

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

IZABELLE AZEVEDO PREMAZZI

Estudo das propriedades e aplicações bioquímicas da molécula de 4-  
metilumbeliferona

Lorena  
2020

IZABELLE AZEVEDO PREMAZZI

Estudo das propriedades e aplicações bioquímicas da molécula de 4-  
metilumbeliferona

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Escola de Engenharia de Lorena da  
Universidade de São Paulo como requisito  
parcial para conclusão da Graduação do curso  
de Engenharia Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Elisson Antônio da Costa  
Romanel

Lorena  
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Premazzi, Izabelle Azevedo

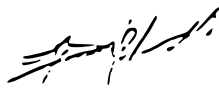
Estudo das propriedades e aplicações bioquímicas da  
molécula de 4metilumbeliferona / Izabelle Azevedo  
Premazzi; orientador Elisson Antônio da Costa  
Romanel. - Lorena, 2020.

42 p.

Monografia apresentada como requisito parcial  
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia  
Bioquímica - Escola de Engenharia de Lorena da  
Universidade de São Paulo. 2020

1. Fluorescência. 2. 4-metilumbeliferona. 3.  
Resíduos de tiro. 4. Balística. I. Título. II. Romanel,  
Elisson Antônio da Costa, orient.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO ALUNO IZABELLE AZEVEDO PREMAZZI, ORIENTADO PELO PROF. DR. ELISSON ANTÔNIO DA COSTA ROMANEL.



---

ASSINATURA DO ORIENTADOR

## RESUMO

PREMAZZI, I. A. **Estudo das propriedades e aplicações bioquímicas da molécula de 4-metilumbeliferona**. 2020: 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Crimes em que hajam disparos de armas de fogo requerem minuciosas investigações, as quais serão capazes de sentenciar ou inocentar os envolvidos. A balística forense é a área responsável pela perícia desses casos, analisando trajetórias, posicionamentos e, principalmente, identidade dos atiradores. A autoria é avaliada de acordo com padrões de dispersão deixados pelos resíduos da munição. A metodologia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), hoje utilizada na avaliação desses resíduos de tiro sobre superfícies, não é efetiva em todas as situações devido ao surgimento de munições atóxicas, livres de metais pesados. Além disso, a forma de recolhimento é inadequada, e as análises, demoradas. Para isso, a saída encontrada foi a adição de compostos luminescentes na composição dos tiros, permitindo seu reconhecimento *in situ*, utilizando apenas lâmpadas ultravioletas. Esses fluoróforos podem ser orgânicos ou inorgânicos, sendo esses derivados de lantanídeos, responsáveis por polêmicas quanto ao impacto ambiental de sua mineração. Dentre os orgânicos, destaca-se a classe das cumarinas, compostos fenólicos de origem vegetal. Como proposta de substância a ser aplicada, este trabalho avalia, por meio de revisão bibliográfica, as propriedades da cumarina 4-metilumbeliferona, fluoróforo de grande relevância para o meio bioquímico e microbiológico. As informações coletadas de resultados obtidos por pesquisadores foram satisfatórias, onde a molécula apresentara alta estabilidade, rendimento quântico de 0,95 e comprimento de onda de emissão máxima à 445 nm. Neste sentido, ensaios para a síntese de cumarinas através do uso de biotecnologia por fermentação e/ou expressão heteróloga ainda são necessários para a produção em escala industrial.

**Palavras-chave:** fluorescência, 4-metilumbeliferona, resíduos de tiro, balística.

## ABSTRACT

PREMAZZI, I. A. **Study of the biochemical properties and applications of the 4-methylumbelliferone molecule**. 2020: 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Crimes in which firearms are fired require thorough investigations, which will be able to sentence or acquit those involved. Forensic ballistics is the area responsible for the expertise of these cases, analyzing trajectories, positions and, mainly, the identity of the snipers. Authorship is assessed according to dispersion patterns left by ammunition waste. The scanning electron microscopy (SEM) methodology, currently used in the evaluation of these shot residues on surfaces, is not effective in all situations due to the appearance of non-toxic ammunition, free of heavy metals. In addition, the method of collection is inadequate and the analyzes take time. For this, the solution found was the addition of luminescent compounds in the composition of the shots, allowing their recognition in situ, using only ultraviolet lamps. These fluorophores can be organic or inorganic, and these are derived from lanthanides, responsible for controversies regarding the environmental impact of their mining. Among the organics, the class of coumarins, phenolic compounds of vegetal origin, stands out. As a proposal for a substance to be applied, this work evaluates, through bibliographic review, the properties of coumarin 4-methylumbelliferone, a fluorophore of great relevance for the biochemical and microbiological environment. The information collected from results obtained by researchers was satisfactory, where the molecule had high stability, quantum yield of 0.95 and maximum emission wavelength at 445 nm. In this sense, tests for the synthesis of coumarins through the use of biotechnology by fermentation and/or heterologous expression are still necessary for industrial scale production.

**Keywords:** fluorescence, 4-methylumbelliferone, gunshot residues, ballistics.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. DESENVOLVIMENTO.....	10
2.1 BALÍSTICA FORENSE.....	10
2.2 LUMINESCÊNCIA.....	14
2.3 FLUORESCÊNCIA.....	16
2.3.1 Decaimentos Não-Radioativos.....	17
2.3.2 Interferências.....	17
2.3.3 Fluoróforos.....	18
2.4 4-METILUMBELIFERONA.....	20
2.4.1 Cumarinas.....	21
2.4.2 Umbeliferona.....	26
2.4.3 Fluorescência.....	28
2.4.4 Aplicações.....	30
2.4.5 Produção.....	32
3. CONCLUSÃO.....	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## 1. INTRODUÇÃO

No cenário brasileiro atual, a coleta de resíduos de tiro faz uso de superfícies adesivas comerciais – como esparadrapos e fitas dupla face comuns. Trata-se de técnica de baixo custo, mas pouco recomendada por não garantir bom recolhimento de amostras. A análise subsequente, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), se vê comprometida pela utilização de munições atóxicas (NTA, do inglês *non toxic ammunition*), livres de metais pesados, como bário, chumbo e antimônio, principais componentes de munições convencionais e alvos do método (MARTINY; PINTO, 2005, MARTINY; PINTO, 2008, MINISTÉRIO DA JUSTIÇA, 2013, COMPANHIA BRASILEIRA DE CARTUCHOS – CBC, 2013).

Sendo assim, a utilização de compostos luminescentes surge como alternativa para o reconhecimento desses resíduos, gerando os chamados resíduos luminescentes de tiro (LGSR, do inglês *luminescent gunshot residue*) que podem ser reconhecidos na própria cena do crime a ser analisada, sem a necessidade de coleta e consequente perda de material. Este método utiliza apenas lâmpadas ultravioleta portáteis, sendo, portanto, uma opção viável, não descartável e relativamente barata, sem requerer equipamentos sofisticados (WEBER et al., 2014; AROUCA, 2016).

Desta forma, é imprescindível explorar a necessidade constante de aprimoramento e inovação das técnicas utilizadas por peritos em campo, a fim de tornar a obtenção de informações cada vez mais eficaz e dinâmica (WEBER et al., 2014; AROUCA, 2016).

A luminescência é, por definição, a característica inata a compostos que, quando incididos com alguma fonte suficiente de energia, sofrem saltos eletrônicos, passando do estado fundamental ao excitado e durante seu retorno ao orbital mais estável – e de menor energia –, liberam essa energia absorvida sob a forma de luz, normalmente dentro do espectro visível (BRANCO, 2014). Divide-se entre os fenômenos de fosforescência ou fluorescência, sendo a segunda muito mais energética que a primeira, com tempo de resposta imediato (SOUZA, 2008).

A substância 4-metilumbeliferona pertence à classe das cumarinas, moléculas naturais encontradas em plantas do grupo das Angiospermas (GARRETT, 20--?). Tem larga aplicação farmacológica, desde ensaios enzimáticos de coliformes fecais à diagnóstico de HIV (CEBALLOS, DINIZ, 2017). Assim como toda molécula orgânica fluorescente, possui um anel aromático em sua estrutura (LUIZ, 2009). Apresenta forte fluorescência em tom azulado com emissão máxima à 460 nm, superior a outras moléculas similares (GRIM, HECKMAN e



LAVIS, 2013) e com rendimento quântico de 0,95 em pH alcalino, o que faz dela um ótimo fluoróforo (ZHI et. al, 2013).

## 2. DESENVOLVIMENTO

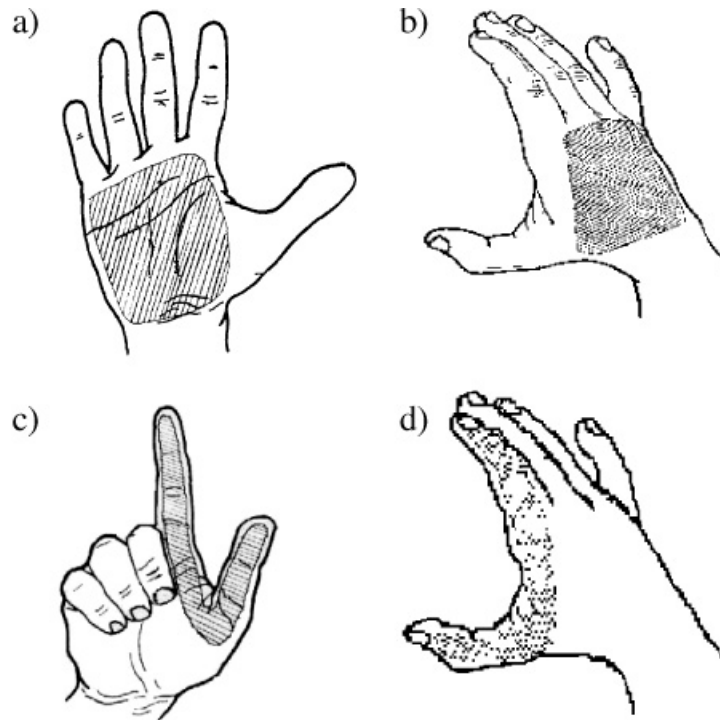
### 2.1 BALÍSTICA FORENSE

Em crimes que envolvam tiros de armas de fogo, descobrir a origem e forma dos disparos é de extrema importância e os resultados devem ser irrefutáveis, uma vez que determinarão os rumos tomados pela investigação pericial, inocentando ou condenando suspeitos, confirmando testemunhos ou ainda diferenciando homicídios de suicídios (WEBER et al, 2014). Para tanto, lança-se mão do estudo minucioso dos resíduos de pólvora (ou GSR, do inglês *gunshot residue*), área da balística forense, responsável pela análise da trajetória da munição e suas consequências como um todo. Dentre elas, os padrões de dispersão das partículas sólidas que compoem o chamado resíduo, sendo, em sua maior parte, chumbo, bário e antimônio (MAIA, 2012).

As altíssimas temperaturas alcançadas durante um disparo, da ordem de 2.500°C, são responsáveis pela vaporização dos compostos metálicos da munição que, com a pressão dos gases expelidos, se depositam nas superfícies ao redor, principalmente sobre o atirador. Em frações de segundos, se condensam e retornam à sua formação sólida, sob a forma de partículas esféricas (SCHWOEBLE E EXLINE, apud MARTINY E PINTO, 2008). Segundo Schwoeble e Exline (2000), os principais locais de deposição desses resíduos relacionados ao atirador são:

1. As mãos, local mais comum de coleta de resíduos, devido à ejeção de cartuchos. As regiões em que se concentram as coletas são quatro (Figura 1), de acordo com Maia (2012):

**Figura 1** – Regiões da mão exploradas para coleta de resíduo de pólvora para análise laboratorial.



**Figura 2.** Regiões da mão de atiradores submetidas à coleta: a) Palma; b) Dorso; c) Região da Pinça (Palmar); d) Região da Pinça (Dorsal).

Fonte: Adaptado de Reis et al., 2004.

