{1}{2} \sum_{a=1}^N \sum_{b=1}^N \langle ab| | ab \rangle \quad (2.25)$$

Agora, para obter uma equação de autovalores para os spin-orbitais moleculares, temos que fazer uso do teorema variacional, o qual afirma que, dada uma função de onda normalizada (Ψ_0), que satisfaz as condições de contorno apropriadas para o problema de interesse, o valor esperado do operador Hamiltoniano é um limite superior para a energia exata do estado fundamental [79, 78, 80], ou seja

$$\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle \geq E_{Exata} \quad (2.26)$$

A ideia do método HF é combinar o princípio variacional com a suposição de que a função de onda que descreve o sistema molecular é um determinante de Slater. Deste modo, podemos dizer que a melhor função de onda é aquela que conduz a um mínimo valor médio do operador Hamiltoniano, que neste contexto, é o funcional dos spin-orbitais moleculares. Desta forma, devemos minimizar o funcional da [Equação 2.25](#) sob a restrição de que os spin-orbitais moleculares permaneçam ortonormais, ou seja

$$\langle \xi_a | \xi_b \rangle - \delta_{ab} = 0 \quad (2.27)$$

este tipo de problema, onde as condições de vínculo se fazem presentes podem ser resolvidos utilizando a técnica dos multiplicadores indeterminados de Lagrange [82]. O método consiste em minimizar o funcional

$$\mathcal{L}[\xi] = E[\xi] - \sum_{a,b} \epsilon_{ab} \{ \langle \xi_a | \xi_b \rangle - \delta_{ab} \} \quad (2.28)$$

onde os coeficientes ϵ_{ab} são os multiplicadores de Lagrange.

Se cada um dos spin-orbitais sofrer uma pequena variação $\delta\xi$, então \mathcal{L} sofrerá uma variação $\delta\mathcal{L}$, assim, teremos que

$$\begin{aligned} \delta\mathcal{L} &= \sum_a \langle \delta\xi_a | h | \xi_a \rangle + \sum_{ab} \{ \langle \delta\xi_a \xi_b | \xi_a \xi_b \rangle - \langle \delta\xi_a \xi_b | \xi_b \xi_a \rangle \} \\ &\quad - \sum_{ab} \epsilon_{ab} \langle \delta\xi_a | \xi_b \rangle + \text{complexo conjugado} \end{aligned} \quad (2.29)$$

Definindo os operadores de Coulomb (\mathcal{J}_b) e o operador de troca (\mathcal{K}_b), com as seguintes expressões

$$\begin{aligned} \mathcal{J}_b(1)\xi_a(1) &= \left\langle \xi_b(1) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \xi_b(1) \right\rangle \xi_a(1) \\ \mathcal{K}_b(1)\xi_a(1) &= \left\langle \xi_b(1) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \xi_a(1) \right\rangle \xi_b(1) \end{aligned}$$

tendo em conta estes dois operadores, podemos escrever

$$\begin{aligned} \delta\mathcal{L} &= \sum_a \left\langle \delta\xi_a(1) \left| \left\{ \left[h(1) + \sum_b [\mathcal{J}_b(1) - \mathcal{K}_b(1)] \right] \right| \xi_a(1) \right\rangle \right. \\ &\quad \left. - \sum_b \epsilon_{ab} \left| \xi_b(1) \right\rangle \right\rangle + \text{complexo conjugado} \end{aligned} \quad (2.30)$$

para que \mathcal{L} seja um mínimo devemos ter $\delta\mathcal{L} = 0$. Como $\delta\xi_a$ é arbitrário, pode-se fazer

$$\left\{ h(1) + \sum_b [\mathcal{J}_b(1) - \mathcal{K}_b(1)] \right\} \xi_a(1) = \sum_b \epsilon_{ab} \xi_b(1)$$

onde a quantidade entre chaves pode ser definido como

$$\mathcal{F} = h(1) + \sum_b [\mathcal{J}_b(1) - \mathcal{K}_b(1)] \quad (2.31)$$

o termo \mathcal{F} é chamado como operador de Fock, assim, em termos deste operador pode-se definir

$$\mathcal{F}(1)\xi_a(1) = \sum_b \epsilon_{ab} \xi_b(1) \quad (2.32)$$

A Equação 2.32 pode ser simplificada utilizando uma transformação unitária [83]

$$\epsilon'_{ab} = \epsilon'_a \delta_{ab}$$

assim,

$$\mathcal{F}(1)\xi'_a(1) = \sum_b \epsilon'_a \delta_{ab} \xi'_b(1) = \epsilon'_a \xi'_a(1)$$

finalmente a Equação 2.32 fica,

$$\mathcal{F}(1)\xi_a(1) = \epsilon_a \xi_a(1) \quad (2.33)$$

a [Equação 2.33](#) é chamada de equação canônica de Hartree-Fock, deste modo, os spin-orbitais obtidos são chamados de spin-orbitais canônicos.

Da [Equação 2.33](#) podemos obter

$$\epsilon_a = \left\langle \xi_a(1) \left| h(1) + \sum_b^N [\mathcal{J}_b(1) - \mathcal{K}_b(1)] \right| \xi_a(1) \right\rangle \quad (2.34)$$

com esta expressão podemos encontrar as energias dos orbitais.

Utilizando as definições dos operadores de Coulomb e de troca, é possível verificar que

$$\epsilon_a = \langle a | h | a \rangle + \sum_b^N \langle ab | ab \rangle$$

se aplicamos \sum_a^N à equação anterior, temos

$$\sum_a^N \epsilon_a = \sum_a^N \langle a | h | a \rangle + \sum_{a,b}^N \langle a, b | ab \rangle \quad (2.35)$$

fazendo uso da [Equação 2.25](#) e da [Equação 2.35](#) encontramos finalmente que

$$E = \sum_a^N \epsilon_a - \frac{1}{2} \sum_{ab}^N \langle a, b | ab \rangle \quad (2.36)$$

é importante notar que a energia eletrônica total não é igual à soma das energias orbitais; as energias orbitais são os autovalores do operador de Fock, o qual inclui a energia de repulsão entre um dado elétron e todos os demais. Desta forma, somar as energias orbitais implica em contar a energia de repulsão elétron-elétron total duas vezes. Para compensar a contagem dupla, a energia de repulsão elétron-elétron deve ser subtraída.

Assim, devemos considerar o seguinte, o operador de Fock depende das soluções da equação de HF, além disso, existe uma equação para cada orbital que depende dos outros orbitais através do operador de HF. Deste modo, as equações devem ser resolvidas de forma acoplada, através de aproximações sucessivas. Por isso, se diz que o método HF é um método auto-consistente, ou seja, no processo iterativo os ξ'^s que são soluções da equação de Hartree-Fock devem ser os mesmos ξ'^s a partir dos quais se obteve o operador de Fock.

2.4.3 Teoria do Funcional de Densidade

Como já foi falado para estudar a estrutura eletrônica e as diversas propriedades dos átomos e moléculas é necessário resolver a equação de Schrödinger, cujo Hamiltoniano geral para os elétrons de uma molécula poliatômica é:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{\alpha} \frac{1}{m_{\alpha}} \nabla_{\alpha}^2 - \frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_{\alpha} \sum_{\beta > \alpha} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta} e'^2}{r_{\alpha\beta}} - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e'^2}{r_{i\alpha}} + \sum_j \sum_{i > j} \frac{e'^2}{r_{ij}} \quad (2.37)$$

A função de onda eletrônica de uma molécula de \mathbf{n} elétrons depende de $3\mathbf{n}$ coordenadas espaciais, quer dizer, $3\mathbf{n}$ variáveis, porém a matemática envolvida na solução da equação de Schrödinger é complexa e poucos problemas tem resolução exata, por esta razão é necessário utilizar uma serie de aproximações.

Uma forma de resolver a equação de Schrödinger para um sistema multieletrônico é usando a sua densidade eletrônica. Assim, uma metologia alternativa chamada Teoria do Funcional da Densidade (DFT) foi desenvolvida, a ideia por trás da DFT é buscar uma densidade eletrônica ($\rho(\mathbf{r})$) representada por 3 variáveis que reproduza uma função de onda de $3\mathbf{n}$ variáveis [84]. O uso da densidade eletrônica como variável básica foi legitimada com a publicação dos teoremas de Hohenberg e Kohn (HK) em 1964 sobre o gás de elétrons não homogêneos [85], os quais enunciam o seguinte:

1. O potencial externo $V_{ext}(\mathbf{r})$ sentido pelos elétrons é um funcional único da densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$.
2. A energia do estado fundamental $E_0[\rho]$ é mínima para a densidade $\rho(\mathbf{r})$.

onde o primeiro teorema implica que a densidade eletrônica de um sistema determina o potencial externo sentido pelos elétrons (no caso das moléculas é devido as cargas dos núcleos) e o número (\mathbf{n}) de elétrons. O segundo teorema, em termos geral diz, que a energia do estado fundamental do sistema pode ser obtida minimizando a energia total com relação a densidade eletrônica.

Em particular, Hohenberg e Kohn mostraram que a energia é um funcional de densidade por meio da relação

$$E[\rho] = F[\rho] + \int \rho(\mathbf{r})v[\mathbf{r}]d\mathbf{r}$$

onde $F[\rho]$ representa o funcional universal que contém energia cinética $T[\rho]$, e a interação elétron-elétron $V_{ee}[\rho]$.

Kohn e Sham apresentaram uma maneira de aproximar o funcional universal $F[\rho]$, Para tanto, Kohn e Sham recorreram a um sistema fictício constituído por um sistema de N elétrons não interagentes. Isso significa que tal sistema pode ser representado por um determinante (o determinante de Slater) cujos elementos são funções que representam cada um dos elétrons do sistema (orbitais, ϕ_i). Assim, a energia cinética corresponde a uma soma das energias cinéticas individuais e a densidade do elétron à soma das densidades orbitais

$$T_s = \sum_{i=1}^N \int \phi_i^*(\mathbf{r}) \left(-\frac{1}{2}\nabla^2 \right) \phi_i(\mathbf{r}) \quad \rho(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N \rho_i(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N \phi_i^*(\mathbf{r})\phi_i(\mathbf{r})$$

Um elemento adicional no modelo de Kohn e Sham é a abordagem da interação elétron-elétron, uma vez que propõem a interação coulombiana como sua parte principal:

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}'$$

com isso o funcional universal é escrito como:

$$F[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (2.38)$$

onde o funcional de troca e correlação, $E_{xc}[\rho]$, é definido como:

$$E_{xc}[\rho] = T[\rho] - T_s[\rho] + V_{ee}[\rho] - J[\rho]$$

Os orbitais Kohn e Sham são aqueles que satisfazem as equações diferenciais inteiras de Kohn e Sham e que irão gerar a energia do estado fundamental:

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{eff}(\mathbf{r})\right) \phi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \phi_i(\mathbf{r}) \quad (2.39)$$

O potencial de Kohn-Sham $V_{eff}(\mathbf{r})$, incorpora os efeitos da interação entre elétrons (incluindo correlação de troca) e também aqueles de um possível potencial externo de confinamento (por exemplo, o potencial atrativo do núcleo atômico em elétrons) $V(\mathbf{r})$. Formalmente, o potencial de Kohn-Sham é definido como a derivada funcional

$$V_{eff}(\mathbf{r}) = \frac{\delta J[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} + \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} + v(\mathbf{r}) = \int d\mathbf{r}' \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} + \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} + v(\mathbf{r})$$

Na prática, é para o segundo termo, chamado de potencial de correlação de troca $V_{xc}[\rho] = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})}$ que as expressões aproximadas devem ser usadas.

A ideia básica do método Kohn-Sham, portanto, pode ser resumida da seguinte forma: o problema de N partículas interagindo entre si e confinadas a um certo potencial externo $V(\mathbf{r})$, é redefinido em termos de um sistema artificial onde as partículas não interagem, mas se movem sob a ação de um potencial efetivo $V_{eff}(\mathbf{r})$. Isso deve modelar os efeitos da interação do sistema físico original de forma que ambos os problemas sejam equivalentes (ou seja, eles têm a mesma distribuição de densidade e, portanto, a mesma energia).

A DFT foi desenvolvida dentro da estrutura da teoria quântica não relativística (equação de Schrödinger independente do tempo) e da aproximação de Born Oppenheimer. A teoria foi posteriormente estendida ao domínio da mecânica quântica dependente do tempo, e falamos da TDDFT ou Teoria Funcional da Densidade Dependente do Tempo e do domínio relativístico. Entre outras coisas, problemas como processos de fotoabsorção de átomos e moléculas tem sido tratados com sucesso nessa abordagem, isso torna possível calcular estados excitados.

2.4.3.1 Funcional e Base

A correlação eletrônica de um sistemas de muitos corpos impõe dificuldades a todos os métodos e, portanto, a chave para o sucesso de qualquer método, incluindo a DFT, é a capacidade de incluir uma grande parte da correlação eletrônica. Em DFT a correlação e a troca são incluídas através dos funcionais densidade (DF - Density Functional), permitindo obter precisão e confiabilidade no entendimento e previsão de sistemas quânticos, com razoável relação custo benefício, quando comparados com outros métodos ab initio [86], podendo fornecer resultados exatos caso este funcional seja conhecido. Contudo, tais funcionais não podem ser conhecidos de forma exata e, por isso, uma grande quantidade de aproximações surgiram ao longo dos anos. Assim, a título de menção, os DFs podem ser classificados em seis grupos principais: aproximação de densidade local (LDA), aproximação do gradiente generalizado (GGA), meta-GGA, DF híbridos, DF de duplo híbrido e DF separados por intervalo [86, 87].

De modo geral os métodos em DFT mais tradicionais são incluídos em três classes. Aqueles que usam a chamada Aproximação da Densidade Local (**LDA** - Local Density Approximation), baseado na parametrização do gás de elétrons homogêneo. O método conhecido como aproximação **GGA** (Generalized Gradient Approximation), é baseados na densidade eletrônica mas levam em conta também seu gradiente, este último responsável por introduzir nos cálculos a não uniformidade da densidade de carga, já que o gradiente introduz uma taxa de variação de alguma quantidade, aqui é a densidade eletrônica. Finalmente, outros métodos levam em conta uma combinação de funcionais para a energia de troca dentro de outros níveis de teoria que, combinado com um funcional para energia de correlação eletrônica da origem são chamados de métodos ou funcionais híbridos. O Funcional **B3LYP**, pertence a esta última classe de métodos e é notadamente o mais popular dentro da DFT, a natureza híbrida deste funcional pode ser confirmada na composição da energia de troca e correlação E_{xc} escrita como

$$E_{xc} = (1-a_0)E_x(LDA) + a_0E_x(HF) + a_xE_x(B88_x) + a_cE_c(LYP88_c) + (1-a_c)E_c(VWN80_c) \quad (2.40)$$

Notou-se as várias aproximações presentes na [Equação 2.40](#), LDA, HF, Becke 1988 (B88) para interação de troca, Lee-Yang-Parr 1988 (LYP88) para correlação eletrônica e Vosko-Wilks-Nusair 1980 (VWN80) para correlação eletrônica. Os coeficientes percentuais são respectivamente $a_0 = 0.2$, $a_x = 0.72$ e $a_c = 0.81$.

Neste trabalho foram utilizados funcionais híbridos entre os quais destacam os Funcionais **B3LYP** e **CAM-B3LYP**, este último é uma versão corrigida do B3LYP, o qual inclui correções de longo alcance usando o método de atenuação de Coulomb.

Por outro lado, os orbitais moleculares podem ser construído através de uma combinação linear de **funções de base**, onde essas funções correspondem aos orbitais atômicos. São dois tipos de funções de base que são comumente utilizados para o cálculo

de estrutura eletrônica. Estas são: funções de Slater (Slater Type Orbitals, **STO**'s) e as funções Gaussianas (Gaussian Type Orbitals, **GTO**'s). Há também as funções que combinam as funções de Slater e as funções Gaussianas. Esse conjunto de bases, STO-KG consiste em expandir os orbitais do tipo Slater em **N** funções gaussianas primitivas,

$$X_m^{STO} = \sum_i^N d_{mi} X_i^{GTO}$$

Aqui, a função de base formada pela combinação linear de funções gaussianas é definida como uma base contraída e cada gaussiana que compõem essa combinação linear é definida como primitiva.

Huzinaga em [88] e Pople e colaboradores em [89], constataram que a melhor combinação entre a precisão e a velocidade para as funções de bases obtidas pela combinação linear de gaussianas foi obtido com **K=3**. Essa função base, STO-3G, ficou conhecida como base mínima ou *single- ζ* , em que há apenas uma função de base definida para cada tipo de orbital. Embora a escolha da base mínima seja satisfatória para alguns sistemas ela apresenta limitações, nesse sentido, surgem funções de base em que o orbital atômico será representado a partir de duas funções contraídas, esse novo conjunto de funções de base é denominado *double- ζ* . O mesmo raciocínio é seguido para construir funções *multiple- ζ* . Há também o conjunto de funções de base split-valence em que os orbitais internos são representados por funções *single- ζ* ou *double- ζ* e possuem um número maior de funções de base para os orbitais de valência.

A designação utilizada por Pople e colaboradores [90] para representar as funções de base contraídas é:

- **6-31G**: É uma função split-valence, em que a região próxima ao núcleo é representada pela contração de seis gaussianas, a região interna dos orbitais da camada de valência é representada pela contração de 3 gaussianas e a parte externa da camada de valência é representada pela contração de uma gaussiana.
- **6-31G***: (*) Indica que foi adicionada uma função tipo-*d* para polarizar a função tipo-*p* na base 6-31G.
- **6-31G****: (**) Indica que foi adicionado funções de polarização tipo-*d* para os átomos pesados e tipo-*p* para os hidrogênios.
- **6-31+G****: (+) Indica que foi adicionado funções difusas nos átomos pesados.
- **6-31++G****: (++) Indica que foi adicionado funções difusas nos átomos pesados e também nos átomos de hidrogênio

2.4.3.2 Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo

O formalismo TDDFT foi desenvolvido por Runge e Gross em 1984, o qual é baseado no fato de que duas densidades $\rho(\mathbf{r}, t)$ e $\rho'(\mathbf{r}, t)$, que evoluem de um estado inicial comum e são influenciadas por dois potenciais externos $V_{ext}(\mathbf{r}, t)$ e $V'_{ext}(\mathbf{r}, t)$ respectivamente, não coincidirá se os potenciais diferirem por mais de uma função independente de tempo [91]. Esta correspondência um-a-um para o caso de densidades e potenciais dependentes do tempo é a extensão do primeiro teorema de Hohenberg e Kohn para o domínio do tempo.

A abordagem de Runge e Gross considera um sistema de componente único na presença de um campo escalar dependente do tempo para o qual o hamiltoniano assume a forma

$$\hat{H}(t) = \hat{T} + \hat{W} + \hat{V}_{ext}(t) \quad (2.41)$$

onde \hat{T} é o operador de energia cinética, \hat{W} a interação elétron-elétron e $\hat{V}_{ext}(t)$ o potencial externo que juntamente com o número de elétrons define o sistema.

Nominalmente, o potencial externo contém a interação dos elétrons com os núcleos do sistema. Para uma dependência de tempo não trivial, há um potencial adicional explicitamente dependente do tempo que pode surgir, por exemplo, de um campo elétrico ou magnético dependente do tempo. A função de onda de muitos corpos evolui de acordo com a equação de Schrödinger dependente do tempo sob uma única condição inicial,

$$i \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\mathbf{r}, t) = \hat{H}(t) \Psi(\mathbf{r}, t) \quad ; \quad \Psi(\mathbf{r}, 0) = \Psi_0 \quad (2.42)$$

A forma mais utilizada de implementar o TDDFT é através da *Teoria de Resposta Linear* (**LRT-Linear Response Theory**) e esta é utilizada para calcular a energia de absorção, geometria de estados excitados, energia de emissão, entre outras. A função resposta da densidade X fornecida pela **LRT** é dada por

$$X(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) = \lim_{\eta \rightarrow 0^+} \sum_m \left(\frac{\langle 0 | \rho(\mathbf{r}) | m \rangle \langle m | \rho(\mathbf{r}') | 0 \rangle}{\omega - (E_m - E_0) + i\eta} - \frac{\langle 0 | \rho(\mathbf{r}') | m \rangle \langle m | \rho(\mathbf{r}) | 0 \rangle}{\omega + (E_m - E_0) + i\eta} \right) \quad (2.43)$$

A [Equação 2.43](#), mede a mudança da densidade quando é introduzida uma perturbação infinitesimal no potencial externo e os seus polos são as energias de excitação do sistema. Os estados excitados pela TDDFT seguem o princípio de Frank-Condon (FC) que fornece as transições verticais entre níveis eletrônicos. O cálculo da energia de absorção ocorre com a geometria de mínima energia do estado fundamental.

