



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalaínas

KARINA KINUYO NAKASHIMA

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Química

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

Data do depósito na SPG:

10/12/2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

N163e Nakashima, Karina Kinuyo
Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalaínas /
Karina Kinuyo Nakashima. -- São Paulo, 2015.
137p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Bastos, Erick Leite

1. Físico-química : Orgânica 2. Antioxidantes I. T. II. Bastos,
Erick Leite, orientador.

547.13 CDD

KARINA KINUYO NAKASHIMA

Estudo do Mecanismo de Ação Antirradicalar de Betalaínas

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo

2015



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalaínas”

KARINA KINUYO NAKASHIMA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestra em Ciências - no Programa de: Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Erick Leite Bastos
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader
IQ - USP

Prof. Dr. Wendel Andrade Alves
UFABC

SÃO PAULO
21 de dezembro de 2015

Eppur si muove!

"E no entanto se move!"

Galileo Galilei

Agradecimentos

"Somos o resultado de tanta gente, de tanta história, tão grandes sonhos que vão passando de pessoa a pessoa, que nunca estaremos sós"

Valter Hugo Mãe, em *O filho de mil homens*

O que tem de transformação aqui é Erick. E transformação é Química. Minha eterna gratidão e admiração por isso. Mãos dadas, pés livres e olhos abertos é tudo o que se espera de um orientador.

A amizade aqui é Isabel. Planos científicos e não científicos, curiosidades científicas e não científicas. A origem da vida não se sabe, mas o sentido da vida tem que ser uma boa amizade e tudo o que vem com ela.

O começo de tudo aqui é Sabin e as amizades que lá se formaram e sobrevivem no espaço-tempo: Anna, Carol, Nathalia, Olívia, Ana Paula, Fabiana e Luísa.

O que tem aqui que eu ainda nem sei, mas ela já sabe, é Débora. E tudo fica mais divertido não sendo mais filha única.

O que tem de consciência aqui é Felipe. Sua vontade de fazer a diferença é inspiradora.

A lucidez e a sensatez são Caroline Matos. Apoio 24h, a qualquer batida na porta.

O que tem de alegrias e dúvidas compartilhadas, de amadurecimento, de problema e de solução, é 09: Bruno, Leonardo, Pamela, Paulo, Robson, Tomaz, Vanessa, Vinicio e Vitor.

A sinceridade das ideias é Erlen. Presença constante nas minhas memórias mais felizes do IQ, me mantendo fiel ao que sou, sem perder o senso crítico.

O que tem de equipe aqui é BastosLab: Luiz, colegas de laboratório, e Letícia, sem os quais este projeto não existiria da forma que é.

Em todas as entrelinhas desta dissertação estão quatro pessoas. Ana Clara, Amanda, Barbara e Glalci, que me cederam experiência e me deram sensação de pertencimento. Foi cada coisa estranha pra se ter vivenciado, mas tê-las vivenciado junto fez toda a diferença. Amizade nascida em torno de algo tão científico, que foi ficando cada vez menos científica.

O que tem de investimento e oportunidade aqui é FAPESP.

O que parece ter levado mais tempo do que levou são as pessoas de outros laboratórios que me ajudaram: Felipe A. Dörr (espectrometria de massas), Janaina D. Vilcachagua (ressonância magnética nuclear), Alex Lima e Carla S. Santos (voltametria cíclica) e Stanley Vasconcellos (cromatografia líquida em escala semi preparativa).

O cuidado que pus aqui é IQUSP. Cada conceito, cada explicação, são Carmen Fernandez, Kaline R. Coutinho, Paulo Agozzini, Mauro Bertotti, Fernando R. Ornellas, *Willi* Baader e Thiago C. R. L. Paixão. O que eventualmente tiver de sabedoria aqui é Peter, modelo de conduta e ponto de equilíbrio dos corredores do Bloco 4. Marcas que foram ficando ao longo da graduação e que não dá nem pra começar a racionalizar.

O amor incondicional daqui é Mitsui.

O que tem de melhor aqui é minha mãe, meu pai e meu tio.

Resumo

NAKASHIMA, K. K. **Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalainas.** 2015. 137 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Foi preparada uma série de quatro betalainas com o objetivo de determinar o efeito da metilação do nitrogênio imínico e da presença de uma hidroxila fenólica na posição 3 do anel aromático sobre a estabilidade e propriedades antirradicalares, fotofísicas e redox desta classe de pigmentos vegetais. O estudo destes compostos, chamados de *m*-betalainofenol, *N*-metil-*m*-betalainofenol, fenilbetalaina e *N*-metil-fenilbetalaina, revelou que os derivados metilados apresentam um deslocamento hipsocrômico sutil dos máximos de absorção e fluorescência em relação aos compostos não metilados. Os deslocamentos de Stokes são maiores em cerca de 4 kJ mol⁻¹ para os derivados metilados e os rendimentos quânticos de fluorescência cerca de três vezes menores. A hidrólise destas betalainas foi investigada na faixa de pH entre 3 e 7. Todas as betalainas são mais persistentes em pH = 6 e a metilação da porção imínica aumenta significativamente a estabilidade da betalaina em meio aquoso. A presença da porção fenólica, em comparação a um grupo fenila, não afeta as propriedades fotofísicas dos compostos e tem um efeito menos pronunciado do que o da metilação sobre a estabilidade destes em meio aquoso. O comportamento eletroquímico dos compostos foi estudado por voltametria cíclica, nas mesmas condições de pH. A *N*-metilação foi novamente mais significativa do que a hidroxilação, provocando aumento de até 200 mV no potencial de pico anódico. O aumento do pH diminuiu o potencial de pico anódico dos quatro compostos, com uma razão entre prótons e elétrons igual a 1 para a maioria dos picos. A capacidade antirradicalar foi quantificada pelo ensaio

colorimétrico TEAC baseado na redução de ABTS^{•+}. Os dois derivados *N*-metilados apresentaram, em média, o mesmo valor de TEAC, apesar de um ser fenólico e o outro não. Já entre os não metilados, que têm TEAC de 2 a 3 unidades inferior à dos outros, a presença do fenol provoca elevação da capacidade antirradicalar. Os resultados sugerem a participação dos elétrons do anel 1,2,3,4-tetrahidropiridínico, acoplados ao próton do nitrogênio imínico, na ação antirradicalar de betalaínas.

Palavras-chave: betalaínas, capacidade antirradicalar, ensaio TEAC, relações estrutura-propriedade

Abstract

NAKASHIMA, K. K. **Study of the mechanism of antiradical action of betalains.** 2015. 137 p. Dissertation (Master's degree) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A series of four artificial betalains was prepared in order to determine the effect of imine nitrogen methylation and phenyl hydroxylation (position 3) over stability and antiradical, photophysical and redox properties of this class of natural pigments. The study of *m*-betalainophenol, *N*-methyl-*m*-betalainophenol, phenylbetalain and *N*-methylbetalain, revealed that the methylated compounds present a small hypsochromic shift of both absorption and fluorescence maxima when compared to the others. The Stokes shifts are around 4 kJ mol⁻¹ higher for methylated betalains, whereas the quantum yields are approximately three times lower. The hydrolysis was investigated between pH 3 and 7. All compounds are more persistent in pH = 6, and imine methylation increases the overall stability in aqueous medium. The presence of a phenol group, in comparison with a phenyl substituent, has a minor effect on the photophysical properties of betalains and has a less pronounced effect over stability than that of methylation. The electrochemical behavior was studied by cyclic voltammetry, in the same pH range, and is also more significantly affected by methylation, rather than by hydroxylation. Methylation increases anodic peak potential up to 200 mV, and the potential is also much higher in more acidic media for all compounds. The number of protons involved in the electrochemical oxidation is the same as the number of electrons for most peaks. The antiradical capacity was quantified using the TEAC assay, and

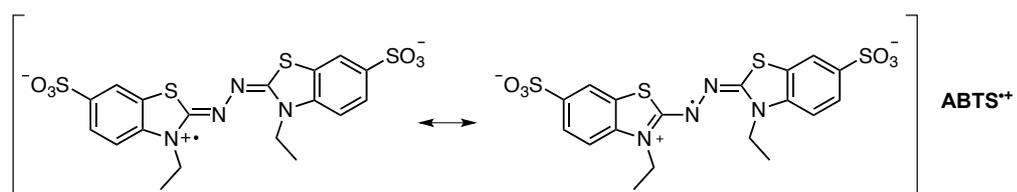
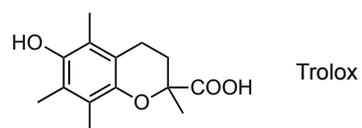
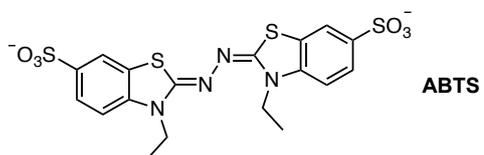
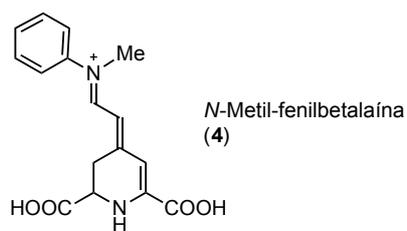
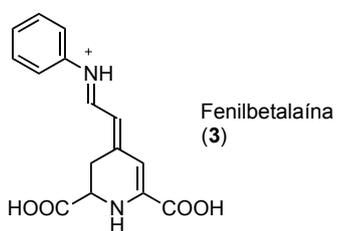
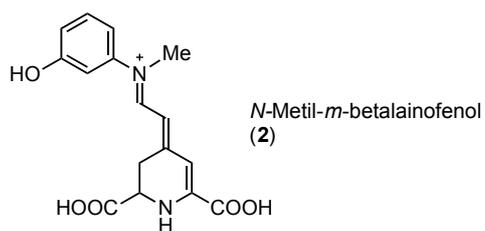
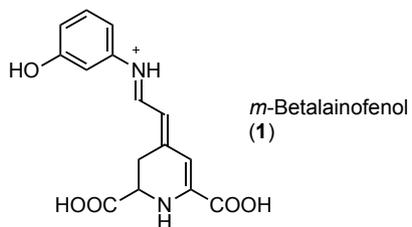
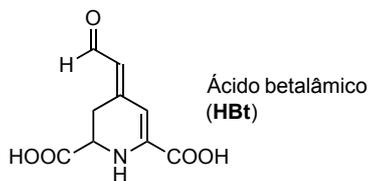
ABTS^{•+} as radical. The methylated betalains presented, in average, the same TEAC value, although only one of them is phenolic. Among the non methylated, which are 2 to 3 units more efficient than the others, the phenolic one has a greater TEAC. These results suggest a participation of the 1,2,3,4-tetrahydropyridinic ring electrons in the oxidation by ABTS^{•+}, coupled to the imine nitrogen proton.

Keywords: betalains, antiradical capacity, TEAC assay, structure-property relationships

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

α	Coeficiente angular de um ajuste linear da forma $y = y_0 + \alpha x$
ϵ	Coeficiente de atenuação molar
Φ_{Fl}	Rendimento quântico de fluorescência
v/n	Razão prótons/elétrons na equação de Nernst
$\lambda^{máx}$	Comprimento de onda de máxima absorção no espectro UV-Vis
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) de amônio
Bt	Betalaína
DAD	<i>Diode array detector</i> , detector de arranjo de diodos
$E_{p,a}$	Potencial de pico anódico do voltamograma cíclico
$E_{p,c}$	Potencial de pico catódico do voltamograma cíclico
ESI+	<i>Electrospray ionization</i> , ionização por elétron-spray em modo positivo
ER, ERO, ERN	Espécie reativa, espécie reativa de oxigênio, espécie reativa de nitrogênio
$^1\text{H-RMN}$	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
$^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$	<i>Correlation spectroscopy</i> , espectroscopia de correlação homonuclear
$^1\text{H}, ^{13}\text{C-HMBC}$	<i>Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy</i> , espectroscopia de correlação heteronuclear a longa distância
HBt	Ácido betalâmico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
m/z	Razão massa/carga na espectrometria de massas
TEAC	<i>Trolox equivalent antiradical capacity</i> ou capacidade antirradicalar em equivalentes de Trolox

Lista de estruturas



Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	vii
Lista de estruturas	ix
1. Introdução	15
1.1. Oxidantes, antioxidantes e a importância do balanço redox <i>in vivo</i>	15
1.2. Eficiência e variedade de antioxidantes naturais	17
1.3. Betalaínas	19
1.4. Desenvolvimento de betalaínas semissintéticas antioxidantes	22
2. Objetivos	25
2.1. Objetivos específicos	25
3. Material e Métodos	27
3.1. Reagentes e solventes	27
3.2. Soluções-estoque e tampões	28
3.2.1. Gerais	28
3.2.2. Método TEAC	30
3.2.3. Rendimento quântico de fluorescência	30
3.2.4. Cromatografia	31
3.3. Semissíntese de betalaínas	31
3.3.1. Extração de ácido betalâmico	31
3.3.2. <i>N</i> -Metilação de <i>m</i> -aminofenol	32
3.3.3. Acoplamento aldimínico	33
3.4. Purificação das betalaínas	34
3.5. Caracterização estrutural	34
3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas	34

3.5.2.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	34
3.6.	Caracterização fotofísica.....	35
3.6.1.	Espectroscopia de absorção e emissão.....	35
3.6.2.	Coefficiente de atenuação molar.....	35
3.6.3.	Rendimento quântico de fluorescência.....	37
3.7.	Determinação da estabilidade em solução aquosa.....	38
3.8.	Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica.....	38
3.9.	Determinação da capacidade antirradicalar com o método ABTS.....	40
3.9.1.	Estudos com o método ABTS.....	40
3.9.2.	Quantificação da capacidade antirradicalar.....	40
3.9.3.	Caracterização dos produtos da reação com ABTS ^{•+}	42
4.	Resultados.....	43
4.1.	Semissíntese de betalaínas anilínicas.....	43
4.2.	Caracterização fotofísica.....	49
4.2.1.	Absorção no UV-vis e emissão de fluorescência.....	49
4.2.2.	Determinação do coeficiente de atenuação molar.....	50
4.2.3.	Medida do rendimento quântico de fluorescência.....	52
4.3.	Determinação da estabilidade em solução aquosa.....	54
4.4.	Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica.....	55
4.5.	Determinação da capacidade antirradicalar com o método ABTS.....	59
4.5.1.	Estudos com o método ABTS.....	59
4.5.2.	Quantificação da capacidade antirradicalar.....	61
4.5.3.	Caracterização dos produtos da reação com ABTS ^{•+}	64
5.	Discussão.....	71
5.1.	Semissíntese de betalaínas.....	73
5.2.	Propriedades fotofísicas.....	77
5.3.	Estabilidade em solução aquosa.....	81
5.4.	Potencial redox.....	85
5.5.	Capacidade antirradicalar.....	87

5.5.1.	Efeito da estrutura das betalaínas.....	89
5.5.2.	Possíveis reações laterais	98
5.5.3.	Efeito do tempo.....	101
6.	Conclusões.....	105
7.	Referências	107
	Súmula curricular.....	112
8.	Anexos	114
8.1.	Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de 1	114
8.2.	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz) de 1	116
8.3.	Espectro de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz) de 1	117
8.4.	Espectro de massas (HPLC-MS e MS^2) de 1	117
8.5.	Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de 2	118
8.6.	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz) de 2	120
8.7.	Espectro de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz) de 2	121
8.8.	Espectro de massas (HPLC-MS e MS^2) de 2	121
8.9.	Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de 3	122
8.10.	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz) de 3	124
8.11.	Espectro de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz) de 3	125
8.12.	Espectro de massas (HPLC-MS e MS^2) de 3	125
8.13.	Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de 4	126
8.14.	Espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz) de 4	128
8.15.	Espectro de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz) de 4	129
8.16.	Espectro de massas (HPLC-MS e MS^2) de 4	129
8.17.	Gráficos de Nernst	130
8.18.	Curvas cinéticas do método ABTS com as betalaínas.....	131
8.19.	Ajustes lineares do método ABTS.....	133

1. Introdução

1.1. Oxidantes, antioxidantes e a importância do balanço redox *in vivo*

A exposição de organismos vivos ao oxigênio molecular resultou na evolução da fotossíntese e da respiração aeróbia.^[1] Apesar de essencial para a respiração, a exposição ao O₂ em concentração atmosférica acima de 21% danifica os neurônios, alvéolos pulmonares e pode induzir a morte celular. Inicialmente, pensava-se que a toxicidade estivesse relacionada à inativação oxidativa de enzimas, mas não foi possível encontrar evidências de tal fenômeno. Os efeitos deletérios de altas pressões de oxigênio foram então atribuídos a *espécies reativas de oxigênio*, EROs, compostos radicalares ou não, capazes de reagir com biomoléculas devido aos seus baixos potenciais de redução. Esta hipótese ganhou força com a descoberta de uma classe de metaloenzimas específicas para dismutar o ânion-radical superóxido (O₂^{•-}) em peróxido de hidrogênio, as *superóxido dismutases* (SODs). Agora se sabe que EROs são constantemente geradas em sistemas biológicos, e que o *vazamento de elétrons* na cadeia respiratória mitocondrial produz O₂^{•-} como produto lateral.^[2,3]

O desequilíbrio entre a concentração de espécies oxidantes e antioxidantes nas células vivas pode levar a um quadro de *estresse oxidativo*.^[1] Entretanto, espécies reativas são importantes para diversas funções biológicas. Por exemplo, células do sistema imunológico passam pelo chamado *burst respiratório* e liberam grandes quantidades de O₂^{•-} e H₂O₂ para combater patógenos.^[4] Óxido nítrico (NO[•]) atua como neurotransmissor e segundo mensageiro de vias de sinalização redox dependentes de cGMP, muitas relacionadas à senescência celular.^[5] Não obstante, mesmo nessas vias, há o risco da geração descontrolada de espécies reativas em geral (ERs), e, por isso, a

evolução de organismos fotossintetizantes e seres aeróbios requereu o surgimento de mecanismos de controle sobre o nível de espécies reativas e de reparo do dano oxidativo. A Figura 1 resume as principais fontes e destinos das espécies reativas na célula, incluindo alguns mecanismos de defesa.

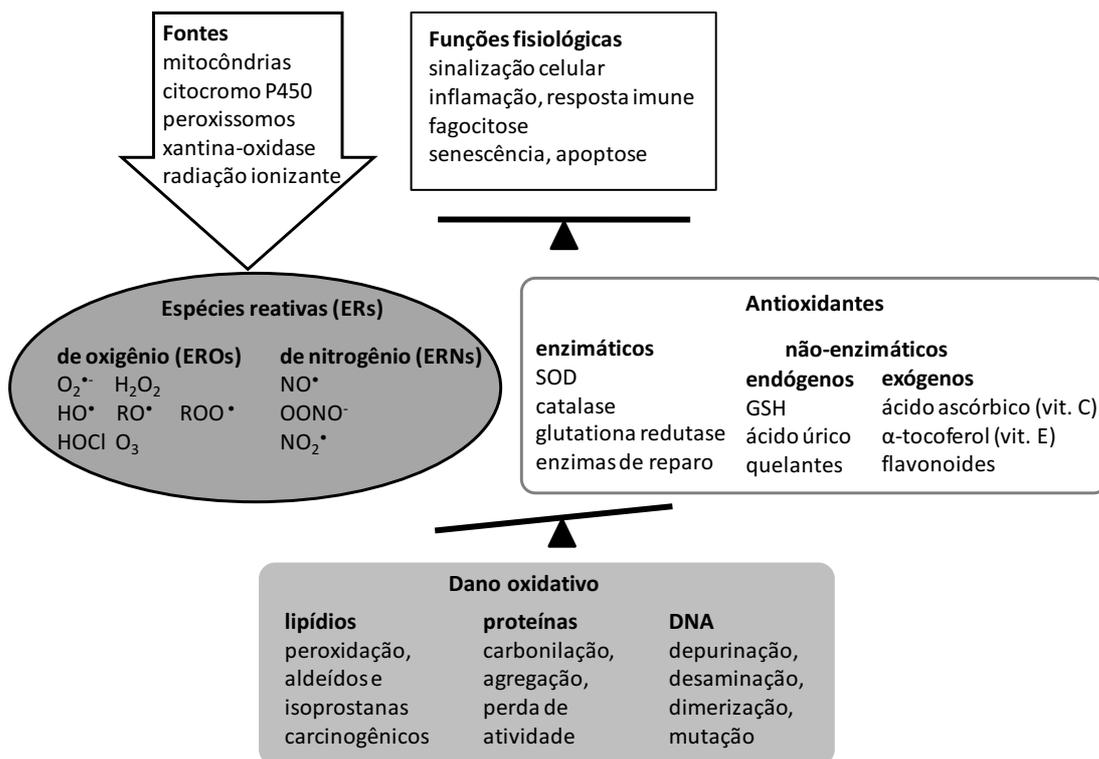


Figura 1. Resumo dos componentes do balanço redox da célula.^[3,6]

Entre os antioxidantes endógenos, como a glutatona, a ação muitas vezes é antirradical, baseada na prevenção da iniciação e propagação da cadeia radicalar de EROs, ou na sua terminação precoce. Essa habilidade tem sido quantificada em termos de capacidade antirradical e atividade antirradical, *i.e.*, o número de radicais sequestrados por molécula de antioxidante e a velocidade da reação, respectivamente.

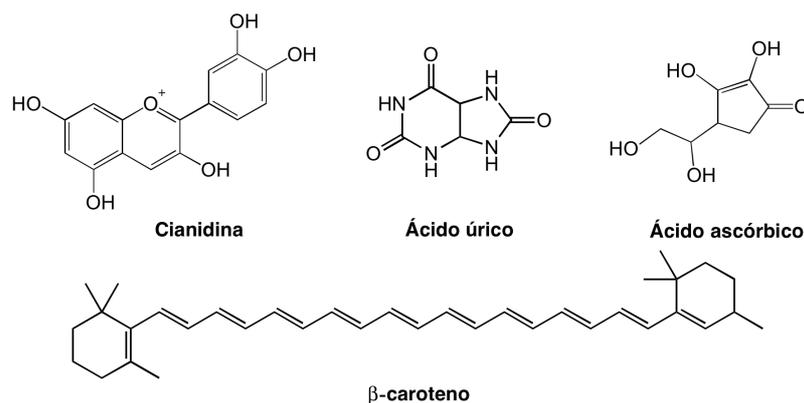
1.2. Eficiência e variedade de antioxidantes naturais

Muitos estudos procuram relacionar a suplementação da dieta com antioxidantes à prevenção e eficácia do tratamento de doenças. Por exemplo, *N*-acetilcisteína (NAC) retarda a tumorigênese de linfomas em ratos,^[7] e a suplementação com antioxidantes, como NAC, vitamina C e betalaínas, diminuiu o nível de biomarcadores de dano oxidativo em humanos.^[7,8] Entretanto, existe o chamado *paradoxo dos antioxidantes*: ratos portadores de genes indutores de câncer de pulmão alimentados com um combinação de NAC e vitamina E apresentaram tumores maiores, mais agressivos e mais fatais do que ratos em dieta normal, e o crescimento de células humanas de câncer de pulmão foi acelerado pelos mesmos antioxidantes.^[9] Ainda, alguns oncogenes promovem a eliminação de espécies reativas antes da iniciação do tumor, e células tumorais sem o fator de transcrição Nrf2, que entram em senescência na presença de altas concentrações de EROs, voltam a proliferar quando tratadas com antioxidantes.^[10]

É possível inferir, portanto, que a atuação de antioxidantes deva ser altamente dependente do contexto celular, porquanto a forma como o potencial antioxidante é determinado pode explicar o *paradoxo*. A eficiência de um antioxidante *in vitro* geralmente é medida como a habilidade de reduzir radicais estáveis, que não têm nenhuma relação com as espécies altamente reativas dos sistemas biológicos. O método TEAC (do inglês, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) quantifica colorimetricamente o número de radicais (ABTS^{•+} ou DPPH[•]) que são consumidos por molécula de antioxidante ao longo de um intervalo de reação definido e relata o resultado em equivalentes de Trolox, derivado hidrossolúvel de vitamina E. O método TRAP, muito usado para determinar níveis séricos totais de antioxidantes antes e depois da ingestão, consiste em medir a concorrência entre antioxidantes e compostos

fluorescentes ou quimiluminescentes por radicais de oxigênio, tipicamente HOO^\bullet , HO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$.^[13c] Tais métodos, além de serem dependentes do radical usado e das condições do ensaio, implicam a introdução de radicais ou de sondas no sistema de estudo que não existem *in vivo*. Ademais, fatores cruciais da ação antioxidante *in vivo* não são contemplados: o antirradical deve ser atóxico, seus metabólitos e seus produtos de oxidação devem ser biocompatíveis, e a cinética de oxidação e a acumulação celular devem ser compatíveis com os tempos de vida e a localização dos radicais, para não comprometerem processos metabólicos essenciais.

Alguns compostos de origem natural satisfazem os requisitos acima e estão representados no Esquema 1. Flavonoides são polifenóis cuja capacidade de sequestrar radicais é atribuída à formação de produtos de oxidação estáveis. Na classe das antocianinas, por exemplo, o núcleo catecólico é crucial para a capacidade antirradicalar, pois produz uma semiquinona pela oxidação em 1 e^- e uma quinona pela oxidação em 2 e^- .^[13] Além disso, esses compostos inibem a xantina oxidase, produtora de $\text{O}_2^{\bullet-}$, e quelam cátions Fe^{II} que podem participar da reação de Fenton.^[14] Há também antioxidantes naturais não-fenólicos. Exemplos incluem os carotenoides – que têm sistemas π conjugados que reagem com oxigênio molecular e espécies radicalares –, o ácido ascórbico (vitamina C) e o ácido úrico.^[15]



Esquema 1. Estruturas de alguns antioxidantes naturais. Cianidina é representante de flavonoides da classe das antocianinas e β-caroteno, de carotenoides.

A oxidação de fenóis é relativamente bem estabelecida na literatura, e envolve a transferência de elétrons e prótons para os radicais.^[16,17] Betalaínas, classe dos compostos deste projeto, podem ser antioxidantes nitrogenados fenólicos ou não fenólicos, o que sugere relações estrutura-propriedade complexas. Estabelecê-las para direcionar o desenvolvimento de antioxidantes potentes é o que se buscou neste trabalho.

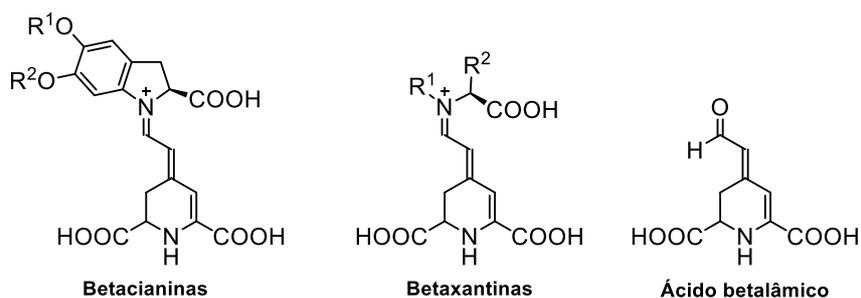
1.3. Betalaínas

Pigmentos vegetais desempenham importantes funções na planta, que vão muito além da atração de insetos polinizadores. Do ponto de vista energético, a captação de luz solar para a fotossíntese pelas clorofilas e a proteção do aparato fotossintetizante pelos carotenoides são as mais relevantes. Contudo, antocianinas e betalaínas parecem ter funções adicionais na planta que estão ligadas à inativação de espécies reativas.^[18]

Betalaínas são uma classe de pigmentos naturais de ocorrência restrita a algumas famílias de plantas da ordem Caryophyllales (*e.g. Beta vulgaris*, beterraba) e a alguns fungos basidiomicetos dos gêneros *Amanita* Dill. Ex Boehm., *Hygrocybe* (Fr.) P. Kumm e *Hygrophorus* Fr.^[19,20], nos quais elas substituem completamente as

antocianinas (*i.e.*, tratam-se de classes mutuamente exclusivas). Curiosamente, estes pigmentos conferem fluorescência a algumas flores (*Mirabilis jalapa* e *Portulaca grandiflora*) e pigmentam raízes que crescem sob a terra, não tendo, portanto, função evolutiva óbvia.

As betalaínas naturais se dividem em duas classes que possuem um núcleo cromofórico comum oriundo de seu aldeído precursor, o ácido betalâmico (HBt). Dependendo da amina da qual derivam, betalaínas são classificadas em betacianinas ou betaxantinas. Betacianinas (*kyaneos*, azul) são iminas betalânicas formadas a partir de ciclo-DOPA com diferentes graus de glicosilação; betaxantinas (*xanthos*, amarelo) são os derivados de outros aminoácidos (Esquema 2).^a



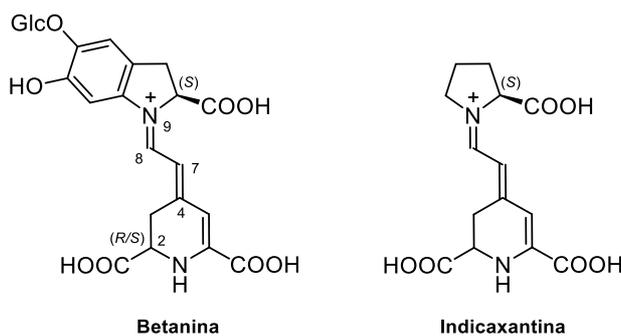
Esquema 2. As duas classes de betalaínas e a origem de seu cromóforo comum: ácido betalâmico.