2. Rosto. A face pode servir de amostra em devidas situações, a depender do tipo de arma utilizada, como rifles;
3. Roupas. Peças de vestuário mantêm vestígios ainda que se tenha um longo intervalo de tempo entre o incidente e a investigação, ou que o suspeito tenha, de alguma maneira, limpo mãos e rosto.

Ainda para Schwoeble e Exline (2000), a forma de coleta dessas amostras pode variar, a depender da agência regulamentadora em vigência e do método de análise a ser empregado, sendo duas as mais difundidas. A primeira delas utiliza de hastes de algodão flexíveis embebidas em soluções de ácido nítrico 5% para análises de espectrometria de absorção atômica (EAA) ou de plasma acoplado indutivamente (ICP). A segunda faz uso de stubs (pequenos tocos) (Figura 2) com fitas adesivas dupla face de carbono para análises em microscópio eletrônico de varredura (MINISTÉRIO DA JUSTIÇA, 2013).

**Figura 2** – Representações de superfície e utilização de *stubs*. (a) *Stub* usado para coleta de resíduo, com fita adesiva dupla face de carbono com dimensões específicas para o microscópio eletrônico de varredura (MEV); (b) Mecanismo de aplicação de *stub* para coleta de resíduos de disparos.



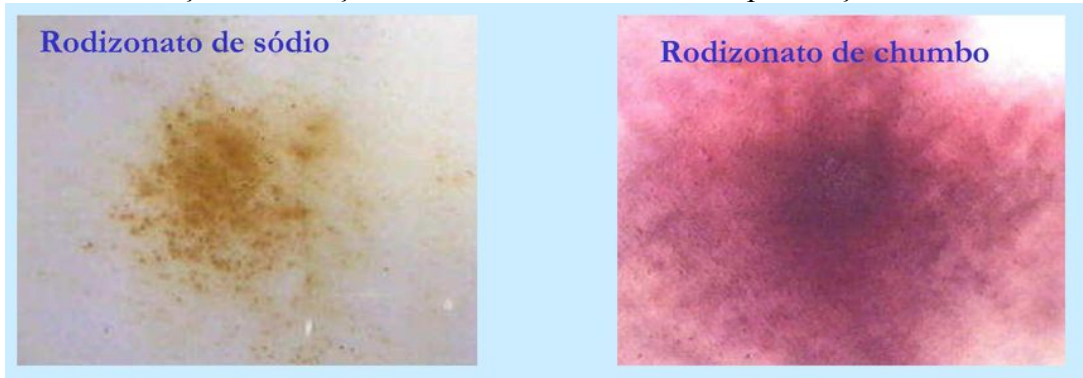
Fonte: (a) Adaptado de Ted Pella, 2020. (b) Adaptado de Evident, 2020.

Entretanto, no atual cenário brasileiro, este procedimento é, normalmente, realizado com o auxílio de esparadrapos de boa qualidade e/ou fitas adesivas simples dupla face. Esses materiais são utilizados por serem mais viáveis economicamente, devido à descartabilidade e alto custo dos *stubs*. Contudo, não são ideais, pois as fitas devem ser condutoras e muitas vezes a coleta pode não ser significativa, comprometendo o sucesso do método (MARTINY; PINTO, 2005; MARTINY; PINTO, 2008).

Além disso, com o surgimento de cartuchos de munições atóxicas (NTA, do inglês *non toxic ammunition*), a eficiência da consolidada microscopia eletrônica (MEV) passou a ser ameaçada, pois, usando raios-X, analisa os espectros de dispersão dos metais pesados das munições. A Companhia Brasileira de Cartuchos – CBC (2013) os define como “não geradores de resíduos tóxicos, livres de metais pesados – como chumbo, bário e antimônio – e totalmente encapsulados”, o que afeta diretamente os compostos-alvo da técnica (AROUCA et al., 2017).

Uma alternativa à retirada de material para o exame residuográfico são os testes químicos, *in situ*, que partem do princípio de revelação através da reação entre o chumbo da munição e o reagente, como o rodizonato de sódio, que passa a ter coloração avermelhada com a formação do rodizonato de chumbo (Figura 3). Mas, segundo Lenhard e colaboradores (2005), esta técnica, porém, pode não ser conclusiva, uma vez que garante, entre tantos, a presença apenas de um elemento, abrindo espaço para contestações da origem do próprio chumbo.

**Figura 3** – Mudança de coloração do sal rodizonato de sódio após reação com chumbo



Fonte: Adaptado de Superintendência da Polícia Técnica Científica, 2003.

Diante de tal cenário, surge a especulação, por parte de vários autores, da possibilidade de se usar marcadores na composição da munição, como a de Brandone et al. (2016) de se adicionar óxido de samário, componente dificilmente encontrado fora de ambientes laboratoriais e/ou industriais restritos. Neste método, porém, a etapa de coleta ainda se faz necessária.

Uma alternativa seria propor marcadores facilmente reconhecíveis na própria cena do crime, não destrutivos e que, portanto, tornem esses resíduos ainda passíveis de estudo laboratorial, se necessário. Destacam-se, então, os compostos luminescentes, capazes de serem revelados sem coleta, apenas com a utilização de lanternas ultravioleta. Sendo, enfim, uma opção viável, de relativo baixo custo e sem requerer equipamentos e instrumentos mais sofisticados (AROUCA, 2016).

Um estudo realizado por Lucena et al. (2016) mostrou que a introdução de um grupo de compostos luminescentes chamado “Estrutura metal-orgânica de lantanídeo” (LMOF, do inglês *lanthanide metal-organic framework*), que são “estruturas metalorgânicas constituídas por um íon lantanídeo contendo ligantes orgânicos”, em munições de calibre 0,38 polegadas acrescentaria em apenas, no máximo, US\$ 0,05 dólares ao custo final.

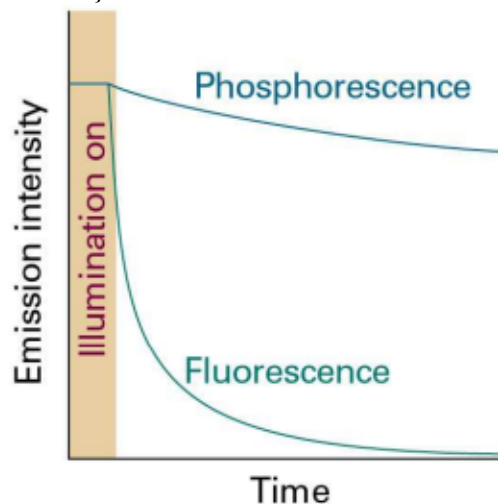
Weber et al. (2014) testaram, ainda, a aplicabilidade desses compostos quanto à interferência no desempenho dos cartuchos. Provaram que, em concentrações até 2% em massa de luminescentes – quantidade suficiente para detecção –, não houve alterações nas trajetórias, dispersões, velocidades e taxa de falhas, além de apresentarem resistência, em torno de 16 vezes, à lavagem de mãos.

## 2.2 LUMINESCÊNCIA

O fenômeno da luminescência pode ser definido como “a emissão de um fóton por uma molécula energizada em um estado excitado após a absorção de luz” e divide-se em outros dois fenômenos: o da fosforescência e da fluorescência (LUIZ, 2009).

As definições mais antigas trazem a diferenciação entre ambas através do tempo de vida médio dessa emissão, isto é: o tempo médio que o composto irá permanecer excitado, até que retorne ao estado fundamental (LUIZ, 2009) (Figura 4). Enquanto a fosforescência é capaz de se manter por maiores períodos após a excitação, a fluorescência cessa praticamente que instantaneamente com o fim da fonte energética, com duração de até 10 nanosegundos (DONOSO, 20--?).

**Figura 4** – Comparação empírica entre os fenômenos de fosforescência e fluorescência. Enquanto a primeira perde intensidade lentamente, a emissão da segunda acaba quase que instantaneamente com o fim da excitação.



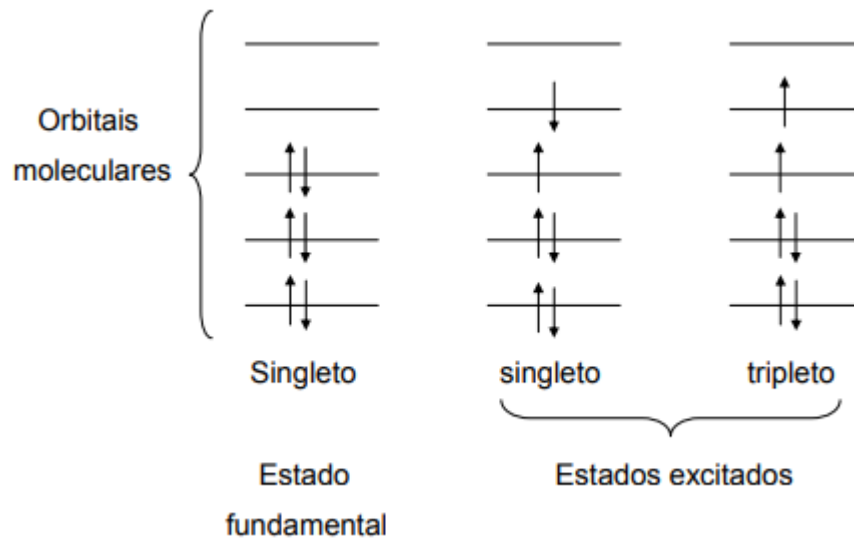
Fonte: Adaptado de Atkins e de Paula, 1978, apud Donoso, 20--?

Entretanto, novas publicações têm distinguido os dois fenômenos pela orientação dos spins dos níveis envolvidos nesse estado excitado da molécula. Caso não ocorra alteração do spin, considera-se uma emissão fluorescente. Mas, se o spin sofrer inversão, tem-se, então, uma emissão fosforescente (DONOSO, 20--?).

Desta forma, esse estado excitado que sofre a molécula variará de acordo com suas transições eletrônicas (Figura 5). Quando a orientação do spin desse elétron é mantida no orbital mais energético, diz-se que o estado excitado dele é singlete  $S_1$  (SOUZA, 2008). Assim, fluorescência é a emissão de luz através de um estado singlete de energia (LUIZ, 2009).

Já quando a orientação é invertida, o estado excitado será tripleto ( $T_1$ ) e, portanto, fosforescência é a emissão de luz pela mudança de um estado singlete – o estado fundamental  $S_0$  – à tripleto (SOUZA, 2008).

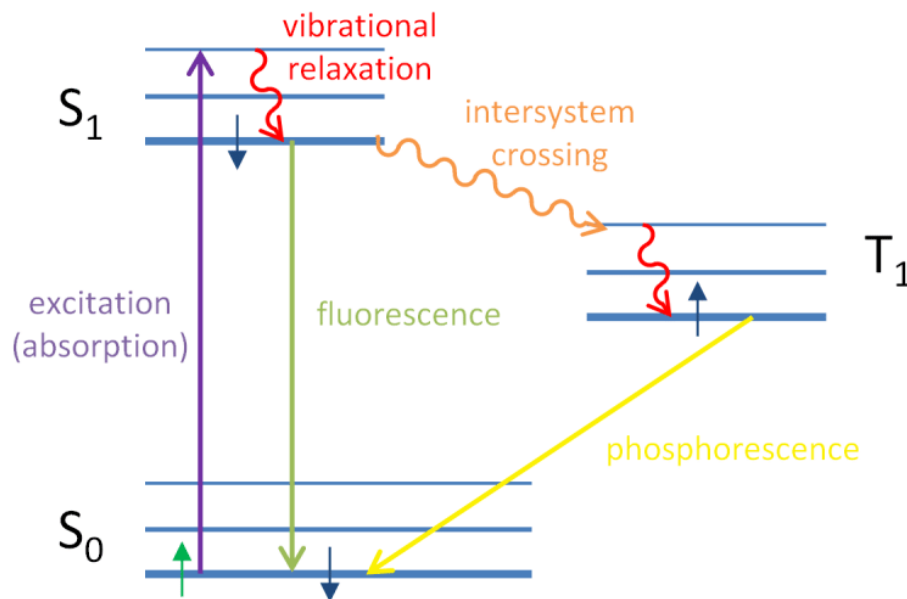
**Figura 5** – Diagrama das duas possibilidades para uma transição eletrônica em um estado excitado. No caso de se manter o spin, diz-se um estado singlete. Para inversão de spin, diz-se de um estado tripleto. Estado fundamental é chamado de singlete.