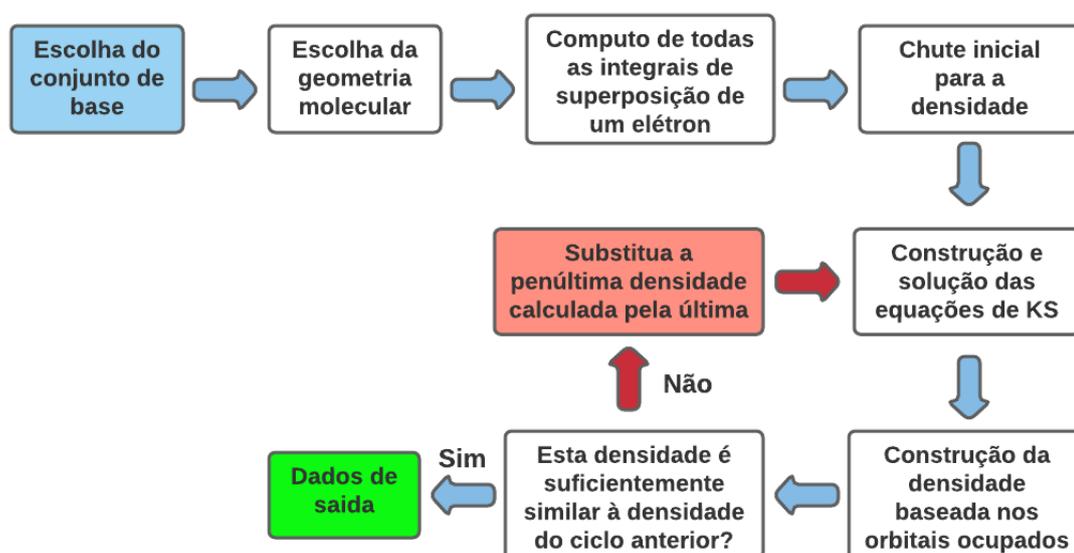


Figura 20 – Fluxograma do ciclo SCF de Kohn-Sham no cálculo DFT e TDDFT. Adaptado de [92].

Uma revisão detalhada da DFT e TDDFT não é o objetivo deste trabalho e, para isso, pode-se referir a [86, 93, 94]. A metodologia da TDDFT também permite computar os efeitos de solventes através dos modelos computacionais propostos por diferentes autores.

2.5 Teoria da Espectroscopia UV-Vis e PAS

2.5.1 Interação radiação-matéria

A radiação eletromagnética tem esse nome porque consiste em campos elétricos e magnéticos perpendiculares entre si, normais à direção de propagação da onda. A conexão da ótica com eletricidade e magnetismo foi realizada pela primeira vez por Maxwell por meio de suas equações, que formam a base de toda eletricidade e magnetismo. No entanto, a teoria ondulatória de Maxwell não explicava todas as propriedades da luz. As investigações realizadas ao longo de quatro décadas (1860-1900) por diversos pesquisadores sobre a radiação do corpo negro, culminaram na hipótese de Max Planck, que propunha que a energia de qualquer sistema que absorve ou emita radiação eletromagnética de frequência ν , varia de acordo com valores discretos ou descontínuos, isto é, múltiplos inteiros de um valor mínimo, o quantum de energia: $E = h\nu$, daí, vem a ideia de “quantum” ou pacote discreto de energia. No fim do século XIX, Albert Einstein apresentou a noção de dualidade onda-partícula para a luz introduzindo o conceito do fóton de modo que foi possível o entendimento do efeito fotoelétrico.

A espectroscopia é uma técnica experimental que se baseia na utilização da luz

para estudar a composição, a estrutura e as propriedades da matéria. Num experimento de espectroscopia, a amostra a ser estudada é irradiada com um feixe de luz incidente e a análise é feita com a luz transmitida, emitida ou difundida pela amostra. O resultado obtido é um registo que compara a composição da luz incidente na amostra com a luz transmitida, emitida ou difundida, e é designado por “espectro” da amostra. O registo de um espectro é efetuado através de equipamentos experimentais designados por espectrômetro, espectrofotômetro e espectrógrafo.

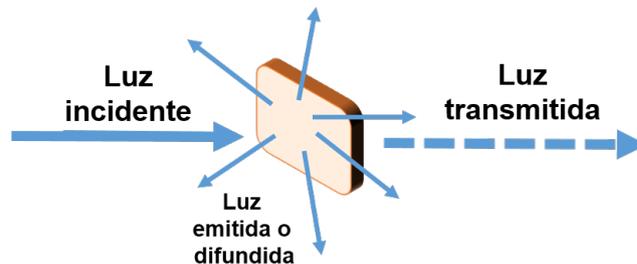


Figura 21 – Esquema das experiências de espectroscopia, a luz transmitida é luz que atravessou a amostra e que foi parcialmente absorvida pela amostra, a luz difundida resulta do espalhamento da luz incidente por colisão com a amostra, a luz emitida é luz com origem na própria amostra (em resultado de um processo físico desencadeado pela luz incidente). Fonte própria.

Para entender o fenômeno de interação radiação-matéria que está na base da espectroscopia, são necessários considerar dois conceitos, relacionados com as propriedades da luz e com a natureza quântica da matéria:

- A radiação eletromagnética, têm energia diferente, isto dependeram da sua frequência, assim, a radiação infravermelha têm menor energia que o a radiação do vermelho, e a luz ultravioleta têm energia superior à radiação violeta.
- Os sistemas atômico-moleculares que constituem a matéria apresentam estados discretos de energia, que podem ser vistos como os “degraus de uma escada” (níveis de energia), cada degrau é um nível de energia e é possível subir/descer de nível recebendo/libertando a energia correspondente a cada nível, mas não é possível estar a meio caminho, entre estes níveis. Dependendo da natureza e composição da amostra, os níveis de energia apresentam diferentes alturas, ou seja, sistemas atômico-moleculares diferentes apresentam níveis de energia com separações diferentes, conhecer a separação entre os níveis de energia permite compreender a estrutura e as propriedades de uma dada amostra.

Assim, os equipamentos de espectroscopia utiliza a radiação eletromagnética para medir a diferença de energia entre os níveis energéticos de um sistema. Para descrição dos eventos

envolvidos na absorção e na emissão de luz por uma molécula, o diagrama de Jablonski é uma ferramenta muito importante, nomeado desta forma em homenagem a Alexander Jablonski (1898 – 1980). Com esta forma de representação, pode-se visualizar melhor os diferentes estados eletrônicos, rotacionais e vibracionais além do estado fundamental e avaliar os possíveis processos quânticos como: absorção de fóton, conversão interna, cruzamento intersistemas, fosforescência e fluorescência. Pode-se avaliar, também, as interações de supressão, energia de transferência e interação com o solvente.

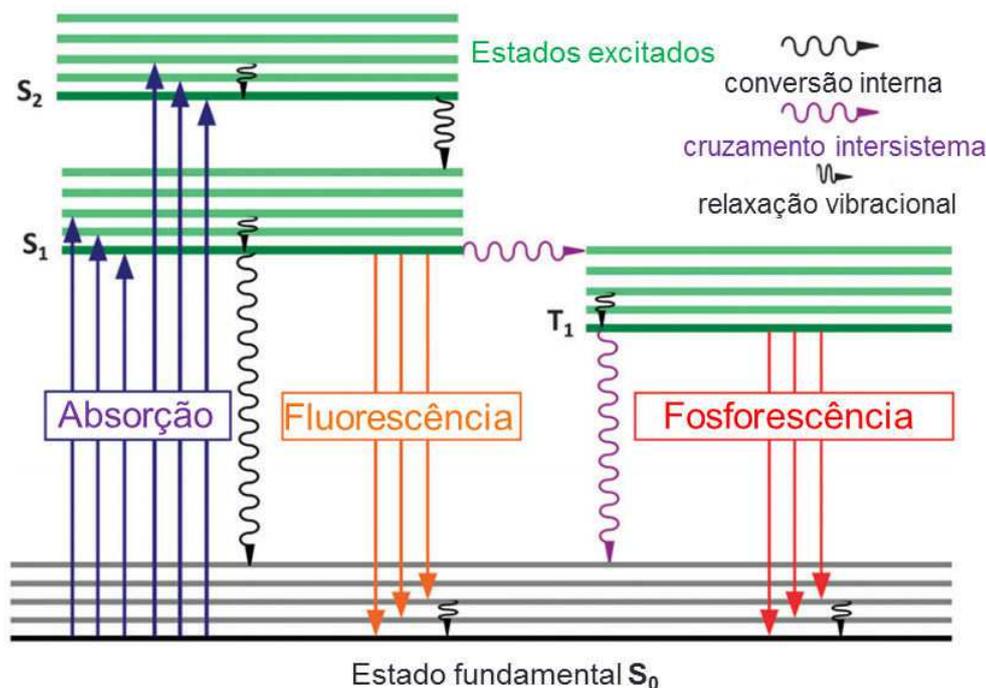


Figura 22 – Diagrama de Jablonski simplificado. Extraído de [95].

Além do exposto anteriormente devemos levar em consideração as regras de seleção das transições eletrônicas:

1. Regra de seleção de orbital

$$\Delta\Lambda = 0, \pm 1 \quad |\Lambda| = 0, 1, 2, 3, 4, \dots = \Sigma, \Pi, \Delta, \Phi, \Gamma, \dots$$

Exemplos: transições permitidas: $\Sigma \rightarrow \Sigma$, $\Pi \rightarrow \Sigma$, $\Delta \rightarrow \Pi$
transições proibidas: $\Delta \rightarrow \Sigma$, $\Phi \rightarrow \Pi$

2. Regra de seleção do spin: não pode-se modificar as orientações de spin relativas. Em outras palavras, as transições permitidas entre os estados implicam que não há variação de spin ($\Delta S = 0$).
3. Regra de Laporte para moléculas centrossimétricas: as únicas transições permitidas são aquelas acompanhadas por uma mudança de paridade. Isto é transições $g \rightarrow u$ e $u \rightarrow g$ são permitidas.

Uma abordagem mais rigorosa da interação radiação-matéria exige o aprofundamento dos dois conceitos fundamentais acima referidos, para continuar com o entendimento experimental da interação da radiação com a matéria é preciso levar em consideração a lei de Lambert-Beer a qual será explicada na seguinte subsecção.

2.5.2 Lei de Lambert-Beer

A lei de Lambert-Beer estabelece uma relação entre a absorvância de uma solução e a sua concentração, quando esta é atravessada por uma radiação luminosa monocromática colimada (raios luminosos paralelos).

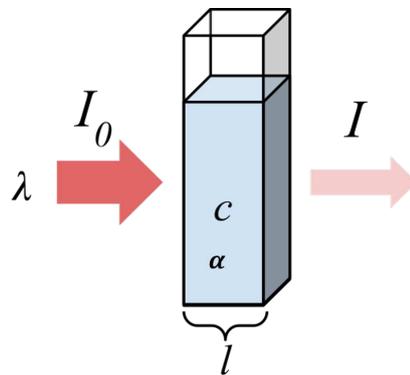


Figura 23 – Diagrama esquemático da Lei de Lambert-Beer, na qual se observa graficamente a absorção de radiação monocromática incidente λ com intensidade I_0 pela solução de comprimento l , absorção molar α e concentração C . Fonte própria.

Da figura 23 pode-se observar a diminuição da potência (intensidade) radiante de uma radiação monocromática após atravessar uma cubeta de largura l contendo a solução com uma concentração C no componente em estudo e um coeficiente de absorção molar característica α , isto pode ser escrito matematicamente como

$$-dI = \alpha IC dl \quad (2.44)$$

onde α é uma constante de proporcionalidade e é chamada de coeficiente de absorção. Esta lei é universal para todos os tipos de transições, exceto no limite de tempo de irradiação muito alto [62], as bandas de absorção geralmente abrangem uma faixa de frequências devido à vida finita do estado excitado e outros fatores que contribuem para o alargamento da linha [62, 96]. Portanto, o coeficiente de absorção molar é uma função das frequências, quer dizer, $\alpha(\nu)$, então temos que

$$-dI = \alpha(\nu) IC dl \quad (2.45)$$

fazendo separação de variáveis e integrando com as seguintes condições ($l = 0$, $I = I_0$), obtemos

$$-\frac{dI}{I} = \alpha(\nu)Cdl$$

$$-\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \alpha(\nu)Cl$$

$$I = I_0 \exp(-\alpha(\nu)Cl) \quad (2.46)$$

Uma vez que é mais conveniente usar o logaritmo com base em 10 do que o logaritmo natural, a [Equação 2.46](#) é geralmente escrita como:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \frac{\alpha(\nu)Cl}{\ln(10)} = \epsilon(\nu)Cl \quad (2.47)$$

onde $\epsilon(\nu)$ é o coeficiente de absorção molar ou absortividade molar, a quantidade ($A = \log(I_0/I)$) é conhecida como absorbância da solução e pode ser lida diretamente do espectro de absorção, muitas vezes como “unidades de absorbância”, embora não tenha dimensões, pois é o logaritmo da razão de intensidades. A relação (I/I_0) é chamada de transmitância e geralmente é expressa como uma porcentagem.

$$T[\%] = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (2.48)$$

Da [Equação 2.44](#) até [Equação 2.48](#) foram derivadas estritamente para radiação monocromática. O coeficiente de absorção molar ϵ depende não apenas do comprimento de onda de excitação, mas também da natureza do material absorvente. O valor de ϵ geralmente citado na literatura é o do máximo da banda de absorção, esta quantidade também varia com a natureza do solvente e a temperatura.

2.5.3 Modelo da PAS

O uso da espectroscopia fotoacústica (PAS) para obter espectros de absorção óptico de substâncias sólidas e fluidos tem atraído considerável interesse na comunidade científica desde meados da década de 1970 [97]. O método fotoacústico possui uma série de características atraentes, devido principalmente a que esta técnica permite obter espectros de absorção, muitas vezes com pouca ou nenhuma preparação da amostra, a PAS não usa nenhum fotodetector para a coleta e detecção do sinal gerado pela amostra, a geração das sinais fotoacústicas são baseadas na absorção óptica da amostra em estudo, seguida da conversão da energia absorvida em calor, a expansão térmica subsequente induzida por calor na amostra e no meio adjacente produz um sinal fotoacústico quando a intensidade do feixe incidente é modulada em uma frequência na faixa acústica, a magnitude do sinal fotoacústico depende linearmente das concentrações de absorção óptica da amostra [97, 98, 99].

2.5.3.1 Método de detecção PAS

A PAS se distingue das técnicas convencionais principalmente pelo fato de que, embora a energia incidente esteja na forma de fótons ópticos, a interação desses fótons com a amostra sob investigação não é estudada através da detecção e análise subsequente de alguns desses fótons, mas através de uma medida direta da energia absorvida pelo material devido à sua interação com o feixe de fótons [99], a amostra a ser estudada (gás, líquido ou sólido) é colocada em uma célula que para nosso caso corresponderam a uma célula fechada. Esta célula é cheia com um gás não-absorvente da radiação incidente (por exemplo: ar do ambiente) [100], além da amostra, a câmera também contém um microfone sensível. A radiação eletromagnética monocromática após percorrer por caminhos ópticos, um chopper eletromecânico, uma grade de difração e a janela de quartzo da célula fotoacústica atinge a amostra, se a amostra absorver algum dos fótons incidentes, os níveis de energia internos são excitados dentro da amostra, após a subsequente desexcitação desses níveis, toda ou parte da energia do fóton absorvido é transformado em energia térmica por processos de desexcitação não radiativa [99, 100].

Uma vez que a absorção de radiação eletromagnética é necessária antes que um sinal fotoacústica possa ser gerada, a radiação que é transmitida elasticamente ou espalhada pela amostra não é detectada e, portanto, não interfere com as medições PAS, isso é de importância crucial para quem trabalha com meios essencialmente transparentes ou muito opacos (por exemplo: pós, sólidos amorfos, géis, entre outros), pois, nenhum dispositivo fotoelétrico é necessário; portanto, é possível realizar estudos em uma ampla gama de comprimentos de onda sem a necessidade de alterar os sistemas de detecção [98, 99, 101]. As únicas limitações são que a fonte não é suficientemente energética (baixa potência) e que a janela da câmera fotoacústica é razoavelmente transparente à radiação eletromagnética incidente [99]. Por fim, o efeito fotoacústico é o resultado de um processo de conversão de energia livre de radiação e, portanto, é complementar aos processos radiativo e fotoquímico [98, 102].

2.5.3.2 Fundamentação teórica da PAS

Nesta subsecção apresentaremos a teoria de Allan Rosencwaig e Gersho (teoria RG) para o efeito fotoacústico, a qual leva em consideração as teorias desenvolvidas anteriormente por Mercadier, Preece e Parker, as quais assumiram que a fonte primária de sinal acústico é devido a um fluxo de calor periódico do sólido ou líquido para o gás circundante (nosso caso, ar da atmosfera), uma vez que o sólido é ciclicamente aquecido pela absorção da radiação eletromagnética monocromática modulada [103]. Essa teoria é capaz de dar conta, de forma natural e direta, de todos os efeitos observados na espectroscopia fotoacústica de sólidos [100].

1. **Equações do fluxo do calor:** A luz absorvida por um sólido é convertida (uma parte ou toda), em calor por processos de desexcitação não radiativa dentro do sólido. Uma teoria RG considera um modelo unidimensional do fluxo de calor na câmara fotoacústica resultante desta energia luminosa absorvida.

Consideremos uma câmara fotoacústica cilíndrica simples, com diâmetro D e comprimento L (ver figura 24). Assumimos que o comprimento L é pequeno em relação ao comprimento de onda do sinal acústico e que o microfone detectará a pressão média produzida na câmara. A amostra é considerada como tendo a forma de um disco de diâmetro D e espessura l e é montada de forma que sua superfície frontal seja exposta ao gás (ar) dentro da câmara e sua superfície traseira esteja contra o suporte de amostra de espessura l_b . O comprimento l_g da coluna de gás na câmara é dado por $l_g = L - l - l_b$. Além disso, assumimos que o gás e os materiais de apoio não absorvem luz.

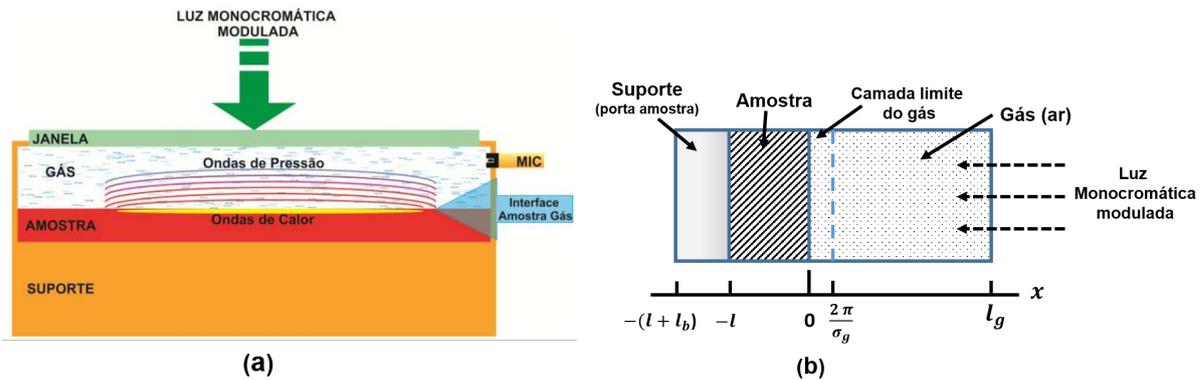


Figura 24 – a) Ilustração da geração de ondas de pressão e calor, dentro da câmara fotoacústica fechada [33]. b) Seção transversal de uma câmara fotoacústica fechada simples, proposta por Rosencwaig e Gersho. Adaptado de [103].

Na teoria RG são definidos os seguintes parâmetros (ver tabela 8):

Tabela 8 – Parâmetros considerados na teoria proposta por Rosencwaig e Gersho.

Parâmetro	Significado	Unidade de medida
k_j	condutividade térmica	$cal/cm s ^\circ C$
ρ_j	densidade do material	gr/cm^3
C_j	calor específico	$cal/gr ^\circ C$
$\beta_j = k_j/\rho_j C_j$	difusividade térmica	cm^2/s
$a_j = \sqrt{\omega/2\beta}$	coeficiente de difusão térmica	$1/cm$
$\mu_j = a_j^{-1}$	comprimento de difusão térmica	cm
onde $j = s, g$ e b (para a amostra, gás e porta-amostra), respectivamente, e ω denota a frequência de corte do feixe de luz incidente em rad/s.		

vamos considerar uma fonte de luz monocromática sinusoidal modulada com comprimento de onda λ incidente na amostra com intensidade

$$I = \frac{1}{2} I_0 (1 + \cos \omega t)$$

onde I_0 é o fluxo de luz monocromática incidente (W/cm^2). Considerando que α seja o coeficiente de absorção óptico (cm^{-1}) da amostra para o comprimento de onda λ . A densidade do calor produzido em qualquer ponto \mathbf{x} devido à luz absorvida pela amostra é dada por

$$\frac{1}{2} \alpha I_0 e^{\alpha x} (1 + \cos \omega t)$$

onde x assume valores negativos, uma vez que a amostra se estende de $x = 0$ a $x = -l$ com a luz incidente em $x = 0$. Notamos da [figura 24 b\)](#) que a coluna do gás (ar atmosférico) se estende desde $x = 0$ até $x = l_g$ e o porta-amostra desde $x = -l$ até $x = -(l + l_b)$.

A equação de difusão térmica na amostra levando em consideração a fonte de calor distribuída pode ser escrita como

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\beta_s} \frac{\partial \phi}{\partial t} - A e^{\alpha x} (1 + e^{i\omega t}) \quad \text{para} \quad -l \leq x \leq 0 \quad (2.49)$$

onde $A = \alpha I_0 \eta / 2k_s$, ϕ é a temperatura, η a eficiência na qual a luz absorvida no comprimento de onda λ é convertida em calor por processos de desexcitação não radiativa.