As duas classes têm propriedades diferentes. Por exemplo, betanina, a betacianina majoritária na beterraba vermelha (*Beta vulgaris*), tem máximo de absorção ($\lambda^{\text{máx}}$) em 535 nm, não é fluorescente e é um antioxidante comparável ao galato de epicatequina, ou seja, quase cinco vezes mais eficiente que Trolox. Por sua vez, a indicaxantina, betaxantina também presente na beterraba, tem $\lambda^{\text{máx}}$ em 485 nm, é

^a Esta classificação se aplica às betalaínas naturais; betalaínas artificiais derivadas de aminas, que seriam classificadas como betaxantinas, podem apresentar coloração variada (laranja, rosa, vermelho).

fracamente fluorescente (rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) de 4×10^{-3} em água^[21]), e é um antioxidante 1,6 vezes mais eficiente que Trolox (Esquema 3).^[22]

A biossíntese de betalainas depende da oxidação enzimática de L-tirosina ao ácido betalâmico, que ocorre em duas etapas dependentes de tirosinases e dioxigenases.^[23,24] Estudos *in vitro* e *in vivo* observaram que, uma vez formado o aldeído, seu acoplamento com aminoácidos é não estereoespecífico, *i.e.*, ambas as formas *S* e *R* dos aminoácidos podem ser incorporadas ao HBt, e não estereosseletivo, *i.e.*, o produto é uma mistura de estereoisômeros (*E/Z* nas ligações C-4–C-7 e C-8–C-9).^[25]



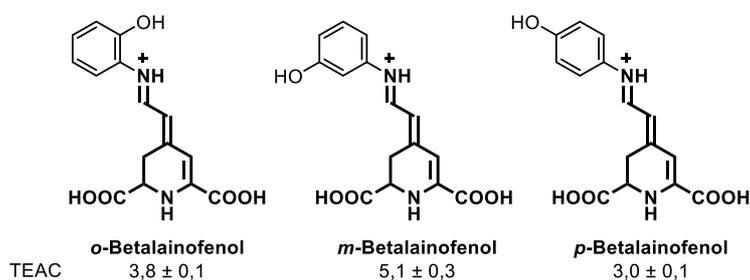
Esquema 3. Estrutura de duas betalainas representantes das betacianinas e das betaxantinas. Betanina e indicaxantina são representadas sem a configuração do carbono quiral C-2 porque geralmente são isoladas como misturas dos dois epímeros ou ocorre epimerização.

Desta forma, é possível semissintetizar *in vitro*, *i.e.*, obter a partir de síntese parcial, betalainas naturais e artificiais empregando-se ácido betalâmico como material de partida. Ele é obtido por meio da extração e hidrólise alcalina de betalainas naturais, já que a síntese total desse aldeído requer métodos pouco ecológicos e rendimento global abaixo de 20%.^[26–28] Betalainas com propriedades de interesse podem ser obtidas pela escolha de aminas adequadas para o acoplamento com HBt.^[27]

1.4. Desenvolvimento de betalaínas semissintéticas antioxidantes

A capacidade antirradicalar de betalaínas é uma das características que podem ser moduladas de acordo com a escolha da amina precursora. Betanina, uma betacianina fenólica encontrada na beterraba e utilizada como corante alimentício (E162), é um antioxidante potente, com TEAC de $4,7 \pm 0,3$.^[29] A título de comparação, galato de epicatequina, presente no chá verde, é um dos antioxidantes naturais de maior TEAC de que se tem conhecimento, medida em $4,90 \pm 0,02$.^[30] Indicaxantina, o derivado da L-prolina, difere da betanina pela ausência do anel catecol monoglicosilado e apresenta TEAC igual a $1,6 \pm 0,1$, que só pode estar associado à oxidação do núcleo betalaínico, seja *via* sistema 1,7-diazaeptamético (1,7-dHm, Esquema 4), seja pela oxidação resultante de descarboxilação.^[31–33]

Estudos com o objetivo de estabelecer relações estrutura-propriedade antioxidante de betalaínas são escassos. Alguns autores já estudaram implicações da estrutura sobre a cor, fluorescência e atividade antirradicalar de betalaínas derivadas de 15 aminas diferentes.^[27] Nosso grupo preparou e estudou as propriedades de três betalaínas fenólicas isoméricas, chamadas de betalainofenóis (Esquema 4). Todas se mostraram antirradicais mais potentes do que Trolox.^[29]



Esquema 4. Betalaínas-modelo monofenólicas preparadas em nosso grupo e estudadas quanto à ação antioxidante. TEAC é a capacidade antirradicalar relativa a Trolox. Os átomos e ligações em negrito compõem o sistema 1,7-diazaeptamético (1,7-dHm), característico de betalaínas.

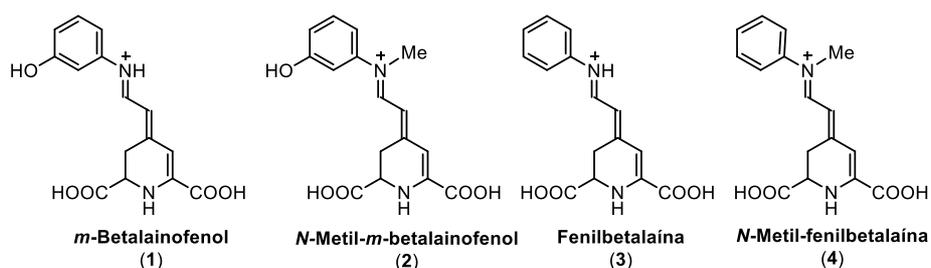
O estudo revelou que o regioisômero *meta* tem TEAC igual a 5,1, significativamente maior do que o *orto* e o *para* (3,8 e 3,0, respectivamente), e maior do que TEAC da betanina (4,7).^[29] O aumento de TEAC em relação à indicaxantina, não-fenólica, é de aproximadamente três vezes, o que é surpreendente considerando-se que a molécula tem apenas um grupo fenol. Além disso, o isômero *meta* se diferenciava pelo aumento do valor de TEAC com o aumento do pH na região entre 4 e 6, de forma análoga ao que ocorre com betanina.^[29,34] A explicação para a dependência do pH não é óbvia, já que TEAC é, em última análise, uma medida estequiométrica, que não deveria depender de estados de protonação. Nesse contexto, surgiu a necessidade de compreender a capacidade antirradicalar de betalainas em termos dos efeitos de pH e da estrutura, de modo a direcionar o desenvolvimento de betalainas artificiais com propriedades antioxidantes.

2. Objetivos

Entender a importância da oxidação da porção fenólica e do sistema 1,7-diazaeptamético para a capacidade antirradicalar de betalaínas-modelo, e como a estrutura de antioxidantes betalaínicos se relaciona à sua propriedade antirradicalar.

2.1. Objetivos específicos

- i. Semissintetizar e caracterizar a estrutura e as propriedades fotofísicas e eletroquímicas de quatro betalaínas aromáticas: *m*-betalainofenol, *N*-metil-*m*-betalainofenol, fenilbetalaína e *N*-metil-fenilbetalaína;



- ii. Investigar como o pH afeta estas propriedades e sua capacidade antirradicalar;
- iii. Racionalizar os resultados em termos do grupo -OH fenólico e sistema conjugado 1,7-diazaeptamético.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes e solventes

As substâncias químicas usadas neste trabalho e suas características são listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Reagentes usados no trabalho, seus fornecedores, pureza e método de purificação.

Reagente	Fórm/Abrev	Fornecedor	Pureza	Purificação
acetonitrila	MeCN	Tedia	HPLC	
acetato de etila	AcOEt	Synth	PA	
dimetilformamida	DMF	S-A	PA	BP = 40 °C, 14 mmHg, armazenado em peneira molecular de 3Å
etanol	EtOH	S-A	PA	
metanol	MeOH	Tedia	HPLC	
metanol deuterado	MeOH- <i>d</i> ₄	S-A		
3-aminofenol		S-A		
anilina		S-A		
<i>N</i> -metilanilina		S-A		destilada à pressão reduzida (P.E. = 81 °C, 14 mmHg) antes do uso
2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolino-6- sulfonato) de amônio	ABTS	S-A		
ácido 6-hidróxi-2,5,7,8- tetrametilcromano-2- carboxílico	Trolox	S-A		
ácido acético	AcOH	S-A		
ácido fórmico	HCO ₂ H	Fluka		
iodeto de metila	CH ₃ I	S-A		
rodamina B		S-A		

ácido bórico	H ₃ BO ₃	S-A	
ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	S-A	
fosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	S-A	
fosfato monossódico	NaH ₂ PO ₄	S-A	
ácido clorídrico	HCl	S-A	37%
hidróxido de sódio	NaOH	Synth	
hidróxido de amônio	NH ₄ OH	S-A	27%
carbonato de potássio	K ₂ CO ₃	S-A	
cloreto de potássio	KCl	S-A	
cloreto de sódio	NaCl	S-A	
persulfato de potássio	K ₂ S ₂ O ₈	S-A	
ferricianeto de potássio	K ₃ [Fe(CN) ₆]	S-A	

S-A: Sigma-Aldrich.

3.2. Soluções-estoque e tampões

Todas as soluções aquosas foram preparadas em água deionizada com resistividade em temperatura ambiente $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

3.2.1. Gerais

- *Solução aquosa de cloreto de potássio (KCl, 0,1 mol L⁻¹):* o sal (0,746 g) foi dissolvido em água (100 mL) em um balão volumétrico e a solução foi armazenada em temperatura ambiente.
- *Solução aquosa de ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆], 0,1 mol L⁻¹):* o sal (0,329 g) foi dissolvido em solução aquosa de KCl 0,1 mol L⁻¹ (100 mL) em um balão volumétrico e a solução foi armazenada em temperatura ambiente, protegida da luz.

- *Solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH, 0,2 mol L⁻¹):* pastilhas da base (0,8 g) foram dissolvidas em água (100 mL) em um balão volumétrico e a solução foi armazenada em frasco plástico.
- *Tampão fosfato salino (PBS, phosphate buffered saline, 10 mmol L⁻¹, pH = 7,4):* NaH₂PO₄ (0,240 g) e Na₂HPO₄ (0,284 g) foram separadamente dissolvidos em água (200 mL cada) em balões volumétricos. Um estoque de 300 mL de PBS 10 mmol L⁻¹ (força iônica (μ) = 22 mmol L⁻¹) foi preparado misturando as duas soluções na proporção aproximada de 3:2 v/v ou até que o pH atingisse o valor de 7,4.
- *Tampão fosfato salino (PBS, pH = 7,4, várias concentrações):* a solução estoque de PBS (10 mL e 50 mL) foi diluída em água (100 mL) em um balão volumétrico para preparar, respectivamente, o tampão nas concentrações de 1 mmol L⁻¹ e 5 mmol L⁻¹.
- *Tampão fosfato salino (PBS, 50 mmol L⁻¹, pH = 7,4, várias forças iônicas):* a solução estoque de PBS (50 mL) foi diluída em água (100 mL) em um balão volumétrico. Para ajuste de força iônica, NaCl (0,028; 0,078; 0,178 g) foi dissolvido no tampão (100 mL cada), obtendo-se respectivamente forças iônicas de 2,5, 5,0 e 10 mmol L⁻¹.
- *Tampão Britton-Robinson (acetato-fosfato-borato, tpBR, 40 mmol L⁻¹, vários pHs):* H₃BO₃ (0,247 g), CH₃COOH (231 μ L) e H₃PO₄ (274 μ L) foram todos dissolvidos ou diluídos em água (100 mL) em um balão volumétrico. Uma solução de NaOH (0,2 mol L⁻¹) foi gotejada ajustando-se o pH para valores que variaram entre 3 e 7. O pH de soluções tamponadas com tpBR foi aferido antes e depois do uso com um pHmetro.

3.2.2. Método TEAC

- *2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) de amônio (ABTS, 7 mmol L⁻¹):* o sal (0,384 g) foi dissolvido em água (100 mL) em um balão volumétrico. A solução foi mantida a 5 °C, protegida da luz e sem agitação, e renovada a cada semana.
- *Solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈, 140 mmol L⁻¹):* o sal (0,038 g) foi dissolvido em água (10 mL) em um balão volumétrico. A solução foi mantida por no máximo um mês em temperatura ambiente e protegida da luz.
- *Solução-estoque de ABTS^{*+}:* à solução de ABTS (5 mL, 7 mmol), adicionaram-se 88 µL da solução-estoque de K₂S₂O₈ (140 mmol). A mistura azulada foi mantida protegida da luz e em temperatura ambiente por 16 h até seu uso.
- *Solução de ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox, 0,1 mmol L⁻¹):* o antioxidante de referência (0,001 g) foi dissolvido em EtOH (50 mL) no momento do ensaio. A solução foi mantida refrigerada.
- *Solução aquosa de betalaína:* uma quantidade de betalaína purificada e liofilizada foi dissolvida em tampão Britton-Robinson com pH = 6. Esta solução foi diluída (10×), o espectro de absorção foi registrado e a concentração foi determinada com base nas respectivas absorvidades molares. A solução foi mantida refrigerada durante o ensaio e descartada em seguida.

3.2.3. Rendimento quântico de fluorescência

- *Solução estoque de rodamina B:* rodamina B (1 mg) foi dissolvida em EtOH (1 mL) e diluída para fornecer um valor máximo de absorção de ~ 0,5.

3.2.4. Cromatografia

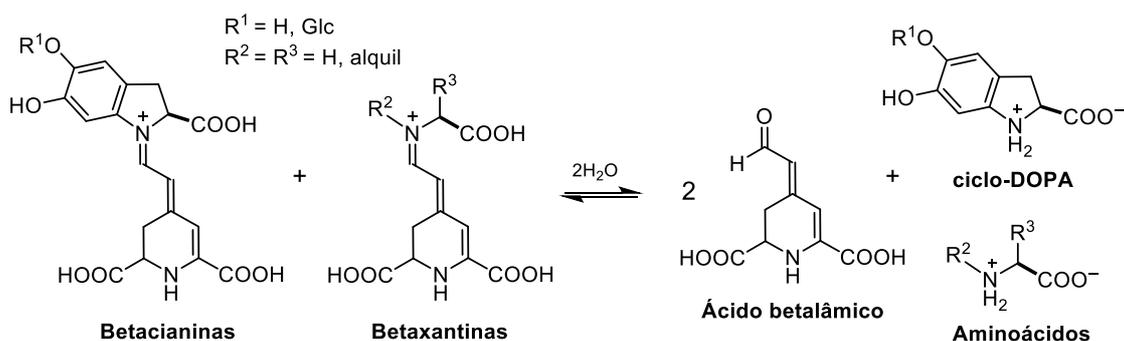
- *Solvente A 0,05% HCO₂H/H₂O*: HCO₂H (125 µL) foi diluído em água deionizada (250 mL). A solução foi agitada em banho ultrassônico por 15 min antes do uso.
- *Solvente A 0,1% HCO₂H/H₂O*: HCO₂H (1 mL) foi diluído em água deionizada (1 L). A solução foi agitada em banho ultrassônico por 15 min antes do uso.
- *Solvente B 0,05% HCO₂H e 90% MeCN/H₂O*: HCO₂H (125 µL) foi diluído em uma mistura de MeCN (225 mL) e água deionizada (25 mL) avolumadas separadamente. A solução foi agitada em banho ultrassônico por 15 min antes do uso.
- *Solvente B 0,1% HCO₂H e 90% MeCN/H₂O*: HCO₂H (500 µL) foi diluído em uma mistura de MeCN (450 mL) e água deionizada (50 mL) avolumadas separadamente. A solução foi agitada em banho ultrassônico por 15 min antes do uso.

3.3. Semissíntese de betalínas

3.3.1. Extração de ácido betalâmico

Beterrabas frescas (em média 10 unidades) foram lavadas e processadas em uma centrífuga de alimentos tipo *juicer* (Philips-Walita, modelo RI1855). A suspensão (ca. 500 mL) foi filtrada em um coador de pano, mantida sob agitação mecânica (ca. 500 rpm) e resfriada a 10 °C. O pH da suspensão foi levado a 11,4 com a adição de hidróxido de amônio concentrado (NH₄OH 28%). A reação (Esquema 5) foi deixada até que a coloração mudasse de vinho para amarelo-esverdeado (ca. 60 min). Em seguida, a suspensão foi resfriada a 5 °C com um banho de CO₂(s)/EtOH, e ácido clorídrico concentrado (HCl 37%) foi adicionado até que o pH atingisse o valor de 1,5 a 2. Duas

extrações com acetato de etila (ca. 50 mL, ou 10% do volume inicial), foram feitas; a fase orgânica formou uma emulsão (ca. 90 mL), que foi centrifugada em tubos cônicos de poli(propileno) (7000 ×g, 5 °C, 2 min). A fase orgânica de cor amarela recolhida foi levada a -80 °C e filtrada a vácuo rapidamente para remoção de excesso de água e sais..



Esquema 5. Equilíbrio de hidrólise da mistura de betalainas oriundas de *Beta vulgaris*. Os contraíons não são mostrados para maior clareza.

3.3.2. N-Metilação de *m*-aminofenol

Conforme procedimento descrito na literatura,^[35] uma mistura de *m*-aminofenol (2 mmol, 0,218 g) e carbonato de potássio (2 mmol, 0,276 g) foi adicionada a um balão flambado e saturado com N₂. Por último, foram adicionados DMF seco (20 mL) e iodeto de metila (1,1 mmol, 132 μL) (Esquema 6). A reação foi mantida sob agitação magnética, temperatura ambiente e fluxo de N₂, e foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (sílica gel, heptanos/AcOEt 2:1 v/v). Ao final de 12 h, o DMF foi evaporado à pressão reduzida (10 mmHg, 50 °C); água (20 mL) foi adicionada e o produto foi extraído com AcOEt (2 × 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas com MgSO₄ e o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, (heptanos/AcOEt 2:1 v/v). O rendimento da preparação foi de 46% (0,91 mmol, 0,998 g) após a purificação.

3.4. Purificação das betalaínas

Empregou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa (Agilent 1260 Infinity) e uma coluna Luna C18 fase reversa (25 cm x 10 mm, 5 μ m, Phenomenex[®]), na seguinte condição: corrida isocrática com 20-30% de B (0,1% HCO₂H e 90% MeCN/H₂O) em A (0,1% HCO₂H/H₂O), dependendo da betalaína; fluxo de 3 mL min⁻¹. A corrida foi acompanhada por detecção espectrofotométrica com grade de diodo em 254, 400 e 500 nm e a fração de interesse foi coletada manualmente e congelada imediatamente, para então ser liofilizada e o sólido resultante, armazenado a -20 °C.

3.5. Caracterização estrutural

3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

Empregou-se um cromatógrafo Prominence LC-20AD (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas Esquire HCT Plus Bruker Daltonics operando em modo alternado e a um detector Prominence SPD-M20A (Shimadzu). Condições da corrida: coluna Kinetex EVO C18 de fase reversa (150 × 4,6 mm, 5 μ m, Phenomenex[®]), gradiente de 5 - 20% B (0 - 8 min) e 20-50% B (8 - 10 min); solvente A: 0,05% HCO₂H em água; solvente B: 90% MeCN e 0,05% HCO₂H em água; fluxo de 0,3 mL min⁻¹. A temperatura do vaporizador foi de 325 °C e a voltagem foi estabelecida em 4 kV.

3.5.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As betalaínas purificadas e liofilizadas (~3 mg) foram dissolvidas em metanol-*d*₄ (700 μ L) e analisadas por experimentos de ressonância magnética nuclear (¹H, ¹H,¹H-COSY e ¹H,¹³C-HMBC), realizados na Central Analítica do IQ-USP em um espectrômetro Bruker AIII500 operando a uma frequência de 500 MHz para ¹H-RMN

(campo de 11,7 T). O deslocamento químico foi determinado em relação ao sinal de TMS. Oito experimentos foram conduzidos em sequência, ao longo de 10 h, a partir da mesma amostra, e espectros de ^1H foram obtidos antes e depois de cada um dos experimentos bidimensionais para verificar o estado da amostra.

3.6. Caracterização fotofísica

3.6.1. Espectroscopia de absorção e emissão

Espectros de absorção e emissão foram obtidos em meio aquoso tamponado (tampão BR, pH = 6) empregando-se celas de quartzo (caminho ótico de 10 mm, 1,5 mL), com o auxílio de um espectrofotômetro Varian Cary 50Bio e de um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, respectivamente. Os espectros foram usados para calcular os deslocamentos de Stokes ($\Delta\lambda$, diferença entre os máximos de fluorescência e absorção) e as energias singlete ($E_{0,0}$, comprimento de onda em que ocorre intersecção entre os espectros de absorção e emissão).

3.6.2. Coeficiente de atenuação molar

O coeficiente de atenuação molar (ϵ) é a constante que relaciona absorção de uma solução à sua concentração na Lei de Beer-Lambert (Eq. 1).

$$A^\lambda = \epsilon^\lambda bc \quad (1)$$

onde A^λ é absorção num comprimento de onda, ϵ^λ é o coeficiente de atenuação molar nesse mesmo comprimento, b é o caminho ótico da cubeta e c é a concentração de cromóforo em solução.

O coeficiente de atenuação molar pode ser calculado medindo-se a absorção de uma solução de concentração conhecida. Soluções de betalaínas preparadas a partir da dissolução de uma quantidade de pó não têm concentração conhecida porque a massa molar exata do sal de imínio depende dos contraíons. Alternativamente, ϵ pode ser

determinado por um método de ponto final, em que a concentração inicial da solução de betalaína é inferida a partir da sua transformação (hidrólise) em outro composto (HBt) cuja concentração pode ser determinada. A Figura 2 ilustra a conversão de betalaína em ácido betalâmico, evidenciando as variações de concentração ao longo do tempo. A concentração de HBt formado é estequiométrica em relação à concentração de betalaína consumida (1:1) e pode ser determinada porque seu $\epsilon^{424 \text{ nm}}$ é conhecido.

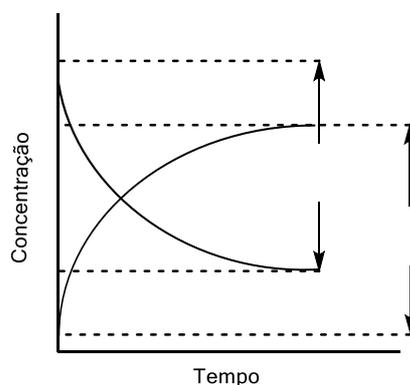


Figura 2. Curva ilustrativa da evolução da concentração das espécies na reação de hidrólise. A concentração de betalaína e a de HBt variam na mesma proporção.

Como a concentração de betalaína não é conhecida, a curva da Figura 2 foi construída substituindo-se concentração por absorção em $\lambda^{\text{máx}}$, já que são grandezas proporcionais. Primeiro, uma solução de betalaína foi preparada em tpBR de pH = 6 e teve seu espectro de absorção registrado. Depois, essa solução foi reproduzida em água, mas com o pH levado a 11 com NaOH antes da adição de alíquota da solução estoque de betalaína. Nos casos em que em pH = 11 a reação de hidrólise foi muito rápida para ser monitorada, usou-se a condição mais branda de pH = 7. A cinética de hidrólise até HBt foi acompanhada no espectrofotômetro. A linha base foi corrigida pela absorção em 700 nm e curvas de absorção no $\lambda^{\text{máx}}$ da betalaína e da absorção em 424 nm ($\lambda^{\text{máx}}$ de HBt) *versus* tempo foram construídas. Os dados foram ajustados por uma equação

mono-exponencial da forma $y = y_0 + Ae^{-kt}$. O coeficiente de atenuação molar foi calculado pela Equação 2.

$$\varepsilon_{bet}^{\lambda_i} = \varepsilon_{HBt}^{424} \frac{A_{bet,0}^{\lambda_i} - A_{bet,\infty}^{\lambda_i}}{A_{HBt,\infty}^{424}} \quad (2)$$

onde $A_{bet,0}^{\lambda_i}$ é a absorção inicial da solução de betalaína em seu $\lambda^{\text{máx}}$, $A_{bet,\infty}^{\lambda_i}$ é a absorção em "tempo infinito" no máximo da betalaína e $A_{HBt,\infty}^{424}$ é a absorção em tempo infinito no máximo de HBt; Os dois últimos valores foram obtidos como o *offset* y_0 dos ajustes mono-exponenciais e $\varepsilon_{HBt} = 26500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.6.3. Rendimento quântico de fluorescência

Três soluções de betalaína em tampão foram preparadas e tiveram sua absorção em $\lambda^{\text{máx}}$ aferida (ca. 0,5). Cada solução foi diluída $10\times$ e excitada em 490 nm (fenda de emissão e fenda de excitação em 20 nm, tensão da fotomultiplicadora em 600 V). O padrão de fluorescência escolhido foi uma solução alcóolica de rodamina B, compatível com as bandas de absorção e emissão das betalaínas estudadas. Sua absorção em $\lambda^{\text{máx}}$ também foi ajustada para ca. 0,5 e a solução foi diluída $1000\times$ antes de ser excitada em 490 nm. O rendimento quântico de fluorescência da betalaína (Φ_{FI}^i) foi calculado como uma média das três medidas, considerando a área de emissão normalizada pela intensidade de absorção, conforme descrito na Equação 3.^[36]

$$\Phi_{FI}^i = \Phi_{FI}^s \frac{F^i f^s (n_D^i)^2}{F^s f^i (n_D^s)^2} \quad (3)$$

onde F^i e F^s denotam a intensidade de emissão integrada da amostra e do padrão, respectivamente; f^i e f^s denotam a absorção da solução de betalaína e do padrão em λ_{exc} (calculada a partir da diluição); n_D^i e n_D^s são os índices de refração dos solventes e, por fim, Φ_{FI}^s é o rendimento quântico de fluorescência do padrão. Considerou-se um índice

de refração de 1,3325 para a solução de amostra, e de 1,3616 para o padrão de rodamina B em etanol. O rendimento quântico de fluorescência do padrão é de 0,5 em etanol, $T_{\text{amb}} = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ a } 565 \text{ nm}$.^[37]

3.7. Determinação da estabilidade em solução aquosa

Soluções de betalaína em tpBR (pH = 3 a 7, 40 mmol L⁻¹) tiveram o espectro de absorção registrado até que a absorção em $\lambda^{\text{máx}}$ caísse para < 25% do valor inicial (*i.e.*, duas meia-vidas). O monitoramento foi feito usando um porta cubetas com capacidade para 18 celas, termostatizado em 25 °C com um acessório Peltier ou banho termostático Lauda RP845, e cubetas de acrílico de 3,5 mL de volume total. A linha base foi corrigida considerando-se a absorção em 700 nm e o valor de absorção em $\lambda^{\text{máx}}$ em função do tempo foi ajustado empregando-se um modelo de mono ou biexponencial com y_0 fixo em zero.

3.8. Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica

Experimentos de voltametria cíclica foram conduzidos empregando-se um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT101 (Metrohm). As medidas foram realizadas com um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo (diâmetro do disco = 2 mm); contra-eletrodo de fio de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl, KCl sat. A velocidade de varredura foi fixada em 50 mV s⁻¹ e o potencial foi varrido entre -1 e +1 V num primeiro momento e depois entre 0 e +1 V. Quando necessário, a janela de potencial foi ampliada e brancos de tpBR em cada pH foram feitos nas condições correspondentes. Foram usadas soluções estoque concentradas de betalaína ($3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), que eram diluídas em solução tampão para a concentração final de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aferida espectrofotometricamente.

Todas as medidas foram alternadas com o seguinte procedimento: (i) polimento do eletrodo de trabalho com alumina depositada em um pedaço de feltro umedecido – 60 ciclos de movimentos em forma de "8" eram realizados, com partículas de alumina de 1, 0,3 e 0,05 μm de diâmetro, respectivamente; (ii) enxague do eletrodo com água e banho ultrassônico por 1 min; (iii) voltamograma de solução "padrão" de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,1 mol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} (velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , janela de potencial de 0 a +0,5 V). Antes de prosseguir para o próximo composto ou para o próximo pH, garantiu-se que o eletrodo de trabalho estivesse em condições idênticas às iniciais, comparando o voltamograma da solução de ferricianeto de potássio com a medida realizada antes de iniciar os ensaios.

A razão entre prótons e elétrons envolvidos na oxidação (v/n) foi determinada a partir de um gráfico de Nernst, construído colocando os potenciais de pico anódicos e catódicos em função do pH. Quando os processos estão acoplados, a constante de equilíbrio redox embute a concentração de prótons, e obtém-se uma curva linear, cujo coeficiente angular é proporcional a v/n (Equações 6 e 7).