Fonte: Adaptado de Souza, 2014.

A energia envolvida nas transições em estado singlete é maior que a das transições de estado tripleto, uma vez que há gasto energético na inversão do spin dos elétrons excitados, de acordo com o diagrama de Jablonski (figura 6). Por consequência, temos uma emissão mais energética: a fluorescência (SOUZA, 2008).

**Figura 6** – Diagrama de Jablonski, indicando os estados energéticos envolvidos nas transições eletrônicas.



Fonte: Adaptado de Eck, 2013.

### 2.3 FLUORESCÊNCIA

Além de ser o fenômeno mais energético de luminescência, a fluorescência ainda apresenta a vantagem de não requerer meios que aumentem a taxa de sucesso de transições eletrônicas com diferentes multiplicidades, isto é: de diferentes spins, como a fosforescência – uma vez que moléculas que estejam excitadas em um estado tripleto têm chances maiores de voltarem ao estado fundamental por processos não-radiativos. Essas condições fizeram com que a fluorescência fosse amplamente explorada e comum em análises químicas (SOUZA, 2008), juntamente com o fato de se tratar de uma técnica linear, não destrutiva à amostra e altamente sensível às suas variações (RODRIGUES, 2007).

O exemplo mais comum de aplicação da fluorescência são as lâmpadas fluorescentes de tubo. Nelas, a corrente elétrica energiza átomos de mercúrio presentes em seu interior. Esses decaem emitindo luz, principalmente, no espectro UV e parcialmente no visível. As paredes do tubo são revestidas com um material fluorescente chamado Cristal de Fósforo, responsável por converter essa emissão UV em visível (DONOSO, 20--?.).



### 2.3.1 Decaimentos Não-Radioativos

A luminescência, como já discutida, é a dissipação da energia absorvida pela molécula através da emissão de radiação luminosa. Esse é o processo radioativo para voltar ao estado fundamental (RODRIGUES, 2007).

Em contraponto, há os chamados decaimentos não-radioativos, os quais não liberarão a energia adquirida na forma de radiação. Nesse caso, a molécula irá perder energia para o meio em que se encontrar por 2 formas possíveis: sendo a primeira delas o relaxamento vibracional, que consiste em colisões com as moléculas do solvente ao redor e a segunda, a conversão interna, onde dois níveis eletrônicos se sobrepõem (RODRIGUES, 2007).

### 2.3.2 Interferências

Alguns fatores podem interferir ou favorecer a intensidade de fluorescência (ou rendimento quântico) de uma molécula – os chamados fluoróforos. São eles:

1) A estrutura da molécula. Quanto menor sua possibilidade de movimentação e maior sua rigidez, menores são as chances do decaimento ocorrer por conversão interna, uma vez que será mais difícil para os orbitais se sobreporem (RODRIGUES, 2007). Um exemplo para esse caso são as estruturas da Fluoresceína, uma das moléculas fluorescentes mais conhecidas, e a fenolftaleína, conhecido indicador de pH completamente não fluorescente (Figura 7). Suas estruturas moleculares são similares, diferindo apenas por uma ligação éter entre os dois radicais fenólicos, suficiente para limitar a movimentação e rotação da molécula de fluoresceína;

2) A frequência da radiação. Radiações de comprimentos de onda muito pequenos, como radiações ultravioleta abaixo de 250 nm, serão tão energéticas que, ao invés de serem absorvidas e re-emitidas pela molécula, serão destrutivas e poderão dissociá-la (RODRIGUES, 2007);

3) A temperatura do meio. Essa aumentará a agitação das moléculas, aumentando as chances da energia se dissipar por colisões entre as moléculas ou sobreposição de níveis orbitais, ambos processos não-radioativos (RODRIGUES, 2007);

4) O pH do meio. Como será discutido mais adiante, o pH do fluoróforo impactará diretamente em sua capacidade fluorescente devido às mudanças da ionização, acrescentando ou retirando elétrons livres (JÚNIOR, 20--?);

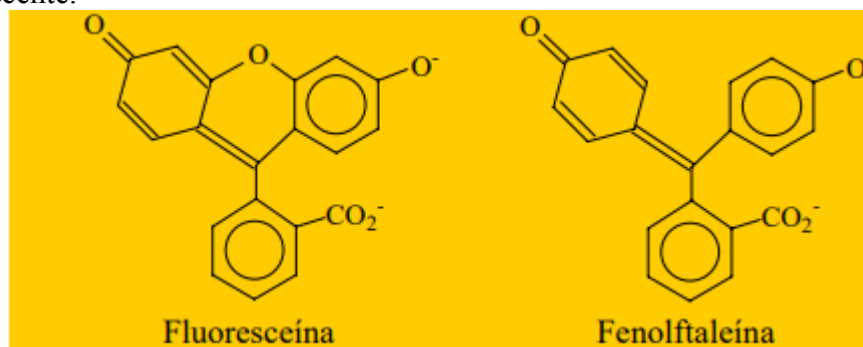
5) A concentração de oxigênio dissolvido. Sua presença é capaz de diminuir ou até mesmo cessar a fluorescência através do fenômeno *quenching*, que é a desativação do estado excitado. As moléculas de oxigênio são capazes de retornar o fluoróforo excitado ao estado

fundamental através de uma transferência de carga onde o oxigênio, então, passará a um estado excitado (SOUZA, 2008);

6) Comprimento de onda da radiação absorvida. Espécies fluorescentes possuem, assim como um comprimento de onda de emissão, um comprimento de onda ideal no qual a absorção e emissão radioativa serão máximas. Desta forma, quanto mais próxima desse comprimento ideal, maior será a fluorescência emitida (JÚNIOR, 20--?);

7) A umidade e o solvente. A umidade no meio aumenta a liberdade das moléculas, levando ao aumento das colisões e fazendo com que a energia seja dissipada por um mecanismo não-radioativo: o relaxamento vibracional (SOUZA, 2008). Por isso, é comum que soluções líquidas não apresentem capacidade fluorescente à temperatura ambiente (LUIZ, 2009). Solventes mais polares levam à uma diminuição mais acentuada da excitação e consequente energia da molécula (REZENDE, 2016).

**Figura 7** – Estruturas moleculares das moléculas de Fluoresceína e Fenolftaleína, evidenciando o impacto da rigidez da molécula na sua capacidade fluorescente. A fluoresceína, mais rígida, é altamente fluorescente, enquanto a fenolftaleína, com maior liberdade, é completamente não fluorescente.



Fonte: Adaptado de Júnior, 2020.

É comum que a energia emitida pela fluorescência seja menor que a absorvida, pois parte dela é dissipada sob a forma de relaxamento vibracional – parcela a qual pode ser maximizada ou minimizada de acordo com os fatores acima. Desta forma, a emissão costuma ter comprimentos de onda maiores que de absorção. Em raros casos, porém, ocorre a chamada fluorescência ressonante, onde os espectros se sobrepõe (RODRIGUES, 2007).

### 2.3.3 Fluoróforos

Fluoróforos são os compostos capazes de emitir luz, e podem pertencer à uma de duas classes: a dos intrínsecos, isto é, amostras que emitem luz naturalmente; ou a dos extrínsecos, aqueles utilizados como sondas, e que são adicionados à uma amostra não-fluorescente (LUIZ,

2009). O primeiro fluoróforo a ser estudado foi a quinina, substância extraída da casca de árvores do gênero *Cinchona*, sob a forma de sulfato de quinina, por John Herschel. Mas foi George Gabriel Stokes quem, estudando intensamente a solução de quinina, batizou o fenômeno de “fluorescência” (REZENDE, 2016). A fluorescência trata-se de uma propriedade incomum entre às moléculas, e, por isso, é dada tamanha importância à utilização dos fluoróforos nas técnicas analíticas (REZENDE, 2016).

As propriedades mais importantes de um fluoróforo são as:

- 1) Rendimento Quântico,  $\Phi$ , que mensura a eficiência de emissão da molécula, definida pela equação (1), através da razão entre a quantidade de fótons emitidos e dos absorvidos; (LUIZ, 2009)

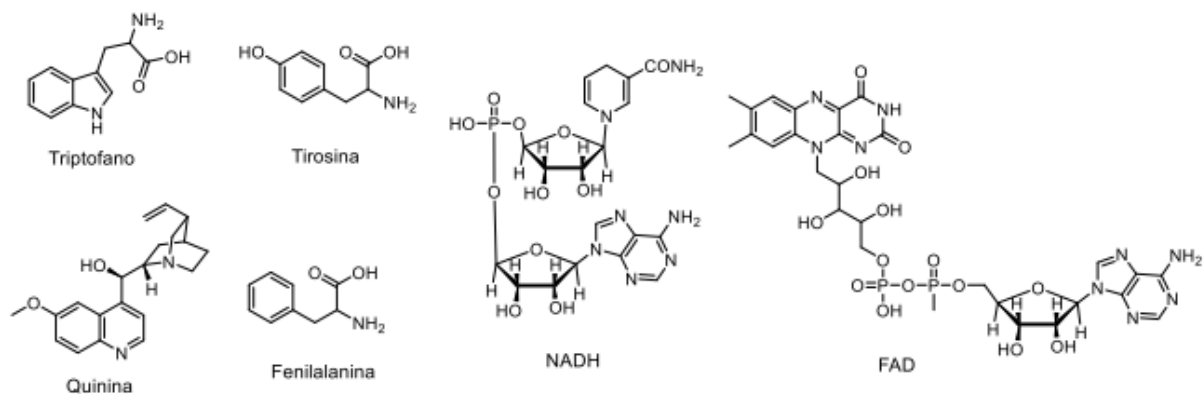
$$\frac{n^{\circ} \text{ de moléculas reagidas ou formadas}}{n^{\circ} \text{ de fótons absorvidos}} \quad (1)$$

- 2) Tempo de fluorescência (LUIZ, 2009).
- 3) Desvio de Stokes, que é a diferença entre os comprimentos de onda de máximas absorção e emissão (REZENDE, 2016).

O rendimento quântico pode variar dentro do intervalo de  $0 \leq \Phi \leq 1$ , sendo a unidade o valor ideal de máxima eficiência (LUIZ, 2009). Juntamente com o tempo de fluorescência, depende do meio em que o fluoróforo está inserido (REZENDE, 2016).

Fluoróforos orgânicos costumam ocorrer entre aqueles que apresentam estruturas aromáticas (Figura 8). Nas proteínas, são representados pelos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina (LUIZ, 2009). Além das vitaminas A (retinol), ácido fólico (B9), coenzimas NADH e FAD e pigmentos como melanina e clorofila, entre outros (REZENDE, 2016).

**Figura 8** – Exemplos de fluoróforos orgânicos com estruturas aromáticas



Fonte: Adaptado de Rezende, 2016.

Já os compostos inorgânicos são representados por aqueles que contém átomos do grupo dos lantanídeos (LUIZ, 2009), principalmente o európio ( $\text{Eu}^{3+}$ ) e térbio ( $\text{Tb}^{3+}$ ), que contém elétrons livres nos orbitais *4f*. Esse tipo de molécula vem sendo aplicada para análises biológicas por possuir o diferencial de tempos de fluorescência consideravelmente maiores que os demais, evitando a interferência do fenômeno de autofluorescência – como para proteínas, por exemplo (REZENDE, 2016). O problema associado às chamadas terras raras se refere à sua mineração, que é dificultada devido à baixa concentração desses elementos nos minerais, gerando impactos e levantando discussões ambientais (SENADO FEDERAL, 2013).