RG assumiu que para a maioria dos sólidos à temperatura ambiente $\eta = 1$ e que para o porta-amostra e gás, as equações de difusão de calor são dadas por

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\beta_b} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad \text{para} \quad -l - l_b \leq x \leq 0 \quad (2.50)$$

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\beta_g} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad \text{para} \quad 0 \leq x \leq l_g \quad (2.51)$$

o tratamento realizado nesta subseção é um tratamento aproximado que dá resultados consistentes em comparação com outros métodos mais exatos propostos por [\[104, 105\]](#) e tem a vantagem de apresentar uma descrição física mais simples do processo.

A parte real da solução da [Equação 2.50](#) e [Equação 2.51](#) são as soluções de interesse físico e representam a temperatura na célula em relação à temperatura ambiente em função da posição e do tempo. Portanto, o campo de temperatura real na célula é dado por

$$T(x, t) = \mathbf{Re}(\phi(x, t)) + \Phi$$

onde \mathbf{Re} é a parte real da solução, e Φ é a temperatura ambiente (temperatura da sala). As condições de contorno apropriadas são obtidas a partir da exigência

de temperatura e continuidade do fluxo de calor nos limites $x = 0$ e $x = -l$, e da restrição de que a temperatura nas paredes da câmara fotoacústica $x = l_g$, e $x = -(I + l_b)$ está à temperatura ambiente. A última restrição é uma suposição razoável para as paredes da câmara de metal, mas não afeta a solução final para a pressão acústica em nenhum caso.

A teoria de RG assumiu que as dimensões da célula são pequenas o suficiente para ignorar o fluxo de calor transferido no gás em condições de estado estacionário.

2. Distribuição de temperatura na câmara fotoacústica: A solução geral para $\phi(x, t)$ na câmara fotoacústica, se pode escrever como

$$\phi(x, t) = \begin{cases} \frac{1}{l_b}(x + l + l_b)W_0 + We^{\sigma_b(x+l)+i\omega t} & \text{para } -l - l_b \leq x \leq -l \\ e_1 + e_2x + de^{\alpha x} + (Ue^{\sigma_s x} + Ve^{-\sigma_s x} - Ee^{\alpha x})e^{i\omega t} & \text{para } -l \leq x \leq 0 \\ \left(1 - \frac{x}{l_g}\right)\theta_0 + \theta e^{-\sigma_g x + i\omega t} & \text{para } 0 \leq x \leq l_g \end{cases} \quad (2.52)$$

onde W , U , V , E , e θ são constantes de valores complexos; e_1 , e_2 , d , W_0 , e θ_0 são constantes de valores reais; e $\sigma_j = (1 + i)a_j$ com $a_j = (\omega/2\beta_j)^{1/2}$. As quantidades W_0 e θ_0 denotam a componente da temperatura (em relação ao ambiente) nas superfícies da amostra $x = -l$ e $x = 0$, respectivamente. As quantidades E e d , são determinadas pela solução da [Equação 2.49](#), assim,

$$d = -\frac{A}{\alpha^2} \quad (2.53a)$$

$$E = \frac{A}{\alpha^2 - \sigma_s^2} = \alpha \frac{I_0}{2k_s(\alpha^2 - \sigma_s^2)} \quad (2.53b)$$

neste caso, o crescimento do componente exponencial das soluções para o gás e o porta-amostra é omitido, porque para todas as frequências ω de interesse, o comprimento de difusão térmica (μ_j) é pequeno em comparação com o comprimento do material, do gás e do porta-amostra, portanto, os componentes senoidais dessas soluções são suficientemente amortecidos para que sejam efetivamente zero nas paredes da câmara fotoacústica.

As condições de continuidade de temperatura e fluxo nas superfícies da amostra são expressamente dadas por

$$\phi_g(0, t) = \phi_s(0, t) \quad (2.54a)$$

$$\phi_b(-l, t) = \phi_s(-l, t) \quad (2.54b)$$

$$k_g \frac{\partial \phi_g}{\partial x}(0, t) = k_s \frac{\partial \phi_s}{\partial x}(0, t) \quad (2.54c)$$

$$k_b \frac{\partial \phi_b}{\partial x}(-l, t) = k_s \frac{\partial \phi_s}{\partial x}(-l, t) \quad (2.54d)$$

onde os subscritos s , b e g identificam a solução da [Equação 2.52](#) para a temperatura no sólido, no suporte e no gás, respectivamente. Essas restrições se aplicam separadamente ao componente não senoidal (componente dc) e ao componente senoidal (componente ac) da solução. Das [Equações 2.54](#), obtemos para os componentes não periódicos da solução

$$\theta_0 = e_1 + d \quad (2.55a)$$

$$W_0 = e_1 - e_2 l + d e^{-\alpha l} \quad (2.55b)$$

$$-\frac{k_g}{l_g} \theta_0 = k_s e_2 + k_s \alpha d \quad (2.55c)$$

$$\frac{k_b}{l_b} W_0 = k_s e_2 + k_s \alpha d e^{-\alpha l} \quad (2.55d)$$

as [Equações 2.55](#) determinam os coeficientes e_1 , e_2 , d , W e θ_0 para a componente dc independente do tempo. Aplicando as [Equações 2.54](#) ao componente sinusoidal da solução, temos que

$$\theta = U + V - E \quad (2.56a)$$

$$\theta = U e^{-\sigma_s l} + V e^{\sigma_s l} - E e^{-\alpha l} \quad (2.56b)$$

$$-k_g \sigma_g \theta = k_s \sigma_s U - k_s \sigma_s V - k_s \alpha E \quad (2.56c)$$

$$k_b \sigma_b W = k_s \sigma_s U e^{-\sigma_s l} - k_s \sigma_s V e^{\sigma_s l} - k_s \alpha E e^{-\alpha l} \quad (2.56d)$$

estas quantidades, junto com a expressão para E na [Equação 2.53b](#), determina os coeficientes U , V , W e θ . Portanto, as soluções para [Equações 2.55](#) e [2.56](#) permitem avaliar a distribuição de temperatura da [Equação 2.52](#) na câmara fotoacústica em termos dos parâmetros ópticos, térmicos e geométricos do sistema. A solução explícita para θ , a amplitude complexa da temperatura periódica no limite amostra-gás ($x = 0$) é dada por

$$\theta = \frac{\alpha I_0}{2k_s (\alpha^2 - \sigma_s^2)} \left[\frac{(r-1)(b+1) e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1) e^{-\sigma_s l} + 2(b-r) e^{-\alpha l}}{(g+1)(b+1) e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1) e^{-\sigma_s l}} \right] \quad (2.57)$$

onde

$$b = \frac{k_b a_b}{k_s a_s}$$

$$g = \frac{k_g a_g}{k_s a_s}$$

$$r = \frac{(1 - i)\alpha}{2a_s}$$

a [Equação 2.57](#) podem ser avaliados para valores de parâmetros específicos, produzindo um número complexo cujas partes reais e imaginárias θ_1 e θ_2 determinam respectivamente os componentes em fase e quadratura da variação periódica da temperatura na superfície $x = 0$ da amostra. Especificamente, a temperatura real em $x = 0$ é dada por

$$T(0, t) = \Phi + \theta_0 + \theta_1 \cos \omega t - \theta_2 \sin \omega t$$

onde Φ é a temperatura ambiente nas paredes da câmara fotoacústica e θ_0 é o aumento na temperatura devido ao componente de estado estacionário do calor absorvido.

3. **Produção da sinal fotoacústica:** na teoria RG, assume-se que a principal fonte do sinal acústico surge do fluxo de calor periódico da amostra para o gás circundante. O processo de difusão periódica produz uma variação periódica de temperatura no gás dada pelo componente senoidal (componente ac) da solução da [Equação 2.52](#),

$$\phi_{ac}(x, t) = \theta e^{-\sigma_g x + i\omega t} \quad (2.59)$$

considerando a parte real da [Equação 2.59](#), se observa que a variação real da temperatura física do gás é

$$T_{ac}(x, t) = [\theta_1 \cos(\omega t - a_g x) - \theta_2 \sin(\omega t - a_g x)] e^{-a_g x} \quad (2.60)$$

onde θ_1 e θ_2 são a parte real e imaginária de θ da [Equação 2.57](#).

Na [figura 25](#) pode-se observar que o componente dependente do tempo da temperatura no gás rapidamente se atenua para zero com o aumento da distância da superfície da amostra. A uma distância de apenas $2\pi/a_g = 2\pi\mu_g$, onde μ_g é o comprimento de difusão térmica, a variação periódica de temperatura no gás é completamente amortecida de forma eficaz. Portanto, podemos definir uma camada limite, conforme mostrado na [figura 24 b](#)), cuja espessura é de $2\pi\mu_g$ aproximadamente e mantendo uma boa aproximação de que apenas esta espessura de gás é capaz de responder termicamente à temperatura periódica na superfície da amostra.

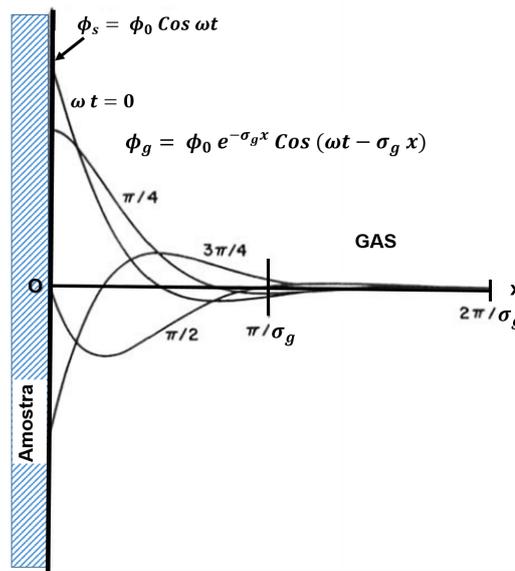


Figura 25 – Distribuição espacial da temperatura dependente do tempo dentro da camada de gás adjacente à interface da amostra. Adaptada de [102]

A média espacial da temperatura do gás dentro desta camada limite em função do tempo pode ser determinada avaliando

$$\bar{\phi}(t) = \frac{1}{2\pi\mu_g} \int_0^{2\pi\mu_g} \phi_{ac}(x, t) dx$$

desde Equação 2.59, obtemos que

$$\bar{\phi}(t) \cong \frac{1}{2\sqrt{2}\pi} \theta e^{i(\omega t - \pi/4)} \quad (2.61)$$

usando a aproximação que $e^{-2\pi} \ll 1$

Devido ao aquecimento periódico da camada limite, esta camada de gás se expande e se contrai periodicamente e pode, portanto, ser pensada como atuando como um pistão acústico no resto da coluna de gás, produzindo um sinal de pressão acústica viajando através de toda a coluna de gás. O deslocamento desse pistão de gás devido ao aquecimento periódico pode ser estimado simplesmente usando a lei dos gases ideais

$$\delta x(t) = 2\pi\mu_g \frac{\bar{\phi}(t)}{T_0} = \frac{\theta\mu_g}{\sqrt{2}T_0} e^{i(\omega t - \pi/4)} \quad (2.62)$$

onde estabelecemos que a temperatura média no componente dc desta camada limite de gás é igual à temperatura no componente dc na superfície sólida, $T_0 = \Phi + \theta_0$. Agora, se assumirmos que o resto do gás responde adiabaticamente à ação desse pistão, então a pressão acústica na célula devido ao deslocamento desse pistão de gás é derivada da lei dos gases adiabáticos $PV^\gamma = constante$, onde P é a pressão, V o volume de gás na câmara fotoacústica e γ a razão dos calores específicos. Portanto,

a variação da pressão é dada por

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_0}{V_0} \delta V = \frac{\gamma P_0}{l_g} \delta x(t)$$

onde P_0 e V_0 são a pressão e o volume do gás no ambiente, respectivamente, e δV é a variação do volume. Assim, da [Equação 2.62](#) se tem que

$$\delta P(t) = Q e^{i(\omega t - \pi/4)} \quad (2.63)$$

onde

$$Q = \frac{\gamma P_0 \theta}{\sqrt{2} l_g a_g T_0} \quad (2.64)$$

Portanto, a variação real da pressão física $\Delta P(t)$ é dado pela parte real de $\delta P(t)$, assim que

$$\Delta P(t) = Q_1 \cos(\omega t - \pi/4) - Q_2 \sin(\omega t - \pi/4)$$

ou

$$\Delta P(t) = q \cos(\omega t - \psi - \pi/4)$$

onde Q_1 e Q_2 são a parte real e complexa de Q , respectivamente, q e $-\psi$ são a magnitude e a fase de Q , quer dizer

$$Q = Q_1 + iQ_2 = q e^{-i\psi}$$

de fato que, Q especifica a envolvente complexa da variação da pressão sinusoidal. Combinando a [Equação 2.57](#) e a [Equação 2.64](#) obtemos a fórmula explícita

$$Q = \frac{\alpha I_0 \gamma P_0}{2\sqrt{2} k_s l_g a_g T_0 (\alpha^2 - \sigma_s^2)} \times \left[\frac{(r-1)(b+1) e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1) e^{-\sigma_s l} + 2(b-r) e^{-\alpha l}}{(g+1)(b+1) e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1) e^{-\sigma_s l}} \right] \quad (2.65)$$

onde b , g , r e σ_s , já foram definidas previamente. Em temperaturas ordinárias, $T_0 \approx \Phi$, portanto, não é necessário avaliar os componentes dc (componente não sinusoidal) da distribuição de temperatura. Portanto, na [Equação 2.65](#) podem ser avaliadas a magnitude e a fase da onda de pressão acústica produzida na câmara pelo efeito fotoacústico.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, serão apresentados os materiais e métodos utilizados neste trabalho. Começamos explicando o método de preparação das amostras para a realização de seus respectivos espectros de absorção com as duas técnicas de espectroscopia (UV-Vis e PAS). A seguir, algumas das partes importantes são especificadas com suas respectivas funções em cada um dos espectrômetros usados. Finalizamos este capítulo, apresentando as configurações dos Funcionais e as Bases utilizadas para realizar o cálculo computacional com o auxílio do software Gaussian 09.

3.1 Materiais

Os Pimentões (*Capsicum Annuum*) utilizados na pesquisa são frutas escolhidas em boas condições visuais, limpos, firmes e com casca brilhante, o que indica que estão frescos e sem defeitos [figura 26](#), nas cores: verde, amarelo, laranja e vermelho. A aquisição dos mesmos foram adquiridos no mercado local, transportados até o laboratório, logo após, foram lavados com água corrente, e secados ao ar livre.



Figura 26 – Pimentões utilizados, limpos, firmes e com casca brilhante. Fonte própria.

3.1.1 Preparo das amostras

As amostras dos pimentões foram manipuladas e elaboradas de diferentes formas, devido principalmente ao modo de detecção das técnicas experimentais utilizadas. Para obtenção do sinal das transições eletrônica entre o estado HOMO–LUMO no espectrômetro UV-Visível, a amostra deve estar no estado líquido e/ou diluída. Enquanto que no espectrômetro fotoacústico a amostra pode estar tanto no estado sólido quanto líquido. Devido à simplicidade na preparação das amostras para a PAS, essa técnica tem uma versatilidade já que ela permite fazer medidas de transições eletrônicas entre os orbitais moleculares.

No primeiro modo de preparo das amostras, os pericarpos dos pimentos foram processados numa centrifuga, para obtenção do suco filtrado dos pimentões: verde, amarelo, laranja e vermelho, [figura 27](#). Essas amostras, logo que preparadas, foram medidas nos dois espectrômetros.



Figura 27 – Processamento para obtenção do suco dos pimentões. Fonte própria.

No segundo modo de preparo das amostras, foram usados uma série de solventes (etanol, n-Hexano, etanol misturado com ácido clorídrico (OH-HCl) na proporção (10:1) respectivamente e água) para obter soluções com as amostras *in-natura* dos pimentões e soluções com os sucos dos pimentões. Os pericarpos dos pimentões (amostras *in-natura*) foram cortados em pedaços de aproximadamente 3 gramas e picotados, para diminuir suas dimensões, assim foram armazenado em tubos de ensaios com a adição de aproximadamente 5 ml de solvente, vedados com tampas e envolto com papel alumínio para evitar a degradação das biomoléculas por efeito do ar e da luz do ambiente. No caso das soluções preparadas com os sucos, foram depositados em tubos de ensaios à vácuo aproximadamente 5 ml de cada suco dos pimentões e de cada solvente, todos estes tubos de ensaios foram envoltos com papel de alumínio para evitar degradações das moléculas. Todas amostras preparadas foram medidas após um período de 24 horas em repouso, tempo esperado para o solvente atuar com o soluto e obter a solução com as extração das biomoléculas, em sequencia, foram medidas no espectrômetro UV-Visível.

Entende-se que durante uma metodologia bem aplicada, deve prezar por todos os processos de limpeza, para evitar a contaminação das amostras.

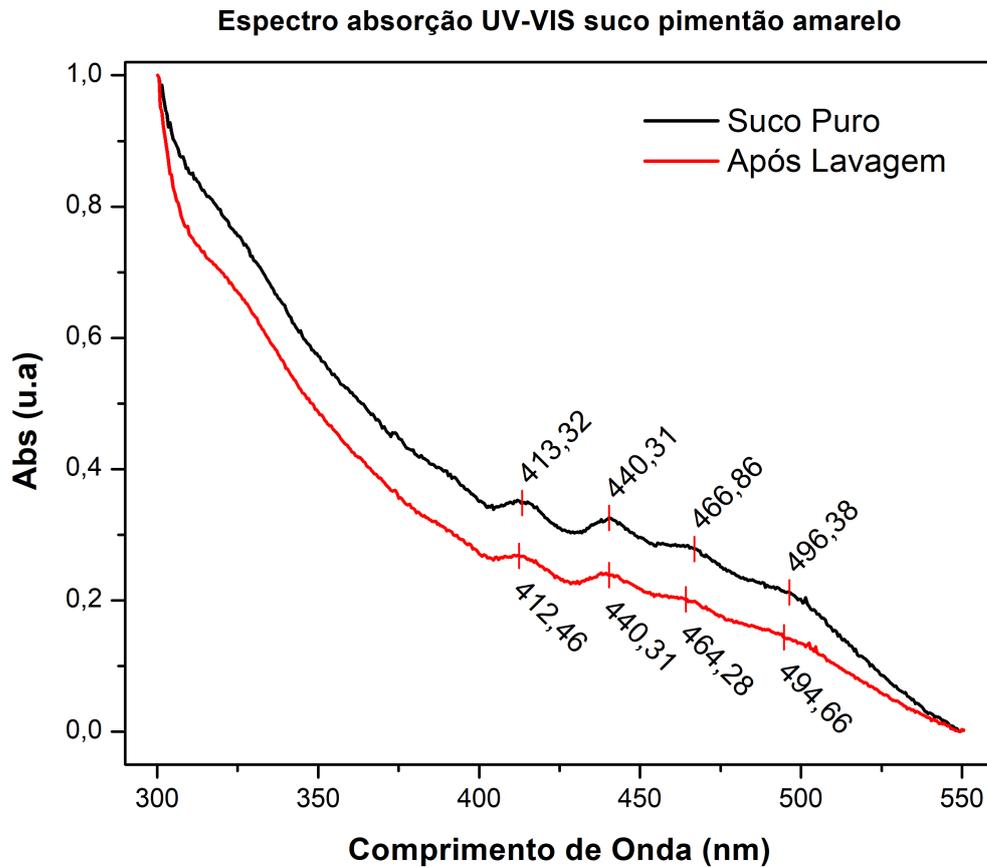


Figura 28 – Espectro de absorção de UV-Vis do suco do pimentão amarelo antes e depois da lavagem do processador de alimentos com sabão neutro e abundante água. Fonte própria.

Note-se que a partir dos espectros de absorção mostrados na [figura 28](#), podemos determinar que não há contaminação nos sucos dos pimentões depois da lavagem com o sabão neutro, umas das variações que podem ser observadas é a mudança nas intensidades das bandas de absorção, mas podemos dizer que segundo a precisão de calibração do equipamento, os comprimentos de onda de absorção destas bandas continuam nas mesmas posições.

3.2 Espectroscopia Fotoacústica (PAS)

O espectrômetro fotoacústico é composto por três partes principais, as quais são descritas e mostrado no esquema do montagem na [figura 29](#).

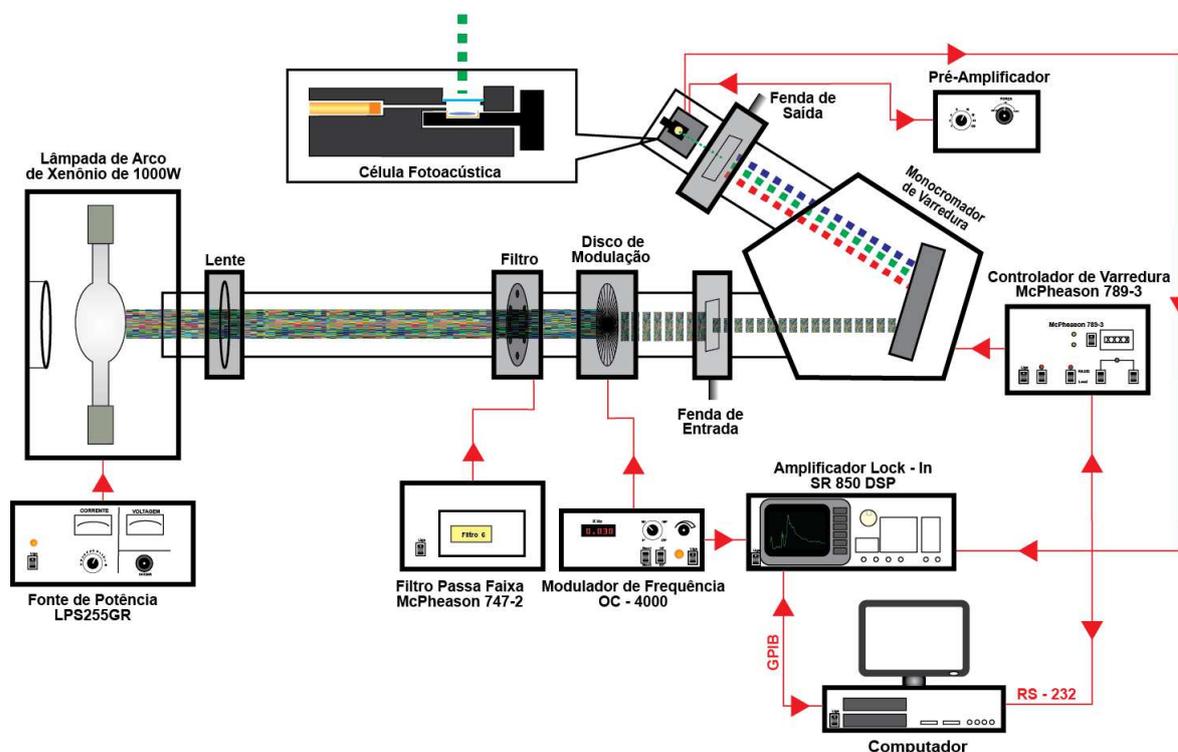


Figura 29 – Esquema do diagrama em bloco do Espectrômetro Fotoacústico. Extraída de [103].