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (4)$$

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln(Q' [\text{H}^+]^v) = E^\circ - \frac{vRT}{nF} \ln(Q') \quad (5)$$

onde E é o potencial medido, E° é o potencial padrão, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura em K e F é a constante de Faraday ($RT/F = 59 \text{ mV}$). v é o número de prótons transferidos; n é o número de elétrons e Q designa o quociente de reação.

3.9. Determinação da capacidade antirradicalar com o método ABTS

3.9.1. Estudos com o método ABTS

Uma solução estoque do cátion-radical do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS^{•+}), preparada com 16 h de antecedência, foi diluída em diversas condições de concentração, pH, força iônica (μ) e capacidade do tampão (Tabela 2), sempre na ausência de antioxidante externo, e monitorada ao longo do tempo no espectrofotômetro^[38].

Tabela 2. Condições usadas no estudo do decaimento natural do cátion-radical.

Exp.	Parâmetro fixado	Parâmetro variado	Valores		
1	Meio (água)	Absorção inicial em 734 nm	0,2	0,7	0,9
2	Concentração de ABTS ^{•+} (Abs ^{734 nm} = 0,7)	Concentração do PBS (mmol L ⁻¹)	1	5	10
3	Concentração do PBS (5 mmol L ⁻¹)	Força iônica do PBS (μ , mmol L ⁻¹) ^a	25	50	100
4	Concentração do tpBR (40 mmol L ⁻¹)	pH	3 a 7		

^a Força iônica ajustada com NaCl.

3.9.2. Quantificação da capacidade antirradicalar

Uma solução estoque do cátion-radical do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS^{•+}), preparada com 16 h de antecedência, foi diluída em tpBR de vários pHs (3 a 7) até atingir 46,7 μ mol L⁻¹, concentração aferida espectrofotometricamente.^[38] A solução resultante foi adicionada em uma microplaca de 96 poços (fundo plano, transparente, capacidade de 300 μ L), termostalizada a 25 °C, conforme a Figura 3. O caminho ótico no poço foi calculado como 8 mm. Programa cinético de leitura (leitor de microplaca TECAN M200): i) leitura inicial em 734 nm (e 1000 nm como referência), ii) ejeção da placa e adição do antioxidante nos poços (Trolox: 0,5 a 4 μ mol L⁻¹; betalaína: 0,3 a 1,5 μ mol L⁻¹), iii) mistura dos reagentes e homogeneização do menisco, recolhendo e devolvendo o volume do poço com uma

ponteira limpa 2× e iv) reintrodução da placa e ciclos de leitura de 3 em 3 min, durante 120 min.

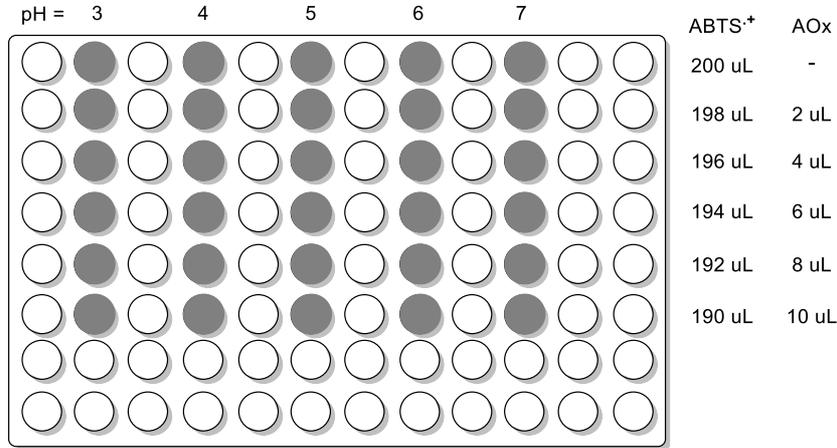


Figura 3. Micro-placa utilizada para o ensaio ABTS/TEAC. Os volumes informados são de solução de radical já em tpBR; após a leitura inicial, eles foram completados para 200 μ L com adição do antioxidante (AOx). Cada coluna refere-se a um pH e cada linha, a uma concentração final de antioxidante. Os poços em cinza são os utilizados por leitura.

A variação relativa da absorção em 734 nm antes e após reação com o antirradical foi determinada sempre em relação ao controle sem betalaína com o emprego da Eq. 8.

$$\Delta A^{rel} = \frac{A_x^0 - A_x^t}{A_x^0} - \frac{A_c^0 - A_c^t}{A_c^0} - \Delta d \quad (6)$$

onde A_x^0 é a absorção (em 734 nm) inicial da solução de cátion-radical, A_x^t é a absorção da solução após tempo t de adição do antioxidante, A_c^0 é a absorção inicial da solução controle de cátion-radical e A_c^t é a absorção da solução após tempo t . Δd é a variação de absorção decorrente da diluição quando da adição de cada um dos volumes de antioxidante e foi calculada como $\Delta d = v/200$, onde v é o volume adicionado ao poço em μ L.

Os valores foram colocados em função da concentração de antirradical no poço e ajustados por regressão linear. O coeficiente angular dessa curva (α_{AOx}), dividido pelo coeficiente angular obtido com Trolox nas mesmas condições (α_{Trolox}), é a capacidade antirradicalar em equivalentes de Trolox, TEAC, determinada para cada pH (3 a 7) e para quatro tempos de reação (6 min, como no protocolo original, e também 30, 60 e 120 min) (Eq. 9).

$$TEAC_{AOx} = \frac{\alpha_{AOx}}{\alpha_{Trolox}} \quad (7)$$

3.9.3. Caracterização dos produtos da reação com ABTS^{•+}

Misturas reacionais semelhantes às do ensaio TEAC/ABTS foram analisadas por HPLC-DAD-ESI(±)-MS. Uma solução estoque 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de betalaína (20 μL) e um estoque 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cátion-radical ABTS^{•+} (20 μL) foram preparados e adicionados a tpBR (200 μL). A injeção na coluna cromatográfica foi feita após 6, 30, 60 e 120 min de mistura. Controles das soluções-tampão, das betalaínas puras em tpBR e de cátion-radical e seu precursor foram injetados automaticamente.

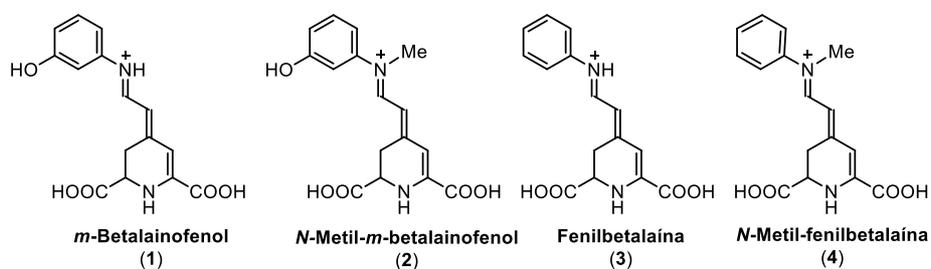
Empregou-se o mesmo sistema cromatográfico da etapa de caracterização das betalaínas semissintetizadas. Os produtos detectados foram submetidos à análise por HPLC-DAD-ESI(+)-MS/MS, realizada nas condições de corrida cromatográfica supracitadas. Condições da fragmentação: pressão de gás nebulizante: 35 psi; fluxo de gás secante: 6 L min^{-1} , 220 °C); voltagem do capilar: 4 kV (modo *smart frag*); detector no modo positivo (ESI+).

4. Resultados

Os resultados serão apresentados na seguinte sequência: semissíntese, purificação e caracterização estrutural das betalaínas **1** a **4** (4.1), caracterização fotofísica (4.2), estabilidade em solução aquosa (4.3), determinação da capacidade antirradicalar (4.4) e determinação das propriedades redox (4.5).

4.1. Semissíntese de betalaínas anilínicas

Foi proposto o estudo de quatro betalaínas não-naturais que resultam do acoplamento aldimínico entre o ácido betalâmico e anilinas (Esquema 8). Destas, *N*-metil-*m*-betalainofenol (**2**) é inédita, *m*-betalainofenol (**1**) foi preparada anteriormente no grupo e fenilbetalaína e *N*-metil-fenilbetalaína já foram descritas na literatura,^[27,39] embora não tenham sido caracterizadas.



Esquema 8. Série de betalaínas semissintéticas proposta que permite o estudo de relações estrutura-propriedade.

Para a semissíntese de betalaínas é necessário obter ácido betalâmico (HBt) e purificá-lo. Para isso, modificamos o método descrito na literatura^[25] de forma a aumentar a sua escala e diminuir as etapas de processamento. Suco de beterraba bruto (500 g) foi hidrolisado com NH_4OH (pH = 11,4) e acidificado até pH = 2 com HCl concentrado, sob temperatura de 5 °C; em seguida realizou-se extração do HBt com

AcOEt. Ácido betalâmico foi obtido em concentração média próxima a $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$,^b perfazendo um rendimento médio de aproximadamente 10%, calculado em relação ao conteúdo de betanina do suco ($\epsilon^{536 \text{ nm}} = 65000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[40] A Figura 4 apresenta a diferença entre o perfil de absorção do suco de beterraba bruto ($\lambda^{\text{máx}} = 536 \text{ nm}$ com ombro em 480 nm) e do ácido betalâmico extraído em acetato de etila acidificado ($\lambda^{\text{máx}} = 380 \text{ nm}$).

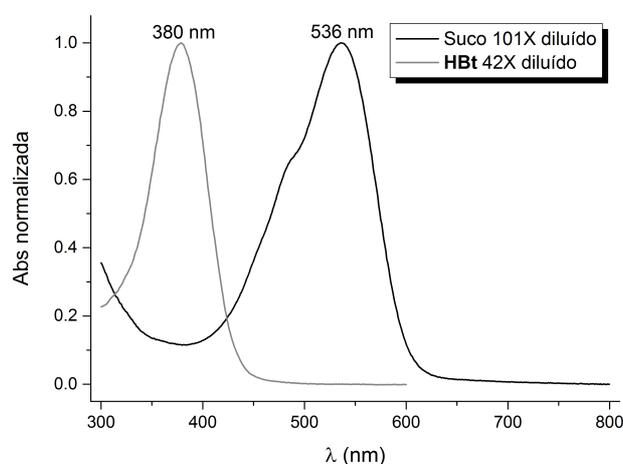


Figura 4. Perfil de absorção de suco de beterrabas vermelhas (após filtração) e do ácido betalâmico extraído em acetato de etila.

As reações de semissíntese foram feitas adicionando-se, sob agitação e em temperatura ambiente, um excesso (10 equiv) das aminas ao ácido betalâmico em acetato de etila. A reação é praticamente instantânea (menos de 5 min) e é evidenciada pela mudança de cor do amarelo característico do ácido betalâmico para vermelho (**2** e **4**) ou magenta (**1** e **3**). Após resfriamento observa-se a formação de corpo de fundo que foi centrifugado e lavado com acetato de etila para retirada do excesso de amina. Os compostos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em condições de fase reversa e escala semi-preparativa. A análise cromatográfica das amostras

^b Estimada considerando-se $\epsilon^{424 \text{ nm}} = 2,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor da literatura para meio aquoso.^[79]

(Figura 5) indica que os compostos foram obtidos com alto grau de pureza e que a ordem de eluição nas condições empregadas é *m*-betalainofenol (**1**), *N*-metil-*m*-betalainofenol (**2**), fenilbetalaína (**3**) e *N*-metil-fenilbetalaína (**4**).

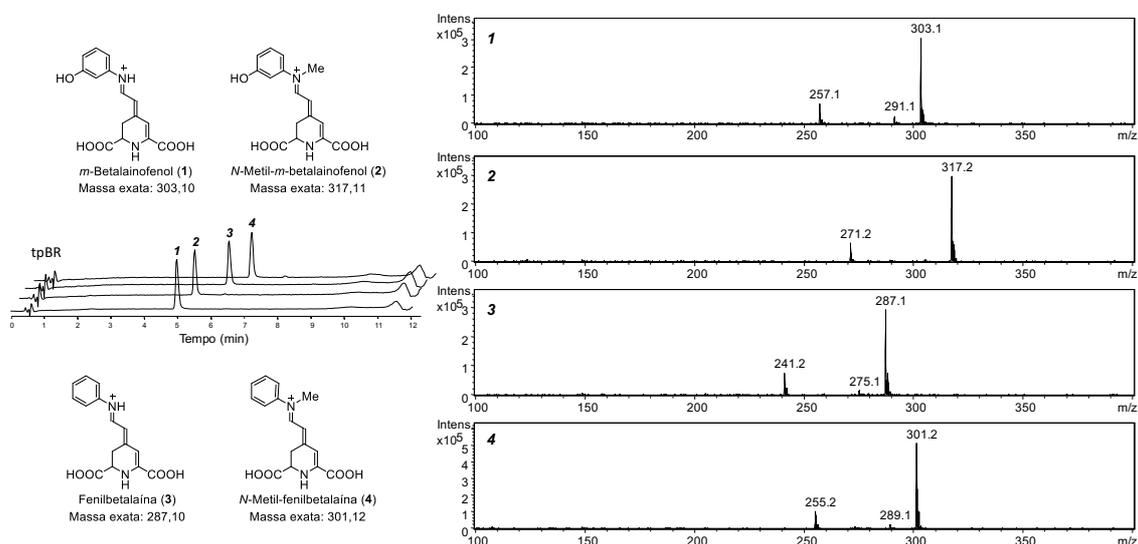


Figura 5. Estruturas, cromatogramas (254 nm) e espectro de massas de amostras das quatro betalainas preparadas e purificadas. Coluna C18 de fase reversa Kinetex EVO C18 de fase reversa (150 x 4,6 mm, 5 μ m, Phenomenex[®]), gradiente de 5-20% B (0-8 min) e 20-50% B (8-10 min); A: 0,05% HCO₂H/água; B: 60% MeCN e 0,05% HCO₂H/água; 0,3 mL min⁻¹.

Em seguida, os compostos foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por elétron-spray em modo positivo (HPLC-MS(ESI+)), resultados também apresentados no Figura 5. Os íons quasi-moleculares ($[M+H]^+$) de **1** e **3** têm relação massa/carga (m/z) esperada, 303,1 (C₁₅H₁₄N₂O₅, M = 302,09) e 287,1 (C₁₅H₁₄N₂O₄, M = 286,10), respectivamente. Os íons moleculares ($[M]^+$) de **2** e **4**, as betalainas catiônicas preparadas, têm m/z em 317,2 (C₁₆H₁₇N₂O₅⁺, M = 317,11) e 301,2 (C₁₆H₁₇N₂O₄⁺, M = 301,12), também de acordo com o esperado. Os quatro espectros de massa apresentam fragmentos de m/z 46 unidades abaixo do pico (quasi)molecular.

Proseguiu-se com a caracterização dos compostos por espectroscopia de RMN. Os espectros de ^1H foram obtidos em um espectrômetro de 500 MHz, com soluções contendo cerca de 3 mg em 600 μL de metanol deuterado que foram centrifugadas antes da análise para remover o corpo de fundo. Os primeiros espectros registrados, imediatamente após a solubilização, são apresentados na Figura 6. Os espectros completos e ampliações, bem como os espectros 2D, são apresentados nos Anexos 8.1 a 8.16.

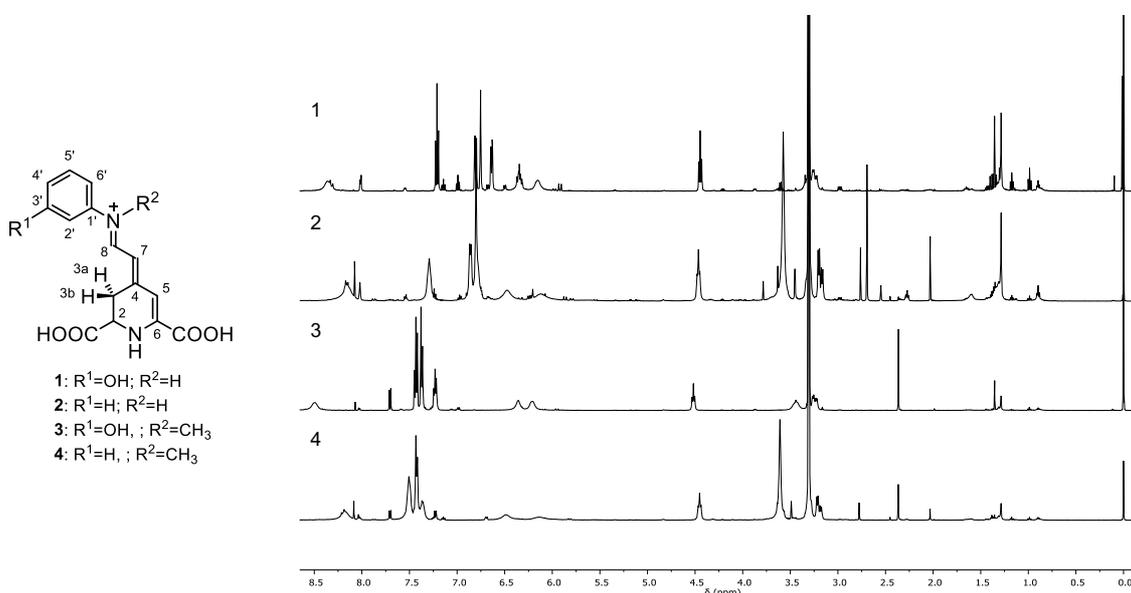


Figura 6. Espectros de ^1H -RMN das betalainas purificadas, obtidos em espectrômetro Brooker AIII500, frequência de 500 MHz, em metanol- d_4 . Sinais de solvente: δ (CH_3OH) = 3,34 ppm; δ (CH_3CN) = 2,03 ppm; δ (AcOEt, CH_3O) = 2,01 ppm; δ (AcOEt, CH_2CH_3) = 1,24 ppm.^[41]

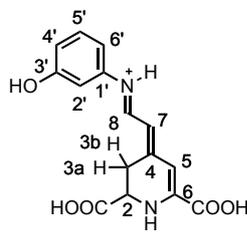
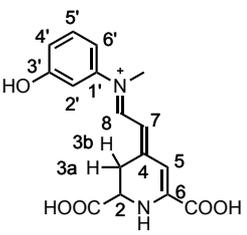
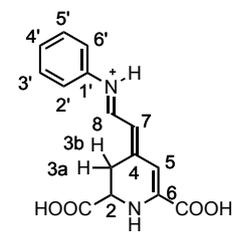
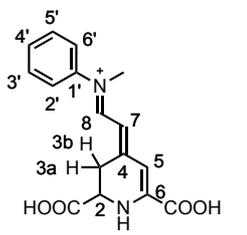
Todos os espectros, em especial os de **2** e **4**, apresentaram sinais alargados, mas os sinais típicos de betalainas (H-2, H-3, H-5, H-7 e H-8) foram encontrados. Observaram-se diferenças sistemáticas entre as betalainas metiladas e as não metiladas. O sinal de H-8 é mais desblindado nas betalainas não metiladas: deslocamento químico (δ) de 8,36 ppm para **1** e 8,50 ppm para **3**, enquanto para **2** e **4** δ é 8,15 e 8,18 ppm, respectivamente. Os sinais de H-5 e H-7 são mais definidos para **1** e **3**, mas as

constantes de acoplamento também não puderam ser determinadas. As betalaínas metiladas têm H-5 mais desblindado e H-7 mais blindado em relação às não-metiladas.

Os hidrogênios H-3a/H-3b são ligeiramente desblindados em **1** e **3** (3,23/3,26 ppm em ambos), ficando mais sobrepostos com o sinal do solvente (metanol-*d*₄, 3,34 ppm). Em **2** e **4**, H-3a/H-3b estão em δ 3,17/3,20 ppm (**2**) e 3,18/3,22 ppm (**4**). H-2 de **1** produz um sinal tripleto em 4,45 ppm, que se mantém para **2** (4,46 ppm) e **4** (4,45 ppm) e cai em 4,52 ppm para **3**. O sinal de H-2 não sofre alterações sistemáticas nem com a *N*-metilação, nem com a hidroxilação. A região aromática apresenta mais diferenças entre as betalaínas fenólicas (**1** e **2**) e não fenólicas (**3** e **4**), sendo que os hidrogênios estão mais desblindados em **3** e **4**. As correlações detectadas no espectro de ¹H,¹H-COSY contribuíram para a atribuição dos sinais.

A Tabela 3 contém um resumo dos resultados da caracterização estrutural. Algumas constantes de acoplamento que deveriam ser iguais (como ³*J*_{2,3} e ³*J*_{3,2}) são apresentadas com valores diferentes, como foi obtido diretamente do tratamento dos espectros.

Tabela 3. Deslocamentos químicos (δ , em relação a TMS) e constantes de acoplamento (3J) dos hidrogênios das quatro betalainas.

H	δ (ppm)			
	1	2	3	4
				
H-2	4,45 (1H, <i>t</i>) $^3J_{2,3a} = 7,9$ Hz $^3J_{2,3b} = 7,9$ Hz	4,46 (1H, <i>t</i>) $^3J_{2,3a} = 7,6$ Hz $^3J_{2,3b} = 7,6$ Hz	4,52 (1H, <i>t</i>) $^3J_{2,3a} = 7,2$ Hz $^3J_{2,3b} = 7,2$ Hz	4,45 (1H, <i>t</i>) $^3J_{2,3a} = 7,5$ Hz $^3J_{2,3b} = 7,5$ Hz
H-3a	3,23 (1H, <i>d</i>) $^3J_{3a,2} = 4,7$ Hz	3,17 (1H, <i>d</i>) $^3J_{3a,2} = 7,6$ Hz	3,23 (1H, <i>d</i>) $^3J_{3a,2} = 5,6$ Hz	3,18 (1H, <i>d</i>) $^3J_{3a,2} = 7,8$ Hz
H-3b	3,26 (1H, <i>d</i>) $^3J_{3b,2} = 6,7$ Hz	3,20 (1H, <i>d</i>) $^3J_{3b,2} = 7,6$ Hz	3,26 (1H, <i>d</i>) $^3J_{3b,2} = 7,0$ Hz	3,22 (1H, <i>d</i>) $^3J_{3b,2} = 7,5$ Hz
H-5	6,35 (1H, <i>bs</i>)	6,47 (1H, <i>bs</i>)	6,36 (1H, <i>bs</i>)	6,49 (1H, <i>bs</i>)
H-7	6,16 (1H, <i>bs</i>)	6,12 (1H, <i>bs</i>)	6,21 (1H, <i>bs</i>)	6,14 (1H, <i>bs</i>)
H-8	8,36 (1H, <i>bs</i>)	8,15 (1H, <i>bs</i>)	8,50 (1H, <i>bs</i>)	8,18 (1H, <i>bs</i>)
N-CH₃	<i>não se aplica</i>	3,57 (3H, <i>s</i>)	<i>não se aplica</i>	3,61 (3H, <i>s</i>)
H-2'	6,76 (1H, <i>t</i>) $^3J_{2',4'} = 2,2$ Hz $^3J_{2',6'} = 2,2$ Hz	6,80 (2H, <i>bs</i>) <i>sobreposição com H-4'</i>	H-2' e H-6' 7,38 (2H, <i>d</i>) $^3J_{2',3'} = 7,9$ Hz $^3J_{6',5'} = 7,9$ Hz	H-2' e H-6' 7,42 (2H, <i>d</i>) $^3J_{2',3'} = 7,9$ Hz $^3J_{6',5'} = 7,9$ Hz
H-3'	<i>não se aplica</i>	<i>não se aplica</i>	H-3' e H-5' 7,44 (2H, <i>t</i>) $^3J_{3',2'} = ^3J_{5',6'} =$ $^3J_{3',4'} = ^3J_{5',4'} =$ 7,9 Hz	H-3' e H-5' 7,51 (2H, <i>bs</i>)
H-4'	6,64 (1H, <i>dd</i>) $^3J_{4',5'} = 8,1$ Hz $^3J_{4',2'} = 2,2$ Hz $^3J_{4',6'} = 1,8$ Hz	<i>sobreposição com H-2'</i>	7,24 (1H, <i>t</i>) $^3J_{4',3'} = 6,7$ Hz $^3J_{4',5'} = 6,7$ Hz	7,36 (1H, <i>bs</i>)
H-5'	7,21 (1H, <i>t</i>) $^3J_{5',4'} = 8,1$ Hz $^3J_{5',6'} = 8,1$ Hz	7,29 (1H, <i>bs</i>) $^3J_{5',4'} = 8,0$ Hz $^3J_{5',6'} = 8,0$ Hz	<i>veja H-3'</i>	<i>veja H-3'</i>
H-6'	6,81 (1H, <i>dd</i>) $^3J_{6',5'} = 8,1$ Hz $^3J_{6',2'} = 2,2$ Hz $^3J_{6',4'} = 1,8$ Hz	6,86 (1H, <i>d</i>) $^3J_{6',5'} = 8,0$ Hz	<i>veja H-2'</i>	<i>veja H-2'</i>

4.2. Caracterização fotofísica

4.2.1. Absorção no UV-vis e emissão de fluorescência

As amostras purificadas foram submetidas a medidas de espectroscopia de absorção na região UV-vis e emissão de fluorescência. É possível observar visualmente que as soluções aquosas de betalaínas não metiladas (**1** e **3**) são mais vermelhas do que as metiladas (**2** e **4**), que são mais amarelas (Figura 7).

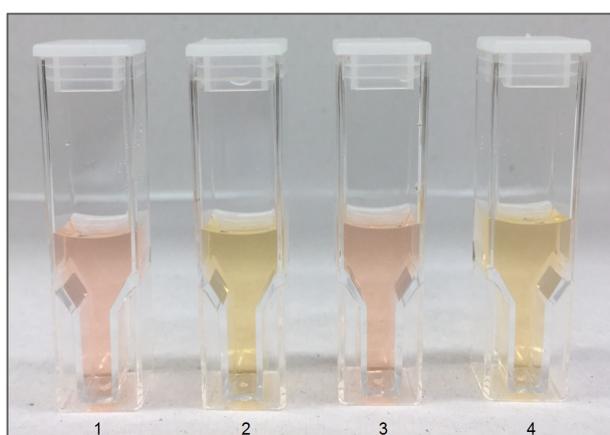


Figura 7. Soluções aquosas das betalaínas semissintetizadas no projeto.

As observações qualitativas de cor foram quantificadas através do registro dos espectros de absorção na região UV-vis; além disso, foram adquiridos os espectros de fluorescência (Figura 8). Observa-se que os compostos não metilados (**1** e **3**) têm máximo de absorção no mesmo comprimento de onda (508 nm) e emissão bastante similar (563 nm e 558 nm para **1** e **3**, respectivamente). Da mesma forma, os compostos *N*-metilados (**2** e **4**) apresentam máximo de absorção em 492 nm e emissão em 550 nm e 553 nm, respectivamente.

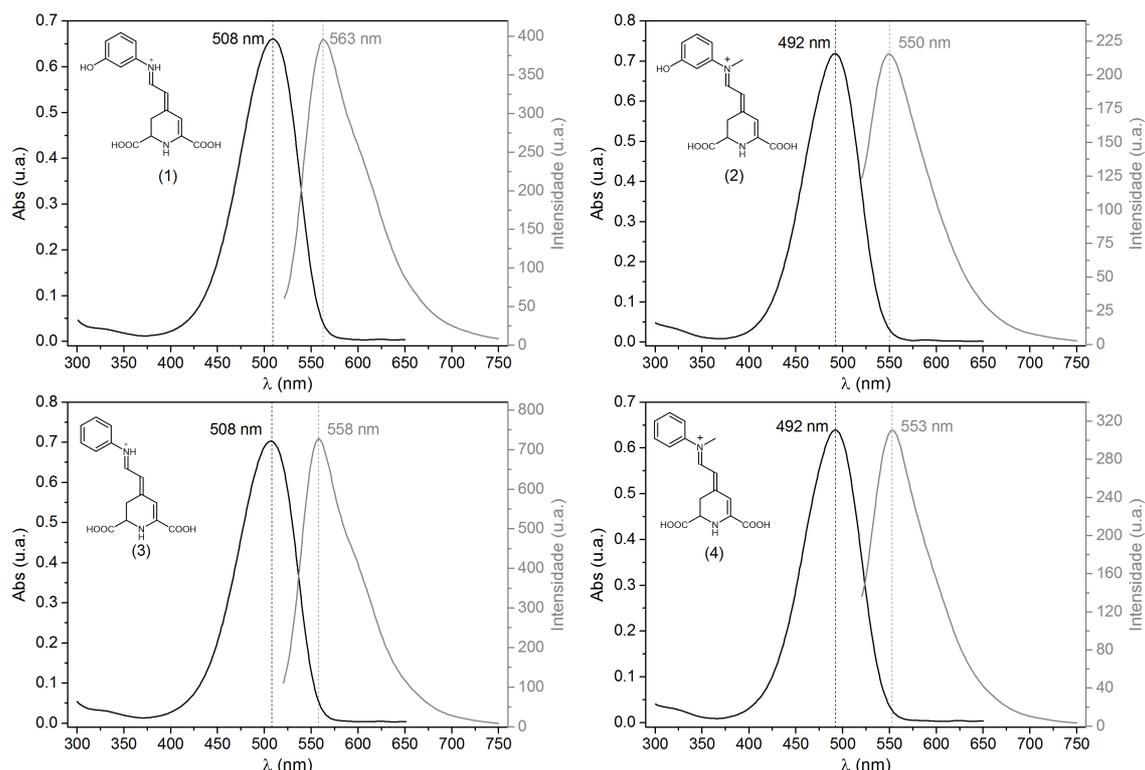


Figura 8. Espectros de absorção e emissão das betalainas **1** a **4** em tpBR 40 mmol L⁻¹, pH = 6. Condições para espectro de emissão: $f_{exc} = f_{em} = 20$ nm, tensão da fotomultiplicadora = 600 V.