Proteínas fluorescentes, porém, já são difundidas na área da biologia como sondas. Tiveram o caminho aberto pelo isolamento da proteína verde fluorescente (GFP; *green fluorescent protein*) a partir da espécie *Aequorea victoria* (cnidário, água vivas). Após os estudos na área de genômica funcional e os ensaios das aplicações biotecnológicas, permitiu um novo tipo de aplicação: a de gene repórter em organismos recombinantes pela sua clonagem. Entretanto, sua utilização para outros fins é prejudicada por sua sensibilidade térmica (REZENDE, 2016).

Durante muitos anos, as sondas fluorescentes foram estudadas apenas a partir de pequenas moléculas e, por isso, são a principal classe de sondas até hoje. As derivadas da xantona são as mais conhecidas, como a fluoresceína – vendida sob a forma de isotiocianato, o FITC, é a sonda mais popular para marcação de biocompostos (REZENDE, 2016). Apesar de sua fluorescência, alguns compostos orgânicos podem ser graves poluentes ao meio ambiente, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (REZENDE, 2016).

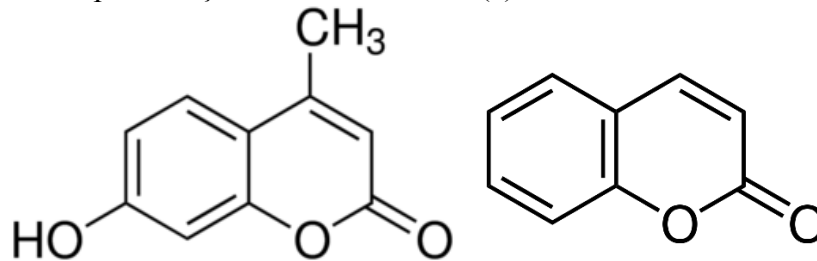
A classe das cumarinas é caracterizada por moléculas derivadas da benzopirona: um anel benzênico ligado à uma pirona. Possuem fluorescência intensa em tom azul. São moléculas orgânicas, mas apresentam mecanismos sintéticos muito bem definidos. Podem ser obtidas através de fermentações utilizando substratos pouco fluorescentes, que liberarão o fluoróforo umbeliferona ao final. Umbeliferona essa que, juntamente com outras 7-aminocumarinas, são as representantes mais conhecidas (REZENDE, 2016).

## 2.4 4-METILUMBELIFERONA

A 4-metilumbeliferona (Figura 9a), também conhecida por hymecromone ou 4-MU, – e nomenclatura IUPAC 7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one – é uma substância natural pertencente à classe de compostos orgânicos chamados de 7-hidroxycumarinas, que são

cumarinas (Figura 9b) com um ou mais grupos hidroxila ligados na posição C7 (YMDB, 2020). Ambas as estruturas podem ser comparadas na figura 8.

**Figura 9** – Representação das moléculas de (a) 4-Metilumbeliferona e (b) Cumarina.



#### 2.4.1 Cumarinas

As cumarinas compõem uma classe de moléculas naturais orgânicas muito importantes encontradas em plantas – principalmente angiospermas – e decorrentes de seu metabolismo secundário, isto é, não são diretamente associadas a seu crescimento, mas a mecanismos de defesa contra predadores e microorganismos, podendo ser encontradas em fungos e bactérias (GARRETT, 20--?).

São compostos fenólicos pertencentes à família das benzopironas, substâncias resultantes da fusão do benzeno com a alfa-pirona. Ao todo, mais de 1.300 cumarinas diferentes já foram catalogadas (BOR et al., 2016). Comumente apresentam uma substituição oxigenada na posição 7, livre em uma hidroxila ou conjugada com radicais metilados, sulfatados ou ainda carboidratos (MATOS et al., 2015), mas a mais simples é a Cumarina, (1-2-benzopirona), um sólido cristalino branco em temperatura ambiente (Figura 9), muito conhecida por seu característico aroma de baunilha (POUMALE et al., 2013).

Foi isolada pela primeira vez em 1820 das sementes de *D. odorata* (Figura 10), mais conhecida como Cumarú, árvore da qual derivou seu nome, com altas concentrações em torno de 3% em peso seco. Está presente também na *Cinnamomum aromaticum*, árvore da canela, principal fonte da cumarina na alimentação. O consumo humano raramente apresenta eventos adversos, entretanto, é reconhecida como tóxica ao fígado de roedores em altas doses, com uma dose letal oral de 680 mg/kg (BOVELL-BENJAMIN; ROBERTS, 2016).

**Figura 10** – Sementes de *D. odorata*



Fonte: Retirado de Seba, 2014.

Devido à hepatotoxicidade e suspeita de propriedades carcinogênicas em animais, foi banida pelo FDA em 1954 como aditivo em alimentos. Entretanto, em 2004, estudos revelaram possuir um mecanismo não-genotóxico, fazendo com que entidades regulamentadoras voltassem atrás e liberassem seu uso (BOVELL-BENJAMIN; ROBERTS, 2016). Em humanos, seria necessário o consumo de, no mínimo, 30 sementes de cumaru – algo próximo de 250 porções – para atingir o nível reportado para uma possível intoxicação por consumo excessivo; montante equivalente ao descrito para especiarias consumidas diariamente, como a noz-moscada (BOVELL-BENJAMIN; ROBERTS, 2016).

Em humanos, o metabolismo da cumarina ocorre através da hidroxilação no carbono 7, gerando as 7-hidroxicumarinas (ou umbeliferonas). As 7-hidroxicumarinas, seus conjugados sulfatados e glicuronídeos – substâncias obtidas pela ligação entre a umbeliferona e um ácido glicurônico por uma ligação glicosídica – são atóxicas, e podem constituir até 97% dos metabólitos urinários, a depender da dose consumida (BOVELL-BENJAMIN; ROBERTS, 2016).

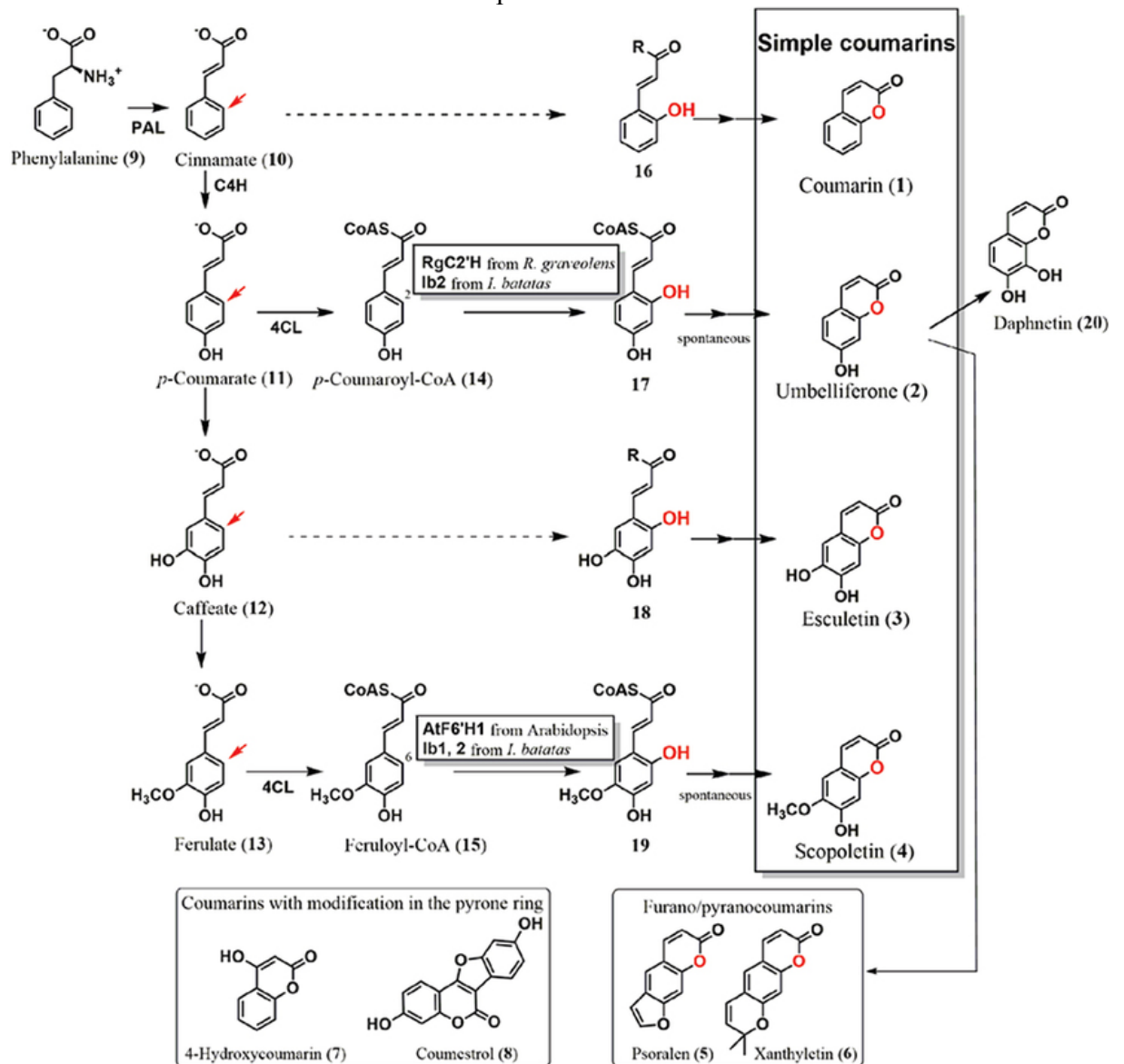
Já sua biossíntese (anabolismo) nas plantas (Figura 11), tem a fenilalanina como precursora na via dos fenilpropanóides, responsável pela síntese de diversos produtos secundários, como a lignina (MARCHIOSI, 2008). As principais etapas consistem na obtenção do ácido cinâmico (ou cinamato) a partir da fenilalanina, orto- ou para- hidroxilações, isomerias cis-trans e adesão de outros anéis, como lactonas, furanos e piranos (MAZIMBA, 2017).

A enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) retira uma molécula de amônia da fenilalanina (9), gerando o ácido cinâmico, ou cinamato (10) em sua forma ionizada, que será

transformado em ácido para-cumárico (11) pela ação da C4H, uma hidroxilase, que adicionará uma hidroxila na posição para- do anel benzênico. Após isso, o para-cumarato é orto-hidroxilado e gera o 2,4-dihidroxicinamato (17) que espontaneamente se degrada em umbeliferona (2). Pode ainda seguir uma via alternativa de síntese de cumarinas secundárias pela hidroxilação na posição orto-, formando o ácido caféico (12) que sofrerá outras hidroxilações em C6 e metoxilação (MAZIMBA, 2017). Após a síntese, ainda, as moléculas mais simples, como a umbeliferona, podem sofrer várias modificações, gerando as mais diversas e complexas cumarinas (SHIMIZU, 2014). Os derivados da cumarina podem ser classificados em cumarinas simples, dímeros, furanocumarinas e piranocumarinas e todos se originam da mesma via metabólica. Suas diferenças e exemplos estão descritos na tabela 1. (POUMALE et al., 2013).

Os genes envolvidos na sequência de reações 4CL, RgC2'H (sequenciado a partir de folhas de arruda), Ib2 e Ib1 (sequenciado a partir da batata-doce) e AtF6'H1 (sequenciado a partir de *Arabidopsis thaliana*) codificam enzimas hidroxilases da classe das dioxigenases 2-oxoglutarato dependentes, responsáveis pela conversão e diferenciação das cumarinas. Desta forma, do ponto de vista biotecnológico e frente à relevância das mais diversas aplicações discutidas neste trabalho, a engenharia genética para a expressão de tais genes em organismos mais simples surge como uma opção à produção desses compostos com rendimentos maiores que os naturalmente encontrados hoje (SHIMIZU, 2014).