3.2.1 Elementos e Funcionamento do Espectrômetro Fotoacústico

1. **Fonte de Radiação e Excitação:** uma lâmpada de arco de xenônio de 1000 W, alimentada por uma fonte de potencia, modelo LPS255HR, emite radiação na faixa do UV-Visível entre (200 - 750) *nm*. Essa radiação pode ser considerada continua nos comprimentos do UV-Visível e é comumente chamada de luz branca. O feixe de luz emitido pela lâmpada passa por um conjunto de filtros ópticos, em seguida o feixe passa por um filtro passa faixa para eliminar os harmônicos de segunda ordem. Depois destas etapas, a luz é modulada, de acordo com as exigências da técnica PAS. Esta modulação é feita pelo modulador ótico eletromecânico, modelo OC-4000 PTI, com variação entre (5-4000) Hz. O valor da modulação varia de experimento para experimento e é determinada pela teoria de Rosencwaig e Gersho (RG). Essa teoria prever que a penetração do sinal na amostra esta relacionada a frequência moduladora de forma inversamente proporcional, em outras palavras, quanto maior a frequência de modulação, menor a intensidade do sinal fotoacústico.

O feixe de luz, agora modulado e filtrado, passa por dois obturadores que antecedem o monocromador, um na horizontal e outro na vertical, que servem para dar forma e também controlar a intensidade do feixe de luz. Após essas etapas a luz chega ao monocromador que é composto por uma grade de difração, com resolução de $0,7 \text{ nm}$, fixa em um eixo móvel, movido por um motor de passo, e controlado pelo controlador de varreduras da McPherson modelo 789A-3. A luz é então modulada e monocromática agora é utilizada para varreduras de comprimento de onda e assim é possível de produzir o sinal fotoacústico.

2. **Câmara Experimental:** a luz monocromática e modulada passa através de uma janela de quartzo da célula fotoacústica, alcançando a amostra fixa no porta-amostra que esta na câmara a pressão ambiente. Quando atingida pela luz monocromática e modulada, [figura 30](#), o efeito fotoacústico ocorre, devido ao gradiente de temperatura e efeito de pistão vibratório das camadas de gás, onde a camada próxima à amostra empurra a camada externa, efeito este que é detectado por um microfone de alta sensibilidade ($0,50 \text{ mV/Pa}$), pré-polarizado, o qual está acoplado à câmara fotoacústica. Com isso, sempre que ocorrer uma transição no UV-Visível, um sinal fotoacústico será detectado.

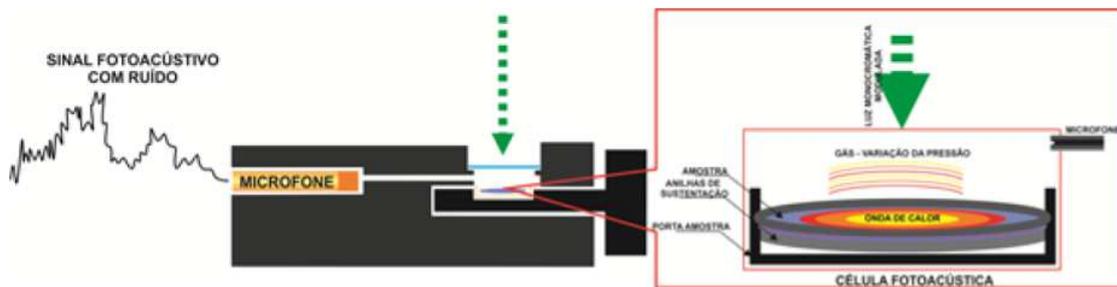


Figura 30 – Esquema do diagrama em bloco da Câmara Fotoacústica. Extraída de [103].

O sinal acústico detectado pelo microfone é muito fraco e, portanto, precisa ser pré-amplificador antes de ir ao lock-in, isto é feito convertendo-se o sinal fotoacústico em elétrico e amplificando-o, com isto temos uma melhor relação entre sinal e ruído, (figura 34), e então, podemos enviar o sinal resultante para o lock-in. O pré-amplificador vem junto com a câmara e possui diferentes configurações de amplificação que podem ser mudadas de acordo com a necessidade do experimento.

Os elementos que fazem parte da câmara experimental são:

- Célula Fotoacústica Fechada MTEC 200;
- Pré-Amplificador;
- Porta-Amostras.

3. **Aquisição de Dados:** Após a pré-amplificação, o sinal é enviado ao amplificador lock-in, modelo SR850 DSP, que faz uma nova amplificação do sinal, além de registrar e enviar os dados para um computador que faz o armazenamento dos mesmos em forma de tabela XY, utilizada para plotar os espectros de PAS. O computador também controla o motor de passo através de uma conexão RS-232 e da configuração do Amplificador lock-in, por conexão GPIB. Os sistema de aquisição de dado é Composto por:

- Amplificador Lock-In de dupla fase da Stanford Research Systems modelo SR850 DSP;
- Microcomputador.

3.2.2 Medidas das amostras na PAS

As amostras do primeiro modo de preparo foram colocadas no porta- amostra da PAS, [figura 31](#) por meio de uma seringa de 3 ml. Como o porta-amostra tem as dimensões de 9 mm de diâmetro por 5 mm de altura, a quantidade depositada do suco de cada pimentão foi de 2 ml aproximadamente. As medidas foram realizadas usando uma frequência de modulação de 20 Hz escolhida de acordo com o modelo de RG, o ganho foi ajustado em 2 dB, como uma constante de tempo de 100 ms, numa varredura em comprimento de onda de (200 – 750) nm com passo de 1 nm. Como a luz emitida pela lâmpada não emite nas mesmas intensidades para os diferentes comprimentos de onda se faz necessário fazer uma medida de calibração utilizando um corpo negro (negro fumo ou Carbon Black) e assim não levar em consideração o espectro da lâmpada, esta medida serve para normalizar as medidas feitas com as amostras.



Figura 31 – Metodologia realizada para obter o espectro de absorção PAS para o suco dos pimentões Amarelo, Vermelho e Laranja. Fonte própria.

Levando em consideração a informação mostrada na [figura 31](#), temos que mencionar que a ausência do espectro de absorção para o suco do pimentão verde foi devido principalmente à suspensão das atividades em nossa universidade e nosso laboratório por conta da pandemia, ao intentar retomar as atividades para a medição dos espectros de absorção na PAS o equipamento teve alguns problemas nas suas configurações internas (provavelmente ocasionado pelo tempo de inatividade do equipamento) os quais impossibilitaram continuar com as medidas.

3.3 Espectroscopia UV-Visível Convencional

O espectrômetro UV-Visível, modelo Varian Cary 50 Bio, é composto pelas partes descritas em seguida e mostrada no esquema da [figura 32](#).

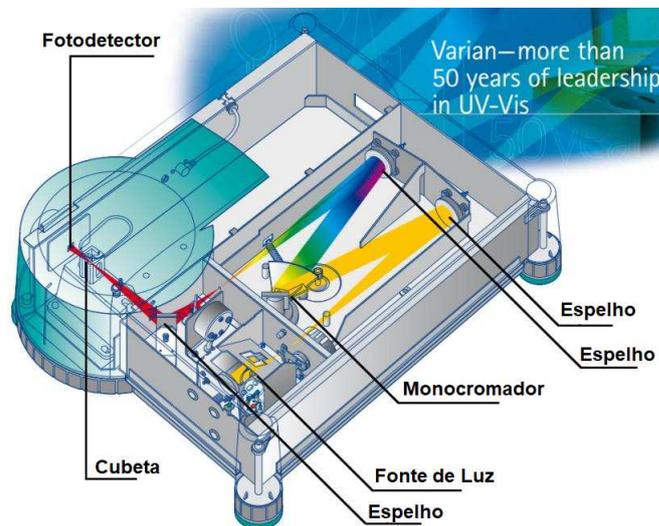


Figura 32 – Esquematização do espectrômetro Cary 50 Bio, mostrando o trajeto percorrido pelo feixe de luz passando pela amostra até atingir o fotodetector. Adaptada de [103].

3.3.1 Elementos e Funcionamento do Espectrômetro UV-Visível Convencional

1. **Fonte de Luz:** O espectrômetro Varian Cary 50 tem uma lâmpada de flash de xenônio como fonte de luz. Seu espectro de emissão não contínua pode variar entre os 190-1100 *nm*.
2. **Espelhos e dispositivos ópticos:** São elementos responsáveis por dar direção ao feixe, com eles busca-se que o feixe que atinge a amostra e por último o detector sejam paralelos entre si.

3. **Monocromador:** A principal função do monocromador é fornecer um feixe de luz com um determinado comprimento de onda e largura de banda.
4. **Cubeta:** Para as medidas foi utilizada uma cubeta de quartzo, já que este material não absorve os comprimentos de onda emitidos pela fonte de luz. A função da cubeta é a deposição das amostras que se deseja fazer a medição.
5. **Fotodetector:** É um sensor que gera um sinal elétrico dependente da intensidade e os comprimentos de onda da radiação eletromagnética que recebe, algumas características do fotodetector que tem o espectrômetro Varian Cary 50 são:
 - A velocidade máxima de varredura é de 24.000 *nm* por minuto. Isso significa que ele pode escanear toda a faixa de comprimento de onda de 190-1100 *nm* em menos de 3 segundos.
 - Tem uma taxa de coleta de dados de 80 pontos por segundo.
 - O Fotodetector do Varian Cary 50 pode medir amostras de até 3 Absorção, então não se precisa diluir com tanta frequência.

3.3.2 Medidas das amostras - UV-Vis

Para a realização das medias, foi utilizado 1 *ml* das soluções com os pimentões *in-natura* do segundo modo de preparo foram colocadas numa cubeta de quartzo de 5 *ml*, o volume em falta foi completado com o solvente correspondente. Além disso, também foram realizadas medidas dos sucos puros e as soluções preparadas com os sucos e cada solvente. Neste caso, devido ao suco ser considerado como uma amostra opaca (absorve toda a radiação incidente da lâmpada do espectrômetro) foi necessário improvisar uma cubeta de vidro, a qual foi feita colando duas lamínulas quadradas de 1 *cm*² e com volume interno de aproximadamente 0,15 *ml*. O modelo utilizado do espectrômetro UV-Vis convencional é de feixe único, por tanto se faz necessário fazer uma medição inicial do *baseline* (linha de base), ou seja, medir primeiro o solvente puro, para o caso dos sucos sem solvente foi necessário medir a cubeta vazia (só com o ar dentro dela), isto é realizado para criar um referencial para as medidas, e assim, definir o feixe de luz a 0% de absorção. O software do espectrômetro realiza automaticamente os cálculos e com base na lei de Lambert-Beer obtêm os espectros de absorção para cada uma das amostras medidas.

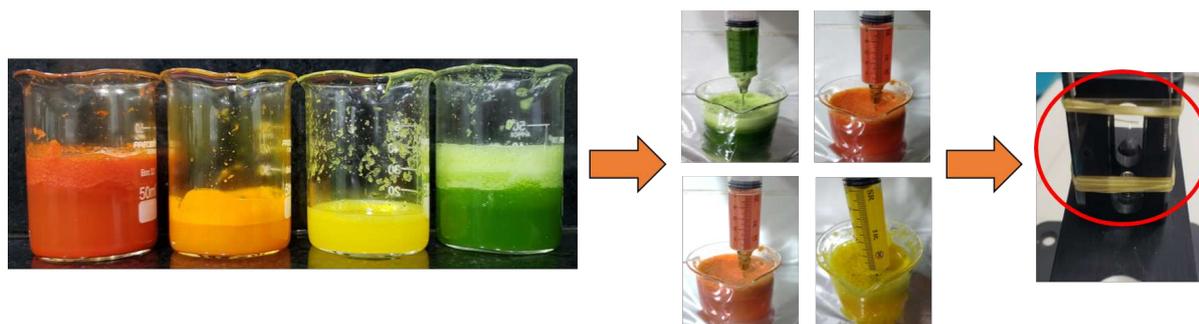


Figura 33 – Metodologia da preparação para obter os espectros de absorção UV-Vis dos sucos dos pimentões, no círculo vermelho (na figurinha da direita) é destacada a cubeta que teve ser fabricada e adaptada na montagem do espectrômetro para fazer as medidas. Fonte própria.

3.4 Simulação computacional

Os cálculos das simulações computacionais foram realizadas usando o software Gaussian 09 [106] instalado em dois computadores, um com processador Intel Core 2 e memória RAM de 8 GB, o outro com processador AMD Ryzen 5 PRO e memória RAM de 8 GB. Para os cálculos de otimização geométrica das biomoléculas foi usada a teoria de funcional da densidade (DFT) com o funcional CAM-B3LYP e a função de base 6-31G, este cálculo permite encontrar a geometria para o estado de mínima energia (estado fundamental) de cada uma das biomoléculas calculadas. Em seguida para obter os espectros UV-Vis, foram realizados os cálculos de energia dos estados excitados de cada uma das biomoléculas, para o caso dos carotenoides foi considerada a teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT), também com o funcional CAM-B3LYP e a função de base 6-31G(d), o número de estados excitados para as biomoléculas pertencentes aos carotenoides foi 25.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Os espectros obtidos pelos métodos descritos no capítulo anterior estão expostos neste capítulo, agrupados de forma concisa para que facilite as exposições dos dados e fazer com que as discussões dos mesmos fluam de forma coerentes com a revisão feita no capítulo 2. Sendo assim, é feita a análise, primeiro, dos espectros UV-Vis obtidos nas amostras dos sucos puros de pimentões de épocas e produtores diferentes, sem o uso de qualquer solvente, para mostrar a reprodutibilidade do experimento e identificar a bandas de energia pertencentes ao conjunto de biomoléculas dos carotenoides e clorofila. Posteriormente é feita uma análise que envolve a comparação entre os espectros de absorção UV-Vis das soluções realizadas em diferentes solventes com os pimentões *in-natura* e suco, em seguida a análise e comparação dos espectros de absorção entre os sucos puros e as soluções preparadas com cada um dos pimentões *in-natura* e suco, para observar o efeito dos solventes nas bandas de energia que terá efeitos tanto de solvatocromismo com de preferência da extração de determinada biomoléculas. Estas análises estarão sempre sendo confrontados como os resultados obtidos pela espectroscopia PAS e os resultados dos espectros de absorção obtidos nas simulações computacionais, para tornar as análises mais robustas.

4.1 Espectros de Absorção UV-Vis Convencional

Dessa maneira a apresentação dos espectros e as discussões se inicia pela [figura 34](#) que mostra os espectros de absorção UV-Vis dos sucos puros dos pimentões verde, amarelo, laranja e vermelho, referentes às amostras adquiridas nos anos de 2020 e 2021 de produtores diferente.

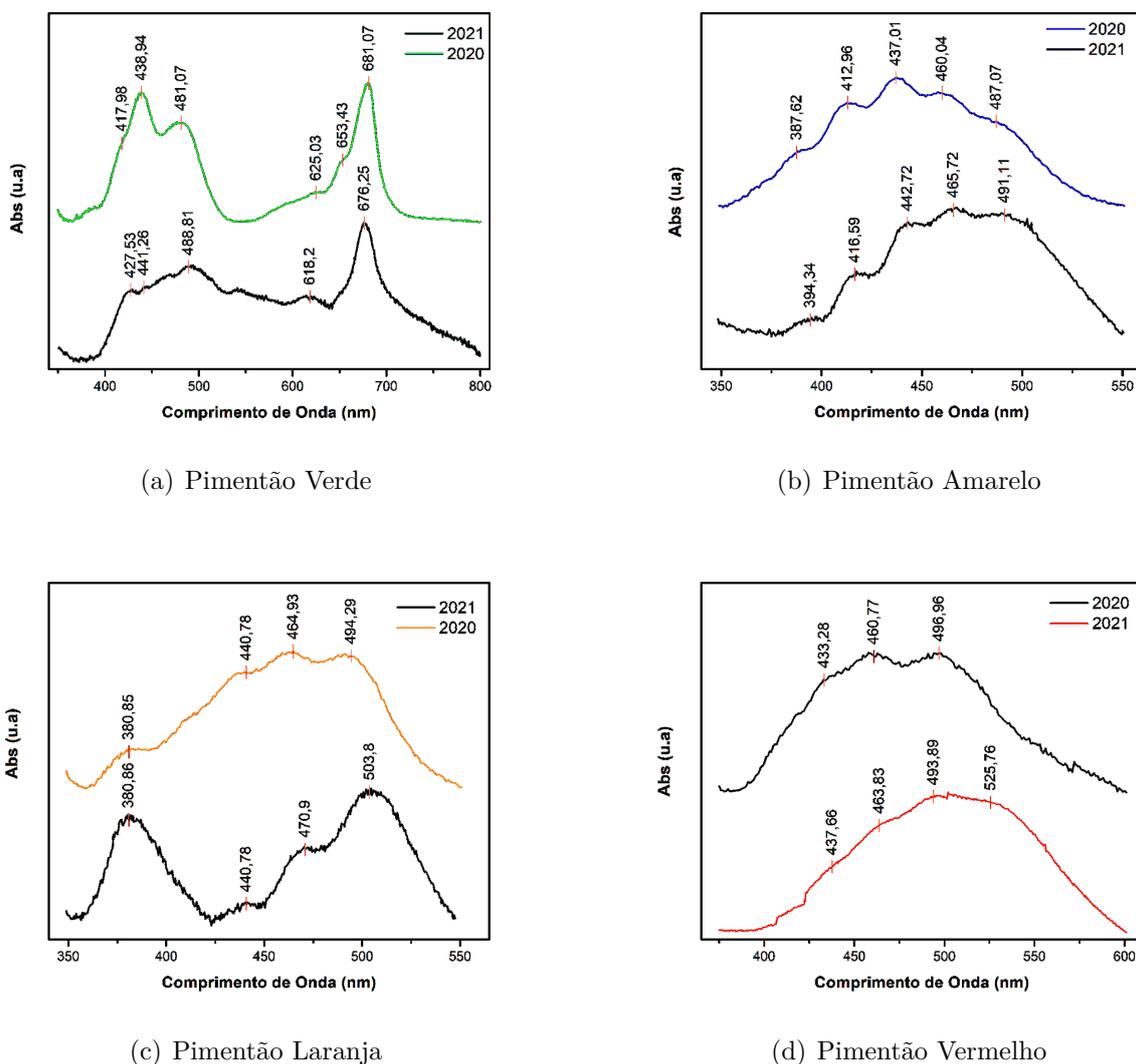


Figura 34 – Espectro de absorção UV-Vis obtidos dos sucos dos pimentões, os quais foram preparados e realizados nos anos 2020 e 2021. (a) Suco pimentão verde, (b) Suco pimentão amarelo, (c) Suco pimentão laranja, (d) Suco pimentão vermelho.

Na [figura 34](#) podemos observar os espectros de absorção dos sucos puros dos pimentões obtidos por espectroscopia UV-Vis convencional, todos os espectros foram realizados na região entre 350-800 nm , seguindo o procedimento descrito na [subseção 3.3.2](#) para o caso dos sucos puros. Levando em consideração os espectros de absorção desta figura, podemos perceber que para os sucos dos pimentões, **amarelo**, **laranja** e **vermelho** se evidenciam bandas de absorção (λ_{abs}) nos comprimentos de onda da região entre os 350-550 nm , assim, podemos dizer que estas bandas de absorção se deve à presença de um conjunto de biomoléculas pertencentes aos carotenóides, uma vez que é comum encontrar essas biomoléculas nesta região do espectro eletromagnético. Por outro lado, o espectro de absorção do suco puro do pimentão verde, pode-se observar bandas de absorção nas regiões

dos 400-500 *nm* e os 600-800 *nm* o qual indica presença das biomoléculas pertencentes às clorofilas **a** e **b**, o que pode ser confrontado com os espectro de absorção de UV-Vis encontrados em nossas simulações computacionais (ver [seção 4.3](#)).