4.2.2. Determinação do coeficiente de atenuação molar

No sólido, as betalainas se encontram na forma de sais de imínio, muito higroscópicos e com tendência de formarem filmes sobre o vidro em que foram armazenadas. Como não se sabe a identidade dos contraíons, também não se conhece a massa molar exata da betalaina, de modo que a massa pesada não pode ser relacionada à quantidade molar, mas a absorção da solução, sim. O parâmetro que relaciona absorção e concentração, coeficiente de atenuação molar (ϵ), foi quantificado por um método de ponto final baseado na hidrólise completa de betalaina para a formação estequiométrica de ácido betalâmico, que tem valor de ϵ conhecido. Os espectros de absorção registrados ao longo da hidrólise dos quatro compostos apresentaram um ponto isobéstico, como pode ser visto nos gráficos da Figura 9. Após correção da linha base, os valores de absorção em 424 nm ($\lambda^{m\acute{a}x}$ de HBt) e em 508 nm ($\lambda^{m\acute{a}x}$ de **1** e **3**) ou 490 nm

($\lambda^{\text{máx}}$ de **2** e **4**) foram extraídos e colocados em função do tempo (Figura 9): a absorção em 424 nm não parte de zero e só aumenta com o tempo ($Abs_{\text{final}}^{424\text{nm}}$); a absorção nos outros λ parte de um valor máximo (Abs_{inicial}) e só diminui, mas não chega a zero no tempo do experimento (Abs_{final}). Devido à maior estabilidade frente à hidrólise de **2** e **4** comparada a **1** e **3**, as medidas cinéticas foram feitas em dois pHs diferentes para reduzir o tempo do experimento. Para **2** e **4** empregou-se uma solução com pH = 11, enquanto para **1** e **3** o pH do meio era de 7.

O ajuste exponencial forneceu parâmetros usados no cálculo de ϵ , apresentados na Tabela 4. O valor de $\epsilon_{\text{HBT}}^{424\text{nm}}$ usado como referência foi de $26.500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, conforme calculado anteriormente no grupo por método de ponto final partindo de betanina.^[29]

Tabela 4. Dados usados na determinação do coeficiente de atenuação molar dos compostos.

Bt	$A_i^{\lambda\text{máx}}$	$A_x^{\lambda\text{máx, a}}$	$\Delta A^{\lambda\text{máx}}$	$A_x^{424, a}$	$\epsilon^{\lambda, b}$	pH ^c
1	0,89	0,02	0,87	0,36	64041	7
2	0,82	0,02	0,80	0,35	60571	11
3	0,91	0,03	0,88	0,38	61368	7
4	1,21	0,02	1,19	0,52	60644	11

^a Valores obtidos a partir dos ajustes exponenciais das medidas (y_0). ^b Valor calculado no grupo também por método de ponto final, partindo de betanina, que tem ϵ conhecido. ϵ em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. ^c pH do experimento de hidrólise.

m-Betalainofenol (**1**) foi a que apresentou maior ϵ ($64.041 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), seguido da fenilbetalaína (**3**, $61.368 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). *N*-Metil-*m*-betalainofenol (**2**) e *N*-metil-fenilbetalaína (**4**) apresentaram coeficientes menores e muito próximos (60.571 e $60.644 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente). É importante ressaltar que os valores de ϵ foram usados para ajustar a concentração das soluções estoque de betalaína usadas nos demais ensaios.

4.2.3. Medida do rendimento quântico de fluorescência

Para complementar a caracterização fotofísica, foram determinados os rendimentos quânticos de fluorescência. Soluções das quatro betalaínas foram preparadas em tpBR e seus espectros de fluorescência foram registrados com uma concentração equivalente a $A^{\lambda_{\text{máx}}} = 0,05$, atingida pela diluição de uma solução $10\times$ mais concentrada. A emissão de **1**, **2**, **3** e **4**, quando irradiadas com 490 nm, ocorre, respectivamente, em 563, 550, 558 e 553 nm. Esse e outros dados da caracterização fotofísica são apresentados na Tabela 5.

Observa-se que **1** e **3** têm os maiores valores de Φ_{Fl} , mas ainda são pouco fluorescentes. A energia singlete ($E_{0,0}$) e o deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda$) das betalaínas não metiladas (**1** e **3**) são menores do que para as betalaínas metiladas (**2** e **4**), e similares entre si. Entretanto, a variação nessas propriedades é muito pequena para ser considerada sistemática e permitir inferir um efeito estrutural.

Tabela 5. Propriedades fotofísicas obtidas a partir dos espectros da Figura 8.

Bt^a	λ^{abs} (nm)	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (cm⁻¹)	$\Phi_{\text{Fl}}/10^{-3, \text{b}}$	$E_{0,0}$ (kJ mol⁻¹)
1	508	490	563	1884	$0,85 \pm 0,03$	222
2	492	490	550	2143	$0,39 \pm 0,02$	230
3	508	490	558	1764	$1,29 \pm 0,04$	223
4	492	490	553	2242	$0,56 \pm 0,04$	228

^aSoluções em tpBR, pH = 6. ^bPadrão: solução de rodamina B em etanol (1,3616; $\Phi_{\text{Fl}} = 0,5$)^[36].

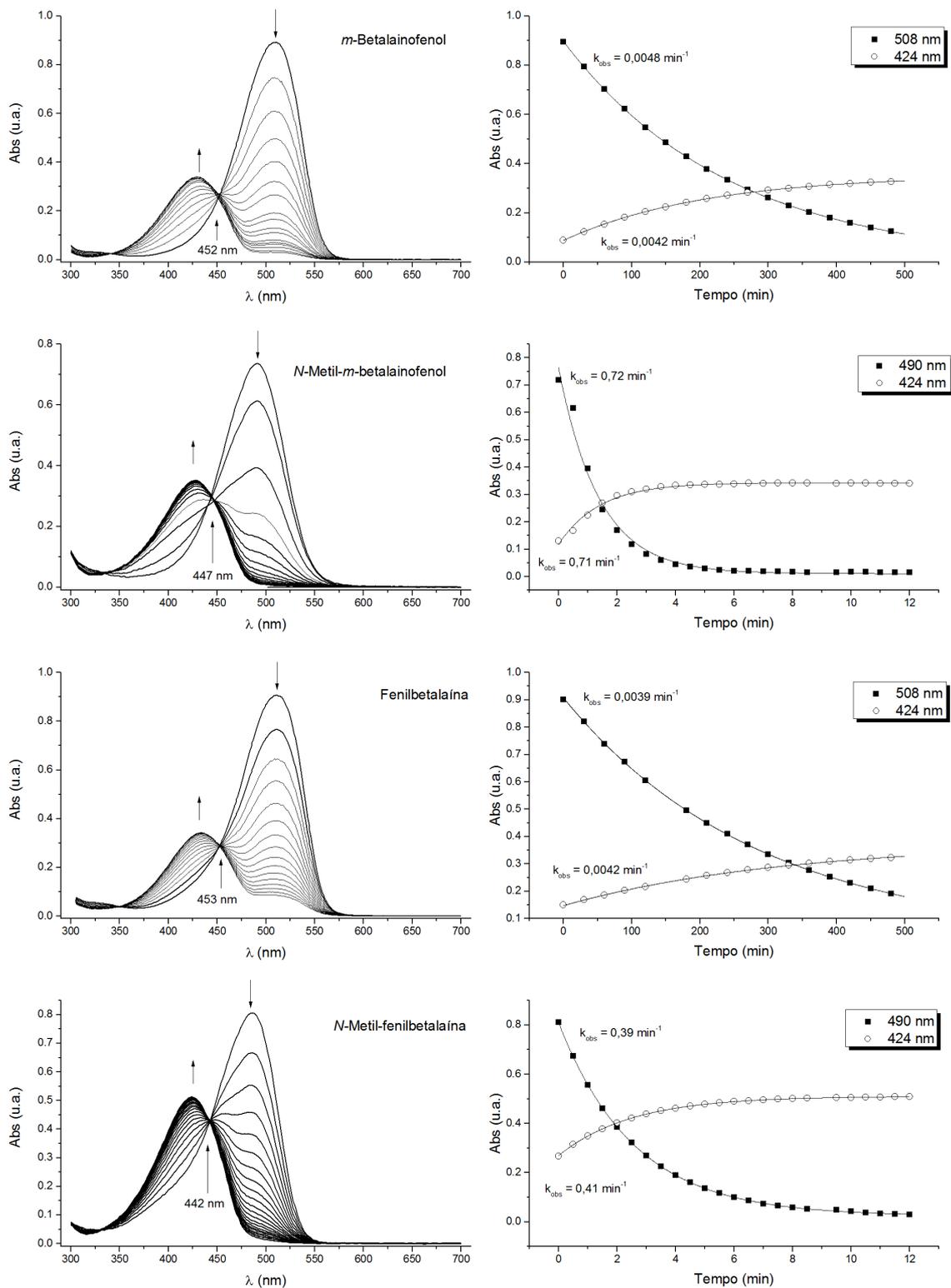


Figura 9. Cinéticas de hidrólise utilizadas para determinação do coeficiente de atenuação molar das betalainas. As absorções em 424 e 508 ou 490 nm foram colocadas em função do tempo e ajustadas por mono-exponenciais. *m*-Betalainofenol e fenilbetalaína: pH = 7; *N*-metil-*m*-betalainofenol e *N*-metil-fenilbetalaína: pH = 11.

4.3. Determinação da estabilidade em solução aquosa

A constante cinética observada (k_{obs}) para a decomposição das betalaínas **1** a **4** em meio aquoso tamponado (tampão Britton Robinson) foi determinada em função do pH para calcular a estabilidade relativa destes compostos. Os espectros de absorção das soluções das betalaínas em tpBR de pH entre 3 e 7 foram registrados ao longo de duas meias-vidas, quando possível. Os máximos de absorção *versus* tempo foram ajustados com uma função monoexponencial de forma a determinar os valores de k_{obs} para cada pH. A dependência dos valores de k_{obs} com o pH em diferentes temperaturas é apresentada na Figura 10.

Observou-se que a curva de k_{obs} de hidrólise em função do pH tem um perfil sistemático para as quatro betalaínas: concavidade para cima, com mínimo em pH = 6. Contudo, as betalaínas **1** e **3** (não metiladas) apresentaram k_{obs} uma ordem de grandeza mais altas do que os valores determinados para **2** e **4** (metiladas) e a concavidade da curva menos acentuada.

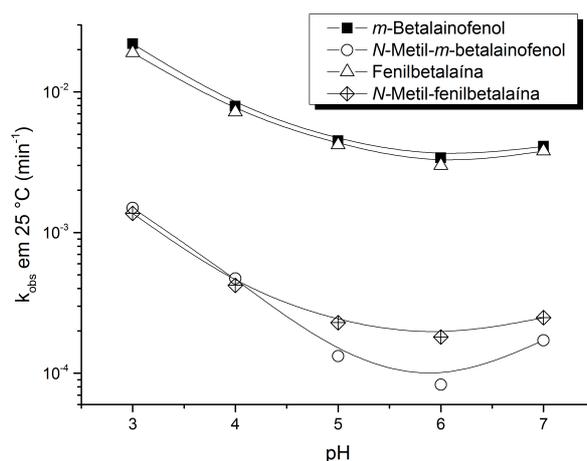


Figura 10. Constantes de decaimento exponencial da absorção das quatro betalaínas em função do pH. Quando foi necessário ajuste bi-exponencial, a maior constante é informada. A escala do eixo y é logarítmica para permitir comparação direta entre os dados e os pontos estão conectados por B-spline; $n = 1$.

4.4. Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica

Conduziu-se um estudo eletroquímico das betalaínas preparadas para obter um parâmetro físico-químico que caracterizasse a oxidação dos compostos. Medidas de voltametria cíclica com eletrodo de carbono vítreo permitiram determinar potenciais de pico anódico (oxidação) e potenciais de pico catódico (redução). As betalaínas apresentaram um comportamento eletroquímico complexo. Na maioria dos voltamogramas, pode-se visualizar mais de um pico de oxidação e o aumento ou diminuição de picos ao longo dos ciclos de varredura de potencial e ao longo da faixa de pH entre 3 e 7 (Figuras 11 e 12).

Em todos os casos, há duas regiões: um sistema reversível entre -100 e 500 mV, mais evidente em pH mais baixo, e processos anódicos irreversíveis por volta de 600 a 1000 mV. A variação do potencial de pico com o pH mantém a mesma tendência nas duas regiões.

As curvas de *m*-betalainofenol (**1**) e *N*-metil-*m*-betalainofenol (**2**) são apresentadas lado a lado na Figura 11. A betalaína **1** é a oxidada mais facilmente dentre as quatro. Em pH = 3, seu processo reversível ocorre em 306 mV (*vs.* Ag/AgCl, KCl sat.) e a outra oxidação em 831 mV. A partir de pH = 6, aparece um pico de maior potencial (836 mV). Para **2**, esses potenciais são de 349 e 1020 mV, respectivamente, sendo que há um ombro em 765 mV na região de alto potencial que persiste em pH = 4.

As betalaínas **3** e **4** produziram voltamogramas com picos mais definidos, ilustrados na Figura 12. Em pH = 3, a oxidação de fenilbetalaína (**3**) ocorre em 384 (reversível), 744 e 894 mV. Na mesma condição, *N*-Metil-fenilbetalaína (**4**) possui o pico anódico reversível em 490 mV e dois picos anódicos irreversíveis em 823 e 1005 mV que se fundem depois de pH = 5.

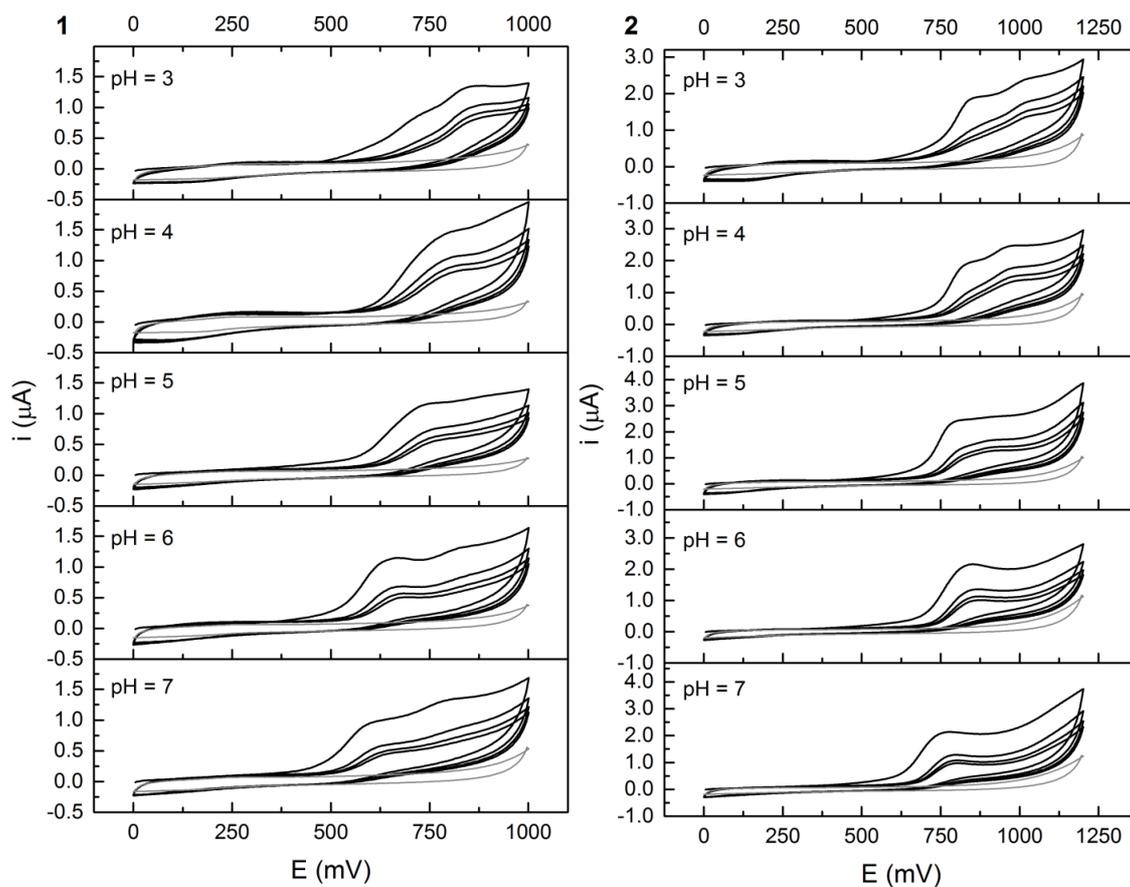


Figura 11. Voltamograma cíclico de *m*-betainofenol (**1**) e *N*-metil-*m*-betainofenol (**2**) em tpBR, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Potencial contra referência de Ag/AgCl, KCl sat. São apresentados quatro ciclos de varredura. Em cinza está o voltamograma do tpBR no pH correspondente, obtido nas mesmas condições.

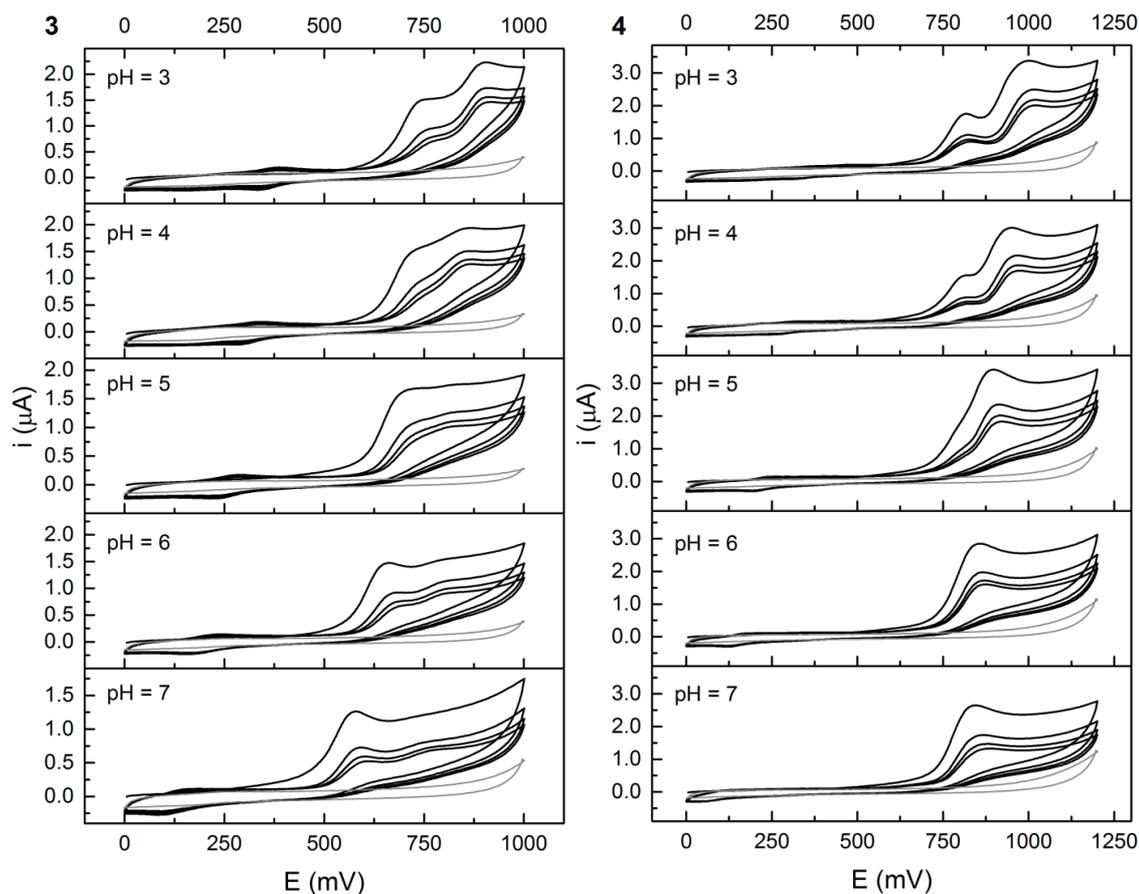


Figura 12. Voltamograma cíclico de fenilbetalaína (3) e *N*-metil-fenilbetalaína (4) em tpBR, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Potencial contra referência de Ag/AgCl, KCl sat. São apresentados quatro ciclos de varredura. Em cinza está o voltamograma do tpBR no pH correspondente, obtido nas mesmas condições.

Os valores dos picos identificados nas figuras Figura 11 e Figura 12 são compilados na Tabela 6. A dependência no pH dos potenciais de pico foi quantificada por um gráfico de Nernst (Anexo 8.17), cujo módulo do coeficiente angular, dividido por 59 mV , indicou a proporção v/n (prótons/elétrons) envolvida em cada processo.

Tabela 6. Potenciais de pico anódico e catódico (E_p , mV, contra eletrodo de referência de Ag/AgCl, KCl sat) extraídos dos voltamogramas cíclicos das betalinas preparadas.

	Picos anódicos			Pico catódico
1				
pH	Ia	Ib	II	III
3	831	-	306	135
4	793	-	267	80
5	734	-	-	-
6	650	836	159	-67
7	631	785	-	-
v/n	1	-	1	1
2				
pH	Ia	Ib	II	III
3	765	1020	349	110
4	760	994	244	80
5	-	918	116	24
6	-	828	-	-
7	-	795	-	-
v/n	-	1	2	1
3				
pH	Ia	Ib	II	III
3	744	894	384	341
4	726	853	328	283
5	-	824	283	237
6	667	805	229	182
7	570	766	166	117
v/n	1	0,5	1	1
4				
pH	Ia	Ib	II	III
3	823	1005	490	315
4	823	963	451	273
5	-	926	256	185
6	-	845	170	131
7	-	825	-	-
v/n		1	2	1

Os picos anódicos para os quais foi possível fazer o ajuste referem-se a processos de transferência de elétron acoplados à transferência do mesmo número de prótons envolvidos, exceto pelos picos anódicos II de **2** e **4**, que têm o dobro de prótons

em relação a elétrons e por um dos picos anódicos de **3**, para o qual há duas vezes mais elétrons do que prótons sendo transferidos no eletrodo.

4.5. Determinação da capacidade antirradicalar com o método ABTS

4.5.1. Estudos com o método ABTS

Antes de aplicar o ensaio TEAC/ABTS para quantificar a capacidade antirradicalar, conduziu-se um estudo do comportamento do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ na ausência de antioxidante para compreender as possíveis limitações e interferências do método. O cátion radical estável do ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) ($\text{ABTS}^{+\bullet}$) foi preparado pela oxidação de ABTS com persulfato na proporção de 3:1 m/m, 16 h antes do experimento. A solução passa da coloração verde característica do ABTS para azul escuro,^[38] pois o $\text{ABTS}^{+\bullet}$ apresenta absorção intensa em 414, 645, 734 e 815 nm em solução aquosa ou alcoólica (Figura 13).^[42] A diminuição dessas bandas é acompanhada pela subida da banda em 340 nm, com um ponto isobéptico claro entre 340 e 395 nm.

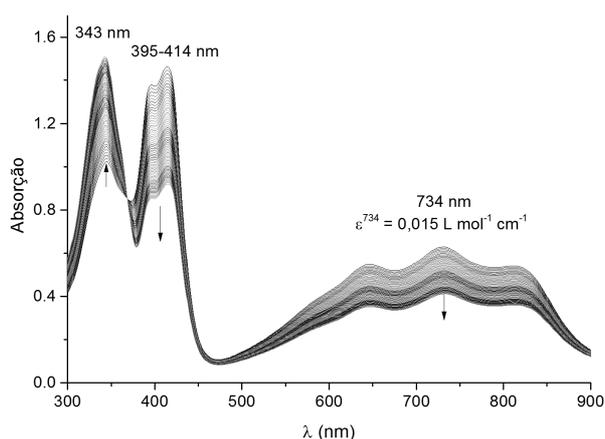


Figura 13. Exemplo de cinética de decaimento de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ monitorada espectrofotometricamente. A banda em 343 nm, característica do precursor ABTS, está presente desde o início da cinética porque, no preparo do radical, a oxidação é propositalmente incompleta.

O estudo do comportamento de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ foi feito variando-se propriedades do meio e monitorando-se o decaimento da absorção em 734 nm; os pontos experimentais foram ajustados e as constantes cinéticas foram calculadas (Figura 14).

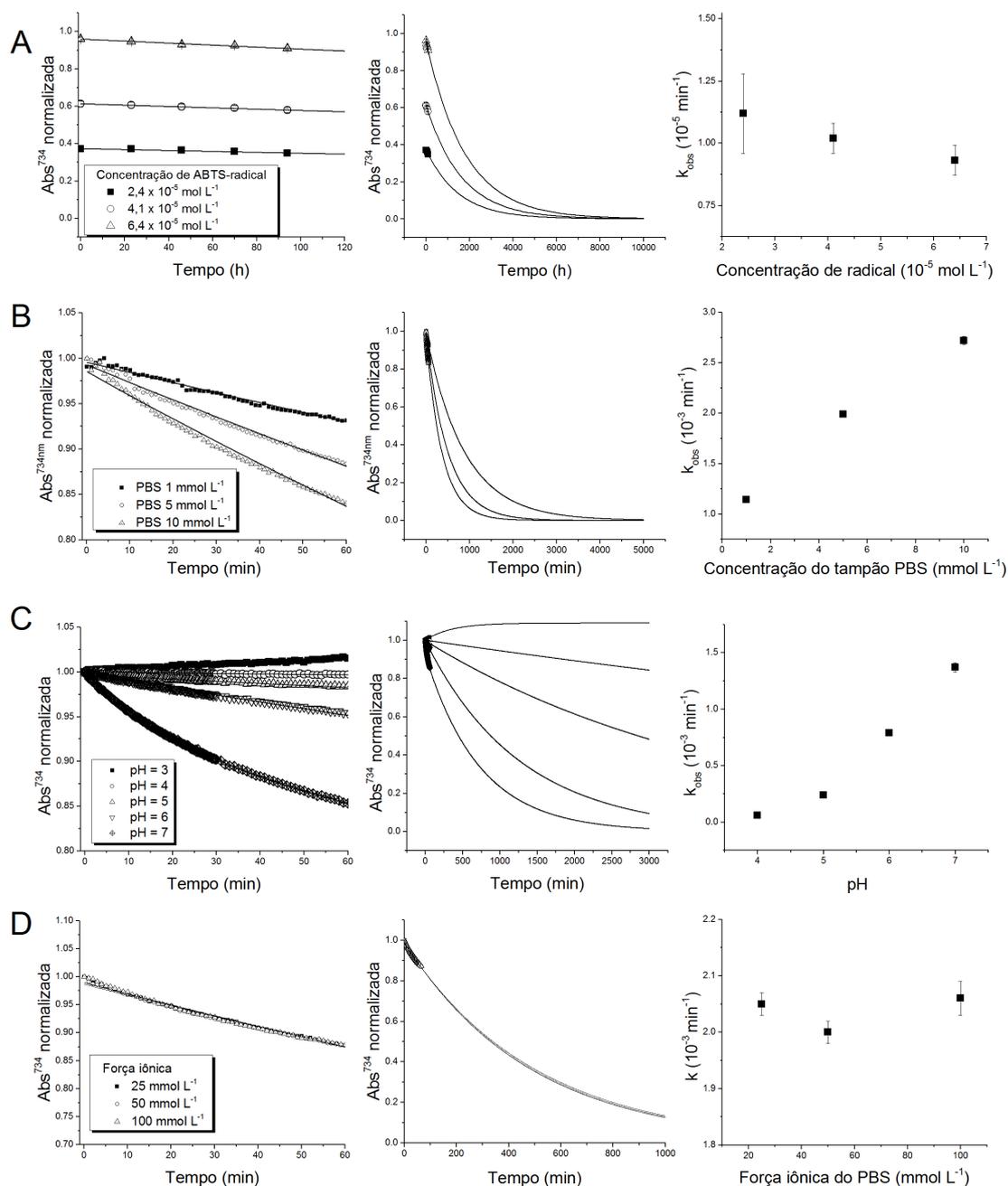


Figura 14. Efeito das propriedades do meio sobre a redução de $\text{ABTS}^{+\cdot}$. À esquerda, os pontos experimentais da cinética de decaimento; no centro, o ajuste exponencial com offset $y_0 = 0$; à direita, as constantes do ajuste exponencial em função da propriedade variada. **A**: efeito da concentração de cátion-radical; **B**: concentração do PBS; **C**: pH e **D**: força iônica.