Figura 11 – Via de biossíntese de cumarinas em plantas

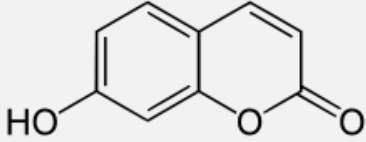
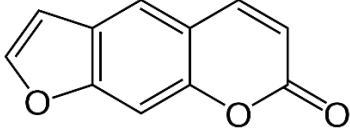
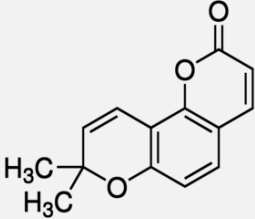
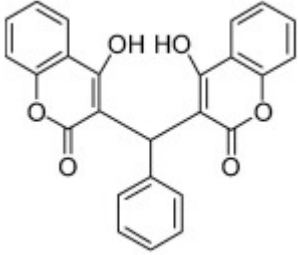


Fonte: Adaptado de Shimizu, 2014.

Do ponto de vista taxonômico, de acordo com um estudo de Ribeiro e Kaplan (2002), uma maior diversidade e complexidade das cumarinas presentes indicam um nível mais alto de evolução da planta (MATOS et al., 2015).



**Tabela 1** – Classificação para derivados da Cumarina de acordo com sua estrutura química.

Classificação	Característica	Exemplo
<b>Cumarinas simples</b>	Cumarinas hidroxiladas, alquiladas ou alcoxiladas (radical derivado de um álcool).	 Umbeliferona (7-hidroxicumarina)
<b>Furanocumarinas</b>	Um anel furânico é ligado ao anel benzênico.	 Psoraleno
<b>Piranocumarinas</b>	Um anel pirônico é ligado ao anel benzênico.	 Seselina
<b>Dímeros</b>	Dímeros ou trímeros de cumarinas, ligados ao anel benzênico ou pirônico.	 3,3'- benzylidene-bis-(4-hydroxycoumarin)

Fonte: Adaptado de Mahabaleshwaraiyah, 2014.

A grande diversidade estrutural das cumarinas é o que as permitem ter uma gama de aplicações, podendo destacar-se as propriedades farmacológicas e terapêuticas, bioquímicas e alimentares (MATOS et al., 2015). As cumarinas têm importância nutricional presente em grande parte da dieta humana diária. Dentre tantas, pode-se destacar a família *Apiaceae*, representada pela cenoura, aipo, salsa, coentro, cominho, erva-doce e anis. Encontram-se também em frutas e vegetais, principalmente os cítricos; os azeites, cafés, vinhos e chás preto e verde são uma importante fonte dessas substâncias (MATOS et al., 2015). Os óleos essenciais

ricos em cumarinas também são utilizados como aromatizantes, como por exemplo os óleos de canela e lavanda (MATOS et al., 2015).

A principal aplicação farmacológica das cumarinas é como antiedemas e anticoagulantes (POUMALE et al., 2013), mas também têm efeito anti-inflamatório e são vasodilatadoras, além de algumas terem efeitos antivirais e antimicrobicos, como contra a candidíase vaginal, uma vez que age inibindo a *C. albicans* (BOR et al., 2016). Vêm sendo muito estudadas como drogas terapêuticas medicinais com maiores atividade, biodisponibilidade, espectro de ação e menores toxicidade, resistência pelo organismo e efeitos colaterais, inclusive para tratamentos de câncer e doenças neurodegenerativas, pois provou-se serem agentes de inibição enzimática, através de estudos recentes que salientam a importância e tendência do estudo químico e biológico desta classe de moléculas (MATOS et al., 2015).

Devido à sua estrutura cíclica e ressonância, os compostos cumarínicos são ricos em elétrons livres e possuem bom desempenho no transporte de cargas elétricas. Além das propriedades farmacológicas, então, as cumarinas são conhecidas por serem excelentes fluoróforos e se observa o rápido crescimento das aplicações bioquímicas de seus derivados como receptores iônicos e agentes de coloração biológica para monitorar atividade enzimática e reações biológicas complexas. Além disso, como pretende-se explorar neste trabalho (MATOS et al., 2015), os fluoróforos, de acordo com Grimm, Heckman e Lavis (2013), comumente são cumarinas com substituições de heteroátomos na posição 7.

#### 2.4.2 Umbeliferona

A umbeliferona, como é conhecida a molécula 7-hidroxycumarina, teve seu nome derivado da família *Umbelliferae*, por sua vez nomeada devido à suas inflorescências em formato similar ao de um guarda-chuva (*umbrella*, em inglês) pelas flores da espécie *Anethum graveolens* (Figura 12), o Dill. Hoje aquela é chamada de *Apiaceae*, na qual a umbeliferona tem sua principal fonte e apresenta mais de 3.000 espécies e representantes de grande importância econômica, como a cenoura e a erva-doce (MAZIMBA, 2017).

A umbeliferona (UMB) é um ativo farmacológico, com propriedades antioxidantes e sua estrutura permite absorver fortemente luz ultravioleta e, por isso, é aplicado a formulações de protetores solares (MAZIMBA, 2017). Como as cumarinas comumente apresentam uma substituição oxigenada na posição 7, a UMB é dada como precursora de moléculas mais complexas (SHIMIZU, 2014).

De acordo com alguns estudos, já foram observadas ações anti-inflamatória, broncodilatadora, analgésica, antitumoral e antinociceptiva, que é a diminuição da capacidade do organismo em reconhecer e perceber a dor (YU; HU; ZHANG, 2015). Das atividades antitumorais, reportaram-se efeitos satisfatórios contra carcinomas mamários induzidos e sarcoma 180 – uma linhagem de células cancerosas – em ratos e células de câncer de laringe e fígado humanos em estudos *in vitro* (YU; HU; ZHANG, 2015).

**Figura 12** – Inflorescência do Dill (*Anethum graveolens*)



Fonte: Adaptado de Idiyatullin, 2018.

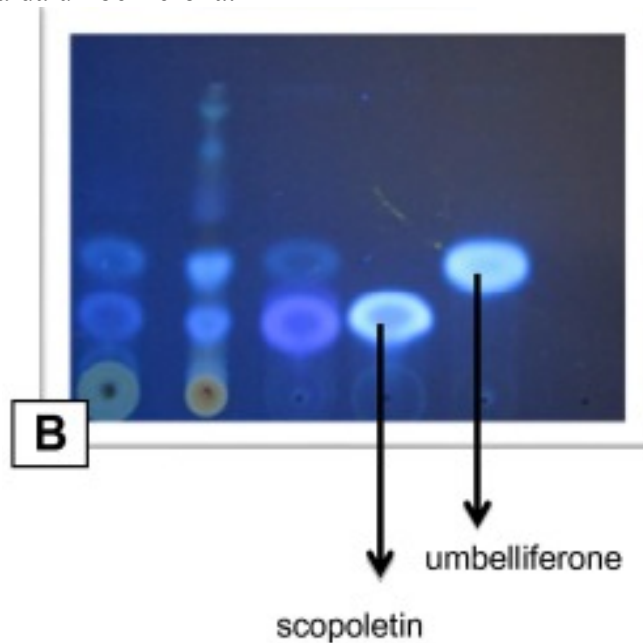
Quando pura, do ponto de vista físico-químico, forma cristais branco-amarelados com baixa solubilidade em água quente e é capaz de absorver luz UV em vários comprimentos de onda (YU; HU; ZHANG, 2015), com picos de absorbância em 339, 294 e 242 nm em solução de metanol, com valores logarítmicos da absorbância de 0,5, 0,36 e 0,77, respectivamente (MAZIMBA, 2017). Em solução com variação de pH, tem absorbância máxima a 325 nm em meio ácido e a 365 nm em meio alcalino (MAZIMBA, 2017),

Sua análise por infravermelho pode ser reconhecida pelas bandas bem definidas pelas ligações químicas: fenólica (hidroxila ligada ao anel benzênico) a  $3165\text{ cm}^{-1}$ , lactônica (ester cíclico) a  $1715$  a  $1690\text{ cm}^{-1}$ , dupla carbônica a  $1575$  e  $1109\text{ cm}^{-1}$  e carbono-hidrogênio, a  $835\text{ cm}^{-1}$  (MAZIMBA, 2017).

Já sua fluorescência característica, em tom de azul, é emitida a 460 nm, com excitação à 330 e 370 nm, a depender do pH ácido ou alcalino, respectivamente. Como pode-se observar na figura 13, com fluorescência superior à outra cumarina, a escopoletina, em solução de

metanol (KASSIM et al., 2013). Porém, ao adicionar-se um radical metil no carbono 4, temos uma molécula de maior estabilidade. Surge, então, a 4-metilumbeliferona (4-MU) (GRIM, HECKMAN E LAVIS, 2013).

**Figura 13** – Exposição de papel de cromatografia de camada delgada em solução de metanol, com pH alcalino, à luz UV com comprimento de onda de 365 nm evidenciando a emissão máxima da umbeliferona.



Fonte: Adaptado de Kassim et al., 2013.

### 2.4.3 Fluorescência

A 4-metil-7-hidroxycumarina surge como uma evolução da molécula de umbeliferona, com maior estabilidade (ZHI et al., 2013). Assim como as cumarinas, possui propriedades e aplicações farmacológicas, como antiviral, antifúngica, antioxidante e anticâncer (ZHI et al., 2013). Sua fluorescência já é observada há décadas, com estudos publicados desde 1994 visando caracterizar suas propriedades. Hoje já se sabe que trata-se de uma molécula com intensidade de fluorescência sensível a mudanças de pH e constantemente são exploradas para novas aplicações, inclusive como sondas bioquímicas (ZHI et al., 2013). Possui alto poder fluorescente, no qual destacam-se suas formas moleculares neutra e aniônica (ZHI et al., 2013). Sua forma catiônica não é a mais recomendada uma vez que possui pKa de 7,8: trata-se de um ácido fraco. Desta forma, em pH mais ácido, torna-se altamente protonado e menos fluorescente (GRIMM, HECKMAN e LAVIS, 2013).

Zhi et al. (2013) calcularam o rendimento quântico da 4-MU pela equação 2, usando Bissulfato de Quinina como padrão de referência, com rendimento quântico de 0,55 a 313nm.

$$Y_u = Y_r * \frac{F_u * A_r}{F_r * A_u} \quad (2)$$

Onde:

$Y_u$  é o rendimento quântico desconhecido;

$Y_r$  é o rendimento quântico da referência;

$F_u$  é a intensidade de fluorescência da solução desconhecida;

$F_r$  é a intensidade de fluorescência da solução de referência;

$A_u$  é a absorbância da solução desconhecida e

$A_r$  é a absorbância da solução de referência.

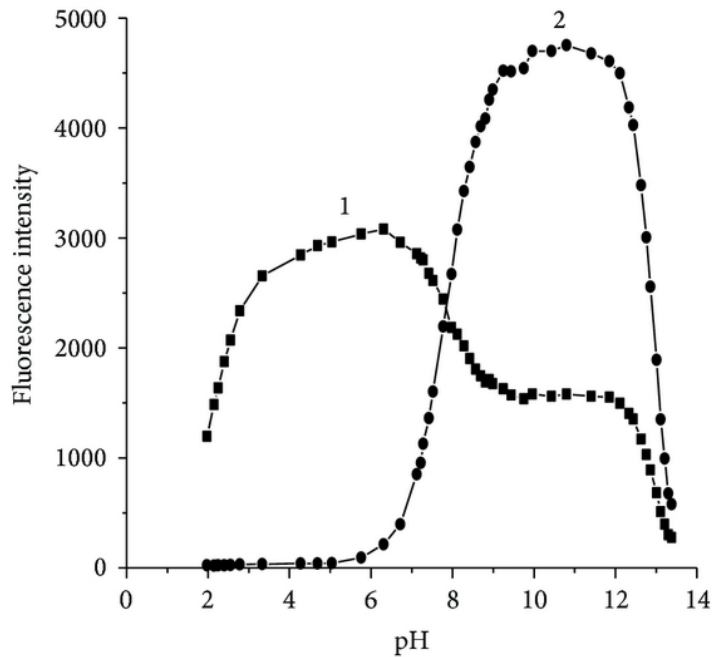
Desta forma, obteve-se que a molécula de 4-metilumbeliferona possui rendimento quântico de 0,74 em pH próximo da neutralidade (5,98) e 0,95 em pH alcalino (9,75), comprovando ser um ótimo fluoróforo (ZHI et al., 2013). Além disso, os resultados mostraram a influência do pH e os espectros de fluorescência da molécula. Os pesquisadores ainda discutem sobre os comprimentos de onda de máxima excitação, que se mantiveram em 360 nm para pH acima de 7 e 320 nm em meio ácido e o de emissão, que, apesar dos efeitos de pH na intensidade, permaneceram constantes em 445 nm (ZHI et al., 2013).