Considerando as informações fornecidas pelos espectros de absorção da [figura 34](#) e a [tabela 9](#), observamos que há variações entre as intensidades de algumas das bandas, isto é devido principalmente aos pimentões terem sido adquiridos em datas e possivelmente em etapas de maturação diferentes, além disso, os pimentões pertencessem a diferentes plantações. Apesar destas variações, destacamos que para as duas amostras (suco 2020 e suco 2021) de cada pimentão foram observadas bandas de absorção em comprimentos de ondas muitos semelhantes, mesmo que para alguns casos houve uns pequenos deslocamentos, os quais pode-se dever aos situações nomeadas anteriormente.

Devemos ter cuidado na hora de interpretar os dados fornecidos pelo espectrômetro UV-Vis convencional, já que em nosso caso o equipamento utilizado não permite a identificação de biomoléculas isômeras já como pode ser visto na [tabela 2](#) algumas biomoléculas dos carotenoides tem suas bandas de absorção muito próximas umas das outras, isto também pode ser observado em nosso espectros de absorção obtidos com as simulações computacionais, pelo fato de que a maiorias das transições eletrônicas destas biomoléculas ocorrem nos orbitais moleculares $\pi \rightarrow \pi^*$. Dito isto, as bandas observadas nos espectros de absorção correspondem a um conjunto de possíveis combinações das biomoléculas dos carotenoides e das clorofilas que estão presentes no suco do pimentão correspondente.

Na tabela a seguir estão as informações que são extraídas das bandas de absorção da [figura 34](#) onde se inclui a energia das transições eletrônicas entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO do conjunto das biomoléculas dos carotenoides e das clorofilas que estão presentes no suco dos pimentões utilizados.

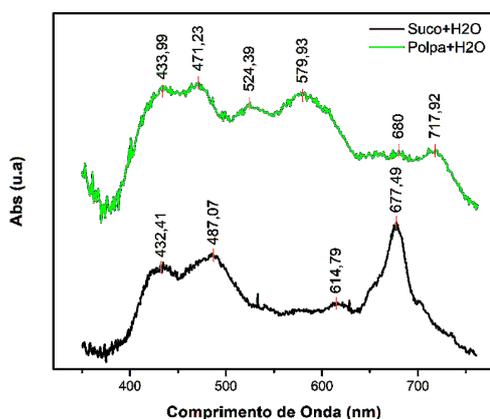
Tabela 9 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis do suco do pimentão verde, amarelo, laranja e vermelho.

Pimentão	Banda	λ_{abs} (nm) Suco 2020	Energia (eV)	λ_{abs} (nm) Suco 2021	Energia (eV)
Verde	1	417,98	2,9682	427,53	2,9019
	2	438,94	2,8265	441,26	2,8116
	3	481,07	2,5790	488,81	2,5381
	4	625,03	1,9850	618,20	2,0069
	5	653,43	1,8987	676,25	1,8346
	6	681,07	1,8216		
Amarelo	1	387,62	3,2007	394,34	3,1462
	2	412,96	3,0043	416,59	2,9781
	3	437,01	2,8390	442,72	2,8024
	4	460,04	2,6969	465,72	2,6640
	5	487,07	2,5472	491,11	2,5262
Laranja	1	380,85	3,2576	380,86	3,2575
	2	440,78	2,8147	440,78	2,8147
	3	464,93	2,6685	470,90	2,6347
	4	494,29	2,5100	503,80	2,4626
Vermelho	1	433,28	2,8634	437,66	2,8348
	2	460,77	2,6926	463,83	2,6748
	3	496,96	2,4965	493,89	2,5120
	4			525,76	2,3598

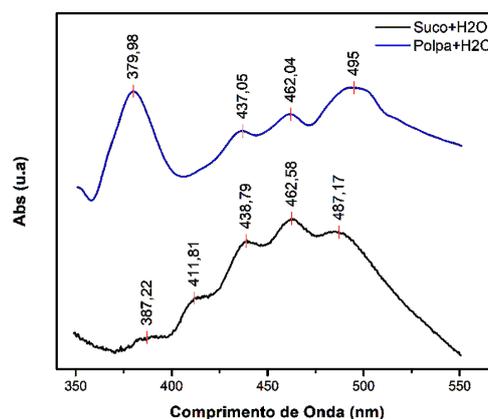
Analisando os valores das energias que são mostrados na [tabela 9](#), observamos que estes estão em concordância com os valores de energia obtidos nas bandas dos espectro de absorção fotoacústico e das bandas dos espectros de absorção que foram encontrados nas simulações computacionais. Estes valores das energias correspondem às transições eletrônicas entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO, observamos que entre as amostras dos sucos 2020 e 2021 temos valores de energia muito próximos, isso reforça que é muito provável encontrar biomoléculas pertencentes ao mesmo grupo molecular, que no nosso caso são os grupos dos carotenóides e as clorofilas.

A seguir, nas [Figuras 35](#), [36](#) e [37](#), serão analisados os espectros de absorção das soluções realizadas com cada um dos pimentões *in-natura* (polpa) e no suco nos mesmos solventes, a água, hexano e álcool 70%, respectivamente.

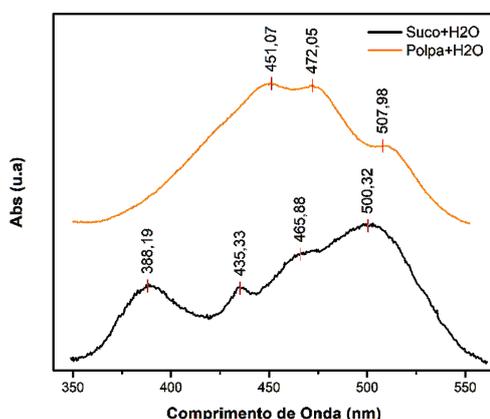
Na [figura 35](#) são comparados os espectros de absorção das soluções realizadas em água (o solvente mais polar utilizado) e cada pimentão em polpa e no suco.



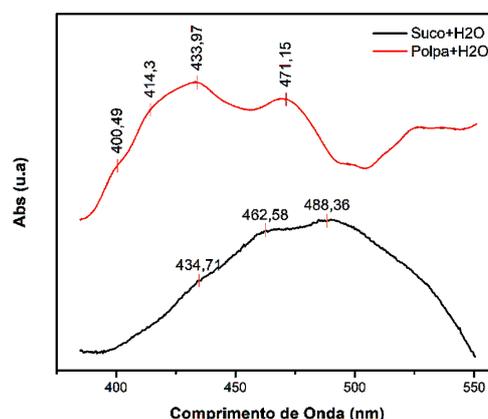
(a) Pimentão Verde



(b) Pimentão Amarelo



(c) Pimentão Laranja



(d) Pimentão Vermelho

Figura 35 – Espectro de absorção UV-Vis de soluções realizadas com pimentões *in-natura* e suco com água. (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho.

Considerando as informações expostas na Fundamentação Teórica (ver [subseção 2.1.2](#)), e levando em consideração que algumas das biomoléculas pertencentes aos carotenoides e às clorofilas não são solúveis em água, mas é importante observar que os pimentões são constituídos por aproximadamente 90% de água, portanto, é muito provável que hajam interações de forças intermoleculares destas biomoléculas com as moléculas da água. Como se pode observar nos espectros de absorção da [figura 34](#), apesar de que os sucos dos pimentões serem constituídos principalmente por água, pode-se obter bandas de absorção localizadas em regiões onde geralmente são encontrados os conjuntos das biomoléculas que são de nosso interesse.

Em relação aos espectros de absorção UV-Vis das soluções feitas com cada um dos sucos dos pimentões em água, é provável que o solvente utilizado tenha diluído cada suco, ou seja, a água diminui a concentração do suco, o que provoca algumas das bandas de absorção sejam menos proeminentes em relação às bandas de absorção dos espectros UV-Vis dos sucos puros. Nas soluções preparadas com os pimentões *in-natura* em água, verifica-se que entre as soluções do pimentão amarelo, laranja e vermelho podem ser identificadas algumas bandas de absorção as quais estão bem definidas, devido ao fato que estes pimentões possivelmente tenham biomoléculas solúveis em água (solvente polar). Para o caso da solução do pimentão verde *in-natura* em água, sabemos que a maior concentração de biomoléculas que compõem este pimentão corresponde às clorofilas **a** e **b**, apesar de essas biomoléculas não serem hidrossolúveis, foi possível obter algumas bandas de absorção localizadas nas regiões características destas biomoléculas, uma possível explicação para isso pode ser devido às interações das forças intermoleculares entre as moléculas das clorofilas e as moléculas da água, uma vez que a possibilidade de ocorrer a dissolução aumenta quando a intensidade das forças atrativas entre as moléculas de soluto e de solvente é maior ou igual à intensidade das forças de atração entre as moléculas do próprio soluto e entre as moléculas do próprio solvente.

Na [tabela 10](#), são fornecidos alguns dados que podem ser obtidos dos espectros de absorção UV-Vis da [figura 35](#) onde são incluídos os valores das energias das transições eletrônicas entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO das biomoléculas que estão presentes nas soluções em água.

Tabela 10 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis das soluções correspondentes aos pimentões *in-natura* e suco em água.

Pimentão	Banda	λ_{abs} (nm) Suco + H_2O	Energia (eV)	λ_{abs} (nm) Polpa + H_2O	Energia (eV)
Verde	1	432,41	2,8692	433,99	2,8588
	2	487,07	2,5472	471,23	2,6328
	3	614,79	2,0180	524,39	2,3659
	4	677,49	1,8313	579,93	2,1393
	5			717,92	1,7281
Amarelo	1	387,22	3,2040	379,98	3,2651
	2	411,81	3,0127	437,05	2,8387
	3	438,79	2,8275	462,04	2,6852
	4	462,58	2,6821	495,00	2,5064
	5	487,17	2,5467		
Laranja	1	388,19	3,1960	451,07	2,7505
	2	435,33	2,8500	472,05	2,6283
	3	465,88	2,6631	507,98	2,4424
	4	500,32	2,4798		
Vermelho	1	434,71	2,8540	400,49	3,0979
	2	462,58	2,6821	414,3	2,9946
	3	488,36	2,5405	433,97	2,8589
	4			471,15	2,6333

Na [figura 36](#) são comparados os espectros de absorção das soluções realizadas em hexano (o solvente mais apolar utilizado) com cada um dos pimentões *in-natura* e em suco.

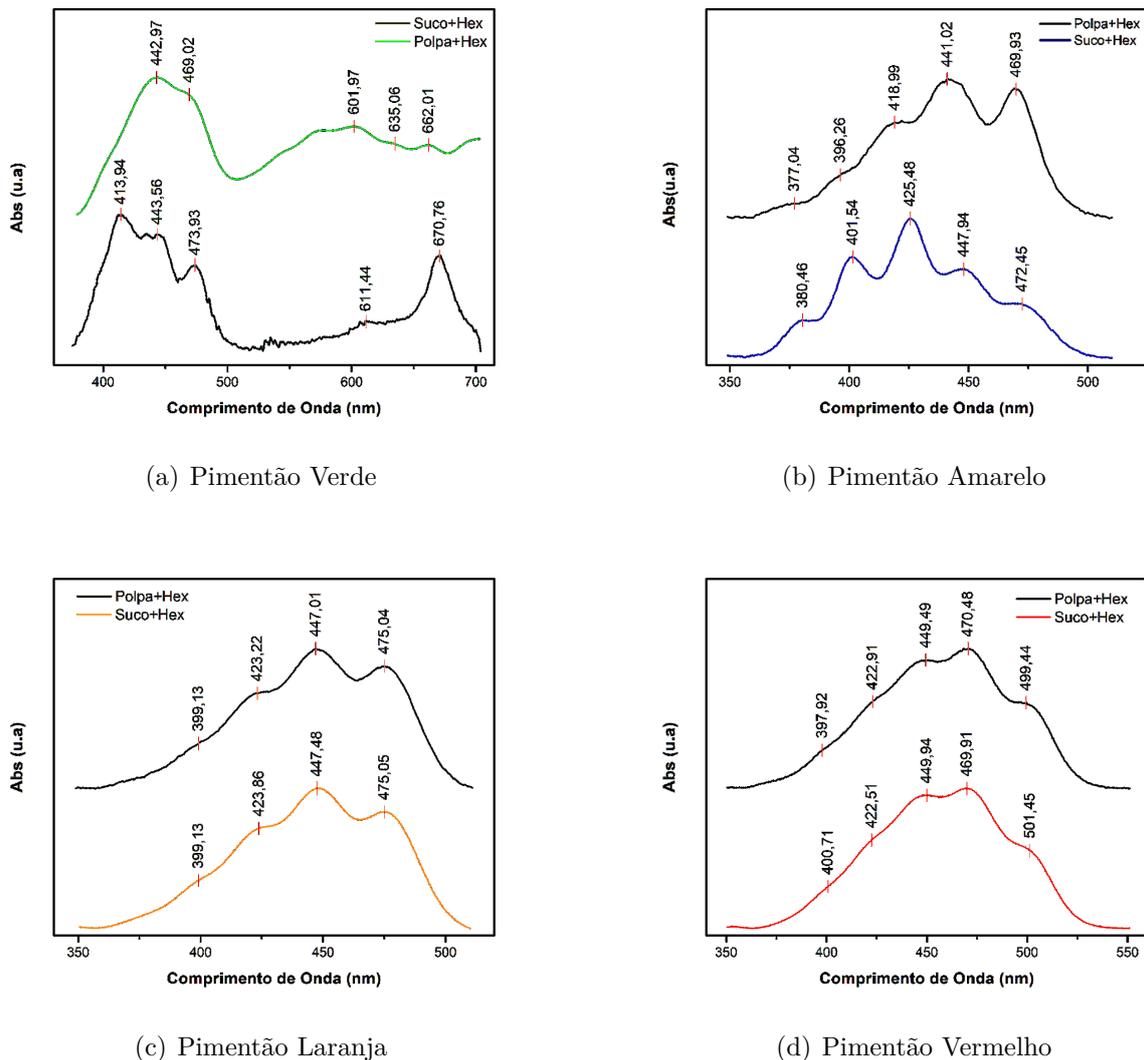


Figura 36 – Espectro de absorção UV-Vis das soluções realizadas com pimentões *in-natura* e suco com hexano. (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho.

Levando em consideração os espectros de absorção mostrados na [figura 36](#), em relação às soluções realizadas em hexano e o pimentão verde, pode-se deduzir que no caso da solução com o pimentão *in-natura* o hexano apresenta dificuldades para extrair as biomoléculas das clorofilas **a** e **b**, apesar do que o espectro apresenta bandas de absorção nas regiões onde absorvem energia estas biomoléculas, só as bandas da região dos 400-500 *nm* são proeminentes. Porém, para o caso do espectro de absorção da solução preparada com o suco deste pimentão foram obtidas bandas localizadas nas duas regiões do espectro eletromagnético onde comumente absorvem energia as biomoléculas das clorofilas **a** e **b**, estas bandas tem maior definição e são mais proeminentes em comparação as bandas de absorção do espectro UV-Vis do suco puro deste pimentão, assim que, é muito provável que este solvente tenha diluído algumas destas biomoléculas.

De acordo com informações encontradas na literatura, no qual afirmam que o conjunto de biomoléculas que pertencem ao grupo dos carotenoides podem ser extraídos com o auxílio de solventes apolares, como o hexano, assim, levando em consideração os espectros de absorção mostrado na [figura 36](#), podemos observar que o uso deste solvente contribui para obtenção de bandas de absorção bem definidas nas soluções dos pimentões amarelo, laranja e vermelho tanto *in-natura* quanto no suco, estas bandas estão localizadas na região do espectro eletromagnético onde comumente absorvem energia estes conjuntos de biomoléculas que pertencem aos carotenoides. É importante destacar que a forma e as quantidades nas bandas de absorção nestes espectros são diferentes devido principalmente aos pimentões serem constituídos por conjuntos de biomoléculas isômeras cabendo a possibilidade de ter biomoléculas iguais mas em concentrações diferentes, isto faz com que as bandas de absorção destas biomoléculas mudem sua forma ou localização (comprimento de onda de absorção).

Na [tabela 11](#), são apresentados alguns dos dados que podem ser obtidos dos espectros de absorção mostrados na [figura 36](#) onde estão incluídos os valores da energia das transições eletrônicas entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO das biomoléculas presentes nas soluções realizadas em hexano.

Tabela 11 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis das soluções correspondentes aos pimentões *in-natura* e suco em hexano.

Pimentão	Banda	λ_{abs} (nm)	Energia	λ_{abs} (nm)	Energia
		Suco + Hexano	(eV)	Polpa + Hexano	(eV)
Verde	1	413,94	2,9972	442,97	2,8008
	2	443,56	2,7971	469,02	2,6452
	3	473,93	2,6178	601,97	2,0610
	4	611,44	2,0291	635,06	1,9536
	5	670,76	1,8496	662,01	1,8741
Amarelo	1	380,46	3,2610	377,04	3,2906
	2	401,54	3,0898	396,26	3,1309
	3	425,48	2,9159	418,99	2,9611
	4	447,94	2,7697	441,02	2,8132
	5	472,45	2,6260	469,93	2,6401
Laranja	1	399,13	3,1084	399,13	3,1084
	2	423,86	2,9271	423,22	2,9315
	3	447,48	2,7726	447,01	2,7755
	4	478,05	2,5953	475,04	2,6117
Vermelho	1	400,71	3,0962	397,92	3,1179
	2	422,51	2,9364	422,91	2,9336
	3	449,94	2,7574	449,49	2,7602
	4	469,91	2,6402	470,48	2,6370
	5	501,45	2,4742	499,44	2,4841

Na [figura 37](#) são comparados os espectros de absorção das preparações das soluções realizadas em álcool 70% (solvente que comparado com a água pode-se considerar apolar, mas que comparado com o hexano pode ser considerado polar) e os pimentões *in-natura* e em suco.

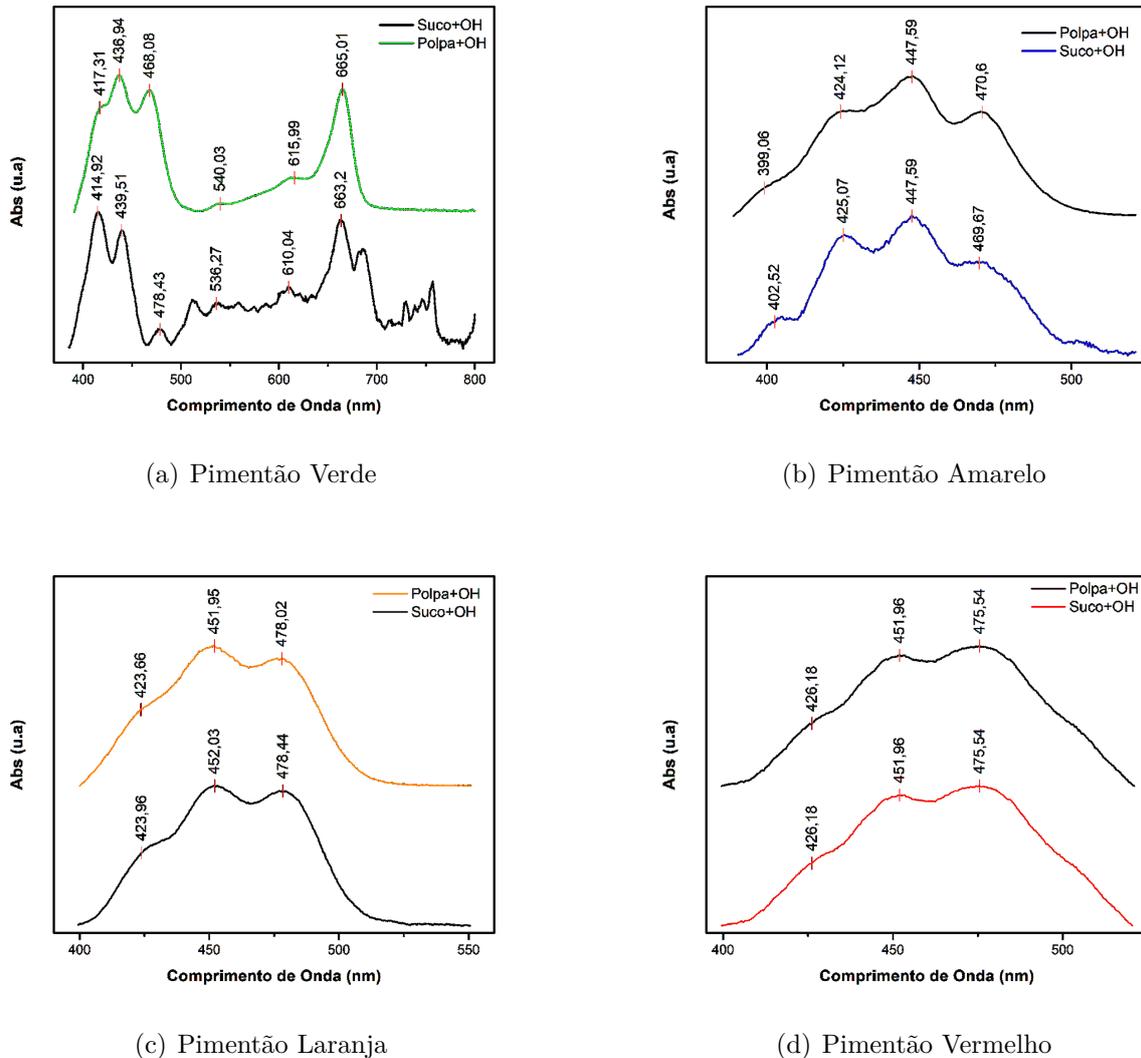


Figura 37 – Espectro de absorção UV-Vis das soluções realizadas com pimentões *in-natura* e suco com álcool. (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho.