Existe uma dependência de k_{obs} na concentração inicial de radical, e soluções mais concentradas decaem mais lentamente (A, Figura 14). O aumento da concentração do tampão e o aumento do pH aceleram o decaimento (B e C, Figura 14). Não se observou efeito sistemático da força iônica sobre o valor de k_{obs} na faixa entre 25 e 100 mmol L⁻¹ (D, Figura 14).

4.5.2. Quantificação da capacidade antirradicalar

O espectro de ABTS^{•+} não se sobrepõe com o das betalaínas, e o $\lambda^{\text{máx}}$ do ABTS^{•+} em que é feita a leitura é igual a 734 nm, enquanto o das betalaínas é próximo de 500 nm (Figura 15).

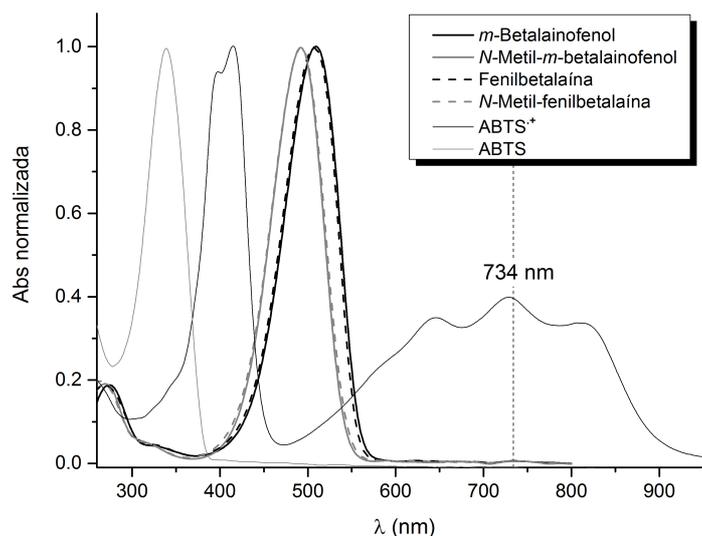


Figura 15. Espectros de absorção normalizados das betalaínas semissintetizadas e de ABTS e seu cátion-radical. Não há sobreposição em 734 nm. A altura relativa das bandas não reflete as proporções usadas na reação entre o radical e a betalaína.

A variação da absorção em 734 nm na presença de antioxidante foi monitorada ao longo de 120 min e calculada não em relação ao valor inicial, mas em relação a um controle sem antioxidante acompanhado simultaneamente, no mesmo pH. As medidas foram feitas em tpBR em pH entre 3 e 7 com intervalo de uma unidade. O experimento inicialmente foi realizado em cubetas de quartzo, lendo-se o espectro de absorção de

seis misturas de reação entre ABTS^{•+} e o antioxidante ao longo de 120 minutos. À parte do decaimento da banda característica do radical, nenhuma alteração espectral ocorre, e por isso pôde-se optar por usar uma microplaca, que permitia que leituras nos cinco pHs fossem feitas simultaneamente, sem mais ou menos tempo decorrido desde a geração do ABTS^{•+}.

Determinou-se o efeito do tempo final de medida empregando-se Trolox, antioxidante de referência para a determinação de TEAC. A variação da absorção em 734 nm apresentou dependência linear da concentração inicial Trolox (Anexo 8.19) e o coeficiente angular da reta ajustada (α) foi determinado após 6, 30 e 60 min (Tabela 7). O coeficiente angular das curvas com Trolox não varia muito com o tempo; por isso, se utilizou sempre α determinado após 6 min de reação como referência para calcular TEAC das betalaínas.

Tabela 7. Coeficiente angular (α) das retas ajustadas para a variação de absorção em 734 nm em função da concentração de Trolox.

pH	α		
	6 min	30 min	60 min
3	0,022 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,022 ± 0,001
4	0,024 ± 0,001	0,025 ± 0,001	0,024 ± 0,001
5	0,027 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,026 ± 0,002
6	0,025 ± 0,001	0,026 ± 0,001	0,025 ± 0,002
7	0,029 ± 0,001	0,028 ± 0,001	0,025 ± 0,001

Quando betalaínas foram adicionadas como antioxidantes, também se verificou dependência linear da variação de absorção com a concentração de composto adicionado. O coeficiente linear da reta ajustada foi dividido por aquele obtido para Trolox (Tabela 7), resultando na capacidade antirradicalar em equivalentes de Trolox, TEAC (*Trolox equivalent antiradical capacity*) apresentada nas curvas da Figura 16 em função do pH. O valor de TEAC foi determinado empregando-se os dados registrados

após 6, 30, 60 e 120 min de reação. A partir de 30 min, o perfil das curvas se mantém relativamente constante. Diferentemente de Trolox (Tabela 7), a capacidade antirradicalar das betalaínas depende do pH (Figura 16).

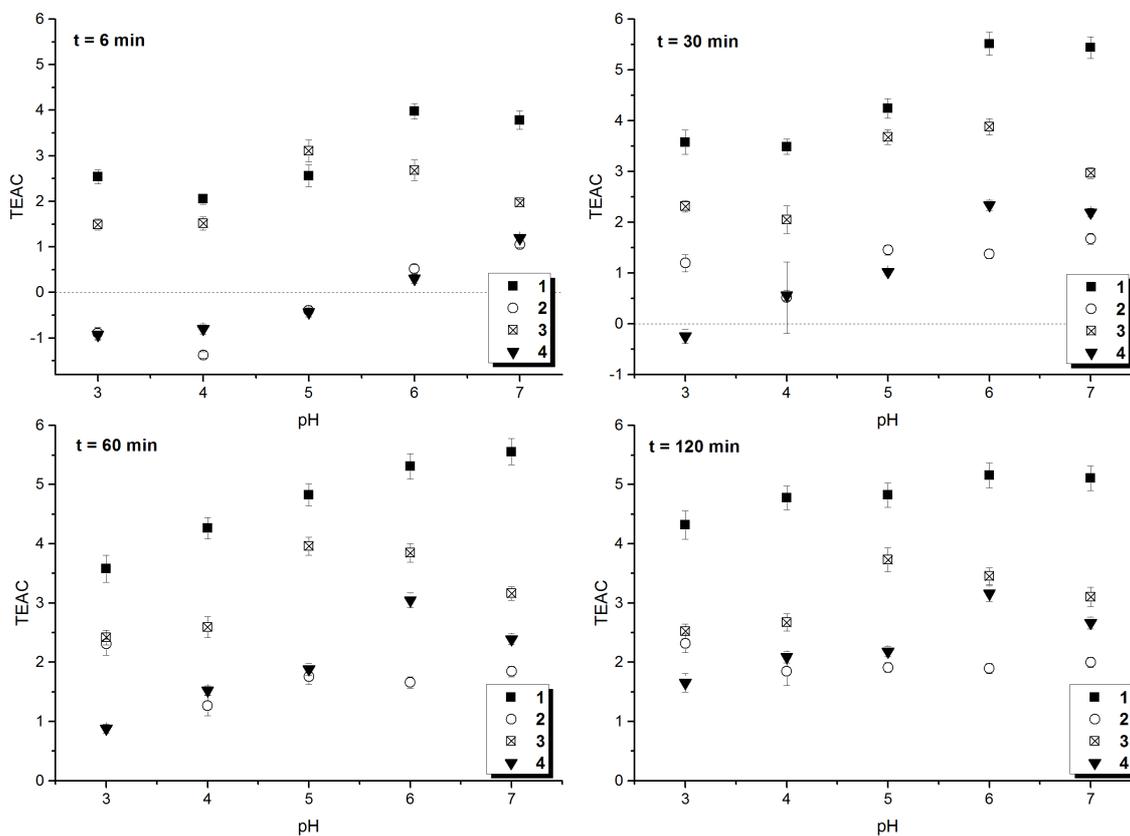


Figura 16. Capacidade antirradicalar relativa a Trolox e determinada pelo ensaio ABTS como função do pH, para cada composto, em quatro momentos da reação.

A dependência entre os valores de TEAC e o pH para o composto **1** tem perfil sigmoidal, e para as outras três betalaínas, o valor de TEAC aumenta com o aumento do pH. O composto **1** também tem sistematicamente a maior capacidade antirradicalar dentre todos, seguido por **3**. Nos tempos iniciais, **2** e **4** apresentaram efeito pró-oxidante (representado por valor negativo de TEAC) em pH = 3, nenhum efeito em pH = 5 e ação antirradical em pH = 7, sendo sempre valores de TEAC abaixo dos calculados para **1** e **3**. Os valores de TEAC da Figura 16 são reportados em detalhes na Tabela 8.

Tabela 8. Capacidade antirradicalar medida em relação a Trolox (TEAC).

pH	1	2	3	4
6 min				
3	2,5 ± 0,2	-0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1	-0,9 ± 0,1
4	2,0 ± 0,1	-1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	-0,8 ± 0,1
5	2,6 ± 0,2	-0,4 ± 0,1	3,1 ± 0,2	-0,4 ± 0,1
6	4,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,7 ± 0,2	0,3 ± 0,1
7	3,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1
30 min				
3	3,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2	2,3 ± 0,1	-0,2 ± 0,1
4	3,5 ± 0,1	0,5 ± 0,7	2,0 ± 0,3	0,6 ± 0,1
5	4,2 ± 0,2	1,4 ± 0,1	3,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1
6	5,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1	3,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1
7	5,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1
60 min				
3	3,6 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1
4	4,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1
5	4,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	4,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1
6	5,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1	3,8 ± 0,2	3,0 ± 0,1
7	5,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1
120 min				
3	4,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,1	1,7 ± 0,2
4	4,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1
5	4,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	3,7 ± 0,2	2,2 ± 0,1
6	5,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,2 ± 0,1
7	5,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1	3,1 ± 0,2	2,7 ± 0,1

4.5.3. Caracterização dos produtos da reação com ABTS^{•+}

Os quatro momentos da reação estudados espectrofotometricamente foram analisados, nos diferentes pHs, por HPLC-MS. Foram caracterizados dois produtos da reação entre ABTS^{•+} e **1**, três produtos da reação com **2**, um produto para **3** e três para **4**, como reportado na Tabela 9. Esses produtos estavam presentes, em proporções diferentes, nos cinco pHs analisados. ABTS e ABTS^{•+} apresentaram tempos de retenção no período de limpeza da coluna.

Tabela 9. Resumo dos resultados da análise por HPLC-MS dos produtos de oxidação das betalainas no ensaio TEAC/ABTS.

Composto	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	
1	303,1	4,7	[M-H] ⁺ de 1
	351,1 (+48)	5,9	1a
	379,1 (+76)	7,7	1b
2	317,1	5,4	[M] ⁺ de 2
	305,0 (-12)	4,9	2a
	393,1 (+76)	9,1	2b
3	287,1	6,2	[M-H] ⁺ de 3
	335,1 (+48)	8,1	3a
4	301,2	6,7	[M] ⁺ de 4
	289,1 (-12)	6,1	4a
	620,0 (+319)	10,5	4b

A proporção entre os vários produtos detectados variou com o tempo de mistura dos reagentes, como pode ser visualizado na Figura 17. Em pH = 3, o produto de oxidação de *m*-betalainofenol (**1**) em *m/z* 351 é único, mas vai gradativamente sendo substituído por *m/z* 379 até pH = 7.

Algo parecido acontece com a betalaina **2** (Figura 18), para a qual um produto em *m/z* 393,1 forma-se em maior extensão à medida que o pH aumenta e apenas até pH = 5 é possível detectar um produto em *m/z* 305,0. O pico da betalaina original não zera ao final de 120 min em nenhum pH, ao contrário do que ocorre com **1**, e o produto em *m/z* 257,8 se repete. Há mais picos cromatográficos do que na figura anterior, sendo que nem todos produziram sinal no detector de massas.

A análise cromatográfica da reação entre **3** e o cátion-radical (Figura 19) detectou um produto em *m/z* 335,1, que se forma a partir de 6 min de reação em todos os pHs. Por fim, para **4** a composição da mistura volta a variar com o pH, sendo que um produto em *m/z* 620,1 torna-se predominante com o aumento do pH (Figura 20). Até

pH = 5 também é possível identificar um produto em m/z 289,0. Em pH = 7, outros produtos em m/z 415,1 e 606,1 foram detectados, mas não puderam ser fragmentados.

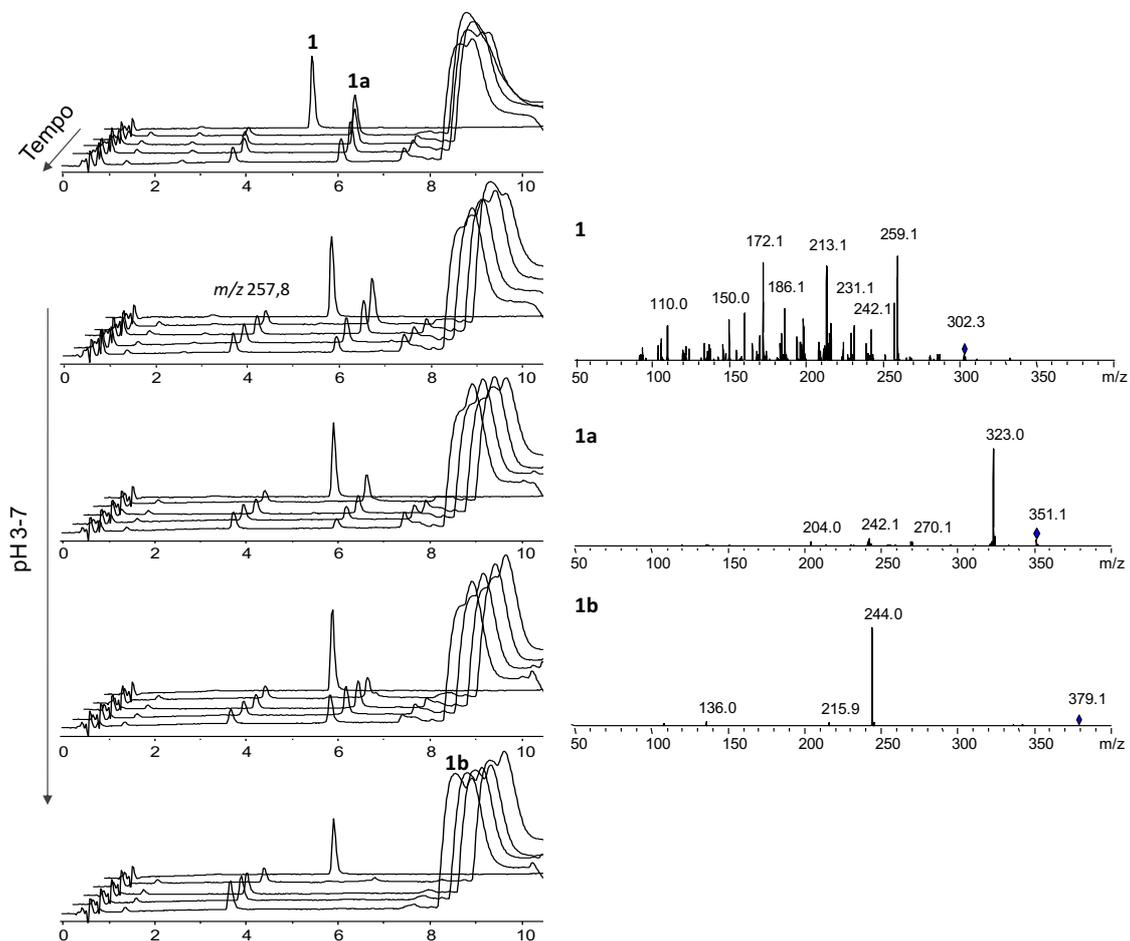


Figura 17. Cromatogramas (254 nm) das misturas de $ABTS^{\bullet+}$ e *m*-betainofenol em vários tempos de reação (0, 6, 30, 60 e 120 min, do fundo para a frente) e em vários pHs (3, 4, 5, 6 e 7 de cima para baixo). Os espectros de MS² dos produtos detectados são apresentados à direita.

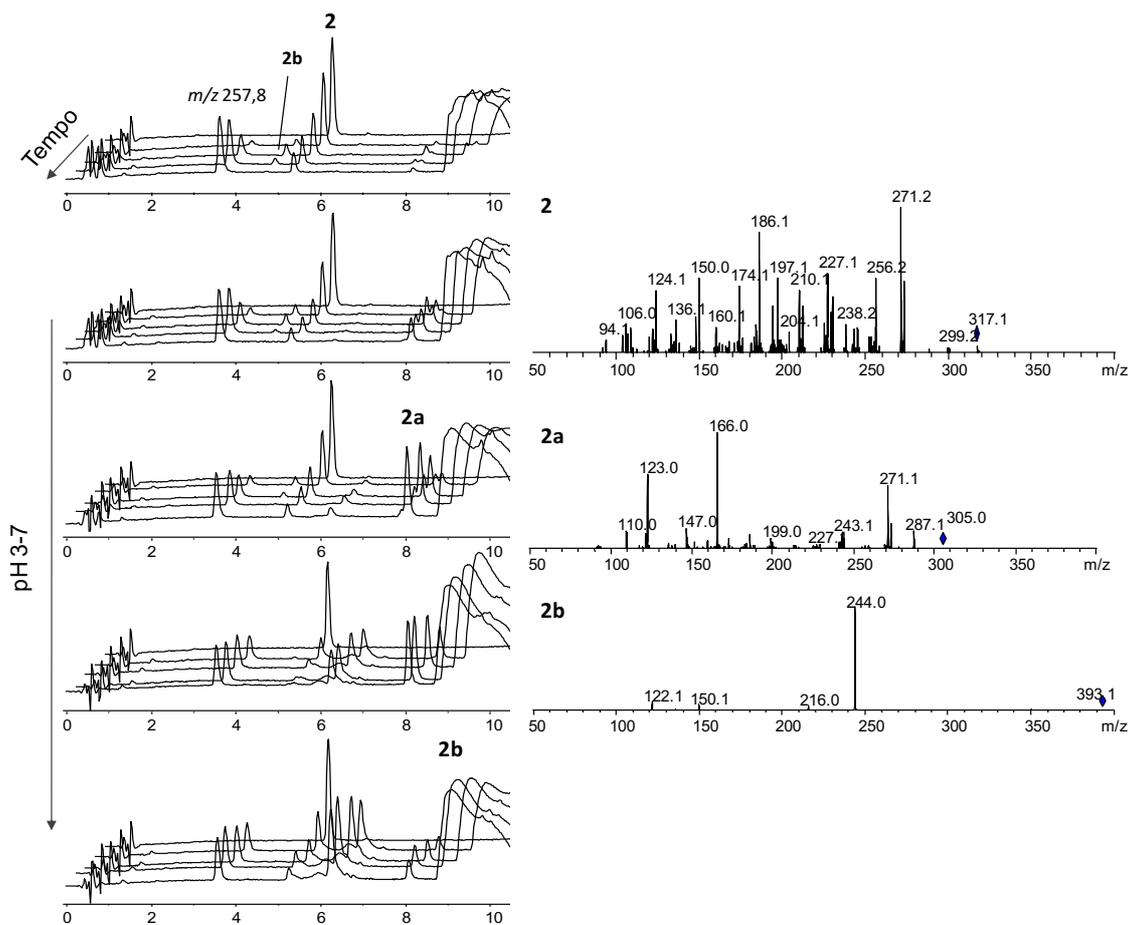


Figura 18. Cromatogramas (254 nm) das misturas de ABTS^{++} e *N*-metil-*m*-betalainofenol em vários tempos de reação (0, 6, 30, 60 e 120 min, do fundo para a frente) e em vários pHs (3, 4, 5, 6 e 7 de cima para baixo). Os espectros de MS^2 dos produtos detectados são apresentados à direita.

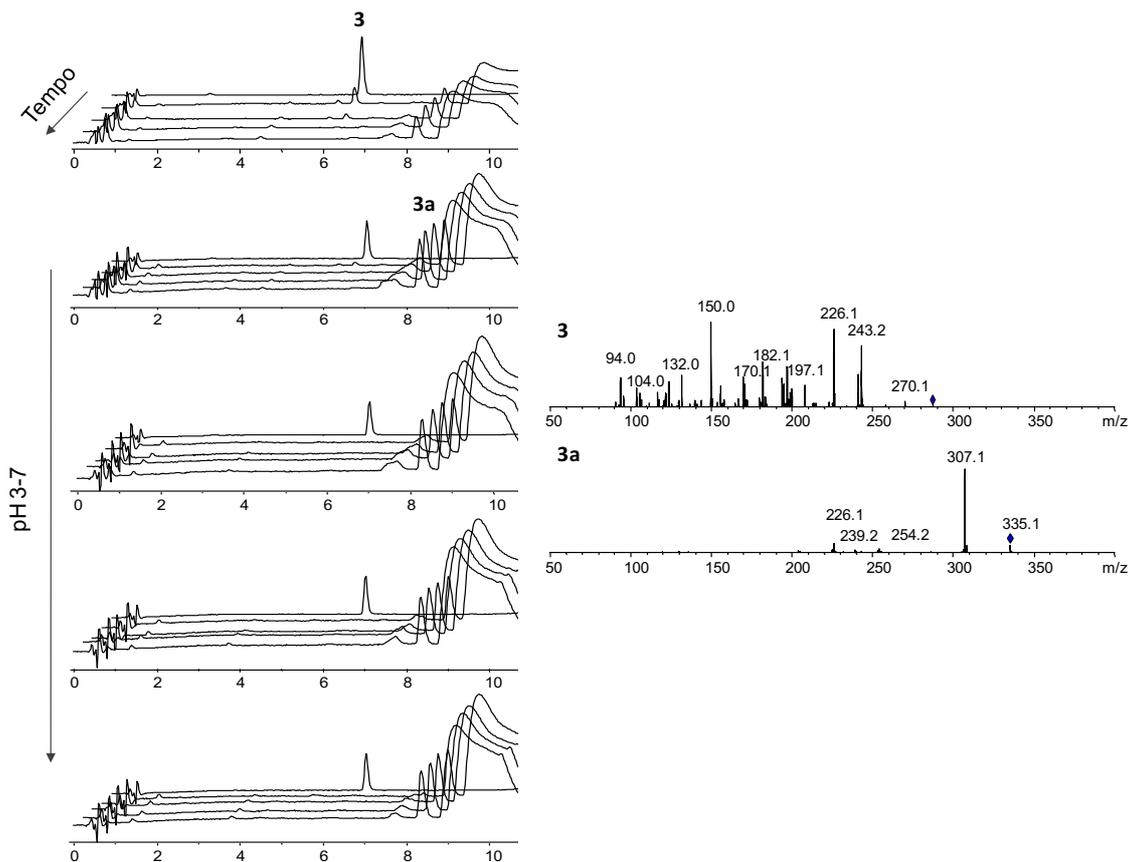


Figura 19. Cromatogramas (254 nm) das misturas de ABTS^{•+} e fenilbetalaína em vários tempos de reação (0, 6, 30, 60 e 120 min, do fundo para a frente) e em vários pHs (3, 4, 5, 6 e 7 de cima para baixo). Os espectros de MS² dos produtos detectados são apresentados à direita.

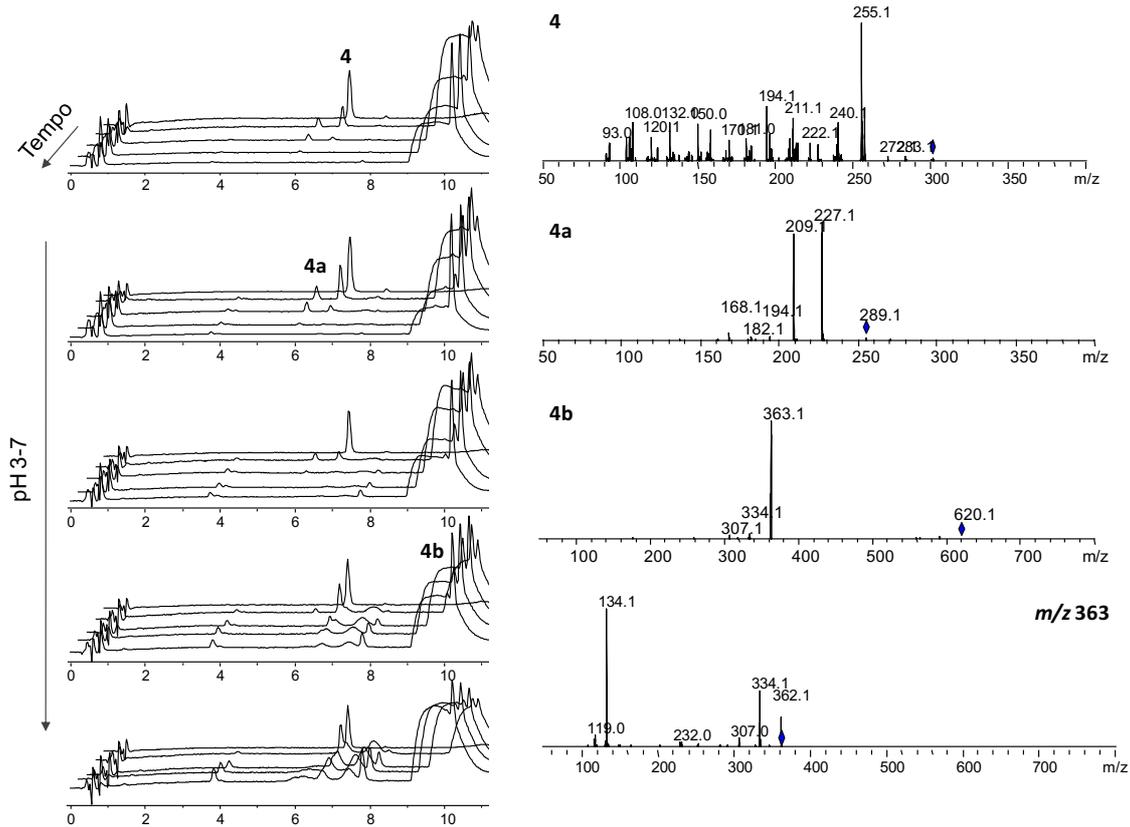
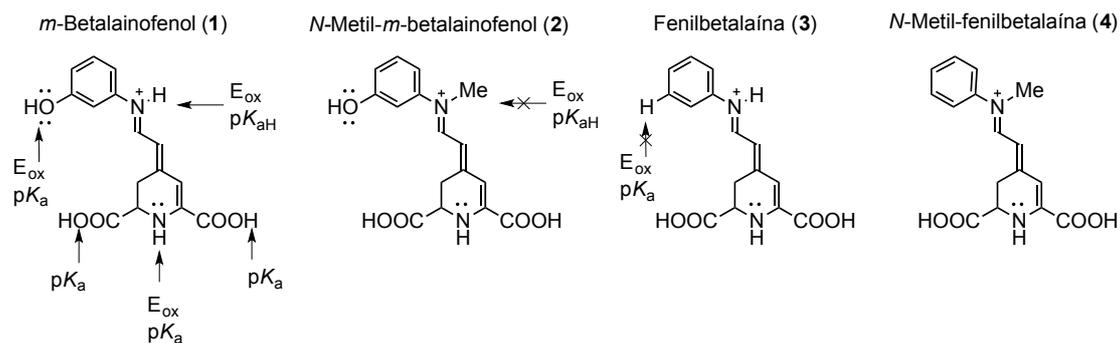


Figura 20. Cromatogramas (254 nm) das misturas de ABTS^{++} e *N*-metil-fenilbetalaína em vários tempos de reação (0, 6, 30, 60 e 120 min, do fundo para a frente) e em vários pHs (3, 4, 5, 6 e 7 de cima para baixo). Os espectros de MS^2 (e MS^3 quando oportuno) dos produtos detectados são apresentados à direita.

5. Discussão

Neste trabalho, procurou-se entender como algumas características estruturais das betalaínas afetam suas propriedades. Betalaínas fenólicas são antioxidantes tão potentes quanto antocianinas; contudo, betalaínas não fenólicas, embora menos eficientes como antioxidantes, ainda têm uma capacidade antirradicalar quase duas vezes mais alta do que ácido ascórbico e Trolox. Considerando-se a estrutura básica das betalaínas, que se origina do ácido betalâmico, poder-se-ia imaginar que a oxidação do sistema 1,7-diazaeptametínico (1,7-dHm) ou do anel 2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetraidropiridínico é responsável por tal capacidade sob o ponto de vista molecular. Decidiu-se, portanto, investigar o papel do sistema 1,7-dHm nas propriedades antirradicalares de betalaínas, bem como na sua estabilidade hidrolítica, potencial redox e propriedades fotofísicas.

Foram semissintetizadas quatro betalaínas análogas que diferem umas das outras pela presença e ausência de um grupo fenol e de um grupo metilímínio (Esquema 9). Os compostos **1** e **2** diferem do par **3** e **4** pela presença do grupo -OH fenólico, enquanto os compostos **1** e **3** diferem dos compostos **2** e **4** pela metilação da imina.. A porção fenólica dos compostos **1** e **2** está em *meta* em relação ao átomo de nitrogênio da porção 1,7-dHm. Isso significa que as porções fenólica e 1,7-dHm não estão conjugadas; por isso, qualquer efeito de um grupo sobre o outro é puramente indutivo, e as transformações nas duas porções podem ser analisadas independentemente.