Em condições ácidas, a intensidade de fluorescência, já baixa, tem decréscimo acentuado diretamente proporcional ao pH e o comprimento de onda de excitação apresenta um leve desvio com pico em 320 nm, enquanto que, para a faixa imediatamente acima de 7, a emissão de fluorescência a 445 nm melhorou conforme o aumento de pH (ZHI et al., 2013).

Em ambos os casos, representada pelo extremo superior da faixa de pH, tem-se dois picos de acordo com o comprimento de onda. O primeiro, referente ao  $\lambda$  de excitação com valor de máximo em 360 nm – e 320 nm para meios ácidos – e o segundo, ao  $\lambda$  de emissão, com máximo em 445 nm. Nota-se ainda que, em valores medianos de pH, surge uma isofluorescência a 330 nm (ZHI et al., 2013).

Finalmente, tem-se sumarizada a relação entre a intensidade de fluorescência I e o pH (Figura 14). Como, neste caso, a variável fixa são os comprimentos de onda de emissão e excitação, tem-se a curva (1), onde  $\lambda_{ex}$  é de 320 nm, a fim de cobrir o pico na acidez, e (2), onde a leitura é feita sob 360 nm, de acordo com o resto da faixa de pH, como é possível observar na ascensão e depressão das curvas. Nela, por fim, é fácil perceber seu alto poder de fluorescência (ZHI et al., 2013).

**Figura 14** – Intensidade de fluorescência versus pH. A curva 1 sob um  $\lambda_{ex}$  de 320nm e a curva 2 sob 360nm.



Fonte: Adaptado de Zhi et al., 2013

Seu sal, sob a forma de fenolato, é altamente fluorescente, com forte absorção a 360nm e emissão de fluorescência azulada característica a 450nm com rendimento quântico de 0,63 (GRIMM, HECKMAN e LAVIS, 2013).

#### 2.4.4 Aplicações Microbiológicas da 4-metilumbeliferona

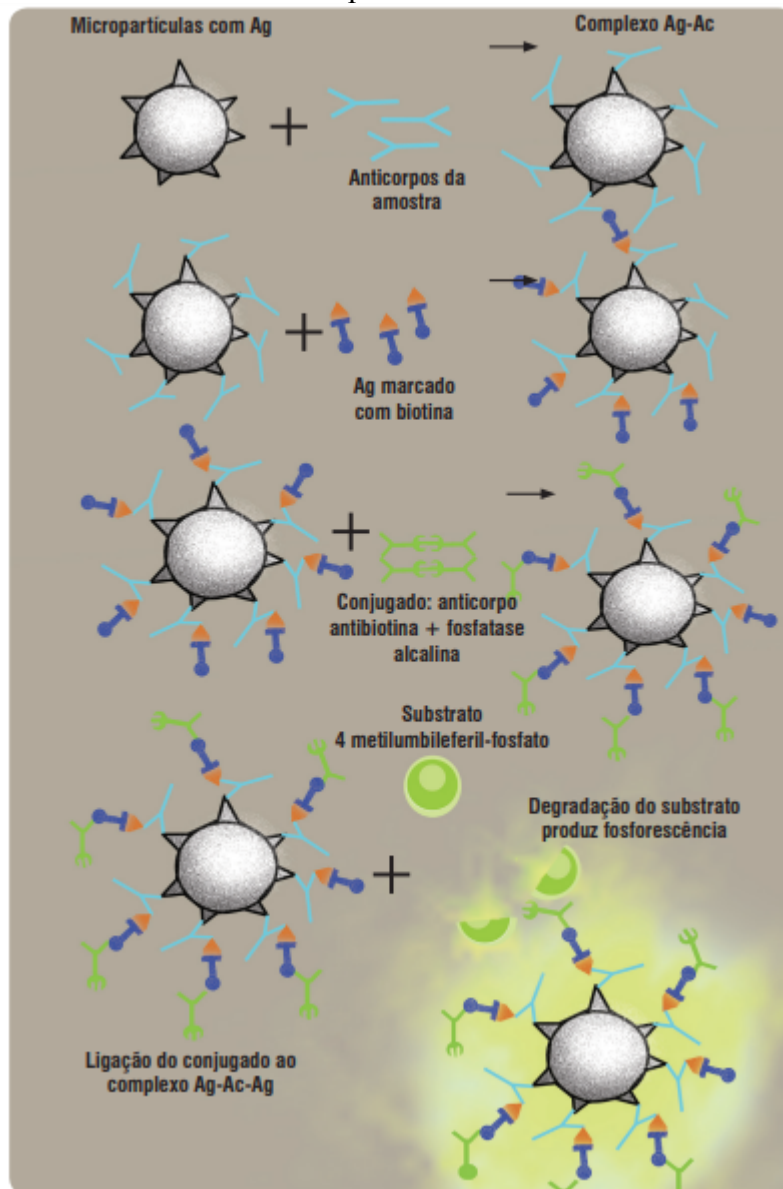
Devido à sua fluorescência já discutida acima, a 4-metilumbeliferona é comumente usada como indicador em ensaios enzimáticos, como o teste rápido de coliformes fecais (CEBALLOS, DINIZ, 2017) e até mesmo diagnósticos laboratoriais de infecção por HIV, como disponibilizado na plataforma TELELAB, do Ministério da Saúde, que disponibiliza cursos voltados aos profissionais da saúde e certificados pela Universidade Federal de Santa Catarina (2020).

O ensaio em questão é denominado de Ensaio Imunoenzimático de Micropartículas, (MEIA, do inglês *Microparticle Enzyme Immunoassay*). Seu mecanismo, conforme descrito pelo curso de Diagnóstico de HIV do TELELAB (2020) (Figura 15), é baseado na interação entre anticorpos (Ac) antibiotina conjugados a enzimas fosfatase alcalinas e um substrato, o 4-metilumbeliferil-fosfato que, quando adicionado, é degradado pela fosfatase alcalina, liberando a molécula de 4-MU.

A matriz sólida – normalmente micropartículas de látex recobertas com antígenos (Ag) do HIV, que irão reter os anticorpos da amostra – recebe um complexo de antígenos recombinantes de HIV, peptídeos sintéticos do envelope do HIV e biotina, que, em presença dos anticorpos anti-HIV 1 e 2, forma um novo tipo de complexo antígeno-anticorpo-antígeno (TELELAB, 2020).

O conjugado de Ac antibiotina + enzimas, quando é então adicionado, liga-se ao complexo anterior, prendendo-se ao sistema. Desta forma, o diagnóstico, então, é feito a partir da intensidade da fluorescência lida (TELELAB, 2020).

**Figura 15** – Esquema do passo-a-passo das reações envolvidas no Ensaio Imunoenzimático de Micropartículas



Fonte: Adaptado de Telelab, 2020

Das aplicações farmacológicas, pode-se destacar a de suplemento alimentar voltado para melhora da saúde hepática, muito consumido na Europa (YATES et al., 2015). Muito tem-se estudado sobre seu conhecido efeito inibitório na síntese do ácido hialurônico (HA), polímero derivado do ácido glicurônico e a N-acetilglucosamina, um dos componentes do peptídeoglicano. Além de explorado pelo mercado cosmético atualmente por suas propriedades hidratantes, é uma biomolécula responsável por promover progressão e crescimento de tumores (YATES et al., 2015).

A família do ácido hialurônico – que inclui as enzimas hialurônico sintases (HAS) e HA receptores – pode ser utilizada para diagnóstico de diversos tipos de câncer, uma vez que sua expressão é elevada nesses tecidos, como no câncer de próstata. Estudos pré-clínicos já mostraram que essas enzimas amplificam o crescimento, metástase e angiogênese (surgimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes) dos tumores. Em contrapartida, a indisponibilidade dessas moléculas interrompe as atividades vitais das células tumorais (YATES et al., 2015).

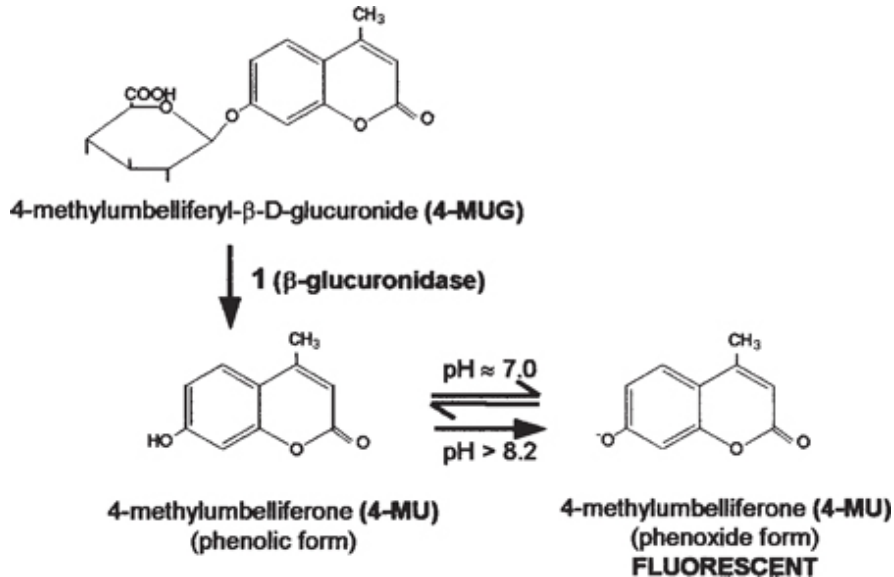
O ácido glicurônico, precursor do HA, é incorporado à nova molécula pela ação das UDP-glicuronil transferases. Entretanto, em presença da 4-MU, o volume intracelular de ácido glicurônico é esgotado e transferido para a estrutura da cumarina, ocorrendo, assim, o bloqueio da síntese de ácido hialurônico. Além disso, células tratadas com 4-MU minimizam a expressão das enzimas envolvidas no processo. A concentração indutora de metade do efeito máximo na inibição da síntese de HA,  $EC_{50}$ , foi calculada em 0,4 mM ou 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (YATES et al., 2015).

#### **2.4.5 Métodos de Produção da 4-metilumbeliferona**

A forma microbiológica de obtenção da molécula de 4-metilumbeliferona é através da fermentação por *E. coli* (PEREIRA et al., 1999). Por possuir a enzima  $\beta$ -glucuronidase, responsável pela degradação de carboidratos complexos (como da bilirrubina conjugada à não-conjugada, reação ocorrida no intestino catalisada pela bile) (SILVA, 2011), a bactéria é capaz de clivar a ligação glicosídica do substrato 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoronide (MUG), liberando uma molécula de 4-MU no meio (Figura 16). O sucesso da reação é facilmente observado através da aparição de fluorescência azul-intensa à 360 nm (CEBALLOS, DINIZ, 2017).



**Figura 16** – Reação de clivagem da molécula de 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide pela catálise da enzima  $\beta$ -glucuronidase, liberando 4-metilumbeliferona. Além disso, temos as versões fenólica e de fenolato de acordo com o pH do meio, evidenciando sua maior fluorescência em meios alcalinos.