Considerando que as biomoléculas das clorofilas **a** e **b** e as xantofilas pertencentes aos carotenóides podem ser extraídas utilizando o álcool como solvente (conforme relatado na [subseção 2.1.2](#)), pode-se observar que nos espectros de absorção para estas soluções com os pimentões amarelo, laranja e vermelho mostrados na [figura 37](#) há presença de bandas de absorção as quais correspondem a um conjunto de biomoléculas dos carotenóides já que temos máximos de absorção bem definidos que estão localizados na região do espectro eletromagnético que são característico deste grupo molecular. Note-se que para os

espectro de absorção de cada pimentão não temos muita diferença na posição das bandas de energia entre eles, apesar de que algumas bandas de absorção tenham um deslocamento muito pequeno essas variações nos comprimentos de onda estão dentro da precisão do equipamento.

Por outro lado, para os espectros de absorção das soluções em álcool realizadas com o pimentão verde, se obtiveram bandas com máximos de absorção que estão localizados nas regiões do espectro electromagnético onde comumente são encontradas as biomoléculas das clorofilas **a** e **b**, além disso, pode-se evidenciar mudanças em algumas bandas de absorção entre os espectros destas soluções as quais pode dever-se à etapa de maturação de cada um dos pimentões verdes utilizados.

Na [tabela 12](#), são apresentados alguns dos dados que podem ser obtidos dos espectros de absorção mostrados na [figura 37](#) onde são incluídos os valores da energia das transições eletrônicas entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO das biomoléculas presentes nestas soluções.

Tabela 12 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis das soluções em álcool com os pimentões *in-natura* e em suco.

Pimentão	Banda	λ_{abs} (nm)	Energia	λ_{abs} (nm)	Energia
		Suco + Álcool	(eV)	Polpa + Álcool	(eV)
Verde	1	414,92	2,9901	417,31	2,9730
	2	439,51	2,8228	436,94	2,8394
	3	478,43	2,5932	468,08	2,6505
	4	536,27	2,3135	540,03	2,2974
	5	610,04	2,0338	615,99	2,0141
	6	663,20	1,8707	665,01	1,8656
Amarelo	1	402,52	3,0823	399,06	3,1090
	2	425,07	2,9187	424,12	2,9253
	3	447,59	2,7719	447,59	2,7719
	4	469,67	2,6416	470,60	2,6364
Laranja	1	423,96	2,9264	423,66	2,9285
	2	452,03	2,7447	451,95	2,7451
	3	478,44	2,5932	478,02	2,5954
Vermelho	1	426,18	2,9111	426,18	2,9111
	2	451,96	2,7451	451,96	2,7451
	3	475,54	2,6090	475,54	2,6090

Na [figura 38](#) e a [figura 39](#), são apresentados em conjunto os espectros de absorção UV-Vis de todas as soluções que foram preparadas com os diferentes solventes e os pimentões *in-natura* e em suco, respectivamente. É importante destacar que as soluções preparadas como pimentão *in-natura* + solventes foram realizadas com os pimentões

adquiridos no ano 2020 e as soluções preparadas com os sucos dos pimentões + solventes foram realizadas com os pimentões adquiridos no ano 2021. Aqui estamos considerando como referência o espectro de absorção UV-Vis de cada um dos sucos puros, a ideia principal destes conjunto de espectros é observar o solvatocromismo evidenciado pelos solventes utilizados, além disso, também podemos identificar se as bandas de absorção de cada um dos espectros obtidos sofrem algum tipo de alteração na sua forma em respeito ao espectro de referencia.

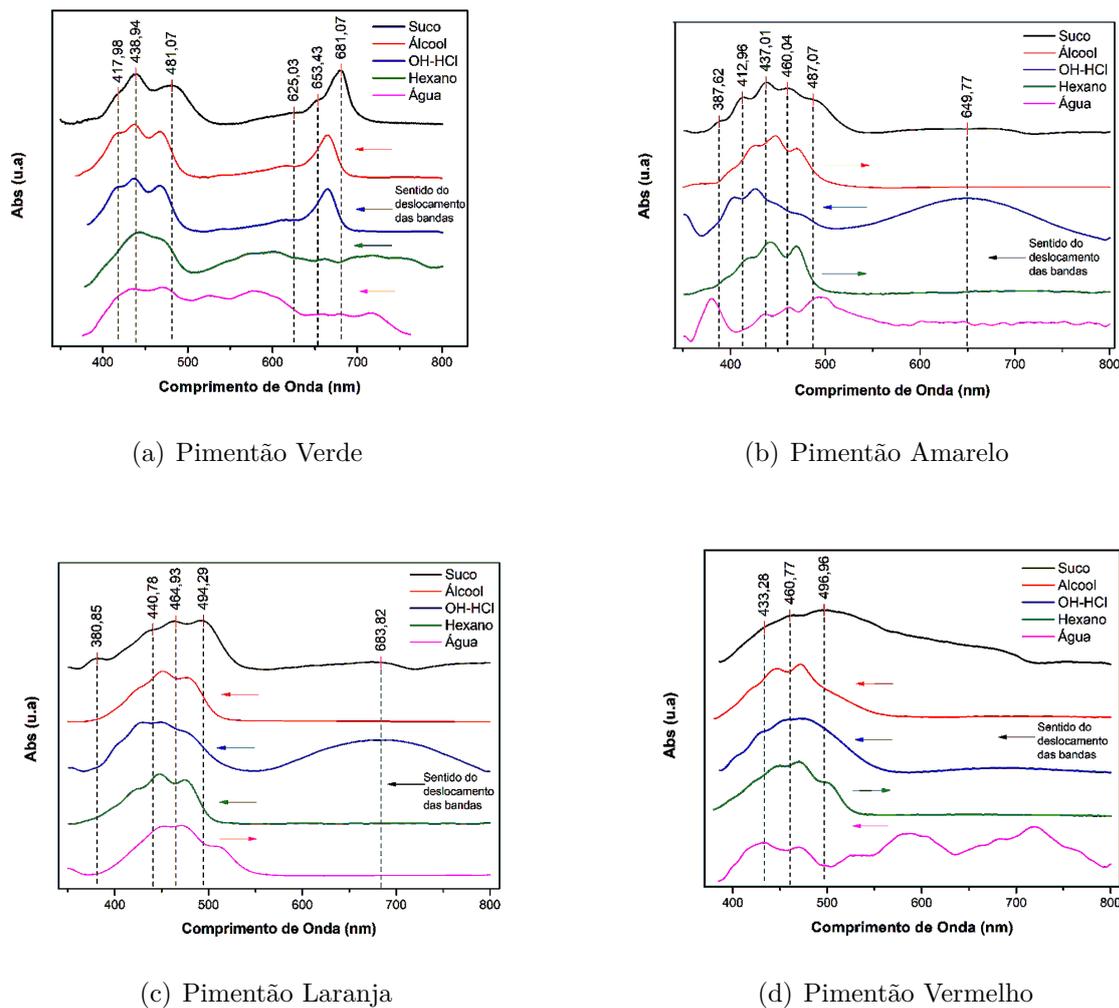


Figura 38 – Comparação entre os espectro de absorção UV-Vis do suco puro de cada pimentão e as diferentes soluções preparadas com os pimentões *in-natura*. (a) Pimentão verde, (b) Pimentão amarelo, (c) Pimentão laranja, (d) Pimentão vermelho.

A figura 38(a) corresponde aos espectros de absorção do suco puro e das soluções preparadas em diferentes solventes com o pimentão verde *in-natura*. Tendo em vista que embora os solventes utilizados tenham constantes dielétricas diferentes, ou seja, tenham polaridade diferente, observamos que alguns dos comprimentos de onda de absorção

máximos (λ_{obs}) apresentam solvatocromismo negativo (deslocamento hipsocrômico) em respeito a cada uma das bandas de absorção da amostra de referencia, isto pode ser evidenciado também nas informações mostradas na [tabela 13](#), este tipo de solvatocromismo significa que neste caso o uso desses solventes aumentou a diferença de energia entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO dos diferentes conjuntos de biomoléculas presentes nestas soluções causando o deslocamento de certas bandas de absorção para comprimentos de onda menores. Além disso, foi constatado que os solventes de hexano e à água são poucos eficientes na extração dos conjuntos biomoleculares presentes no pimentão verde *in-natura*.

A [figura 38\(b\)](#) corresponde aos espectros de absorção do suco puro e das soluções realizadas com o pimentão amarelo. Como já mencionado, os solventes utilizados possuem polaridades diferentes, apesar disso e como pode ser observado nos espectros de absorção das soluções preparadas com os solventes de álcool e hexano, apresentam solvatocromismo positivo (deslocamento batocrômico) em comparação à amostra de referencia, isto significa que o uso destes solventes diminui a diferença de energia entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO dos diferentes conjuntos de biomoléculas presentes neste pimentão, causando o deslocamento de certas bandas de absorção para comprimentos de onda mais longos. No caso da solução preparada com o solvente OH-HCl, foi evidenciado solvatocromismo negativo em certas bandas de absorção localizadas na região entre 400-500 *nm*, além disso, é importante destacar que este espectro de absorção apresenta uma banda de absorção na região entre 500-800 *nm*, isso indica que esse solvente conseguiu extrair e estabilizar outros conjuntos de biomoléculas e é muito possível que correspondam às antocianinas as quais pertencentes a um grupo molecular diferente ao dos carotenoides, estas biomoléculas têm a possibilidade de serem extraídas no álcool mas degradam-se rapidamente, para evitar a sua degradação utiliza-se uma pequena concentração de ácido, neste caso utiliza-se o **HCl**.

Por outro lado, o espectro de absorção da solução em água apresenta algumas diferenças na sua forma e suas intensidades nas bandas localizadas na região dos 350-550 *nm*, porém existem duas bandas de absorção (banda 2 e 3) que coincidem com os comprimentos de onda de absorção da amostra de referência; também foi constatado que este espectro de absorção apresenta solvatocromismo negativo para a banda de absorção 1, aqui os estados excitados foram melhores estabilizados, diminuindo a diferença de energia entre orbitais moleculares HOMO-LUMO e solvatocromismo positivo para a banda de absorção 4, neste caso os estados fundamentais foram melhor estabilizados, acrescentando a diferença de energia entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO dos conjuntos de biomoléculas presentes nesta solução.

A [figura 38\(c\)](#) corresponde aos espectros de absorção do suco puro e as soluções elaboradas com o pimentão laranja nos solventes selecionados. A primeira observação que devemos destacar é que apesar dos solventes utilizados possuem polaridades diferentes, os

espectros de absorção para as soluções realizadas em álcool, OH-HCl e o hexano apresentam solvatocromismo negativo (deslocamento hipsocrômico) em relação ao espectro de referência, isso significa que o uso desses solventes na amostra aumentou a diferença de energia entre os orbitais moleculares HOMO-LUMO dos diferentes conjuntos de biomoléculas, causando o deslocamento de certas bandas de absorção para comprimentos de onda mais curtos. No caso da solução preparada com o solvente OH-HCl, foi evidenciada uma banda na região entre 500-800 *nm*, isto indica o mesmo comportamento da amostra do pimentão amarelo, este solvente extraiu algumas biomoléculas pertencentes a um grupo molecular diferente ao carotenoides possivelmente sejam moléculas pertencentes às antocianinas. Por outro lado, o espectro de absorção da solução preparada em água apresenta solvatocromismo positivo em relação ao espectro de absorção de referência, isso significa que para certos conjuntos de biomoléculas os estados excitados ficaram melhor estabilizadas.

A [figura 38\(d\)](#), temos como referência o suco puro do pimentão vermelho e as diferentes soluções realizadas com a polpa deste pimentão. Inicialmente, devemos enfatizar que os solventes álcool e hexano conseguiram extrair de forma eficiente alguns conjuntos das biomoléculas dos carotenoides que se encontram nestas amostras, isso se reflete em cada um de seus espectros de absorção visto que, em comparação com o espectro de absorção da referência temos bandas mais proeminentes e definidas, isto deve-se principalmente ao fato de ter uma maior concentração de biomoléculas que absorvem energia nessa região, além disso, notamos que os espectros de absorção dessas soluções possuem solvatocromismo diferentes, para o caso do solvente álcool encontramos deslocamentos hipsocrômicos e para a solução com hexano temos deslocamento batocrômico. No caso da solução em OH-HCl, apresenta solvatocromismo negativo e podemos observar uma banda com baixa intensidade de absorção na região de 500-800 *nm*, quer dizer, que a concentração das biomoléculas que absorvem luz naquela região diminuiu em comparação com as soluções feitas neste mesmo solvente nas amostras do pimentão amarelo e laranja. Por outro lado, no caso da solução preparada em solvente água, vemos que o espectro de absorção é muito diferente aos espectros das outras soluções e do suco puro, além disso, evidenciamos solvatocromismo negativo na região entre 400-500 *nm* em relação ao espectro de absorção de referência.

Na [figura 39\(a\)](#) encontramos os espectros de absorção das soluções preparadas com cada um dos sucos do pimentão e alguns solventes selecionados, estes serão comparados com a amostra de referência que corresponde aos espectros de absorção do suco puro de cada pimentão.

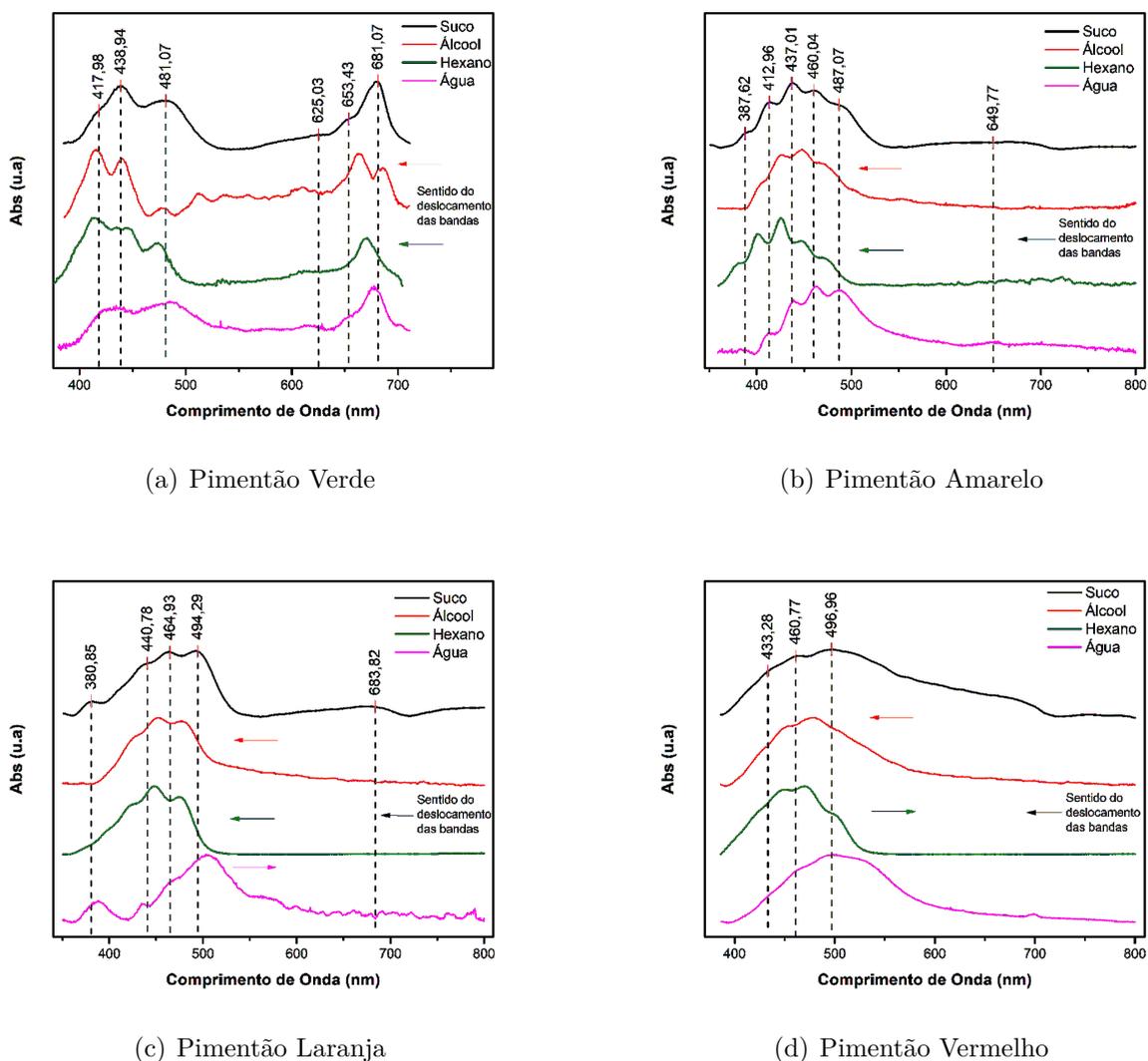


Figura 39 – Comparação entre os espectro de absorção UV-Vis do suco puro de cada pimentão e as diferentes soluções preparadas com os sucos dos pimentões. **(a)** Pimentão verde, **(b)** Pimentão amarelo, **(c)** Pimentão laranja, **(d)** Pimentão vermelho

A seguir faremos uma análise geral dos espectros de absorção mostrados na [figura 38](#) e na [figura 39](#). Inicialmente devemos destacar que os espectros de absorção das soluções feitas em água mostrados na [figura 39](#) tem suas bandas de absorção localizados quase nas mesmas posições onde se localizam as bandas de absorção de cada uma das amostra de referência, levando em consideração esses resultados podemos inferir que a água dilui cada um dos sucos do pimentão isto faz com que em algumas ocasiões podem-se apresentar pequenos deslocamentos e mudanças nas intensidades das bandas de absorção.

É importante notar também que para o espectro de absorção das soluções preparadas com os solventes álcool e hexano que são vistos nas [figura 39\(a\)](#), [39\(c\)](#) e [39\(d\)](#), elas apresentam o mesmo tipo de solvatocromismo que foi observado nas soluções preparadas

com os pimentões *in-natura* nos mesmos solventes, deve-se observar que a variação do deslocamento entre as bandas de absorção das soluções da [figura 38](#) e da [figura 39](#) não são os mesmos a respeito das amostras de referência, isto se deve principalmente ao fato dos pimentões utilizados para cada uma das soluções serem adquiridos em anos e talvez em etapas de maturação diferentes, além disso, devemos considerar que as interações das forças intermoleculares dos solventes e as amostras vão depender do tipo de preparo desta (*in-natura* ou *suco*).

Comparando a [figura 38\(b\)](#) e a [figura 39\(b\)](#) descobrimos que para as soluções preparadas no álcool tanto com o pimentão amarelo *in-natura* e suco, os comprimentos de onda de absorção máxima para cada uma das bandas destes dois espectros são muito próximos entre eles (ver as informações da [tabela 13](#)), além disso, observamos que os dois espectros de absorção apresentam o mesmo tipo de solvatocromismo em relação ao espectro de absorção da amostra de referência. Porém, no caso das soluções preparadas em solvente hexano, observamos que para a [figura 38\(b\)](#) temos solvatocromismo positivo e que para a [figura 39\(b\)](#) se observa solvatocromismo negativo, uma possível explicação para isso pode ser devido ao fato da não miscibilidade do hexano com a água presente no suco do pimentão, devemos considerar que é muito provável que as interações das forças intermoleculares das biomoléculas dos carotenoides presentes no suco e o hexano sejam maiores que as interações entre os carotenoides e a água, isto permite obter uma diluição com este conjunto de biomoléculas. Para o caso da solução preparada com a polpa em hexano, embora a polpa contenha água, ela não está em contato direto com o solvente uma vez que a água está contida dentro da polpa o que representa uma dificuldade para o solvente interagir e extrair essas biomoléculas.

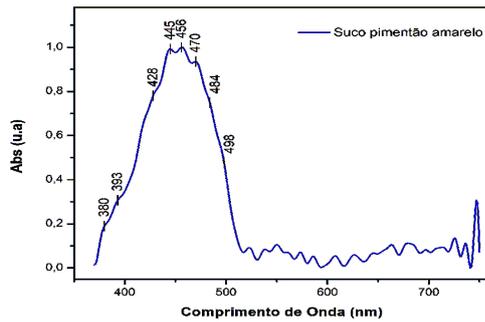
Na [tabela 13](#) são apresentadas algumas informações que podem ser extraídas dos espectros de absorção dispostos na [figura 38](#) e a [figura 39](#), aqui pode-se evidenciar os comprimentos de onda de absorção para cada um dos espectros de absorção das soluções preparadas e seus respectivos deslocamentos, caso tenham, com os respectivos espectros de absorção das amostras de referência.

Tabela 13 – Informações das bandas de absorção dos espectros UV-Vis das soluções realizadas em diferentes solventes com os pimentões *in-natura* e em suco.