Esquema 9. Betalaínas anilínicas propostas para estudar efeitos estrutura-propriedade.

A discussão dos resultados será feita na seguinte sequência: primeiro, as preparações serão comentadas; a análise dos sinais de $^1\text{H-RMN}$ da caracterização estrutural dará início ao estabelecimento de relações estrutura-propriedade, verificando sempre a importância da *N*-metilação e da hidroxilação. Em seguida, as propriedades fotofísicas dos quatro compostos serão comparadas, e efeitos como deslocamento batocrômico e aumento do deslocamento de Stokes serão interpretados em nível molecular, verificando ao final da análise se os efeitos estruturais são compatíveis com os encontrados para a propriedade anterior. A estabilidade das betalaínas será discutida em duas frentes: a diferença de estabilidade das betalaínas em função da estrutura e o perfil da curva de k_{obs} vs. pH. A análise do comportamento eletroquímico finalizará a discussão das propriedades físico-químicas. Por fim, a capacidade antirradicalar será discutida: primeiro quanto ao efeito estrutural sobre TEAC, depois quanto ao efeito do pH e de reações laterais e por último em relação ao efeito do tempo sobre a medida de TEAC, de modo a estabelecer um modelo para a oxidação das betalaínas que seja compatível com suas propriedades físico-químicas e os resultados de TEAC.

5.1. Semissíntese de betalaínas

A principal dificuldade no estudo de betalaínas é a sua obtenção. A abordagem mais comum para a semissíntese de betalaínas é a hidrólise alcalina de betanina de beterraba na presença de excesso de amina, seguida de reacoplamento pela adição de ácido.^[43] Esta abordagem produz, obviamente, uma mistura entre a betalaína desejada e betanina, a última fruto do reacoplamento entre o ácido betalâmico e ciclo-DOPA 5-*O*-glicosilada — a menos que um grande excesso de amina seja usado. Alguns autores preferem hidrolisar a betanina em meio aquoso alcalino e extrair o ácido betalâmico resultante com AcOEt. A extração deve ser feita em meio ácido, no qual o HBt se encontra em sua forma neutra e sua partição na fase orgânica é mais favorável. Como resultado, a partição do HBt entre a fase aquosa e a fase orgânica quando o meio é acidificado (até pH = 2) concorre com o reacoplamento deste ácido e aminas presentes no meio, o que torna o processo intrinsecamente ineficiente.^[25]

Em nosso grupo, optou-se pelo segundo método para minimizar a competição da amina com ciclo-DOPA, e favorecer o equilíbrio de adição nucleofílica pela precipitação do produto e pela escassez de água, mas algumas modificações foram feitas para aprimorar essa metodologia. A primeira extração com AcOEt foi suprimida, aumentando a praticidade do procedimento, e a escala foi aumentada para partir de 500 mL de suco bruto de beterraba, mais coerente com a demanda de HBt e betalaínas semissintéticas no laboratório. Ademais, a reação entre HBt e as anilinas em AcOEt é conveniente já que os produtos formados são insolúveis e precipitam.

O acoplamento entre HBt e aminas aromáticas é rápido e espontâneo,^[25] mas o uso de 10 equiv de amina é necessário para garantir o deslocamento do equilíbrio de adição no sentido do produto. O excesso de amina é facilmente removido com lavagens

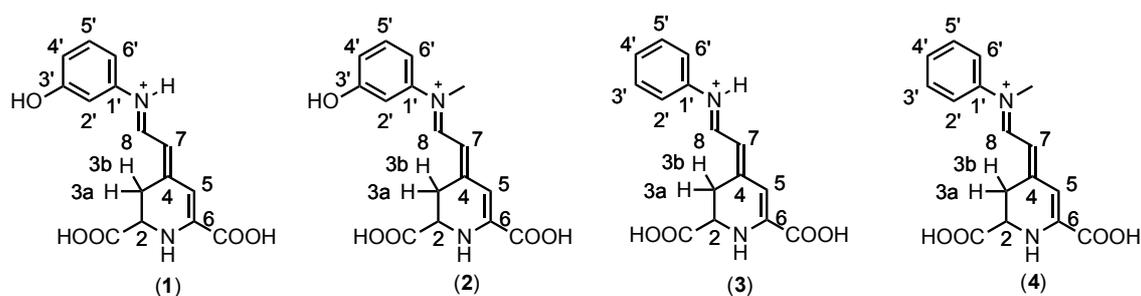
do sólido com AcOEt. O uso de suco de beterraba, apesar de ser a estratégia mais eficiente considerando-se disponibilidade e conteúdo de pigmento, introduz muitas impurezas no produto final, que também apresentou sinais de degradação (descarboxilação e oxidação) na análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massas, provavelmente intensificados pelas condições ácidas da semissíntese.

A caracterização por espectroscopia de RMN é difícil e há poucos relatos na literatura, em especial dados de ^{13}C -NMR. Os resultados disponíveis se originam de espectros complexos, com picos alargados devido ao baixo grau de protonação (e conseqüente alta força iônica) e sobreposição de sinais devido à ocorrência de epimerização e isomerização da dupla ligação.^[44] Betalaínas são solúveis em solventes polares próticos, mas a escolha do solvente para RMN não é simples: são instáveis em água e metanol e têm sinais de ^1H que coincidem com o espectro de trifluoroetanol, um dos poucos solventes em que são estáveis.^[21] O uso de metanol- d_4 já foi descrito^[20,45] e minimizou – mas não eliminou – a precipitação no tubo, como curiosamente se observou em água. Por conta da precipitação, baixa temperatura não foi uma alternativa, de modo que a degradação dos compostos ao longo das análises foi inevitável. No lugar de registrar um espectro de ^{13}C , que levaria múltiplas meias-vidas dos compostos, optou-se por tentar atribuir os sinais de carbono por um espectro de correlação $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC. Não obstante, os sinais de carbono não puderam ser satisfatoriamente atribuídos.

Verificou-se o alargamento dos sinais dos hidrogênios ligados ao nitrogênio e aos carbonos da imina do sistema 1,7-diazaeptamético, que impediu a determinação de constantes de acoplamento desse grupo. O fenômeno é similar ao relatado para hidrogênios de amidas e pirrois diretamente ligados a ^{14}N e sujeitos a *quadrupole*

broadening.^[46] Nesse caso, a assimetria do núcleo de nitrogênio provoca o surgimento de um momento quadrupolar, que pode ou não acoplar com o spin nuclear, dependendo de sua magnitude. Como o momento quadrupolar de ^{14}N é moderado, a relaxação nem é rápida o suficiente para que o ^1H vizinho não seja afetado, nem lenta o bastante para que o acoplamento seja *eficiente* e diferentes estados de spin possam ser visualizados no espectro, resultando no alargamento do sinal. Outro fator relevante para a caracterização por RMN é que a solução de betalaína provavelmente tem uma força iônica elevada, o que dificulta a medida experimental. Além de a própria betalaína encontrar-se desprotonada, em formas carregadas, o processo de semissíntese e purificação pode introduzir íons como cloreto, amônio e formiato.

O alargamento e a coalescência do sinal são mais evidentes nas betalaínas *N*-metiladas, mas esse não foi o único efeito de estrutura observado no espectro de ^1H -RMN dos compostos. A numeração dos hidrogênios é rerepresentada no Esquema 10 para facilitar a leitura.



Esquema 10. Estruturas das betalaínas caracterizadas por ^1H -RMN.

A *N*-metilação afeta os deslocamentos químicos dos hidrogênios do sistema conjugado 1,7-dHm. Os núcleos H-8 (próximos do nitrogênio da imina) de **2** e **4** são mais blindados (8,15 e 8,18 ppm) e têm maior coalescência do sinal do que aqueles dos compostos não metilados **1** e **3** (8,36 e 8,50 ppm). Quando se comparam aminas

alifáticas protonadas e desprotonadas, a formação de carga positiva no nitrogênio desblinda os núcleos de hidrogênio do grupo alquila devido à ocorrência de hiperconjugação entre o sistema doador $\sigma^2(\text{C-H})$ e acceptor $p^+(\text{N})$. É o que ocorre, por exemplo, com os hidrogênios do cátion tetraetilamônio em relação à trietilamina (Esquema 11). Desta forma, se os compostos **1** e **3** estivessem desprotonados, esperaria-se que os deslocamentos químicos dos respectivos H-8 estivessem em campo mais alto (*i.e.*, núcleos mais blindados) do que os determinados para **2** e **4**, algo contrário ao que se observa experimentalmente. Voltando às aminas do Esquema 11, a comparação entre o cátion trialquilamônio e o tetralquilamônio (protonação *vs.* alquilação), sugere que a desblindagem do núcleo de hidrogênio dos grupos alquila imediatamente ligados ao nitrogênio é maior no nitrogênio protonado do que no alquilado, provavelmente devido ao efeito doador de elétron dos grupos alquila substituintes ao nitrogênio. Dessa forma, o núcleo H-8 deveria estar menos blindado em **1** e **3** protonados do que em **2** e **4**, exatamente como se observa experimentalmente. Um efeito análogo, porém mais sutil, se verifica para H-7: os núcleos estão ligeiramente mais blindados nas betalaínas *N*-metiladas (**2** e **4**) em comparação às não metiladas (**1** e **3**). O efeito de blindagem dos núcleos de H-7 e H-8 resultante da metilação do grupo imina está qualitativamente de acordo com valores calculados pelo programa Mestrenova considerando-se os compostos **1** e **3** protonados e os compostos **2** e **4** e tem implicações importantes quanto à reatividade.

			
δ (ppm)			
CH ₂	1,03	1,43	1,27
CH ₃	2,53	3,17	3,27

Esquema 11. Deslocamentos químicos de ¹H em trietilamina, trietilamônio e tetraetilamônio retirados de banco de dados da literatura disponível no endereço <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/chem605/index.htm>.

Já para H-5 (localizado no anel 1,2,3,4-tetraidropiridínico) os núcleos estão menos blindados em **2** e **4** do que em **1** e **3**. Embora sutil, a *N*-metilação também diminui o deslocamento químico de H-3a e H-3b e aumenta suas constantes de acoplamento com H-2, o que pode sugerir que a metilação introduz uma torsão no sistema que retira os dois anéis do mesmo plano. Já na região aromática, o efeito mesomérico do fenol é mais acentuado do que o efeito hiperconjugativo do metil (+H) e as betalainas dividem-se entre fenólicas e não-fenólicas. O efeito doador de elétrons (+M) sobre as posições *orto* e *para* blinda H-2', H-4' e H-6' (de 7,38 (H-2' de **3**) para 6,76 (H-2' de **1**) ppm), enquanto o efeito retirador de elétrons (-M) sobre *meta* desblinda H-5', que se desloca para campo baixo (7,44 (**3**) para 7,21 (**1**) ppm).

5.2. Propriedades fotofísicas

Sabe-se que o acoplamento de HBt com anilinas estende a conjugação do anel 2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetraidropiridínico, diminuindo a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado e levando ao deslocamento batocrômico da banda de absorção tanto em relação ao seu precursor, o ácido betalâmico ($\lambda^{\text{máx}} = 424$ nm), quanto a betaxantinas naturais, como a indicaxantina ($\lambda^{\text{máx}} = 485$ nm). Os máximos de absorção de **2** e **4** ($\lambda^{\text{máx}} = 492$ nm) seguem esta mesma tendência, mas são menos deslocados para o vermelho (deslocamento batocrômico) do que os máximos de absorção de **1** e **3** ($\lambda^{\text{máx}} = 508$ nm). Uma possível explicação para este resultado pode ser

a menor planaridade dos derivados metilados, *i.e.*, o substituinte metil introduz uma torção do anel aromático em relação ao plano do sistema 1,7-diazaeptamético.^[27] Por outro lado, os resultados de espectrometria de RMN indicam um efeito eletrônico importante da metilação sobre o carbono aldimínico ligado ao H-8.

Considerando a hipótese de que os derivados não metilados **1** e **3** estão protonados, a diferença entre os compostos pode ser melhor compreendida se o efeito doador de elétron do metil (que resulta na blindagem de H-8) for levado em conta. A hiperconjugação do orbital $\sigma^2(\text{C-H})$ com $p^+(\text{N})$ estabiliza a carga positiva do nitrogênio dos compostos **2** e **4**. Em **1** e **3**, em que não existe efeito hiperconjugativo +H, a estabilização requer maior delocalização da deficiência de carga nos orbitais π conjugados do sistema 1,7-dHm; com isso, a energia do sistema π diminui, o que se reflete no espectro UV-Vis como um maior $\lambda^{\text{máx}}$. A mesma tendência é observada nos máximos de fluorescência: os máximos de emissão de **1** e **3** são mais deslocados para o vermelho do que os observados para **2** e **4**, o que permite inferir que o metil também tende a diminuir a delocalização de carga no estado eletronicamente excitado destas betalainas.

Os compostos **3** e **4** já foram descritos na literatura, mas não foram caracterizados adequadamente. Há dois relatos da preparação de **3** e os autores descrevem a coloração rosa/salmão do produto, com máximo de absorção em 506 nm.^[47,48] Em um destes estudos, os autores também descrevem a síntese de **4** ($\lambda^{\text{máx}} = 487$ nm). Os valores de coeficiente de atenuação molar (ϵ) determinados para **3** e **4** são 54.000 e 62.000 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente, e são ligeiramente diferentes dos valores determinados nesse trabalho (61.600 e 60.400 L mol⁻¹ cm⁻¹).^[48] Contudo, considerando-se a incerteza do método de ponto final, este erro é pouco relevante.

Como as betalaínas são muito higroscópicas e são obtidas em quantidades ínfimas, é muito difícil determinar os valores de ϵ empregando-se pesagem direta. Por isso, a betalaína é hidrolisada e o seu valor de ϵ é determinado em relação ao valor relatado para HBt ($26.500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que tem o mesmo nível de incerteza. Embora os valores relatados na literatura tenham sido determinados empregando-se o mesmo método de ponto final, neste trabalho procurou-se garantir que a reação de hidrólise tivesse atingido o equilíbrio, acompanhando a cinética de hidrólise e verificando se a constante cinética observada para a formação de HBt coincidia com o valor determinado para a decomposição da betalaína. A racionalização do valor de ϵ em termos da estrutura é difícil, já que a incerteza da medida não permite diferenciar os compostos **1** a **4** de forma confiável. Todavia, parece haver uma tendência tênue a valores de ϵ um pouco mais baixos para os análogos metilados **2** e **4**.

Os deslocamentos de Stokes ($\Delta\lambda$) para **1** a **4** foram calculados a partir dos máximos de absorção e emissão e os valores obtidos são próximos aos relatado para a betanina e para a indicaxantina (2900 e 1270 cm^{-1} , respectivamente).^[49] Os derivados metilados **2** e **4** têm maior deslocamento de Stokes de em relação a **1** e **3** ($2143 > 1884 \text{ cm}^{-1}$ e $2242 > 1764 \text{ cm}^{-1}$). Entretanto, ao se converter essa diferença de energia de cm^{-1} para kJ mol^{-1} , nota-se que o efeito da metilação é de cerca de 4 kJ mol^{-1} . Esta diferença pode estar relacionada ao menor grau de delocalização do sistema 1,7-dHm de **2** e **4** comparado a **1** e **3**, o que poderia resultar em um aumento da liberdade torsional destes derivados. Ainda, a introdução de um substituinte *que rotaciona*, como metil, implica um trabalho torsional para a rotação do grupo no estado excitado; isso se reflete numa maior variação de energia ao longo da relaxação geométrica no estado excitado, e por

consequente, em um maior deslocamento de Stokes.^[50] Seja qual for a explicação, o efeito é sutil e pouco relevante para a aplicação destas betalaínas.

Os rendimentos quânticos dos compostos **1** a **4** são baixos, mas apenas o valor determinado para **4** ($\Phi_{\text{Fl}} = 5,6 \times 10^{-4}$) é menor do que o da betanina ($\Phi_{\text{Fl}} = 7 \times 10^{-4}$)^[49]. Esta não é uma informação surpreendente, visto que estes compostos são pouco rígidos e preferem a desativação do estado eletronicamente excitado singlete pela via não-radiativa no lugar da emissão de fluorescência.^[21,51] O composto **3** tem o maior Φ_{Fl} dentre as quatro betalaínas: $1,3 \times 10^{-3}$; porém, este composto é quatro vezes menos fluorescente do que a indicaxantina.^[52] A diferença na eficiência da fluorescência de **3** e **4** foi descrita na literatura e racionalizada pelo aumento dos graus de liberdade conformacionais introduzidos pelo grupo metil, que aumenta a importância de vias de relaxação não-radiativas.^[53] O substituinte fenólico em meta não afeta $\lambda^{\text{máx}}$, nem o deslocamento de Stokes, mas parece diminuir o rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_{\text{Fl}}(\mathbf{1}) = 8,4 \times 10^{-4}$ e $\Phi_{\text{Fl}}(\mathbf{2}) = 3,9 \times 10^{-4}$), provavelmente por afetar a diferença dos momentos de dipolo dos estados fundamental e excitado singlete da betalaína. A ocorrência de um processo de transferência de elétron fotoinduzido (PET, *photoinduced electron transfer*) que leva a supressão da fluorescência, o que também pode explicar o menor Φ_{Fl} das betalaínas fenólicas, não pode ser descartada.^[54] Entretanto, a variação no deslocamento de Stokes, na energia singlete e no rendimento quântico de fluorescência não é significativa para permitir estabelecer relações inequívocas entre estrutura e propriedade.

A maior importância da *N*-metilação em relação à hidroxilação na fotofísica, de modo geral, soma-se aos resultados da ressonância magnética nuclear para indicar que o substituinte fenol em meta pouco afeta a densidade de carga no núcleo betalâmico. Em

estudo anterior do nosso grupo, *o*-betalainofenol e *p*-betalainofenol foram caracterizadas e apresentaram $\lambda^{\text{máx}}$ de absorção em 510 e 513 nm, mas $\Delta\lambda$ foi de 1971 e 2162 cm^{-1} , valores mais próximos dos obtidos para as betalaínas *N*-metiladas no presente estudo.^[29] A fluorescência dos dois regioisômeros é inferior à de *m*-betalainofenol e à de qualquer um dos compostos preparados neste estudo, de modo que a posição do fenol é determinante para sua participação na densidade de carga do sistema 1,7-dHm.

5.3. Estabilidade em solução aquosa

A densidade eletrônica no núcleo betalâmico foi avaliada por uma terceira via: a estabilidade frente à hidrólise, reflexo direto da eletrofilicidade do carbono da imina (C=N). A determinação de k_{obs} da hidrólise em pH entre 3 e 7 forneceu dois resultados interessantes: o perfil de dependência de k_{obs} em relação ao pH e a maior estabilidade das betalaínas *N*-metiladas. Para iniciar a discussão, o tempo de meia-vida a 25 °C foi calculado como o inverso de $k_{\text{obs}}^{25\text{ °C}}$ e é informado na Tabela 10.

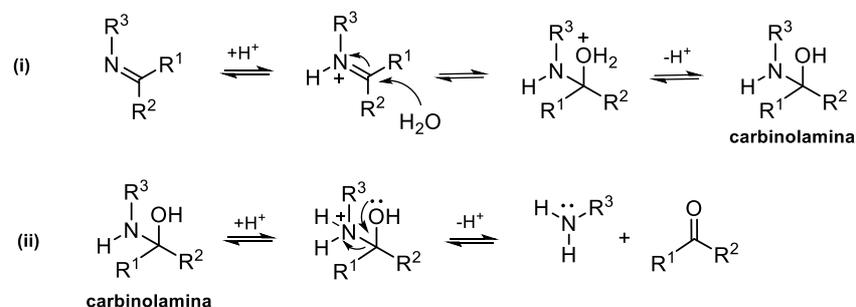
Tabela 10. Tempo de meia-vida a 25 °C das betalaínas estudadas, em tpBR.

Composto	$t_{1/2}$ (h) em pH:				
	3	4	5	6	7
1	1	2	4	5	4
2	11	35	126	201	97
3	1	2	4	6	4
4	12	40	73	92	67

Observa-se que a estabilidade atinge um máximo em pH = 6 (betanina é estável entre pH 4 e 6).^[55] Valores de meia-vida parecidos foram obtidos em um estudo de estabilidade em água pura: as betalaínas catiônicas betanina e indicaxantina apresentaram meias-vidas de 130 e 996 h, respectivamente, enquanto o valor para a betalaína cumarínica artificial (de amina primária) foi de 4 h.^[21]

Em toda a faixa de pH (e em todas as temperaturas), *N*-metil-*m*-betalainofenol (**2**) e *N*-metil-fenilbetalaína (**4**) são pelo menos uma ordem de grandeza mais estáveis do que as betalaínas correspondentes não metiladas. Apesar da estabilidade de betanina e indicaxantina, esse resultado não é a princípio esperado, a menos que os compostos **1** e **3** estejam com a porção imina protonada, conforme sugerido pelos dados de espectrometria de RMN.

Um estudo com iminas derivadas de benzofenona e aminas alifáticas ($R=NH_2$, $R=N(H)CH_3$ e $R=N(CH_3)_2^+$) determinou que a imina catiônica (dimetilada) era a mais estável das três na região entre $2 < \text{pH} < 7$.^[56] A dependência da constante de hidrólise com o pH foi explicada considerando-se que a adição de água à forma protonada da imina (*i*) é a etapa determinante da velocidade de reação (Esquema 12). Sendo assim, a substituição de H por CH_3 diminui a eletrofilicidade do carbono aldimínico, levando ao aumento da estabilidade da imina. A esse efeito, soma-se o efeito hidrofóbico do metil, que contribui para afastar moléculas de água que fariam o ataque nucleofílico.^[56]



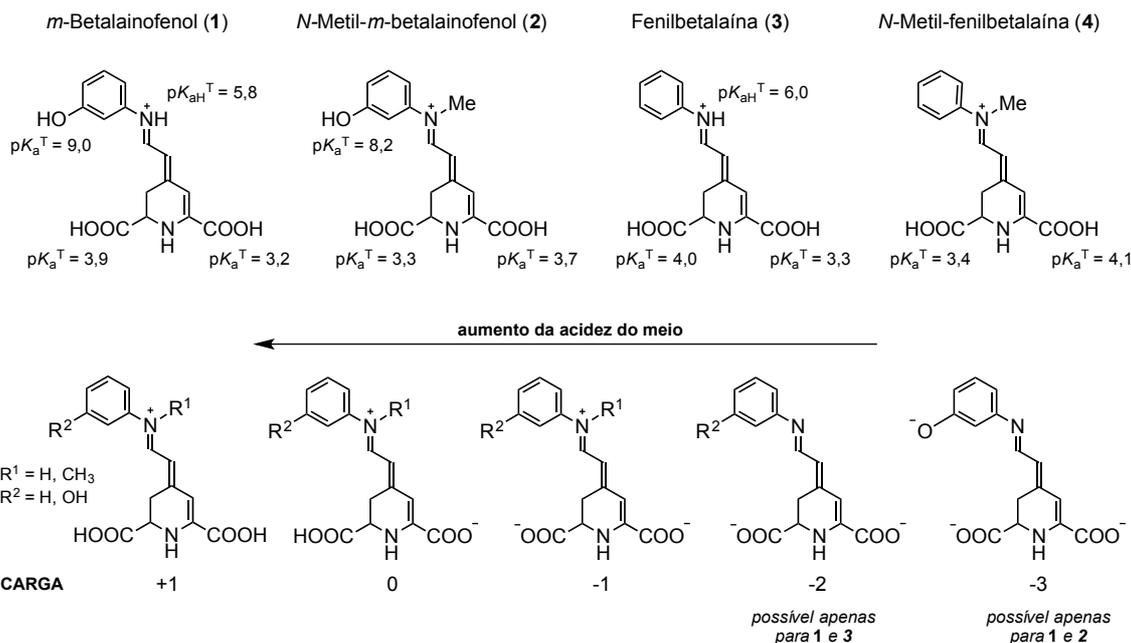
Esquema 12. Mecanismo de hidrólise de iminas em meio aquoso, via intermediário carbinolamina.

Dessa forma, a maior estabilidade de **2** e **4** em relação a **1** e **3** protonadas poderia ser explicada considerando-se o mesmo argumento: a formação da carbinolamina é a etapa lenta da reação e o grupo metil diminui a eletrofilicidade do carbono aldimínico e aumenta o efeito hidrofóbico na periferia do sítio de ataque nucleofílico da água.

Embora não tenha sido possível determinar o pK_{aH} da porção imina das betalaínas **1** e **3**, sabe-se que, de forma geral, o pK_{aH} de uma imina é duas a quatro unidades abaixo do valor determinado para a amina precursora.^[57] Além disso, o valor teórico de pK_{aH} para **1** e **3** foi determinado em 5,8 e 6,0 respectivamente. O conjunto de resultados apresentados até o momento corrobora a hipótese de que em pH entre 3 e 7 a imina estaria realmente protonada.

Todavia, o estado de protonação da imina não é suficiente para explicar o fato de o perfil de dependência de k_{obs} no pH das quatro betalaínas ser igual. A decomposição das betalaínas **1** e **3** está, *a priori*, sujeita a catálise ácida, pois a protonação da imina favorece a hidrólise. Porém, o mesmo comportamento é o observado para **2** e **4**, que não são passíveis de protonação da imina.

Algo que as quatro betalaínas têm em comum e poderia explicar o mesmo comportamento das betalaínas **1/3** e **2/4** são as carboxilas do sistema 1,7-dHm. O pK_a desses grupos foi relatado na literatura para betanina e indicaxantina como 3,4 e 3,3, respectivamente.^[58,59] Experimentos preliminares de titulação potenciométrica em nosso grupo detectaram um pK_a em 2,6 para betanina, e 3,0 para *m*-betalainofenol, mas por limitações impostas pela quantidade disponível de composto, não foram concluídos e realizados com todas as betalaínas até o momento. Os pK_a s teóricos dos ácidos carboxílicos das betalaínas preparadas puderam ser obtidos pela ferramenta de simulação do programa Marvin Suite e são apresentados no Esquema 13. Os valores são próximos aos da literatura para as betalaínas naturais e similares entre as quatro betalaínas. O pK_a da amina do anel 1,2,3,4-tetraidropiridínico foi previsto como maior do que 20, de modo que o grupo deve estar predominantemente protonado nas condições estudadas.



Esquema 13. Valores de pK_a teóricos (pK_a^T) de grupos ionizáveis das betalainas, calculados com o programa Marvin Suite, e os estados de protonação predominantes em cada faixa de pH.

Em decorrência dos pK_a s, a carga global das betalainas muda com o pH (Esquema 13).^[60] Na faixa de pH em que a hidrólise foi estudada, as quatro betalainas estão gradativamente passando da forma zwitteriônica (0) para o mono-ânion (-1), pois os pK_a s dos ácidos carboxílicos recaem entre 3 e 4. Essa proposta explica a diminuição do k_{obs} de hidrólise na faixa de pH entre 3 e 6 inclusive para as betalainas *N*-metiladas, pois o aumento do caráter aniônico poderia diminuir a eletrofilicidade do carbono aldimínico e desfavorecer o ataque nucleofílico da água. Nesse modelo, o aumento de k_{obs} observado de pH 6 a 7 (Figura 10) seria reflexo da diminuição da importância da catálise ácida, ou de um efeito de compensação relacionado ao aumento da concentração de HO^- , ou de uma base geral (*e.g.*, HPO_4^{2-} do tampão), no meio.

5.4. Potencial redox

As caracterizações estrutural, fotofísica e de estabilidade evidenciaram que a protonação/desprotonação das betalaínas é relevante para compreender a química destes pigmentos. Nesse sentido, o estudo eletroquímico buscou, além de determinar a energia necessária para a oxidação das diferentes betalaínas, avaliar se a transferência de elétrons está acoplada a uma transferência de prótons. A escolha da voltametria cíclica foi porque a técnica tem componentes cinéticos e termodinâmicos da oxidação, já que a velocidade (corrente) é medida em função da força-motriz da reação (potencial).^[61]

As betalaínas estudadas apresentaram perfil voltamétrico complexo, mas sistematicamente o aumento do pH facilita a oxidação; em outras palavras, a transferência de elétrons está acoplada à transferência de prótons. Para a maioria dos picos anódicos, o potencial varia ~ 59 mV por unidade de pH, de modo que o número de elétrons transferidos é igual ao de prótons ($v/n \sim 1$).