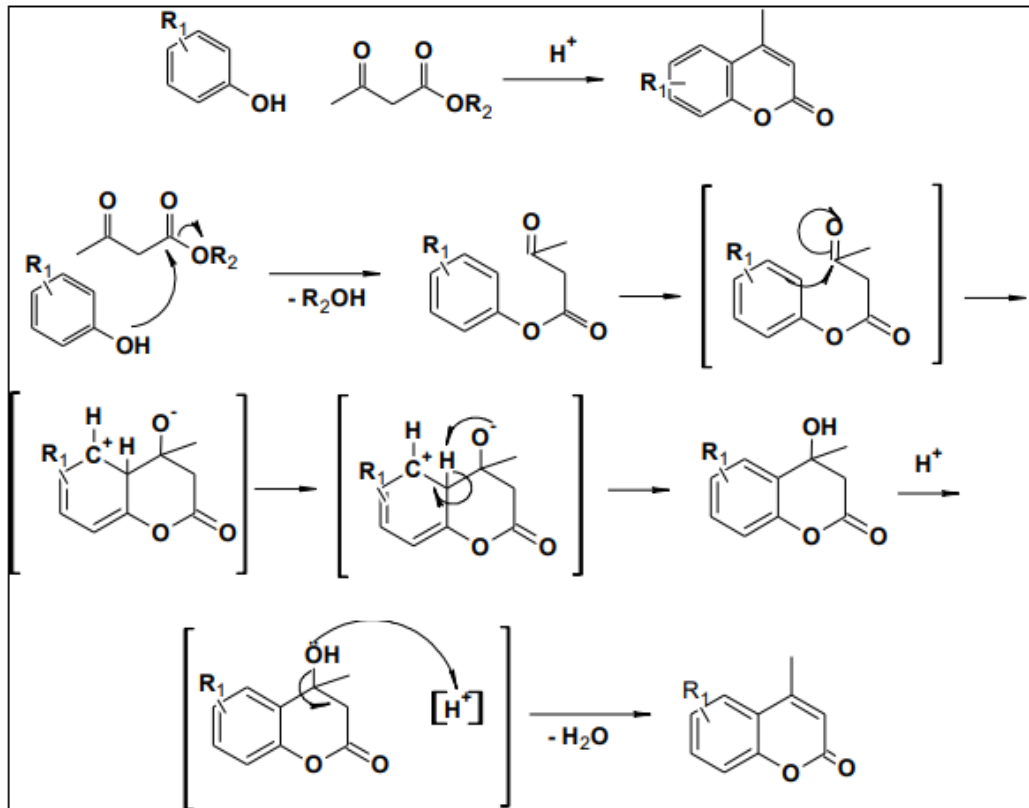


Fonte: Adaptado de Cervera, 2005.

Pela bioquímica, abre-se espaço para o estudo da expressão heteróloga de genes que codificam enzimas chave para a biossíntese de cumarinas como a umbeliferona e escopoletina, que serão esqueleto para as mais diversas moléculas derivadas, como a 4-metilumbeliferona a partir de glicose como substrato (SHIMIZU, 2014).

Além disso, pode ainda ser obtida por rota química, sendo rapidamente sintetizada pela reação entre resorcinol e acetoacetato de etila em meio ácido e sob aquecimento (ISAC-GARCÍA et al., 2016). Trata-se da reação de condensação de Pechmann (Figura 17), utilizada para síntese de cumarinas. Baseia-se na reação entre um composto fenólico e um  $\beta$ -cetoéster (Figura 18); este último, com estrutura onde uma cetona é condensada a um éster na posição  $\beta$  (VIANNA, 2011).

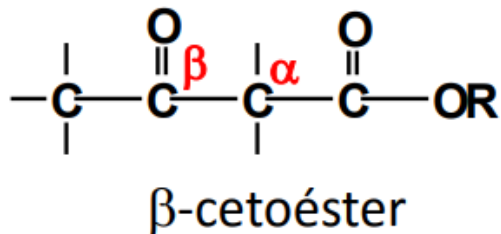
**Figura 17** – Mecanismo proposto para reação de Pechmann para a síntese de 4-metilcumarinas.



Fonte: Adaptado de Vianna, 2011.

Desta forma, para o caso da 4-metilumbeliferona, o radical  $R_1$  mostrado trata-se de uma hidroxila na posição meta do anel aromático, resultando na molécula de resorcinol, e  $R_2$  trata-se de um radical metila para a molécula de acetoacetato de etila (VIANNA, 2011).

**Figura 18** – Estrutura química molecular genérica de um  $\beta$ -cetoéster



Pesquisadores da Indonésia realizaram experimentos nos quais utilizaram 0,6655 g de Resorcinol, 0,76 g de acetoacetato de etila, 10mL de tolueno e 0,6565 g da resina Amberlyst-15 (WAHYUNINGRUM, ZULQARNAEN, SUENDO, 2014), uma resina de troca iônica para HPLC carregada com ácido sulfônico, sensível ao calor e concentrações acima de 10% de tolueno, que funciona como uma excelente fonte de ácido forte e pode ser utilizada como

catalisador (MERCCK, 2020). A mistura, que foi mantida a 150 °C por 45 minutos, obteve rendimento de 90,01% de 7-hidroxi-4-metilcumarina recristalizada (WAHYUNINGRUM, ZULQARNAEN, SUENDO, 2014).

Apesar da necessidade do aquecimento para o sucesso da reação de síntese de cumarinas com substituição no carbono 4 já ser estabelecido, pesquisas mostraram que o uso de radiação de micro-ondas, substituindo o aquecimento convencional, gera ótimos resultados e algumas vantagens frente ao método tradicional, como maiores rendimento, pureza de produto e menor tempo de reação (VIANNA, 2011).

### 3. CONCLUSÃO

Desta forma, como discutido neste trabalho, percebe-se que ainda há espaço para o estudo de novos compostos luminescentes, moléculas de grande relevância para a bioquímica. De origem inorgânica, explora-se os derivados de lantanídeos ou as terras-raras. Essas substâncias, porém, são oriundas de mineração e provocam impactos ambientais enormes mesmo que sejam obtidos em pequenas quantidades.

Em contraponto, os compostos orgânicos, de origem vegetal em sua maioria, não apresentam esse tipo de problema. Representando-os, a classe das Cumarinas, com estruturas fenólicas derivadas do benzeno com a alfa-pirona, tem conquistado espaço nas aplicações biotecnológicas, de sondas fluorescentes à medicação antitumoral.

A molécula de 4-metilumbeliferona, por seus radicais, é mais estável que as outras cumarinas. Sob a forma de sal, ainda, possui alta resistência térmica e não apresenta propriedades irritantes ou tóxicas para a pele. Possui um ótimo rendimento quântico de 0,95 em pHs alcalinos, com o máximo sendo alcançado na unidade, isto é, quando a emissão de fótons é igual à quantidade absorvida, o que comprova e justifica suas aplicações como fluoróforo. Apesar de sofrer influência do pH em sua intensidade de fluorescência e comprimento de onda de máxima absorção, sua emissão não é alterada e se mantém em 445 nm. Industrialmente, pode ser obtida pela reação com *E. coli*, utilizando o substrato 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoronide (MUG) ou ainda pela reação entre resorcinol e acetoacetato de etila através de uma condensação de Pechmann.

Sendo assim, pelas características e propriedades avaliadas, é cabível dizer que a 4-metilumbeliferona é um possível fluoróforo a ser utilizado como marcador luminescente de resíduo de tiros.

Para próximos trabalhos, sugerem-se os estudos práticos da viabilidade de sua aplicação, verificando sua concentração mínima para observação e de sua expressão heteróloga através da biologia sintética (engenharia genética), uma vez conhecidos os genes envolvidos em sua biossíntese.

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROUCA, A. M. **Estudo da Aplicabilidade de Marcadores Luminescentes de Disparos de Armas de Fogo**. 2016. 151f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/22787/1/2016\\_AlineMarcelinoArouca.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/22787/1/2016_AlineMarcelinoArouca.pdf)>. Acesso em: 15 de Maio, 2018.

AROUCA, A.M. et al. Use of Luminescent Gunshot Residues Markers in Forensic Context – Part II: **Forensic Science International**, v. 281, p. 161-170, dez. 2017. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/320887090\\_Use\\_of\\_luminescent\\_gunshot\\_residues\\_markers\\_in\\_forensic\\_context\\_-\\_Part\\_II](https://www.researchgate.net/publication/320887090_Use_of_luminescent_gunshot_residues_markers_in_forensic_context_-_Part_II)>. Acesso em: 12 de Maio, 2018.

BOR, T. et al. Antimicrobials from herbs, spices, and plants. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. (Ed.). **Fruits, Vegetables, and Herbs: Bioactive Foods in Health Promotion**: Academic Press, 2016. Cap. 26. p. 551-578. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029725000263>>. Acesso em: 6 de Janeiro, 2020.

BOVELL-BENJAMIN, A. C.; ROBERTS, J. Naturally Occurring Toxicants: Presence in Selected Commonly Consumed Fruits. In: PRAKASH, V. et al (Ed.). **Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods**: Academic Press, 2016. Cap. 13. p. 247-282. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012800605400013X?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 de Janeiro, 2020.

BRANCO, P. M. **Fluorescência dos Minerais**. 2014. Disponível em: <[http://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/Rede-de-Bibliotecas---Rede-Ametista/Canal-Escola/Fluorescencia-dos-Minerais-1314.html?from\\_info\\_index=11](http://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/Rede-de-Bibliotecas---Rede-Ametista/Canal-Escola/Fluorescencia-dos-Minerais-1314.html?from_info_index=11)>. Acesso em: 27 de Maio, 2018.

CEBALLOS, B. S. O.; DINIZ, C. R. **Técnicas de Microbiologia Sanitária e Ambiental**. Campina Grande: Eduepb – Editora da Universidade Estadual da Paraíba, 2017. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/60417492/tecnicas-de-microbiologia>. Acesso em: 6 de Fevereiro, 2020.

CERVERA, M. **Histochemical and Fluorometric Assays for uidA (GUS) Gene Detection**. In: Peña L. (eds) **Transgenic Plants: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology™, vol 286, 2005. Humana Press. Disponível em: <https://rd.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-827-7:203>. Acesso em 10 de Julho, 2020.

COMPANHIA BRASILEIRA DE CARTUCHOS - CBC. **Munições NTA - Non Toxic Ammunition**. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.cbc.com.br/upload/informativos/23.pdf>>. Acesso em: 18 de Maio, 2018.

DONOSO, J. P. **Espectroscopia Eletrônica: espectros de emissão e luminescência**. São Carlos: IFSC – USP, 20--?. Disponível em: <http://www.ifsc.usp.br/~donoso/espectroscopia/Luminescencia.pdf>. Acesso em: 21 de Março, 2020.

ECK, M. **Performance enhancement of hybrid nanocrystal-polymer bulk heterojunction solar cells: aspects of device efficiency, reproducibility and stability**, 2013. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/279824911\\_Performance\\_enhancement\\_of\\_hybrid\\_nanocrystal-polymer\\_bulk\\_heterojunction\\_solar\\_cells\\_aspects\\_of\\_device\\_efficiency\\_reproducibility\\_and\\_stability](https://www.researchgate.net/publication/279824911_Performance_enhancement_of_hybrid_nanocrystal-polymer_bulk_heterojunction_solar_cells_aspects_of_device_efficiency_reproducibility_and_stability)>. Acesso em: 8 de Julho, 2020.

EVIDENT. **GSR Collection Kits**, 2020. Disponível em: <<https://www.shopevident.com/category/blood-trajectory/gsr-collection-kits>>. Acesso em: 14 de Julho, 2020.

GARRET, R. **Cumarina, C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>**. Disponível em: <[http://qnint.s bq.org.br/qni/popup\\_visualizarMolecula.php?id=EGwfxWnqDymHIheEJmzQtaOi6FS0\\_DJLGH3oRRKy0ahwBB-0NhnVJGwTf46Fgh93kbBveU0w4TW7OCTcnNeUuA==>](http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=EGwfxWnqDymHIheEJmzQtaOi6FS0_DJLGH3oRRKy0ahwBB-0NhnVJGwTf46Fgh93kbBveU0w4TW7OCTcnNeUuA==>)>. Acesso em: 06 de Janeiro, 2020.