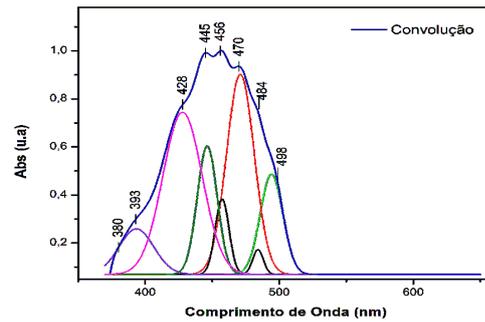
Pimentão	Solvente	Pimentão <i>in-natura</i> λ_{abs} (nm)	Pimentão em suco λ_{abs} (nm)
Verde	Álcool	417,31 ; 436,94 ; 468,08 540,03 ; 615,99 ; 665,01	414,92 ; 439,51 ; 478,43 536,27 ; 610,04 ; 663,20
	OH-HCl	418,02 ; 436,97 ; 647,04 539,01 ; 612,04 ; 665,07	—
	Hexano	442,97 ; 469,02 ; 601,97 635,06 ; 662,01	413,94 ; 434,56 ; 473,93 611,44 ; 670,76
	Água	433,99 ; 471,23 ; 534,39 579,93 ; 680,00 ; 717,92	432,41 ; 487,07 614,79 ; 677,49
Amarelo	Álcool	399,06 ; 424,12 447,59 ; 470,60	402,52 ; 425,07 447,59 ; 469,67
	OH-HCl	404,01 ; 425,94 ; 449,01 473,05 ; 650,07	—
	Hexano	377,04 ; 396,26 ; 418,99 441,02 ; 469,93	380,46 ; 401,54 ; 425,48 447,94 ; 472,45
	Água	379,98 ; 437,05 ; 462,04 495,00	387,22 ; 411,81 ; 438,79 462,58 ; 487,17
Laranja	Álcool	423,66 ; 451,95 ; 478,02	423,96 ; 452,03 ; 478,44
	OH-HCl	401,07 ; 429,02 ; 449,93 475,96 ; 684,00	—
	Hexano	399,13 ; 423,22 ; 447,01 475,04	399,13 ; 423,86 447,48 ; 475,05
	Água	451,07 ; 472,05 ; 507,98	388,19 ; 435,33 468,88 ; 500,32
Vermelho	Álcool	426,28 ; 451,96 ; 475,54	426,18 ; 451,96 ; 475,54
	OH-HCl	402,93 ; 429,94 ; 449,93 475,95 ; 685,43	—
	Hexano	397,92 ; 422,91 ; 449,49 470,48 ; 499,44	400,71 ; 422,51 ; 449,94 469,91 ; 501,45
	Água	400,49 ; 414,30 433,97 ; 471,15	434,71 ; 462,58 ; 488,36

4.2 Espectros de Absorção PAS

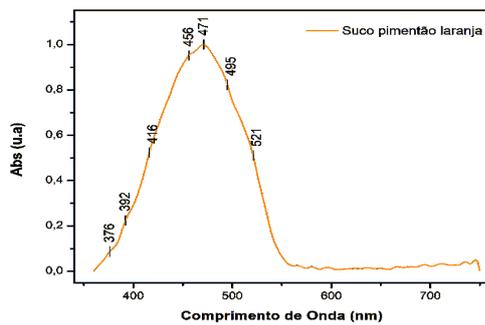
Os espectros de absorção PAS para os sucos dos pimentões nas cores: amarelo, laranja, vermelho estão dispostos na [figura 40](#), a região na qual foram realizados os espectros fotoacústicos foi entre 350-750 nm, as amostras foram preparada seguindo o procedimento descrito na [subseção 3.2.2](#) para o caso do suco dos pimentões.



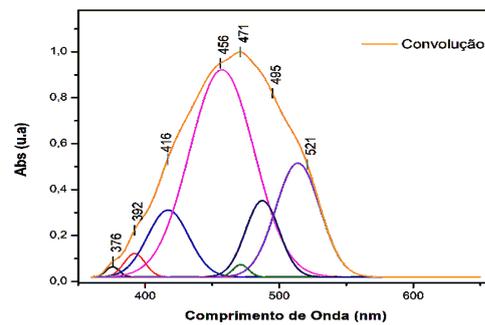
(a) Pimentão Amarelo



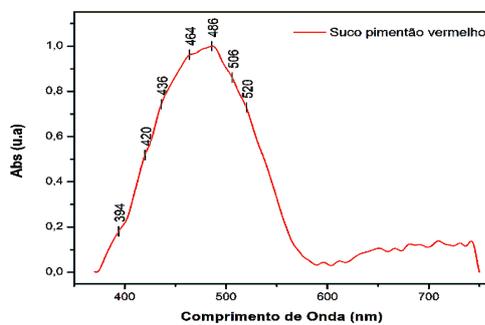
(b) Convolução Pimentão Amarelo



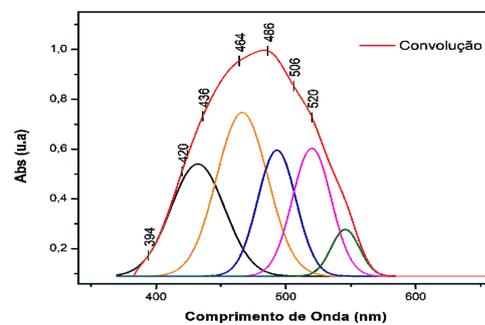
(c) Pimentão Laranja



(d) Convolução Pimentão Laranja



(e) Pimentão Vermelho



(f) Convolução Pimentão Vermelho

Figura 40 – Espectro de absorção fotoacústico do suco dos pimentões amarelo, laranja e vermelho, também se apresentam suas respectivas deconvoluções gaussianas para cada uma das bandas de absorção, as quais ao realizar a convolução reproduz o espectro de absorção fotoacústico.

Para a obtenção dos espectros de absorção fotoacústicos das amostras dos sucos dos pimentões apresentados na [figura 40 \(a\), \(c\), \(e\)](#) foi necessário normalizar eles pelo espectro de absorção fotoacústico do Carbon Black o qual é obtido antes de realizar as medias com as amostras dos sucos, é necessário fazer isto para não levar em consideração o espectro de emissão da lâmpada de arco de xenônio. Uma vez obtidos os espectros de absorção fotoacústicos dos sucos dos pimentões, podemos observar que ainda seguimos tendo bandas de absorção na região onde são encontradas as biomoléculas dos carotenoides. As informações extraídas da [figura 40](#) ajudam a reforçar os resultados obtidos nos espectros de absorção UV-Vis convencional, devido a que foi possível obter bandas de absorção com duas técnicas experimentais diferentes na mesma região do espectro eletromagnético.

Apesar de obter algumas bandas de absorção fracas em intensidade na região após os 550 *nm*, acreditamos que isto é devido principalmente ao sinal captada pela célula fotoacústica encontra-se perto da sinal de ruído eletrônico do equipamento. Algumas bandas de absorção do espectro PAS foram marcadas levando em consideração as bandas de absorção dos espectros UV-Vis convencional. No caso dos espectros de absorção apresentados na [figura 40 \(b\), \(d\), \(f\)](#) foram realizados levando em consideração os máximos das bandas de absorção fotoacústica de cada um dos espectros dos sucos, assim, foram gerados as funções gaussianas as quais representam os máximos de absorção PAS após disso foram realizadas as convoluções das funções gaussianas, isto permitiu obter um espectro de absorção muito semelhante ao obtido experimentalmente no espectrômetro fotoacústico.

Na [tabela 14](#) são apresentados as informações que podem ser obtidas a partir dos espectros de absorção mostrados na [figura 40](#).

Tabela 14 – Informações das bandas de absorção dos espectros PAS do suco do pimentão amarelo, laranja e vermelho.

Pimentão em Suco	Banda	λ_{abs} (nm)	Energia (eV)
Amarelo	1	380	3,2649
	2	393	3,1569
	3	428	2,8988
	4	445	2,7880
	5	456	2,7208
	6	470	2,6397
	7	484	2,5634
	8	498	2,4913
Laranja	1	376	3,2997
	2	392	3,1650
	3	416	2,9824
	4	456	2,7208
	5	471	2,6341
	6	495	2,5064
	7	521	2,3813
Vermelho	1	394	3,1489
	2	420	2,9540
	3	436	2,8456
	4	464	2,6739
	5	486	2,5528
	6	506	2,4519
	7	520	2,3859

4.3 Cálculo Computacional

Os espectros de absorção mostrados na [figura 41](#) foram obtidos por meio de simulações computacionais nas configurações mostradas na [tabela 15](#), esses espectros que correspondem a um conjunto de biomoléculas pertencentes ao grupo dos carotenóides os quais se encontram presentes nos pimentões escolhidos. É muito importante destacar que os comprimentos de onda das bandas de absorção máxima destas biomoléculas estão muito próximas umas das outras e que todas estão localizadas na mesma região do espectro eletromagnético onde foram encontradas as bandas experimentalmente usando as técnicas de espectroscopia UV-Vis e PAS.

Os resultados obtidos nos espectros de absorção da [figura 41](#) reforçam a ideia de que as bandas de absorção obtidos nos espectros experimentais correspondem a um conjunto de biomoléculas que absorvem energia em regiões muito próximas, além disso, devemos considerar que devido ao poder de resolução dos equipamentos usados não podemos afirmar com precisão quais são as biomoléculas individuais presentes em cada uma das preparações feitas com cada um dos pimentões.

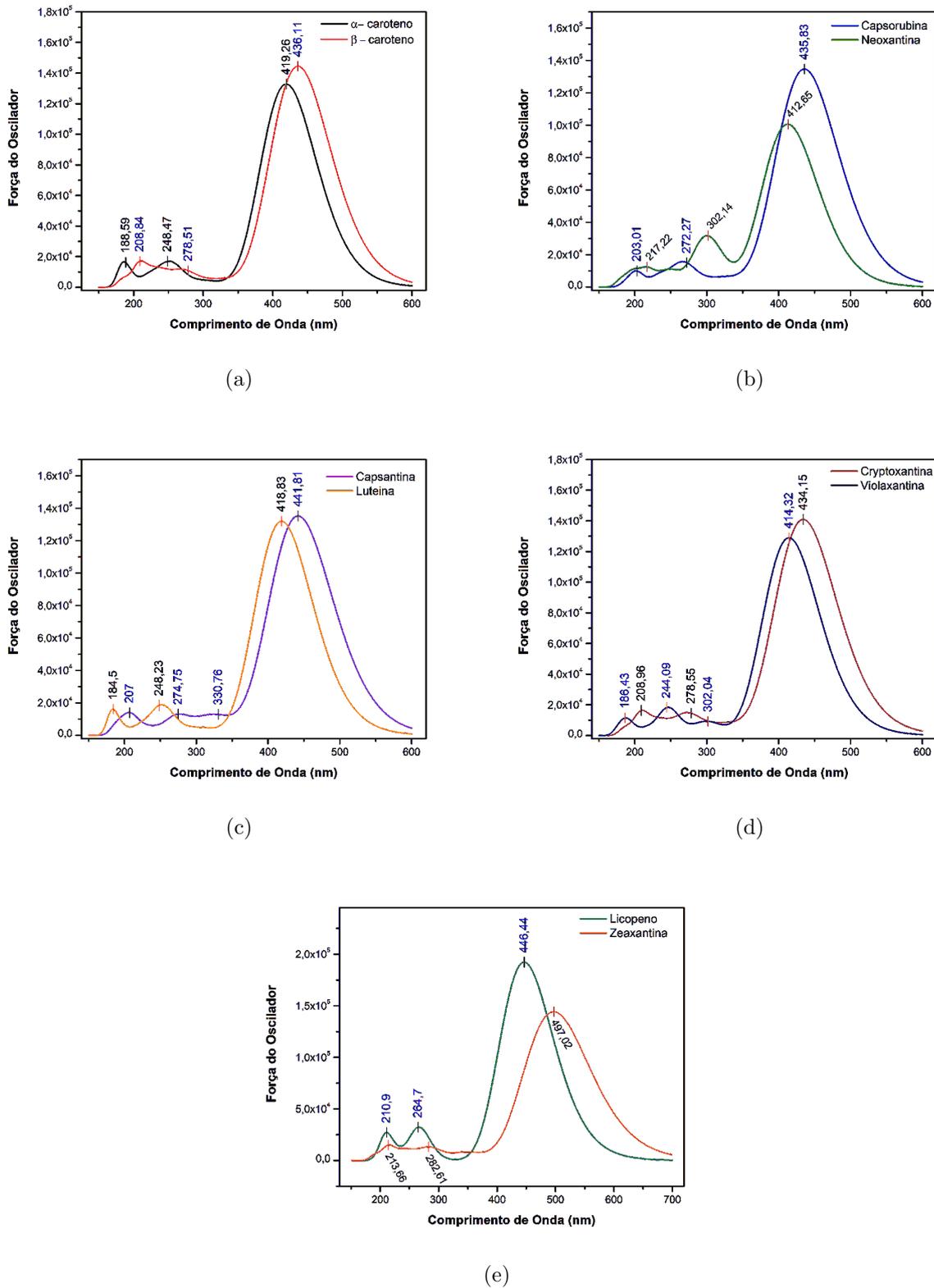


Figura 41 – Espectro de absorção UV-Vis obtidos pela simulação computacional de algumas biomoléculas pertencentes ao grupo dos carotenoides e que segundo as informações da [tabela 2](#) estão presentes nos pimentões utilizados.

A tabela a seguir mostra os dados que foram obtidos a partir dos espectros de absorção de UV-Vis realizados com o cálculo computacional da TDDFT tao como são mostrados na [figura 41](#).

Tabela 15 – Informações obtidas a partir das simulações computacionais de cada uma das biomoléculas selecionadas para fazer os cálculos.

Carotenoide	Configuração Gaussian 09	Absorção Máxima λ_{abs} (nm)	Energia (eV)
α -Caroteno	TDDFT - CAM-B3LYP 6-31G (d) ; N = 25	419,26	2,9572
β -Caroteno		436,11	2,8430
Capsorubina		435,83	2,8448
Neoxantina		412,65	3,0046
Capsantina		441,81	2,8063
Luteina		418,83	2,9602
Cryptoxantina		434,15	2,8558
Violaxantina		414,32	2,9925
Licopeno		446,44	2,7771
Zeaxantina		497,02	2,4946

Os diagramas dos orbitais moleculares HOMO e LUMO das biomoléculas de carotenóides que foram considerados nas simulações computacionais são apresentados a seguir na [figura 42](#).

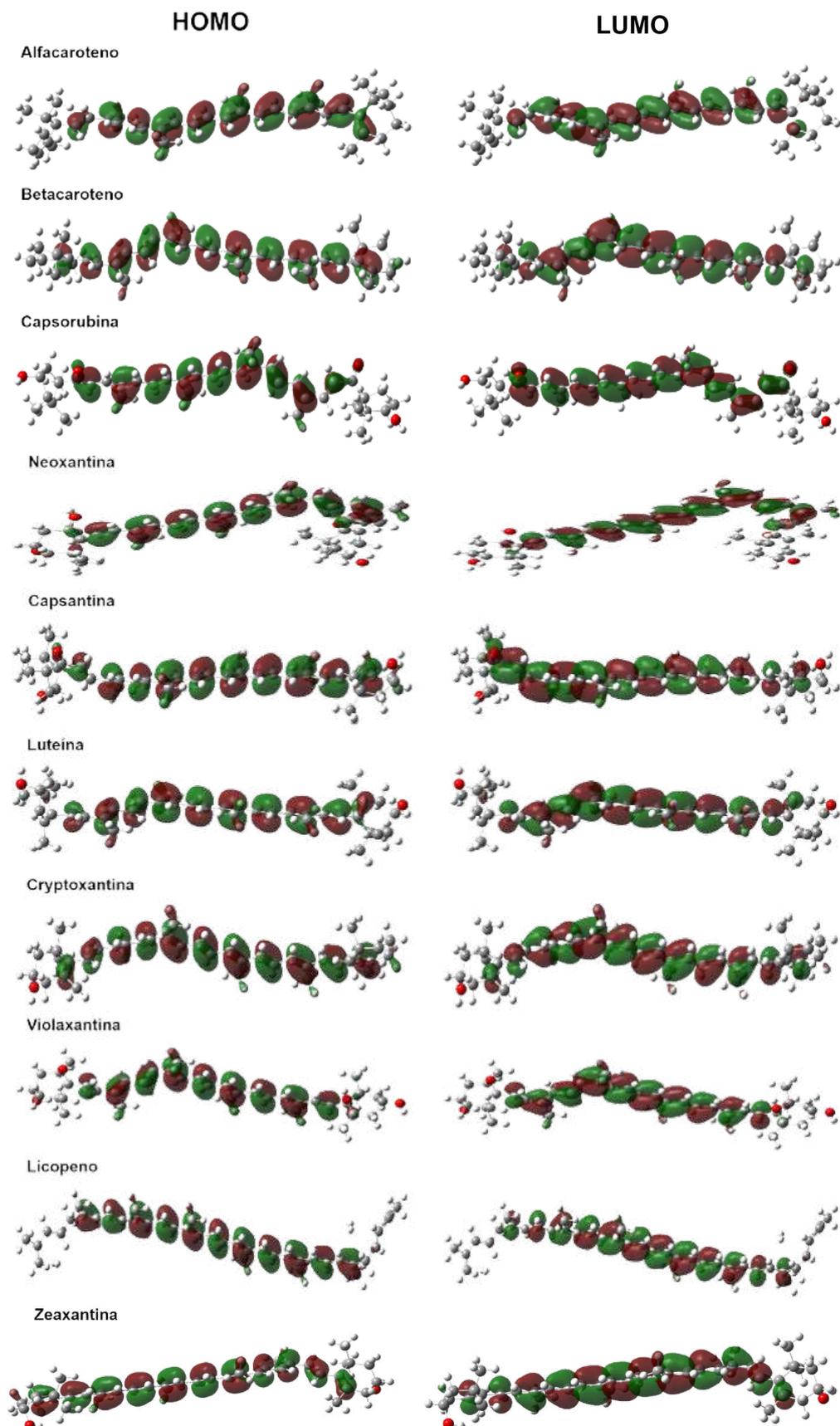


Figura 42 – Diagrama dos Orbitais Moleculares HOMO e LUMO das biomoléculas dos carotenoides, as quais foram obtidos no Software Gaussian 09 a partir dos cálculos do TDDFT de cada uma delas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As técnicas utilizadas de espectroscopia de UV-Vis convencional e Fotoacústica foram implementados para a identificação dos conjuntos das biomoléculas pertencentes aos carotenoides e as clorofilas que se encontram presentes nas diferentes preparações realizadas com os pimentões das cores verde, amarelo, laranja e vermelho. Estas técnicas mostraram ser muito úteis e versáteis na identificação destes conjuntos biomoleculares, uma vez que para cada uma das técnicas utilizadas foi possível obter bandas de absorção nas regiões do espectro eletromagnético onde comumente absorvem estas biomoléculas tal como foi demonstrado nos espectros de absorção UV-Vis que foram obtidos mediante simulações computacionais. Tendo em conta as informações encontradas nos espectros de absorção obtidos mediante a TDDFT, podemos dizer que é muito provável que as bandas de absorção dos espectros experimentais podem-se dever à presença de conjuntos de biomoléculas que em alguns casos pertencem aos carotenoides e em outro as clorofilas.

No caso das soluções realizadas com os diferentes solventes e os pimentões *in-natura*, evidenciamos que dos solventes utilizados os mais eficientes para extrair as biomoléculas das clorofilas **a** e **b** foram o Álcool 70% e OH-HCl já que os espectros de absorção destas soluções apresentaram bandas localizadas nas regiões onde comumente absorvem energia estas biomoléculas. A respeito das biomoléculas dos carotenoides podemos dizer que todos os solventes utilizados conseguiram extrair estas biomoléculas uma vez que para todos os espectros de absorção destas soluções se obtiveram bandas de absorção localizadas nas regiões onde comumente absorvem energia os carotenoides (350-550nm), é importante destacar que para este caso os solventes mais eficientes para extrair estes conjunto de biomoléculas foram o Álcool e o Hexano já que nos espectros de absorção destas soluções foi possível obter bandas mais prominentes e bem definidas. Por outro lado, nos espectro de absorção das soluções com os solventes escolhidos e os sucos de cada pimentão podemos concluir que na maioria dos casos os solventes diluirão alguns dos conjuntos moleculares

presentes em cada um dos sucos provocando que houveram mudanças nas intensidades e posições das bandas de absorção a respeito dos espectros das amostras de referencia.

Foi possível determinar mediante os espectros de absorção UV-VIS o tipo de solvatocromismo apresentado para cada uma das soluções preparadas com cada solvente, o qual se deve principalmente as propriedades físico-químicas e as interações entre os solventes utilizados e os orbitais moleculares HOMO-LUMO de cada biomolécula. Embora os pimentões amarelos, laranjas e vermelhos estejam conformados por biomoléculas pertencentes aos carotenoides, cada um deles é composto por diferentes carotenoides, por este motivo é que em alguns casos as soluções realizadas com determinados solventes apresentam solvatocromismo positivo e em outros solvatocromismo negativo tal e como foram evidenciado na [figura 38](#) [figura 39](#).

Levando em consideração os diagramas dos orbitais moleculares HOMO-LUMO de algumas biomoléculas pertencentes aos carotenoides obtidos a partir dos cálculos computacionais da TDDFT (ver [figura 42](#)), podemos observar que a geometria de cada um dos orbitais moleculares que participam das transições eletrônicas corresponde a orbitais do tipo $\pi - \pi^*$, o qual concorda com os ranges de absorção de energia destes tipos de orbitais moleculares segundo é relatado na literatura.

Perspectivas

- Estudar efeito da temperatura no processo de extração dos conjuntos biomoleculares utilizando diferentes solventes.
- Realizar simulações computacionais com diferentes configurações dos funcionais e conjuntos de bases e tentar obter configurações que possam otimizar o tempo de cálculo.
- Realizar simulações computacionais levando em consideração as teorias dos solventes a fim de obter espectros de absorção UV-Vis para assim comparar com os dados obtidos experimentais.