Os voltamogramas cíclicos dos quatro compostos apresentaram um processo reversível em baixo potencial (0 a 500 mV) e um processo anódico irreversível com maior intensidade de corrente em potencial mais alto (entre 600 e 1000 mV). Numa primeira análise, poder-se-ia imaginar que a oxidação da betalaína ocorre na região de maior potencial. Os potenciais diminuem de pH 3 até 7: de 831 para 631 mV *vs.* Ag/AgCl, KCl sat. para **1**; de 1020 para 795 mV para **2**; de 894 para 766 mV para **3** e de 1005 para 825 mV para **4**. Esses valores estão acima do determinado para betanidina, a forma deglicosilada de betanina, que apresentou pico anódico entre 300 mV (pH = 8) e 600 mV (pH = 3) na voltametria cíclica.^[62]

Além disso, embora o potencial de pico anódico medido não possa ser correspondido diretamente ao potencial padrão de redução, esperava-se obter valores

inferiores a 680 mV, o potencial de redução de $\text{ABTS}^{*\cdot+}/\text{ABTS}$,^[63] supondo que a oxidação da betalaína sobre o eletrodo relaciona-se à oxidação na presença de $\text{ABTS}^{*\cdot+}$. Os picos na região de alto potencial estão quase todos acima de 680 mV (vide item 5.5). Dessa forma, e considerando sua semelhança com os valores reportados para betanidina, é mais provável que o processo reversível na região de baixo potencial se refira à oxidação de interesse. Se o produto dessa primeira oxidação, ou um derivado hidrolítico, polimerizar e adsorver sobre o eletrodo, como já foi proposto para betanidina,^[62] o processo acima de 600 mV poderia representar a oxidação da betalaína sobre o eletrodo passivado.

O padrão complexo de oxidação não afeta a interpretação dos resultados porque os dois processos anódicos parecem correr em paralelo, *e.g.*, em $\text{pH} = 3$, o composto **1** tem o menor potencial de pico anódico nas duas regiões (306 e 831 mV), e sua versão metilada (**2**) tem maior potencial (349 e 1020 mV), bem como sua versão sem fenol (**3**) (384 e 894 mV). Ou seja, independentemente da identificação dos picos do voltamograma, todos parecem ser influenciados pela estrutura da betalaína e, portanto, podem ser usados na discussão de relações estrutura-propriedade.

Como os picos na região de menor potencial são menos definidos e não puderam ser localizados em todos os pHs, o uso da segunda oxidação é mais conveniente. De modo geral, o grupo metilímínio aumenta o potencial de pico anódico, enquanto o fenol diminui esse valor. Analisando apenas o potencial, em $\text{pH} = 3$, todas as betalaínas preparadas são antioxidantes melhores do que betanidina. Entretanto, como será discutido adiante, não só o potencial controla a capacidade antirradicalar medida.

5.5. Capacidade antirradicalar

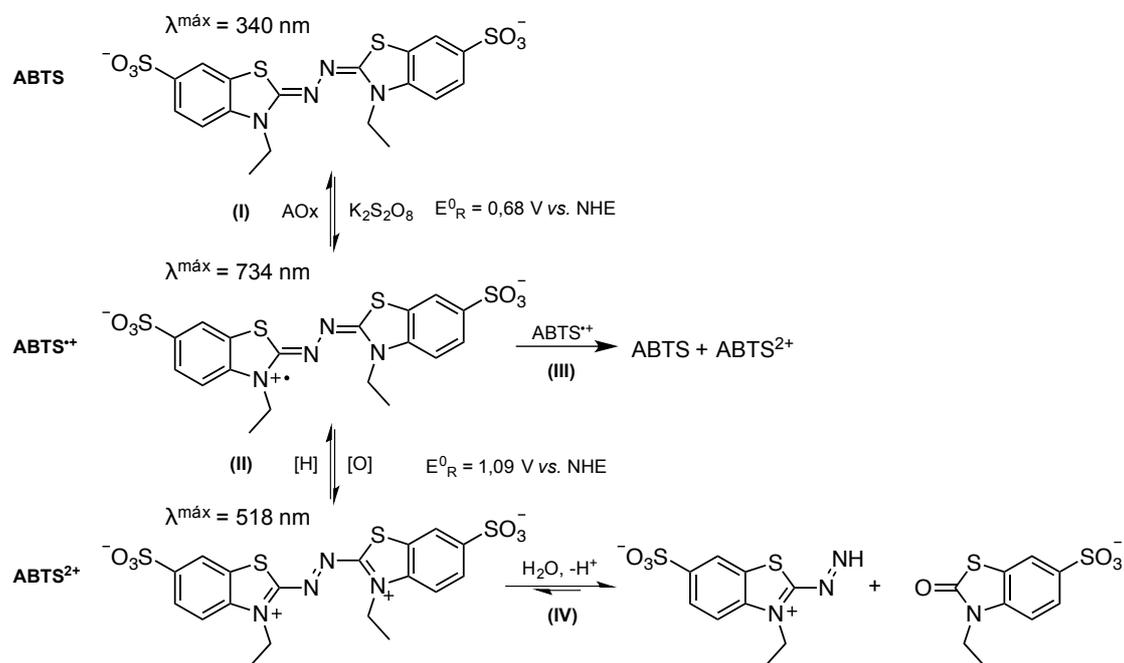
A capacidade antirradicalar das betalaínas estudadas foi determinada pelo ensaio TEAC/ABTS. Trata-se de um protocolo descrito para antioxidantes como glutatona e ácido ascórbico que, em linhas gerais, consiste em medir espectrofotometricamente a redução de $ABTS^{•+}$ por um antioxidante ao longo de 6 min.^c Os autores do protocolo recomendam usar no preparo do radical excesso de ABTS para que a oxidação seja incompleta, minimizando assim a interferência da reação de desproporcionamento dos radicais.^[38] Há mais interferências sobre a confiabilidade da medida, que podem vir da formação de adutos covalentes,^[64] de efeitos estéricos na reação com o radical^[11] e do desconhecimento dos mecanismos de redução disponíveis – se via transferência de elétron, ou de átomo de hidrogênio.^[11,38,64] Alguns estudos na literatura verificaram ainda a dependência de TEAC medida em relação à concentração de antioxidante usada nos ensaios, ao tempo de medição^[38,65] e ao oxidante escolhido para o preparo do radical.^[66] Apesar dessas dificuldades, avaliou-se que o ensaio seria uma forma simples de obter dados comparativos e relacionar a capacidade antirradicalar com a estrutura dos compostos. Por isso, antes de iniciar os ensaios, julgou-se necessário estudar o radical separadamente, na ausência de antioxidante.

A constante de decaimento do radical observada, k_{obs} , depende da concentração inicial de radical, da presença e da concentração de PBS e do pH. O efeito do PBS poderia estar relacionado à força iônica, mas essa hipótese foi descartada porque quantidades crescentes de NaCl adicionadas ao PBS não afetaram k_{obs} . Quando se variou o pH de tpBR, que também contém fosfato, k_{obs} aumentou, o que sugere que o processo responsável pelo decaimento da banda em 734 nm é sujeito a catálise básica

^c Protocolo descrito em um artigo com mais de 8000 citações entre 1999 e 2015.

geral ou catálise nucleofílica dos íons fosfato, mono-hidrogenofosfato e di-hidrogenofosfato. ABTS e $ABTS^{•+}$ estão sujeitos a muitas reações, representadas no Esquema 14.

A oxidação de ABTS por persulfato (reação I), na proporção usada no ensaio TEAC/ABTS, é propositalmente incompleta: isso evita o avanço da oxidação até $ABTS^{2+}$ (reação II) e a permanência de ABTS em solução minimiza a reação de desproporcionamento do $ABTS^{•+}$, que também leva à formação do dicátion, sobretudo em meio alcalino (reação III).^[38,67,68] Alguns autores relataram o aumento da absorção em 287, 279 e 240-260 nm^[69], associando-o a produtos de decomposição de $ABTS^{2+}$ (reação IV) pelos íons fosfato do tampão.^[70] Vale destacar que qualquer reação que leve ao consumo do $ABTS^{•+}$ levará a um aumento do valor de TEAC medido.



Esquema 14. Reações relevantes envolvendo ABTS e seus radicais. Referências das reações no texto.

Os potenciais das espécies trazem uma informação importante: apenas antioxidantes com potencial de redução inferior a 0,68 V (potencial de redução do par

ABTS^{•+}/ABTS vs. NHE)^[71] reagem por vias redox com ABTS^{•+}. Antioxidantes com potencial superior a 0,68 V, mas ainda inferior a 1,09 V (potencial de redução de ABTS²⁺/ABTS^{•+})^[71] podem reduzir ABTS²⁺ eventualmente presente no meio, levando à formação de mais ABTS^{•+}.

Tendo em vista a complexidade do sistema ABTS/ABTS^{•+}, o estudo do cátion-radical foi importante para dar confiabilidade ao ensaio TEAC e reconhecer suas limitações. O sistema é altamente dependente das condições do meio e, mesmo com o uso de um antioxidante de referência, a capacidade antirradicalar está longe de ser um valor absoluto, sendo específico para as condições usadas na determinação. Novamente, como os objetivos deste trabalho dependem da interpretação de valores relativos, não são comprometidos pelo método escolhido, que traz a vantagem de ser versátil e ter sido usado em muitas determinações na literatura, inclusive de misturas complexas e compostos naturais.

As betalaínas apresentaram TEAC dependente do pH, do tempo de reação com o radical, e da estrutura. *m*-Betainofenol (**1**) apresentou as maiores capacidades antirradicalares em todas as condições de pH e tempo, seguida por fenilbetalaína (**3**). *N*-Metil-betainofenol (**2**) e *N*-metil-fenilbetalaína (**4**) apresentaram os menores valores de TEAC, ainda superiores a Trolox.

5.5.1. Efeito da estrutura das betalaínas

Em um primeiro momento, o efeito estrutural será discutido, com base em TEAC medida após 6 min de reação. Pode-se considerar que a capacidade antirradicalar de **4** representa um valor intrínseco a todas as betalaínas da série, já que se trata da estrutura mais *limitada*, em termos de oxidação, *i.e.*, não possui porção fenólica e nem

elétrons n livres na aldimina. Para evidenciar a diferença entre as betalaínas, TEAC da Tabela 11 é reportada relativa a **4** ($\Delta\text{TEAC} = \text{TEAC}(i) - \text{TEAC}(\mathbf{4})$).

Tabela 11. ΔTEAC das betalaínas preparadas (TEAC de *N*-metil-fenilbetalaína (**4**) foi subtraída de $\text{TEAC}^{6\text{min}}$). A média sobre os cinco pHs é informada na última linha.

ΔTEAC				
pH	1	2	3	4
3	+3,5	+0,0	+2,4	0
4	+2,8	-0,6	+2,3	0
5	+3,0	-0,0	+3,5	0
6	+3,7	-0,2	+2,4	0
7	+2,6	-0,1	+0,8	0
média	+3,1	-0,1	+2,3	0

Alguns aspectos chamam a atenção na Tabela 11: por um lado, a hidroxilação de **4** tem pouco efeito sobre a capacidade antirradicalar, o que é inesperado considerando-se que fenóis geralmente estão associados a altas capacidades antirradicalares. Por outro lado, **1** tem ΔTEAC superior a **3**, o que só pode ser efeito da hidroxilação. A substituição de $-\text{CH}_3$ por $-\text{H}$ em **2** e em **4** aumenta a capacidade antirradicalar das betalaínas mais do que a presença do fenol. A ordem de TEAC não reproduz a hierarquia dos potenciais de oxidação ($E_{p,a}$) determinados por voltametria cíclica, mas o efeito estrutural e do meio, sim: a metilação aumenta $E_{p,a}$ e diminui TEAC, a hidroxilação diminui $E_{p,a}$ e aumenta TEAC, e o aumento do pH diminui $E_{p,a}$ e aumenta TEAC.

Os principais mecanismos de oxidação de fenóis descritos na literatura são processos que envolvem transferência de elétron e de próton. São pelo menos três possibilidades, sem contar vias intermediárias: abstração de próton seguida de transferência de elétron (*sequential proton loss electron transfer*, SPLET), transferência de elétron seguida de transferência de próton (*electron transfer-proton transfer*, ETPT)

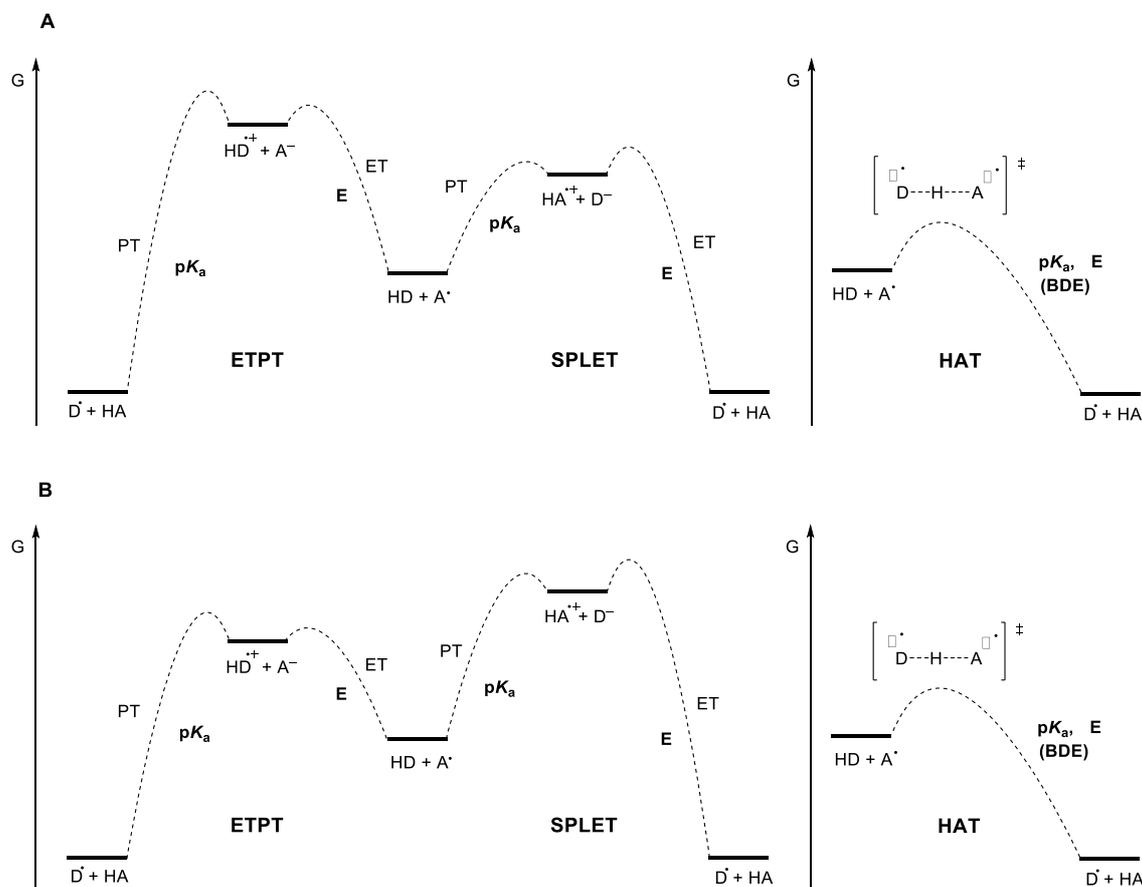
e a via concertada, transferência de átomo de hidrogênio (*hydrogen atom transfer*, HAT).^[72] ^d Este último é o principal mecanismo dentro da família de transferências concertadas de próton e elétron (*proton-coupled electron transfer*, PCET).^[72]

O Esquema 15 apresenta as três possibilidades em termos de uma reação entre um doador HD e um aceptor genérico A (conversão de HD + A^{*} para HA + D^{*}). A barreira potencial para a ocorrência de transferência de próton (PT) está relacionada com a variação do p*K*_a (ΔpK_a) entre o reagente e a espécie intermediária formada. De forma análoga, a barreira para a transferência de elétron (ET) relaciona-se com a diferença do potencial redox E (ΔE) entre reagentes e intermediários. Em ambos os casos, o passo subsequente é rápido e o mecanismo é sequencial, ou seja, ocorre em dois processos elementares (SPLET ou ETPT).

Contudo, pensando na via SPLET, a transferência do próton provoca um abaixamento do potencial redox, o que pode iniciar a doação do elétron antes de a saída do próton se completar, *i.e.*, levar a uma transferência concertada de próton e elétron (PCET). Da mesma forma, pensando na via ETPT, a doação do elétron leva à diminuição do p*K*_a da espécie, e pode adiantar a desprotonação, que ocorre concertadamente. No caso particular em que PT e ET ocorrem concertada e sincronizadamente, trata-se de uma transferência de átomo de hidrogênio (HAT), cuja barreira potencial é controlada pela diferença entre a energia de dissociação (BDE) da ligação H–D (no doador, ou antioxidante) e da ligação H–A (no radical, ou aceptor). Como BDE é uma propriedade termodinâmica e pode ser calculada pela soma das

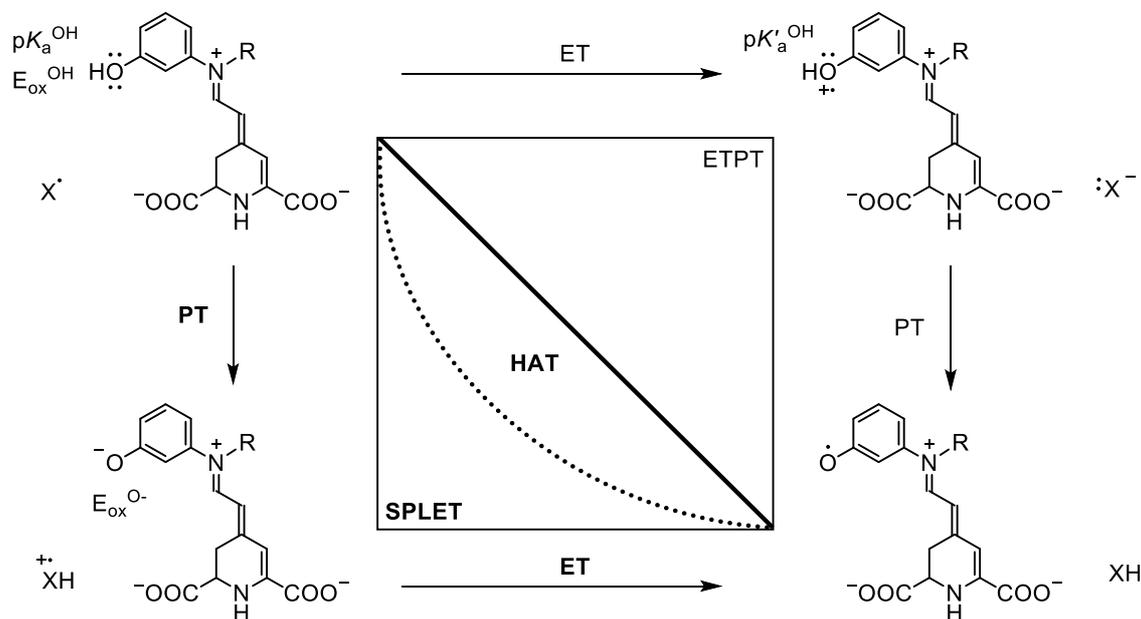
^d A nomenclatura destas vias ainda não foi padronizada na literatura. HAT é considerada aqui como um tipo de PCET, mas alguns trabalhos consideram-nas como classes separadas de mecanismos (Truhlar e colaboradores).^[80] Ingold e colaboradores consideram a designação PCET mais adequada para fenóis do que HAT.^[81] Weinberg considera PCET como qualquer processo que envolva elétrons e prótons, não necessariamente de forma concertada.^[69]

energias de Gibbs das etapas ET e PT, pode-se dizer que a barreira potencial do processo HAT é influenciada por ΔpK_a e ΔE combinados.



Esquema 15. Diagrama qualitativo dos principais processos de transferência de elétron e próton. No sistema **A**, a via sequencial SPLET tem menor barreira potencial do que ETPT; **B** apresenta a situação contrária. Em ambos os casos representados, o mecanismo concertado HAT oferece uma via de formação do produto mais favorável do ponto de vista cinético.

As mesmas vias podem ser representadas para uma betalaína fenólica num diagrama bidimensional como o do Esquema 16. Nas bordas do diagrama, a transferência de próton (PT) e de elétron (ET) ocorrem de forma sequencial (SPLET ou ETPT), e existe um intermediário entre os dois processos (espécies nos vértices do quadrado). No interior do diagrama, a transferência é concertada (PCET) — especificamente na diagonal, tem-se HAT — e um único estado de transição conecta o reagente ao produto.

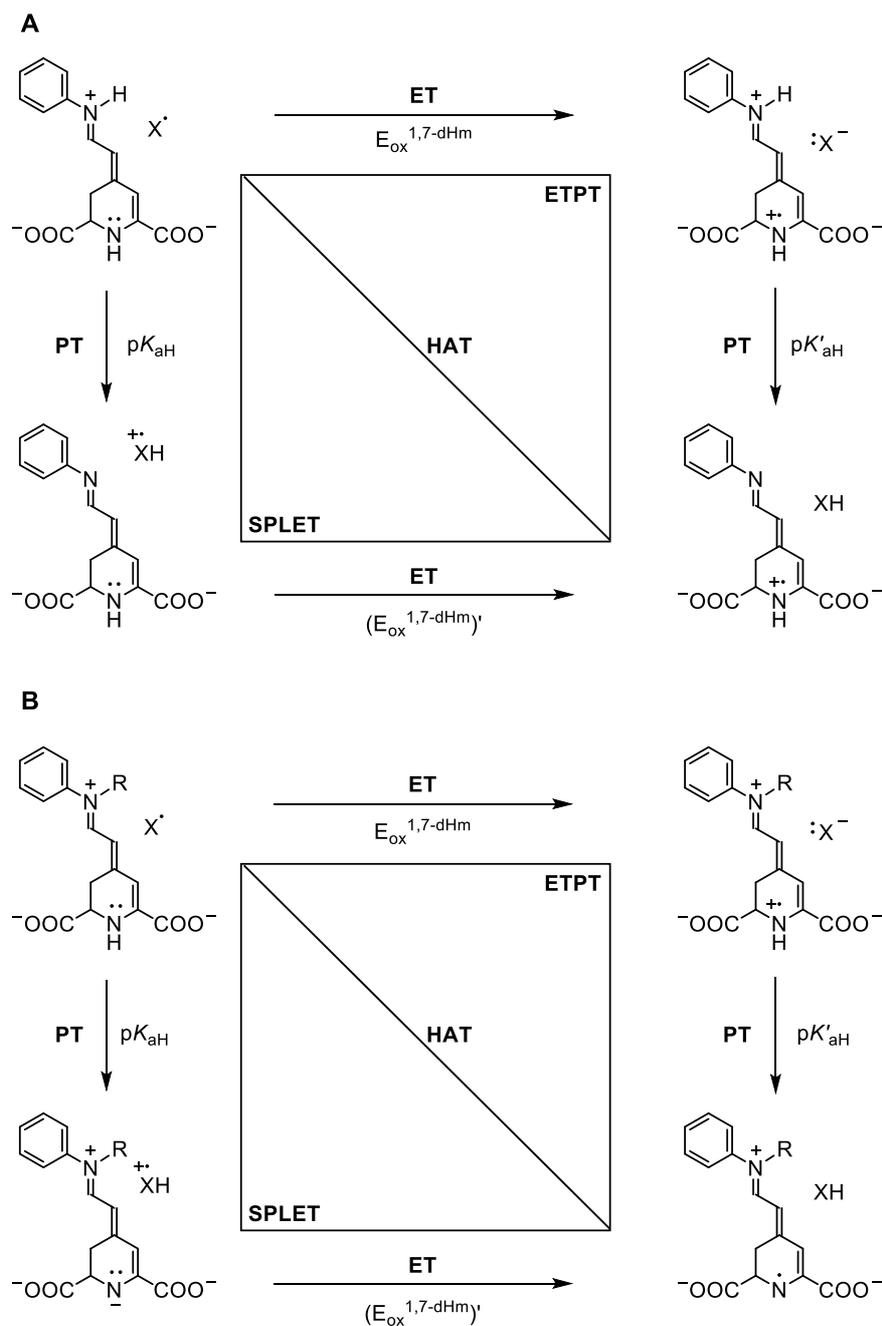


Esquema 16. Diagrama bidimensional para os possíveis mecanismos de reação entre a porção fenólica de uma betalaína e um radical genérico X^\bullet .

A via concertada tende a ser mais favorável, como foi representado nos diagramas do Esquema 15. No sistema fenol/fenoxila, os intermediários fenolato e cation-radical fenoxila são, por definição, estruturas de alta energia, mais reativas do que o produto final. Dessa forma, ΔG^0 da primeira etapa da via sequencial, seja PT ou ET, tende a ser maior do que o ΔG^0 da via concertada. Como a energia de ativação ($\Delta^\ddagger G$) é, no mínimo, igual a ΔG^0 , a via concertada tende a apresentar menor barreira energética.^[72] A vantagem da via concertada não é regra: depende do meio e só ocorre se próton e elétron são termodinamicamente acoplados, *i.e.*, se a desprotonação provoca uma grande queda de E , ou se a oxidação diminui muito o pK_a de pelo menos um dos reagentes, de modo que os intermediários são tão energéticos que ficam acima do estado de transição para HAT no diagrama de energia.

Em solventes apolares, HAT é de fato o mecanismo predominante para fenóis. Em meios polares, existe uma contribuição significativa de SPLET, porque o solvente estabiliza o intermediário negativamente carregado.^[73] Não obstante à complexidade do tema, a oxidação de fenóis é considerada relativamente bem compreendida na literatura. Ao contrário, o mecanismo de oxidação do núcleo característico de betalaínas nunca foi estudado. Como o grupo 1,7-dHm tem pares de elétrons livres e prótons ácidos, é natural supor que os mesmos mecanismos de fenóis estão disponíveis (Esquema 17). Entretanto, é difícil decidir não só entre os vários mecanismos da reação — o que requereria um estudo de efeito isotópico cinético —, como também quais os prótons e elétrons envolvidos.

Pela simulação dos pK_a s, o grupo imina é muito mais ácido do que a amina do anel 1,2,3,4-tetraidropiridínico e poder-se-ia pensar que a participação do seu próton é mais provável. No entanto, o pK_a só é determinante para o mecanismo SPLET. Se o potencial de oxidação da amina for suficientemente baixo, ou o mecanismo concertado tiver uma barreira potencial pequena, o envolvimento do próton da amina volta a ser plausível.

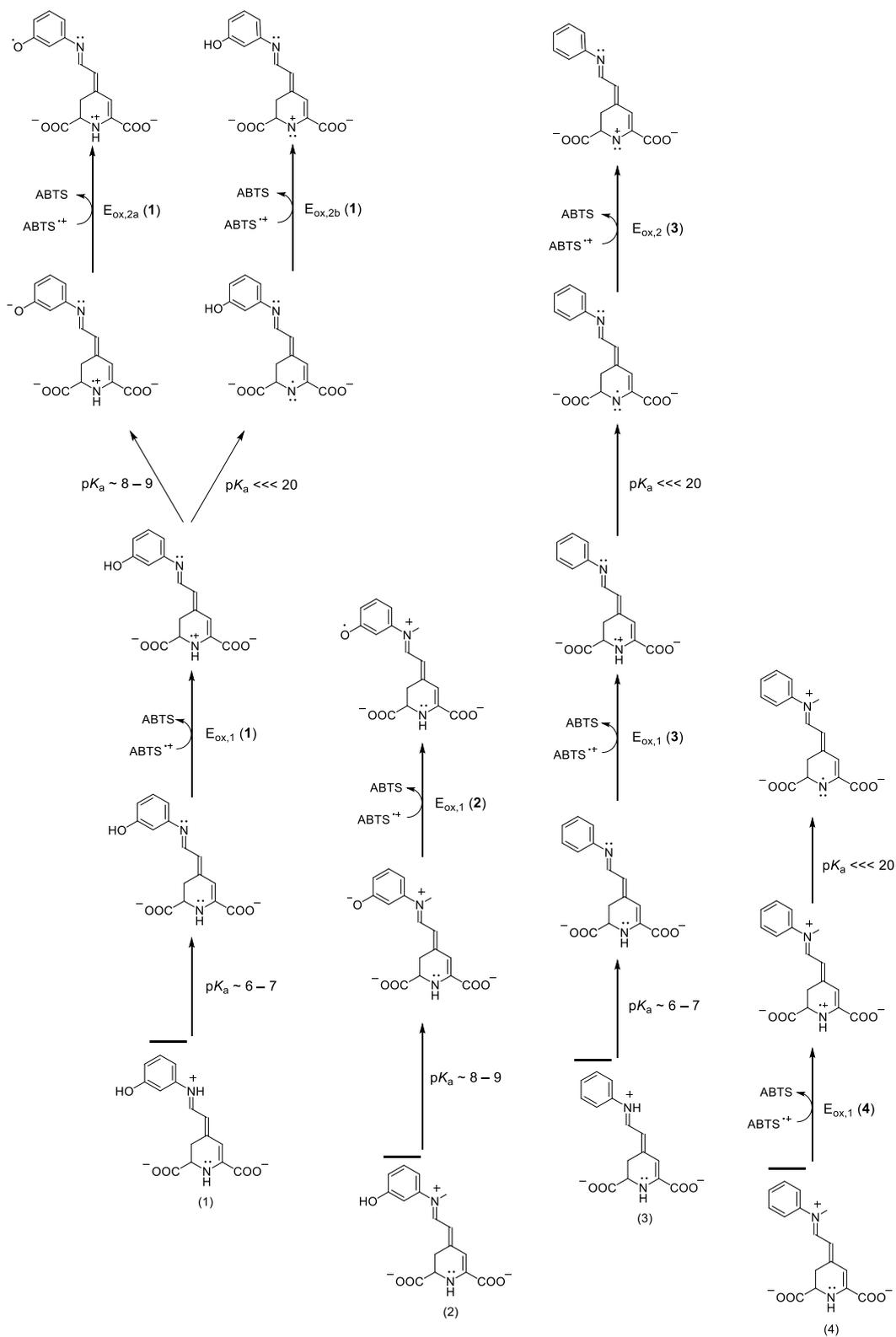


Esquema 17. Diagrama bidimensional para os possíveis mecanismos de reação entre o sistema 1,7-diazaeptamético de uma betalaína e um radical genérico X^\bullet . O sistema **A** é proposto para as betalaínas não metiladas; **B** está, *a priori*, disponível para as metiladas e não-metiladas.