GRIMM, J. B.; HECKMAN, L. M.; LAVIS, L. D. The Chemistry of Small-Molecule Fluorogenic Probes. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, [s.l.], p.1-34, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123869326000016#s0020>>. Acesso em: 16 de Janeiro, 2020.

IDIYATULLIN, I. **Inflorescence of dill, close-up stock photo**, 2018. Disponível em: <https://www.istockphoto.com/fi/photo/inflorescence-of-dill-close-up-gm1053958582-281611653>. Acesso em: 9 de Julho, 2020.

ISAC-GARCÍA, J. et al. Green Chemistry Experiments. **Experimental Organic Chemistry**, [s.l.], p. 417-484, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128038932500139>. Acesso em: 8 de Janeiro, 2020.

JÚNIOR, A. M. **Mecanismos de Absorção e Emissão de Energia**. São Paulo: IQ/USP, 2020. Disponível em: [http://www.nupeg.ufrn.br/downloads/fotoquimica/aula\\_4.pdf](http://www.nupeg.ufrn.br/downloads/fotoquimica/aula_4.pdf). Acesso em: 21 de Março, 2020.

KASSIM, N. K. et al. Antioxidant activity-guided separation of coumarins and lignan from *Melicope glabra* (Rutaceae). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 139, n. 1-4, p.87-92, ago. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461300143X>>. Acesso em: 12 de Janeiro, 2020.

LENHARD, Sara L.R.; et al. Contribuição à Identificação de Resíduos de Disparo de Arma de Fogo: **Perícia Federal**, Brasília, n. 22, p.13-14, set./dez. 2005. Disponível em: <<http://www.apcf.org.br/Portals/0/revistaAPCF/22.pdf>>. Acesso em: 17 de Maio, 2018.

LUCENA, M. A. M. et al. Investigation of the Use of Luminescent Markers as Gunshot Residue Indicators: **Forensic Science International**, v. 280, p. 95-102, nov. 2017. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/320089459\\_Investigation\\_of\\_the\\_use\\_of\\_luminescent\\_markers\\_as\\_gunshot\\_residue\\_indicators](https://www.researchgate.net/publication/320089459_Investigation_of_the_use_of_luminescent_markers_as_gunshot_residue_indicators)>. Acesso em: 12 de Maio, 2018.

LUIZ, F. C. L. Introdução à Fluorescência. **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas**. p 15-32. Tese (Doutorado) - Curso de Física, Pontefícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <[http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0510942\\_09\\_cap\\_02.pdf](http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0510942_09_cap_02.pdf)>. Acesso em: 22 de Janeiro, 2020.

LUIZ, F. C. L. **Estudos de Fluorescência Estacionária e Resolvida no Tempo de Anestésicos Locais e de Antibióticos da Classe das Fluoroquinolonas**. 2009. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Física, Puc - Rio, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/colecao.php?strSecao=resultado&nrSeq=15676@1&msg=28#>. Acesso em: 30 de Março, 2020.

Mahabaleshwaraiyah, N. **Synthesis of some Heterocyclic compounds and their Pharmacological studies**, 2014. Disponível em: <<http://shodhganga.inflibnet.ac.in:8080/jspui/handle/10603/31587>>. Acesso em: 9 de Julho, 2020.

MAIA, F. S. **Criminalística Geral**. Fortaleza, 2012. Disponível em:<[http://tmp.mpce.mp.br/esmp/apresentacoes/I\\_Curso\\_de\\_Investigacao\\_Criminal\\_Homic%C3%ADdio/02\\_Criminalistica\\_Geral\\_29\\_11\\_2012.pdf](http://tmp.mpce.mp.br/esmp/apresentacoes/I_Curso_de_Investigacao_Criminal_Homic%C3%ADdio/02_Criminalistica_Geral_29_11_2012.pdf)>. Acesso em: 17 de Maio, 2018.

MARCHIOSI, R. **Efeitos metabólicos nas raízes de soja, susceptível e resistente ao glifosato, após exposição das sementes ao herbicida**. 2008. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008. Disponível em: <[http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=117882](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=117882)>. Acesso em: 07 de Janeiro, 2020.

MARTINY, A.; PINTO, A. L. **Aplicação da Microscopia Eletrônica de Varredura à Análise de Resíduos de Tiro**. 2008. Disponível em: <[http://rmct.ime.eb.br/arquivos/RMCT\\_3\\_quad\\_2008/aplic\\_microscop\\_elet\\_resid\\_tiro.pdf](http://rmct.ime.eb.br/arquivos/RMCT_3_quad_2008/aplic_microscop_elet_resid_tiro.pdf)>. Acesso em: 17 de Maio, 2018.

MATOS, M. J. et al. Coumarins: An Important Class of Phytochemicals. In: RAO, V.; RAO, L. (Ed.). **Phytochemicals: Isolation, Characterization and Role in Human Health**: Intechopen, 2015. Cap. 5. p. 113-140. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-isolation-characterisation-and-role-in->

human-health/coumarins-an-important-class-of-phytochemicals>. Acesso em: 6 de Janeiro, 2020.

MAZIMBA, O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. **Bulletin Of Faculty Of Pharmacy**, Cairo University, [s.l.], v. 55, n. 2, p.223-232, dez. 2017. Egypts Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.05.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110093117300297>>. Acesso em: 8 de Janeiro, 2020.

MERCK. **Amberlyst® 15 hydrogen form**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/216399?lang=pt@ion=BR>. Acesso em: 6 de Março, 2020.

TELELAB. **Diagnóstico do HIV - Aula 5**: Diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: [https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22167/mod\\_resource/content/1/HIV%20-%20Manual%20Aula%205.pdf](https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22167/mod_resource/content/1/HIV%20-%20Manual%20Aula%205.pdf). Acesso em: 29 de Fevereiro, 2020.

PEREIRA, M. et al. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 51, n. 5, p. 421-426, out. 1999. UNIFESP. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09351999000500004](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09351999000500004). Acesso em: 9 de Fevereiro, 2020

PINTO, A. L.; MARTINY, A. Implantação de uma Rede de Microscopia Eletrônica para Análise de Provas Periciais. **Perícia Federal**, Brasília, n. 22, p.8-12, set./dez. 2005. Disponível em: <<http://www.apcf.org.br/Portals/0/revistaAPCF/22.pdf>>. Acesso em: 17 de Maio, 2018.

REIS, E. et al. **Identificação de resíduos de disparos de armas de fogo por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo**, 2004. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000300009](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000300009). Acesso em: 10 de Julho, 2020.

REZENDE, L. C. D. **Síntese, Caracterização e Aplicações de Fluoróforos Derivados do BODIPY**. 2016. 130 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-23052016-103608/publico/Tese\\_Simplificada\\_corrigida.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-23052016-103608/publico/Tese_Simplificada_corrigida.pdf). Acesso em: 30 de Março, 2020.

RODRIGUES, C. E. D. **Avaliação Metrológica da Resposta de Sinais de Fluorescência para Medições de Pigmentos em Água**. 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Metrologia Para Qualidade e Inovação, Puc, Rio de Janeiro, 2007. Cap. 2. Disponível em: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/colecao.php?strSecao=resultado&nrSeq=11505@1>. Acesso em: 21 de Março, 2020.



SCHWOEBLE, A. J.; EXLINE, David L.. **Current Methods in Forensic Gunshot Residue Analysis**. Boca Raton: Crc Press, 2000.

SEBA, R. **Semente de Cumaru**, 2014. Disponível em: <<https://infograficos.estadao.com.br/paladar/cozinha-do-brasil/2014/semente-cumaru.html>>. Acesso em 9 de Julho, 2020.

SENADO FEDERAL. **INB, CNEM e CMBB: a radioatividade associada às terras-raras**. 2013. Disponível em: <http://www.senado.gov.br/noticias/Jornal/emdiscussao/terras-raras/contexto/inb-cnem-e-cmbb-a-radioatividade-associada-as-terras-raras.aspx>. Acesso em: 13 de Abril, 2020.

SHIMIZU, B. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in the biosynthesis of simple coumarins. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 5, n. 549, p.1-7, 3 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4217350/#!po=42.3077>>. Acesso em: 8 de Janeiro, 2020.

SILVA, S. M. **Icterícia Neonatal**. 2011. 30 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Cidade do Porto, 2011. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/61080/2/Ictercia%20Neonatal.pdf>. Acesso em: 10 de Fevereiro, 2020.

SOUZA, C. F. **Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente**. 2008. 172 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Puc, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/colecao.php?strSecao=resultado&nrSeq=13068@1&msg=28#>. Acesso em: 22 de Março, 2020.

SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICA CIENTÍFICA, **Centro de Exames Análises e Pesquisas**, 2003. Disponível em: <https://docplayer.com.br/11219393-Superintendencia-da-i-c-i-m-l-ceap-ceap-nucleo-biol-e-bioquimica-fisica-instrumental-entorpecente.html>. Acesso em: 17 de Maio, 2018.

TED PELLA, INC. **Planotec GSR & Particle Analysis Calibration Kit**, 2020. Disponível em: [https://www.tedpella.com/calibration\\_html/Gunshot\\_Particle\\_Analysis\\_Calibration\\_Kit.htm](https://www.tedpella.com/calibration_html/Gunshot_Particle_Analysis_Calibration_Kit.htm). Acesso em: 17 de Maio, 2018.

VIANNA, D. R. **Avaliação in vitro da Atividade Antifúngica e Citotóxica de Cumarinas Naturais e Sintéticas**. 2011. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61008/000826305.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 3 de Março, 2020.

WAHYUNINGRUM, D.; ZULQARNAEN, M.; SUENDO, V. **The synthesis and characterization of 7-hydroxy-4-methylcoumarin and the investigation of the fluorescence properties of its 7-hydroxy-4-methylcoumarin-chitosan films.** [s.l.], 2014. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/262951725\\_The\\_Synthesis\\_and\\_Characterization\\_of\\_7-Hydroxy-4-Methylcoumarin\\_and\\_the\\_Investigation\\_of\\_the\\_Fluorescence\\_Properties\\_of\\_Its\\_7-Hydroxy-4-Methylcoumarin-Chitosan\\_Films](https://www.researchgate.net/publication/262951725_The_Synthesis_and_Characterization_of_7-Hydroxy-4-Methylcoumarin_and_the_Investigation_of_the_Fluorescence_Properties_of_Its_7-Hydroxy-4-Methylcoumarin-Chitosan_Films). Acesso em: 6 de Março, 2020.

WEBER, I.T. et al. Use of Luminescent Gunshot Residues Markers in Forensic Context: **Forensic Science International**, v. 244, p. 276-284, set. 2014. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/265788965\\_Use\\_of\\_Luminescent\\_Gunshot\\_Residues\\_Markers\\_in\\_Forensic\\_Context](https://www.researchgate.net/publication/265788965_Use_of_Luminescent_Gunshot_Residues_Markers_in_Forensic_Context)>. Acesso em: 12 de Maio, 2018.

YATES, T. J. et al. Dietary Supplement 4-Methylumbelliferone: An Effective Chemopreventive and Therapeutic Agent for Prostate Cancer. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 107, n. 7, 13 abr. 2015. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jnci/article/107/7/djv085/912364>. Acesso em: 29 de Janeiro, 2020.

YMDB: Yeast Metabolome Database, **4-Methylumbelliferone**. 2020. Disponível em: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB00971>. Acesso em: 6 de Janeiro, 2020.

YU, S.; HU, D.; ZHANG, J. Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.3869-3873, 18 maio 2015. Disponível em:

<<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2015.3797>>. Acesso em: 10 de Janeiro, 2020.

ZHI, H. et al. Fluorescent Properties of Hymecromone and Fluorimetric Analysis of Hymecromone in Compound Dantong Capsule. **Journal Of Spectroscopy**, [s.l.], v. 2013, p.1-9, 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jspec/2013/147128/>. Acesso em: 26 de Janeiro, 2020.