REFERÊNCIAS

- 1 HORTON, H. R.; POZO, V. González y. *Principios de bioquímica*. Pearson Educación, 2008. (Moran, Laurence A, 572.076 572.076 P7 2008 PRI 2008). ISBN 9789702610250. Disponível em: <<https://books.google.com.ni/books?id=wNkpOAAACAAJ>>. Citado na página 27.
- 2 DERGAL, S. B. *Química de los alimentos*. Alhambra. (Alhambra universidad). ISBN 9789684440135. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=1j5jAAAAMAAJ>>. Citado na página 27.
- 3 KUME, A.; AKITSU, T.; NASAHARA, K. N. Why is chlorophyll b only used in light-harvesting systems? *Journal of Plant research*, Springer, v. 131, n. 6, p. 961–972, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 36.
- 4 UENOJO, M.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, Scielo Brasil, v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007. Citado na página 27.
- 5 MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; FRANCISCO, H. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 54, n. 2, p. 149–155, 2004. Citado na página 28.
- 6 PARK, P.; KIM, E.; CHU, K. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, Elsevier, v. 53, n. 2, p. 148–152, 2007. Citado na página 28.
- 7 REICHARDT, C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 94, n. 8, p. 2319–2358, 1994. Citado 5 vezes nas páginas 28, 49, 50, 51 e 53.
- 8 CHENG, S.-H. et al. Extraction of carotenoids and applications. In: *Carotenoids: Properties, Processing and Applications*. Elsevier Science, 2020. p. 259–288. ISBN 9780128173145. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=H7SrDwAAQBAJ>>. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 31.
- 9 REICHARDT, C.; WELTON, T. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Wiley, 2011. ISBN 9783527642137. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=6MzGgfWZAIMC>>. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 51.

- 10 ILLESCAS, J. L.; BACHO, O.; FERRER, S. Frutas y hortalizas. *Guía Práctica. Madrid. MERCASA*, 2008. Citado na página 28.
- 11 ANGULO, A. et al. Bioquímica. 2011. Citado na página 28.
- 12 ROTH, K. The biochemistry of peppers. *Chemviews*, 2014. Citado na página 28.
- 13 INTEREST, C. *The Chemistry of Bell Peppers – Colour and Aroma*. 2020. [Internet; descargado 05-Outubro-2020]. Disponível em: <<https://www.compoundchem.com/2016/07/05/bell-peppers/>>. Citado na página 28.
- 14 DATA, M. F. *Green Bell Peppers Peppers - Sweet Green Raw*. [Internet; visitou 08-novembro-2020]. Disponível em: <<https://tools.myfooddata.com/nutrition-facts/170427/wt1>>. Citado 3 vezes nas páginas 21, 28 e 31.
- 15 DATA, M. F. *Sweet Yellow Peppers Peppers - Sweet Yellow Raw*. [Internet; visitou 08-novembro-2020]. Disponível em: <<https://tools.myfooddata.com/nutrition-facts/169383/wt1>>. Citado 3 vezes nas páginas 21, 28 e 31.
- 16 DATA, M. F. *Sweet Red Bell Peppers Peppers - Sweet Red Raw*. [Internet; visitou 08-novembro-2020]. Disponível em: <<https://tools.myfooddata.com/nutrition-facts/170108/wt5>>. Citado 3 vezes nas páginas 21, 28 e 31.
- 17 STAFF, H. S. B. B. E. 2020. [Internet; visitou 08-novembro-2020]. Disponível em: <<https://www.healthsciencebulletin.com/orange-bell-pepper-nutrition-facts/>>. Citado 3 vezes nas páginas 21, 28 e 31.
- 18 ROTH, K. Die skala des wilbur lincoln scoville. manche mögen's scharf. *Chemie in unserer Zeit*, Wiley Online Library, v. 44, n. 2, p. 138–151, 2010. Citado na página 29.
- 19 BOSLAND, P.; VOTAVA, E.; VOTAVA, E. *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums*. CABI, 2012. (Crop production science in horticulture). ISBN 9781845938253. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=UIrC1Qx4QfEC>>. Citado na página 29.
- 20 MACIEL, M. I. S. et al. Fitoquímicos bioativos em diferentes variedades de pimentão. *Horticultura Brasileira, Brasília*, v. 21, n. 2, p. 1–4. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 29.
- 21 GALANAKIS, C. M. *Nutraceutical and functional food components: effects of innovative processing techniques*. Elsevier Science, 2016. ISBN 9780128096505. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=jmeyDAAAQBAJ>>. Citado 3 vezes nas páginas 21, 30 e 38.
- 22 RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E.; SÁNCHEZ-PRIETO, M.; OLMEDILLA-ALONSO, B. Assessment of carotenoid concentrations in red peppers (*capsicum annum*) under domestic refrigeration for three weeks as determined by hplc-dad. *Food Chemistry: X*, Elsevier, p. 100092, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 30.
- 23 CURL, A. L. Red pepper carotenoids, the carotenoids of red bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications, v. 10, n. 6, p. 504–509, 1962. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 30.
- 24 CURL, A. L. Bell pepper carotenoids, carotenoids of green bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications, v. 12, n. 6, p. 522–524, 1964. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 30.

- 25 MARTÍNEZ, A. M. Química de productos naturales. El autor, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 30.
- 26 KEVREŠAN, Ž. S. et al. Carotenoid content in fresh and dry pepper (*capsicum annum* l.) fruits for paprika production. *Food and Feed research*, v. 36, n. 1-2, p. 21–28, 2009. Citado 3 vezes nas páginas 21, 30 e 48.
- 27 CAMARA, B.; MONEGER, R. Free and esterified carotenoids in green and red fruits of *capsicum annum*. *Phytochemistry*, Elsevier, v. 17, n. 1, p. 91–93, 1978. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 30.
- 28 BAENAS, N. et al. Industrial use of pepper (*capsicum annum* l.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food chemistry*, Elsevier, v. 274, p. 872–885, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 31.
- 29 MIRANDA, V. S. et al. Carotenóides de bactérias halófilas: produção, caracterização e atividade antioxidante. 2010. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 32.
- 30 KOSTRZEWA, D.; DOBRZYŃSKA-INGER, A.; RESZCZYŃSKI, R. Pilot scale supercritical co₂ extraction of carotenoids from sweet paprika (*capsicum annum* l.): Influence of particle size and moisture content of plant material. *LWT*, Elsevier, p. 110–345, 2020. Citado na página 31.
- 31 KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, Citeseer, v. 66, n. 5, p. 1003–1010, 1994. Citado na página 31.
- 32 ZHANG, Z. et al. Microstructure and bioaccessibility of different carotenoid species as affected by hot air drying: Study on carrot, sweet potato, yellow bell pepper and broccoli. *LWT*, Elsevier, v. 96, p. 357–363, 2018. Citado na página 31.
- 33 NETO, O. T. et al. Identificação de carotenoides em vegetais, in-natura, utilizando espectroscopia fotoacústica. Universidade Federal de Campina Grande, 2018. Citado 5 vezes nas páginas 18, 35, 38, 43 e 73.
- 34 MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review. *Journal of Chemistry*, Hindawi, v. 2016, 2016. Citado 5 vezes nas páginas 17, 35, 36, 37 e 38.
- 35 SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, Elsevier, v. 76, p. 735–750, 2015. Citado na página 35.
- 36 NASCIMENTO, R. L. Carotenoides de descarte de vegetal folhoso: obtenção e potencial antioxidante. Escola de Nutrição. Citado 3 vezes nas páginas 35, 36 e 37.
- 37 SATHASIVAM, R. et al. An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *South African Journal of Botany*, Elsevier, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 36.
- 38 CARDOSO, S. L. Photophysics of carotenoids and the antioxidant role of β -carotene. *Quim Nova*, v. 20, p. 535–540, 1997. Citado na página 36.
- 39 MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, Springer, v. 74, n. 1, p. 1–16, 2020. Citado na página 36.

- 40 ARUNKUMAR, R.; GORUSUPUDI, A.; BERNSTEIN, P. S. The macular carotenoids: A biochemical overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, Elsevier, p. 158617, 2020. Citado na página 36.
- 41 SHEIKH, A. Q.; PANDIT, A. K.; GANAI, B. A. Seasonal variation in chlorophyll content of some selected plant species of yousmarg grassland ecosystem. *Asian Journal of Plant Science and Research*, v. 7, n. 2, p. 33–36, 2017. Citado na página 36.
- 42 MARTIN, L. *What Are the Roles of Chlorophyll A and B?* 2019. [Internet; descargado 02-novembre-2020]. Disponível em: <<https://sciencing.com/what-are-the-roles-of-chlorophyll-a-b-12526386.html>>. Citado na página 36.
- 43 DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, Taylor & Francis, v. 40, n. 3, p. 173–289, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 37.
- 44 BELL, J. G. et al. Depletion of α -tocopherol and astaxanthin in atlantic salmon (*salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition*, Oxford University Press, v. 130, n. 7, p. 1800–1808, 2000. Citado na página 37.
- 45 BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, Wiley Online Library, v. 126, n. 3, p. 369–381, 2006. Citado na página 37.
- 46 CHOKSI, P. M.; JOSHI, V. Y. A review on lycopene extraction, purification, stability and applications. *International Journal of Food Properties*, Taylor & Francis, v. 10, n. 2, p. 289–298, 2007. Citado na página 38.
- 47 GROSS, J. *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*. Springer US, 2012. ISBN 9781461520337. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=gBDaBwAAQBAJ>>. Citado na página 38.
- 48 THANE, C.; REDDY, S. Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. *Nutrition & Food Science*, MCB UP Ltd, 1997. Citado na página 38.
- 49 STREIT, N. M. et al. As clorofilas. *Ci&A Rural*, scielo, v. 35, p. 748 – 755, 06 2005. ISSN 0103-8478. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000300043&nrm=iso>. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 39.
- 50 SANTIAGO, R. E. *Biomarcadores de luteína, zeaxantina y otros carotenoides en la relación dieta y salud ocular humana*. Tese (Doutorado) — Universidad Complutense de Madrid, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 53.
- 51 RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. et al. *A guide to carotenoid analysis in foods*. [S.l.]: ILSI press Washington, 2001. Citado na página 39.
- 52 BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, Wiley Online Library, v. 9, n. 15, p. 1551–1558, 1995. Citado na página 39.

- 53 STRAIN, H. H.; SVEC, W. A. Extraction, separation, estimation, and isolation of the chlorophylls. In: *The chlorophylls*. Elsevier, 1966. p. 21–66. ISBN 978-1-4832-3289-8. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781483232898500084>>. Citado na página 39.
- 54 VALDUGA, E. et al. Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *sporidiobolus salmonicolor* cbs2636. Florianópolis, SC, 2005. Citado na página 40.
- 55 BRITTON, G. Uv/visible spectroscopy. *Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy*, Birkhauser Verlag, p. 20–21, 1995. Citado na página 40.
- 56 GOMES, L. M. M. Inclusão de carotenoides de pimentão vermelho em β -ciclodextrina e avaliação da sua estabilidade, visando aplicação em alimentos banca examinadora. Universidade Federal Fluminense, 2017. Citado na página 40.
- 57 SOLOVCHENKO, A. Screening pigments: General questions. In: _____. *Photoprotection in Plants: Optical Screening-based Mechanisms*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 9–31. ISBN 978-3-642-13887-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-13887-4_2>. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 40.
- 58 AYALA, J. D. *TEORIA DO ORBITAL MOLECULAR*. 2020. [Internet; descargado 06-Outubro-2020]. Disponível em: <<http://qui.ufmg.br/~ayala/matdidatico/tom.pdf>>. Citado na página 41.
- 59 ALCANIZ, E. de J. *TEORIA DO ORBITAL MOLECULAR*. 2019. [Internet; descargado 06-Outubro-2020]. Disponível em: <http://www3.uah.es/eJesus/resumenes/QI/Tema_2.pdf>. Citado na página 41.
- 60 ATKINS, P.; PAULA, J. D. Atkins' physical chemistry. Oxford press, 2006. Citado 4 vezes nas páginas 17, 41, 42 e 46.
- 61 ZIELINSKI, T. J. et al. Quantum states of atoms and molecules. ACS Publications, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 43.
- 62 KAKKAR, R. *Atomic and Molecular Spectroscopy*. Cambridge University Press, 2015. ISBN 9781107063884. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=aMnSCQAAQBAJ>>. Citado 8 vezes nas páginas 17, 18, 43, 45, 46, 47, 52 e 70.
- 63 FLOWERS, P. et al. *Chemistry*. OpenStax, Rice University, 2016. (Open Textbook Library). ISBN 9781938168390. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=nPQyrgEACAAJ>>. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 44.
- 64 WIETHAUS, G. Síntese e caracterização de novas iminas com aplicação em óptica não-linear. 2010. Citado na página 47.
- 65 GÓMEZ-GARCÍA, M. D. R.; OCHOA-ALEJO, N. Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 14, n. 9, p. 19025–19053, 2013. Citado na página 48.
- 66 MONTIEL, H. P. *Física general*. Grupo Editorial Patria, 2014. (Serie Bachiller). ISBN 9786077440635. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=__puEBgAAQBAJ>. Citado na página 49.

- 67 SOLUTIONS, Solvation, and Dissociation. Chemistry Libretexts, 2020. [Online; accessed 2021-06-24]. Disponível em: <<https://chem.libretexts.org/@go/page/53091>>. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 49.
- 68 INDUSTRIAL solvents handbook. M. Dekker, 1996. ISBN 9780824797188. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=IOpGAQAIAAJ>>. Citado 2 vezes nas páginas 49 e 51.
- 69 MARCUS, Y. *The properties of solvents*. Wiley, 1998. (The Properties of Solvents, v. 1). ISBN 9780471983699. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=YDpRAAAAMAAJ>>. Citado 6 vezes nas páginas 18, 49, 50, 51, 52 e 53.
- 70 MCMURRY, J.; MONDRAGÓN, C. H.; POZO, V. G. *Química orgánica*. International Thomson, 2014. ISBN 9789706863546. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=LZ4xXyz8Qy4C>>. Citado 2 vezes nas páginas 50 e 53.
- 71 SOLUTIONS, Solvation, and Dissociation. Chemistry Libretexts, 2019. [Online; accessed 2021-06-24]. Disponível em: <https://www.omundodaquimica.com.br/academica/org1_ligacao>. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 51.
- 72 MACHADO, V. G.; STOCK, R. I.; REICHARDT, C. Pyridinium n-phenolate betaine dyes. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 114, n. 20, p. 10429–10475, 2014. Citado na página 51.
- 73 BUCKINGHAM, A. D.; LIPPERT, E.; BRATOS, S. *Organic Liquids: Structure, dynamics, and chemical properties*. Wiley, 1978. (A Wiley-Interscience publication). ISBN 9780471996736. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=2QzwAAAAMAAJ>>. Citado na página 51.
- 74 COMMON POLAR PROTIC SOLVENTS. Cayman Chemical. [Online; accessed 2021-06-24]. Disponível em: <<https://static.caymanchem.com/cms/caymanchem/cmsImages/news/502/CommonSolventsPolarProtic.pdf>>. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 53.
- 75 COMMON POLAR APROTIC SOLVENTS. Cayman Chemical. [Online; accessed 2021-06-24]. Disponível em: <<https://static.caymanchem.com/cms/caymanchem/cmsImages/news/502/CommonSolventsPolarAprotic.pdf>>. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 53.
- 76 COMMON NONPOLAR SOLVENTS. Cayman Chemical. [Online; accessed 2021-06-24]. Disponível em: <<https://static.caymanchem.com/cms/caymanchem/cmsImages/news/502/CommonSolventsNonpolar.pdf>>. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 54.
- 77 REQUENA, A.; ROMERO, F. La aproximación de born-oppenheimer. *Anales de la Universidad de Murcia (Ciencias)*, p. 48–74, 1985. Citado na página 54.
- 78 ATKINS, P. P.; PAULA, J. D. *Atkins' Physical Chemistry*. Oxford University Press, 2018. ISBN 9780198814740. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=ygDATQEACAAJ>>. Citado 3 vezes nas páginas 54, 55 e 59.
- 79 LEVINE, I. N.; BUSCH, D. H.; SHULL, H. *Quantum chemistry*. Pearson Prentice Hall, 2009. ISBN 9780136131069. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=DcDWPgAACAAJ>>. Citado 3 vezes nas páginas 55, 56 e 59.

- 80 PANSINI, F. N. N. Conjunto de bases gaussianas universal para átomos de k até kr. *Master's thesis, Universidade Federal do Espírito Santo*, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 56 e 59.
- 81 SLATER, J. C. The theory of complex spectra. *Physical Review*, APS, v. 34, n. 10, p. 1293, 1929. Citado na página 56.
- 82 SEARS, F. W.; SALINGER, G. L. *Termodinámica teoría cinética y termodinámica estadística*. Reverte, 2021. ISBN 9788429190663. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=ypAXEAAAQBAJ>>. Citado na página 59.
- 83 MORGON, N. H. *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. Editora Livraria da Física, 2007. ISBN 9788588325876. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=XtUuweLdWWQC>>. Citado na página 60.
- 84 GEORG, H. d. C. *Efeitos do meio em propriedades conformacionais e eletrônicas de moléculas*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2006. Citado na página 62.
- 85 DAMASCENO, M. V. A. *Estudos teóricos dos efeitos de solvente no espectro eletrônico de absorção da molécula óxido mesitil*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2009. Citado na página 62.
- 86 MORGON, N. H.; CUSTODIO, R. Teoria do funcional de densidade. *Química Nova*, v. 18, n. 1, p. 44–55, 1995. Citado 2 vezes nas páginas 64 e 67.
- 87 TSIPIIS, A. C. Dft flavor of coordination chemistry. *Coordination Chemistry Reviews*, Elsevier, v. 272, p. 1–29, 2014. Citado na página 64.
- 88 HUZINAGA, S. Gaussian-type functions for polyatomic systems. i. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 42, n. 4, p. 1293–1302, 1965. Citado na página 65.
- 89 HEHRE, W. J. Ab initio molecular orbital theory. *Accounts of Chemical Research*, ACS Publications, v. 9, n. 11, p. 399–406, 1976. Citado na página 65.
- 90 KRISHNAN, R. et al. Self-consistent molecular orbital methods. xx. a basis set for correlated wave functions. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 72, n. 1, p. 650–654, 1980. Citado na página 65.
- 91 MORZAN, U. N. *Dinámica cuántica en sistemas complejos: desde la espectroscopía hasta el transporte electrónico*. Tese (Doutorado) — Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2017. Citado na página 66.
- 92 CRAMER, C. J.; BICKELHAUPT, F. Essentials of computational chemistry. *ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH-*, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, v. 42, n. 4, p. 381–381, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 67.
- 93 CAPELLE, K. A bird's-eye view of density-functional theory. *Brazilian journal of physics*, SciELO Brasil, v. 36, p. 1318–1343, 2006. Citado na página 67.
- 94 YANAI, T.; TEW, D. P.; HANDY, N. C. A new hybrid exchange–correlation functional using the coulomb-attenuating method (cam-b3lyp). *Chemical physics letters*, Elsevier, v. 393, n. 1-3, p. 51–57, 2004. Citado na página 67.

- 95 MARTINS, V.; RONCONI, C. Coordination networks: Design, synthesis, topology and photophysical properties. *Revista Virtual de Química*, BRAZILIAN CHEMICAL SOC SECRETERIA REGIONAL RIO DO JANEIRO, UNIV FEDERAL, v. 9, n. 3, p. 1318–1341, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 69.
- 96 LIMA, L. S. Lei de lambert–beer. *Revista de Ciência Elementar*, Casa das Ciências, v. 1, n. 1, 2013. Citado na página 70.
- 97 MCCLELLAND, J. F. Photoacoustic spectroscopy. *Analytical Chemistry*, ACS Publications, v. 55, n. 1, p. 89–105, 1983. Citado na página 71.
- 98 WEST, G. A. et al. Photoacoustic spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, American Institute of Physics, v. 54, n. 7, p. 797–817, 1983. Citado 2 vezes nas páginas 71 e 72.
- 99 ROSENCWAIG, A. Photoacoustic spectroscopy. *Annual review of biophysics and bioengineering*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 9, n. 1, p. 31–54, 1980. Citado 2 vezes nas páginas 71 e 72.
- 100 ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics*, American Institute of Physics, v. 47, n. 1, p. 64–69, 1976. Citado na página 72.
- 101 ROSENCWAIG, A. Theoretical aspects of photoacoustic spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, American Institute of Physics, v. 49, n. 5, p. 2905–2910, 1978. Citado na página 72.
- 102 ROSENCWAIG, A. Photoacoustic spectroscopy. Elsevier, v. 46, p. 207–311, 1978. Citado 3 vezes nas páginas 18, 72 e 78.
- 103 PAO, Y.-H. *Optoacoustic spectroscopy and detection*. Elsevier Science, 2012. ISBN 9780323158817. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=GMUa9xJrkQAC>>. Citado 7 vezes nas páginas 18, 19, 72, 73, 85, 86 e 88.
- 104 BENNETT, H. S.; FORMAN, R. A. Photoacoustic methods for measuring surface and bulk absorption coefficients in highly transparent materials: theory of a gas cell. *Applied optics*, Optical Society of America, v. 15, n. 10, p. 2405–2413, 1976. Citado na página 74.
- 105 AAMODT, L.; MURPHY, J.; PARKER, J. Size considerations in the design of cells for photoacoustic spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, American Institute of Physics, v. 48, n. 3, p. 927–933, 1977. Citado na página 74.
- 106 FRISCH, G. W. T. M. J. et al. *Gaussian 09, Revision A.02*. 2016. Disponível em: <<http://gaussian.com>>. Citado na página 90.