A análise de resultados de TEAC deve se restringir a reações que levam a redução de $ABTS^{+\bullet}$. Desta forma, o Esquema 18 é uma tentativa de interpretar os valores de TEAC determinados para as betalaínas **1** a **4** a partir das hipóteses

mecanísticas apresentadas anteriormente. O valor de TEAC dos compostos **1** e **3** são próximos (em pH = 6: 4,0 e 2,7, respectivamente), assim como ocorre com **2** e **4** (0,5 e 0,3, respectivamente). Isso implica que metilação, mais do que a ausência do fenol, compromete a formação de espécies capazes de reduzir ABTS^{•+}.

O composto **1** tem uma imina protonada com pK_{aH} próximo a 7. A sua desprotonação leva à formação de um diânion que pode reduzir ABTS^{•+} convertendo-se em uma espécie radicalar. Esta espécie ainda pode ter sua porção fenólica desprotonada e o fenolato resultante também pode reduzir ABTS^{•+}. Na espécie radicalar, o pK_{aH} da amina do anel 1,2,3,4-tetrahidropiridínico pode estar tão reduzido, que sua desprotonação e oxidação também ocorrem, acrescentando uma terceira possibilidade de oxidação para o composto **1**. O composto **3** não possui o -OH fenólico, porém a primeira etapa de PT e ET e a segunda etapa envolvendo o anel, descritas para **1**, estão disponíveis. Isso explica qualitativamente o efeito reduzido do -OH fenólico sobre a capacidade antirradicalar. O composto metilado **2** não possui um próton ácido o suficiente no sistema 1,7-dHm que permita a sua desprotonação em água. Contudo, o fenol pode ser desprotonado e reduzir ABTS^{•+}. A espécie radicalar resultante ainda apresenta restrições energéticas para a desprotonação do sistema 1,7-dHm, já que, ao contrário do que ocorre com **1** e **3**, a primeira oxidação não deve afetar significativamente o pK_{aH} da amina do anel. O composto **4** tem a mesma limitação de desprotonação do sistema 1,7-dHm, mas pensando num mecanismo concertado ou ETPT, não se pode descartar sua oxidação. É importante ressaltar que com os dados apresentados nesse trabalho não é possível definir se as reações de transferência de próton e transferência de elétron ocorrem de forma acoplada (concertada) ou não. Apesar disso, a ocorrência de HAT ou SPLET/ETPT não compromete a validade da proposta.

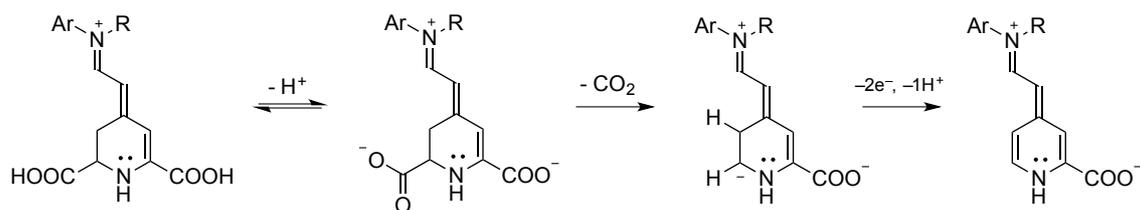


Esquema 18. Proposta de vias de oxidação das betalainas preparadas. Conforme os resultados obtidos, os potenciais de oxidação representados seguem a seguinte relação: $E_{ox,1} (1) < E_{ox,1} (2) < E_{ox,1} (3) < E_{ox,1} (4)$. Para justificar a sequência dos eventos, $E_{ox,1} < E_{ox,2}$.

5.5.2. Possíveis reações laterais

Em princípio, o método TEAC mede o número total de radicais $ABTS^{*\cdot}$ consumidos por mol de antirradical. Se a reação redox é um equilíbrio, a constante de equilíbrio determina as concentrações *finais* de produtos e reagentes, e um antioxidante que tenha um equilíbrio mais deslocado para os produtos apresentará maior TEAC. O aumento do pH do meio aumenta a concentração das formas desprotonadas do fenol e da imina, que têm potenciais de oxidação mais baixos comparados às respectivas formas protonadas. A diminuição de E_{ox} reduz a barreira de energia para a transferência de elétron,^[73] podendo aumentar TEAC medida. Entretanto, o efeito do pH, embora menos acentuado, ainda é presente para **4**, que não tem próton imínico nem fenólico, reforçando a hipótese de que há outros pontos de oxidação na molécula além dos apresentados na seção anterior.

Um estudo da oxidação de betanina por $ABTS^{*\cdot}$ detectou 2-decarboxi-2,3-dihidrobetanina como principal produto de oxidação ($-46 m/z$) e um produto decarboxilado di-hidroxilado ($-12 m/z$).^[32] A reação de **2** e **4** com $ABTS^{*\cdot}$ leva a produtos com m/z compatíveis com a ocorrência de descarboxilação (Esquema 19).



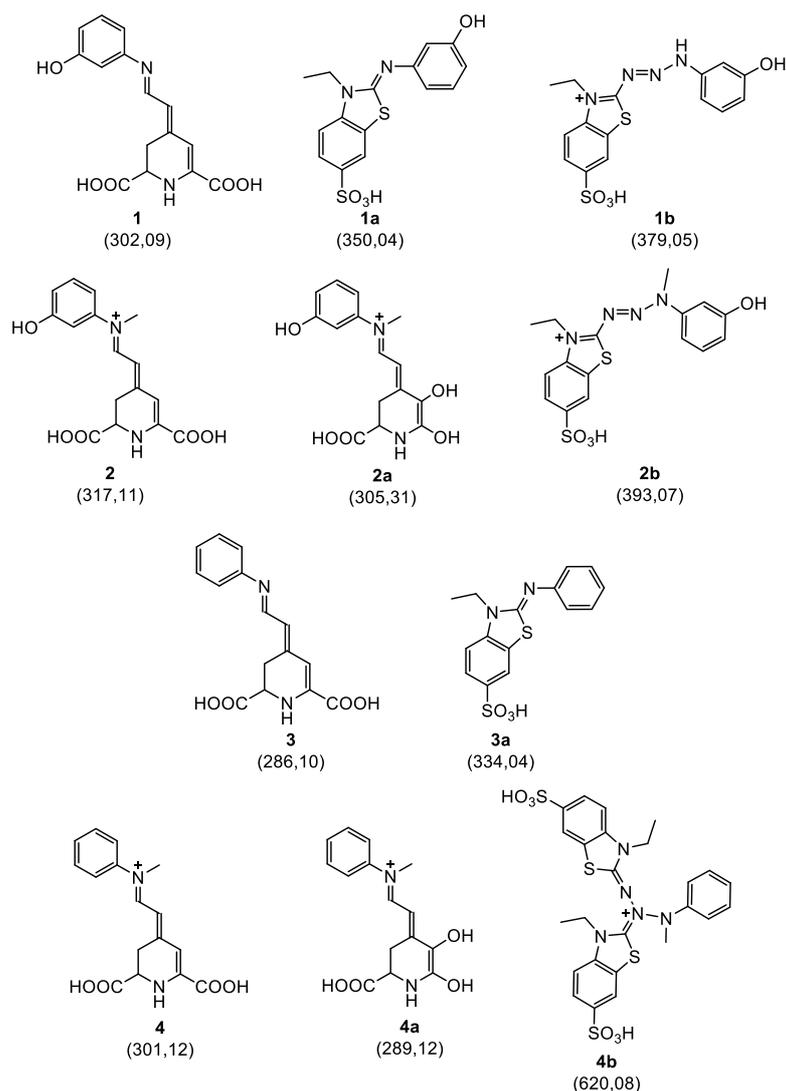
Esquema 19. Mecanismo de descarboxilação oxidativa da carboxila ligada a $C-sp^3$.

Esta via se aplica a todas as betalainas e de fato é favorecida em meios alcalinos, mas ainda não é suficiente para justificar quantitativamente os valores de TEAC determinados. No caso de **1**, TEAC chega a 4,8 em $pH = 7$, o que implica consumo de quase 10 equivalentes de $ABTS^{*\cdot}$ por mol de antioxidante. Os valores altos de TEAC já

foram explicados pelo fato de a medida de capacidade antirradicalar ter contribuição não só de reações entre o antioxidante original e ABTS^{•+}, mas também de reações com produtos de oxidação que ainda sejam reativos, e que podem ter contribuições da estrutura do radical.^[74,75]

A caracterização dos produtos de reação sugere que esse é o caso das betalaínas estudadas. O mesmo valor de diferença de massa entre as betalaínas se manteve entre seus produtos, indicando que a estrutura do produto carrega a porção anilínica da betalaína.^[76] Há espécies de *m/z* superior à das betalaínas, que não foram detectados em estudo similar conduzido com betanina e ABTS^{•+} em que se usou excesso de betalaína. Aqui, reproduziu-se o excesso de radical tal como é usado no ensaio TEAC/ABTS, o que pode explicar a diferença nos resultados.^[32]

Os vários produtos detectados estão presentes em todos os tempos de reação e todos os pHs, mas em *proporções* diferentes, o que vai ao encontro da proposta de que os produtos iniciais continuam reagindo e TEAC medida é na verdade uma soma da capacidade antirradicalar das betalaínas e seus derivados com ABTS. Um padrão parecido foi verificado para a oxidação de polifenóis por ABTS^{•+}, em que ocorre formação de adutos covalentes primários instáveis, que liberam uma parte da molécula de ABTS para originar adutos secundários, estes sim estáveis.^[76] Com base nesses estudos e em padrões de fragmentação, alguns produtos de oxidação são propostos no Esquema 20.



Esquema 20. Possíveis produtos da reação entre ABTS^{++} e as betalainas, segundo resultados da caracterização por espectrometria de massas. Entre parênteses, os valores de m/z detectados.

O Esquema 18 apresentou as reações iniciais de betalainas e espécies reativas betalainicas com ABTS^{++} sem elaborar sobre eventuais reações que levariam aos produtos apresentados no Esquema 20. Obviamente, a ocorrência de descarboxilação oxidativa e outras clivagens de mesma natureza levariam a um aumento da capacidade antirradicalar. Contudo, a reação destas espécies com ABTS^{++} deve ser mais lenta e contribuir menos do que os radicais betalainicos formados na primeira etapa redox.

Apesar de a distinção entre o padrão de reação de ABTS^{•+} com betalaínas fenólicas *versus* não-fenólicas, ou *N*-metiladas *versus* não metiladas não ser clara, a formação de adutos covalentes redutores explicaria a magnitude de TEAC. Ademais, ela poderia ser responsável pelo efeito do tempo sobre a capacidade antirradicalar.

5.5.3. Efeito do tempo

Ainda que a capacidade antirradicalar tenha sido definida como uma propriedade termodinâmica, determinada pela estabilidade relativa entre reagentes e produtos da reação redox, fica claro que existe um componente cinético, de atividade antirradicalar, na medida pelo método TEAC. Os autores que propõem o ensaio com ABTS em 6 min validam-no com antioxidantes como ácido ascórbico e glutatona, e comparam os resultados obtidos para tempos de 1 e 3 min de reação.^[38] Entretanto, alguns autores observaram a diferença entre antirradicais que consomem ABTS^{•+} instantaneamente, sem efeito prolongado (Trolox, hidroquinona); antirradicais que têm ação instantânea e efeito prolongado (catecol) — caso das betalaínas **1**, **2**, **3** e **4** —, e antirradicais que não provocam queda brusca na absorção, e sim um decaimento lento e contínuo, entre outros grupos intermediários.^[66] A Tabela 12 contém a média de TEAC sobre o pH em quatro momentos do ensaio.

Tabela 12. Média sobre o pH da capacidade antirradicalar em relação a Trolox (TEAC).

TEAC médio				
t (min)	1	2	3	4
6	3,0 ± 0,8	-0,2 ± 1,0	2,2 ± 0,7	-0,1 ± 0,9
30	4,5 ± 1,0	1,2 ± 0,4	3,0 ± 0,8	1,2 ± 1,1
60	4,7 ± 0,8	1,8 ± 0,4	3,2 ± 0,7	1,9 ± 0,8
120	4,8 ± 0,3	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,5	2,3 ± 0,6

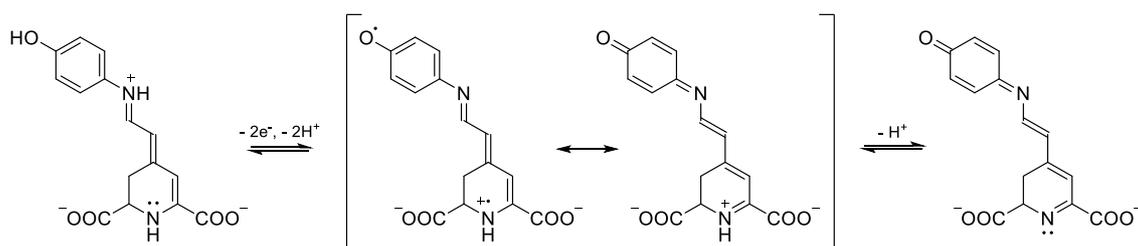
TEAC das betalaínas aumenta com o tempo de reação, o que poderia, *a priori*, ser reflexo da hidrólise a HBt, que é antioxidante potente (TEAC = 2,7 em pH = 7).^[77]

Todavia, a variação ao longo do tempo não reflete o efeito do pH sobre k_{obs} de hidrólise. O perfil de reação das betalaínas **2** e **4** com ABTS^{*+} é claramente mais lento do que o das betalaínas **1** e **3**, como pode ser visto nas curvas cinéticas do ensaio ABTS (8.18). Além disso, **2** e **4** exibem efeito pró-oxidante ($\text{TEAC} < 0$) no início do ensaio. Essas duas observações sugerem que existem pelo menos dois processos em curso: um de consumo de radicais (anti-oxidante) e um de formação de mais radicais (pró-oxidante), mas que quando o primeiro é muito rápido (betalaínas **1** e **3**), seu efeito sobrepõe-se ao do segundo, que não é visualizado no ensaio. Quando o consumo de radicais é mais lento, como com **2** e **4**, inicialmente é possível observar a formação de mais ABTS^{*+} , mas gradualmente o consumo torna-se mais importante. A formação de ABTS^{*+} pode resultar da presença de pequenas concentrações de ABTS^{2+} em solução, que seria reduzido a ABTS^{*+} pelas betalaínas mais facilmente do que ABTS^{*+} é reduzido a ABTS. A reação envolve a oxidação das betalaínas, mas como o ensaio só mede concentração de ABTS^{*+} , seria computada como efeito pró-oxidante.

Os resultados avaliando o método TEAC indicam que este método não é o mais adequado para determinar a capacidade antirradicalar de compostos que podem consumir o ABTS^{*+} por vias que não envolvem processos redox, o que leva a um valor superestimado de TEAC. Infelizmente, os dados de espectrometria de massas e relatos da literatura sugerem que ABTS^{*+} é bastante reativo na presença de espécies nucleofílicas, bem como sujeito a reações ácido-base.

Por fim, é interessante notar que *o*-betalainofenol e *p*-betalainofenol, regioisômeros de **1** que motivaram este projeto, apresentavam TEAC inferior à de **1**.^[29] Essa diferença também pode ser resolvida com base na proposta do Esquema 18: no regioisômero *meta*, as oxidações do fenol e do núcleo 1,7-dHm ocorrem

independentemente, consumindo pelo menos dois radicais. O produto birradicalar pode formar adutos e continuar a sua oxidação. Nos isômeros *orto* e *para*, fenol e núcleo 1,7-dHm estão conjugados e a via de oxidação que leva a iminoquinona está disponível (Esquema 21).^[78] A formação da iminoquinona também consome dois radicais, mas como se trata de estrutura estável e não-radicalar, pode constituir um produto final que interrompe a cadeia radicalar ou que limita a capacidade antirradicalar.



Esquema 21. Rota de oxidação de *p*-betalainofenol até a sua iminoquinona correspondente. Uma via análoga é possível para *o*-betalainofenol, mas não para *m*-betalainofenol (**3**).

6. Conclusões

A metilação da porção imínica de betalaínas parece aumentar a estabilidade estes pigmentos frente à hidrólise mas, infelizmente, compromete sua capacidade antirradicalar. Os efeitos eletrônicos resultantes da alteração estrutural das betalaínas puderam ser quantificados por meio de espectrometria de ressonância magnética nuclear. A presença de um grupo fenólico tem menor importância sobre a estabilidade e propriedades fotofísicas de betalaínas do que o metilímínio. O método TEAC baseado na redução de ABTS^{•+} não foi capaz de quantificar apropriadamente o número de radicais sequestrados por molécula de betalaína. Contudo, a análise dos valores relativos de TEAC permitiu estabelecer uma relação entre a estrutura da betalaína e sua capacidade antirradicalar. A presença de uma porção imínica permite processos de transferência de elétron vinculados a transferência de próton que diminuem a barreira potencial para a oxidação de betalaínas. A metilação aumenta esta barreira e, portanto, compromete o potencial antioxidante destes derivados.

7. Referências

- [1] K. J. Davies, *IUBMB Life* **2000**, *50*, 279–289.
- [2] I. N. Acworth, D. R. McCabe, T. J. Maher, in *Oxid. Antioxidants Free Radicals* (Eds.: S.I. Baskin, H. Salem), Taylor & Francis, Washington, **1997**, pp. 23–79.
- [3] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, **1999**.
- [4] H. J. Forman, M. Torres, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *166*, S4–S8.
- [5] G. A. Blaise, D. Gauvin, M. Gangal, S. Authier, *Toxicology* **2005**, *208*, 177–192.
- [6] K. Apel, H. Hirt, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 373–399.
- [7] P. Gao, H. Zhang, R. Dinavahi, F. Li, Y. Xiang, V. Raman, Z. M. Bhujwala, D. W. Felsher, L. Cheng, J. Pevsner, et al., *Cancer Cell* **2007**, *12*, 230–238.
- [8] L. Tesoriere, D. Butera, A. M. Pintaudi, M. Allegra, M. A. Livrea, *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 391–395.
- [9] K. Le Gal, M. X. Ibrahim, C. Wiel, V. I. Sayin, M. K. Akula, C. Karlsson, M. G. Dalin, L. M. Akyürek, P. Lindahl, J. Nilsson, et al., *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 1–7.
- [10] R. M. Perera, N. Bardeesy, *Nature* **2011**, *475*, 43–44.
- [11] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü, *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 957–998.
- [12] E. L. Bastos, P. Romoff, C. R. Eckert, W. J. Baader, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7481–7488.
- [13] M. M. Silva, M. R. Santos, G. Caroco, R. Rocha, G. Justino, L. Mira, *Free Radic. Res.* **2002**, *36*, 1219–1227.
- [14] R. J. Nijveldt, E. van Nood, D. E. C. van Hoorn, P. G. Boelens, K. van Norren, P. A. M. van Leeuwen, *Am J Clin Nutr* **2001**, *74*, 418–425.
- [15] W. Tantawy, *Mini. Rev. Org. Chem.* **2014**, *11*, 186–224.
- [16] M. C. Foti, C. Daquino, I. D. Mackie, G. A DiLabio, K. U. Ingold, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9270–9282.
- [17] G. Litwinienko, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 222–230.

- [18] S. F. Brockington, R. H. Walker, B. J. Glover, P. S. Soltis, D. E. Soltis, *New Phytol.* **2011**, *190*, 854–864.
- [19] F. C. Stintzing, R. Carle, **2008**, 87–99.
- [20] S. Heuer, S. Richter, J. W. Metzger, V. Wray, M. Nimtz, D. Strack, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 761–767.
- [21] F. H. Bartoloni, L. C. P. Gonçalves, A. C. B. Rodrigues, F. A. Dörr, E. Pinto, E. L. Bastos, *Monatshefte fuer Chemie* **2013**, *144*, 567–571.
- [22] L. C. P. Gonçalves, B. M. Di Genova, F. A. Dörr, E. Pinto, E. L. Bastos, *J. Food Eng.* **2013**, *118*, 49–55.
- [23] U. Steiner, W. Schliemann, H. Böhm, D. Strack, *Planta* **1999**, *208*, 114–124.
- [24] L. A. Mueller, U. Hinz, J. P. Zryd, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 567–569.
- [25] W. Schliemann, N. Kobayashi, D. Strack, *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 1217–1232.
- [26] L. C. P. Gonçalves, R. R. Tonelli, P. Bagnaresi, R. A. Mortara, A. G. Ferreira, E. L. Bastos, *PLoS One* **2013**, *8*, 1–7.
- [27] F. Gandía-Herrero, J. Escribano, F. García-Carmona, *Planta* **2010**, *232*, 449–60.
- [28] J. Cabanes, F. Gandia-Herrero, J. Escribano, F. Garcia-Carmona, M. Jimenez-Atienzar, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3776–3782.
- [29] L. C. P. Gonçalves, Betalaínas: Semissíntese, Capacidade Antirradicalar E Aplicação Como Sondas Em Sistemas Biológicos, Universidade Federal do ABC, **2012**.
- [30] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956.
- [31] F. Gandía-Herrero, J. Escribano, F. García-Carmona, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1142–1146.
- [32] S. Wybraniec, K. Starzak, A. Skopin, B. Nemzer, Z. Pietrzkowski, T. Michalowski, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 6465–6476.
- [33] F. Di Meo, V. Lemaur, R. Lazzaroni, J. Duroux, Y. Olivier, P. Trouillas, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 2082–2092.
- [34] a Gliszczyńska-Swigło, H. Szymusiak, P. Malinowska, *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 1079–1087.

- [35] C.-S. Tsai, P.-Y. Liu, H.-Y. Yen, T.-L. Hsu, C.-H. Wong, *Chem. Commun. (Camb)*. **2010**, *46*, 5575–5577.
- [36] S. Fery-Forgues, D. Lavabre, *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 1260–1264.
- [37] T. Karstens, K. Kobs, *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1871–1872.
- [38] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
- [39] L. Kimler, R. A. Larson, L. Messenger, J. B. Moore, T. J. Mabry, *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **1971**, 1329–1330.
- [40] S. J. Schwartz, J. H. von Elbe, *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 540–543.
- [41] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [42] L. M. Magalhães, M. a. Segundo, S. Reis, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *613*, 1–19.
- [43] F. Gandia-Herrero, F. Garcia-Carmona, J. Escribano, *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 262–269.
- [44] F. C. Stintzing, J. Conrad, I. Klaiber, U. Beifuss, R. Carle, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 415–422.
- [45] G. F. Trezzini, J. Zryd, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1897–1899.
- [46] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*. 1979, **2009**.
- [47] L. Kimler, R. a. Larson, L. Messenger, J. B. Moore, T. J. Mabry, *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **1971**, 1329.
- [48] F. Gandía-Herrero, J. Escribano, F. García-Carmona, *Planta* **2010**, *232*, 449–460.
- [49] M. Wendel, S. Nizinski, D. Tuwalska, K. Starzak, D. Szot, D. Prukala, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 18152–18158.
- [50] X. Liu, Z. Xu, J. M. Cole, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 16584–16595.
- [51] J.-Y. Fang, S. Hammes-Schiffer, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 5727–5739.
- [52] M. Wendel, D. Szot, K. Starzak, D. Tuwalska, D. Prukala, T. Pedzinski, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *Dye. Pigment.* **2015**, *113*, 634–639.
- [53] F. Gandia-Herrero, J. Escribano, F. Garcia-Carmona, *Planta* **2010**, *232*, 449–460.

- [54] X.-F. Zhang, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1261–1268.
- [55] J. H. von Elbe, I.-Y. Maing, C. H. Amundson, *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 334–337.
- [56] K. Koehler, W. Sandstrom, E. H. Cordes, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2413–2419.
- [57] M. Novak, G. A. Bonham, J. J. Mulero, M. Pelecanou, J. N. Zemis, J. M. Buccigross, T. C. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4447–4456.
- [58] T. Nilsson, *Lantbrukshoegskolans Ann.* **1970**, *36*, 179–219.
- [59] H. Wyler, *Chemie unserer Zeit* **1969**, *3*, 146–151.
- [60] T. Frank, F. C. Stintzing, R. Carle, I. Bitsch, D. Quaas, G. Strass, R. Bitsch, M. Netzel, *Pharmacol. Res.* **2005**, *52*, 290–297.
- [61] C. Costentin, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2145–2179.
- [62] S. Wybraniec, P. Stalica, A. Sporna, B. Nemzer, Z. Pietrzkowski, T. Michalowski, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12163–12170.
- [63] S. L. Scott, W. J. Chen, A. Bakac, J. H. Espenson, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6710–6714.
- [64] C. Aliaga, E. A. Lissi, *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 1052–1059.
- [65] L. Mira, M. Silva, R. Rocha, C. F. Manso, *Redox Rep.* **1999**, *4*, 69–74.
- [66] C. Henriquez, C. Aliaga, E. Lissi, *Int. J. Chem. Kinet.* **2002**, *34*, 659–665.
- [67] B. R. E. Childs, W. G. Bardsley, *Biochem. J* **1975**, *145*, 93–103.
- [68] E. P. Labrinea, C. A. Georgiou, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *526*, 63–68.
- [69] D. R. Weinberg, C. J. Gagliardi, J. F. Hull, C. F. Murphy, C. a Kent, B. C. Westlake, A. Paul, D. H. Ess, D. G. McCafferty, T. J. Meyer, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4016–93.
- [70] O. A. El Seoud, M.-F. Ruasse, W. A. Rodrigues, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, *1700*, 1053–1058.
- [71] S. Scott, W. Chen, A. Bakac, J. H. Espenson, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6710–6714.
- [72] J. M. Mayer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 363–90.

- [73] M. Musialik, R. Kuzmicz, T. S. Pawlowski, G. Litwinienko, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2699–2709.
- [74] M. J. T. J. Arts, G. R. M. M. Haenen, H.-P. Voss, A. Bast, *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 45–49.
- [75] S. Llesuy, P. Evelson, A. M. Campos, E. Lissi, *Biol. Res.* **2001**, *34*, 51–73.
- [76] A. M. Osman, K. K. Y. Wong, A. Fernyhough, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *346*, 321–329.
- [77] F. Gandia-Herrero, J. Escribano, F. Garcia-Carmona, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1030–1036.
- [78] J. J. Warren, T. A. Tronic, J. M. Mayer, S. V. G. Bond, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6961–7001.
- [79] G. F. Trezzini, J.-P. Zrýb, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1901–1903.
- [80] O. Tishchenko, D. G. Truhlar, A. Ceulemans, M. T. Nguyen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7000–10.
- [81] G. Litwinienko, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 222–230.

Súmula curricular

Karina Kinuyo Nakashima

Brasileira, nascida em São Paulo em 26 de novembro de 1991.

EDUCAÇÃO

2013-2015	Mestrado em química	Instituto de Química, USP
	<i>Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalainas.</i>	
	Orientador: Prof. Dr. Erick L. Bastos	
	Bolsa FAPESP 2013/24964-9	
2010-2013	Licenciatura em química	Instituto de Química, USP
2009-2012	Bacharelado em química	Instituto de Química, USP
	Iniciação científica: <i>Caracterização teórica dos isômeros na superfície de energia potencial [H,S,O,X] (X = F,Cl).</i>	
	Orientador: Prof. Dr. Fernando R. Ornellas	
	Bolsa FAPESP 2011/10094-7	

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

1º sem/2013	Estágio	DOW Brasil, São Paulo
	Laboratório de Óleo e Gás	
2º sem/2012	Monitoria de ensino	Instituto de Química, USP
	QFL0242 – Físico-Química (para Química)	
	Docente: Prof. Paulo T. A. Sumodjo.	

PRÊMIOS

2012	Medalha Lavoisier de melhor aluno do curso de bacharelado em Química, Conselho Regional de Química (CRQ) — IV Região.	
------	---	--

2013 Medalha Lavoisier de melhor aluno do curso de licenciatura em Química,
Conselho Regional de Química (CRQ) — IV Região.

PRODUÇÃO ACADÊMICA

Artigos completos publicados em periódicos

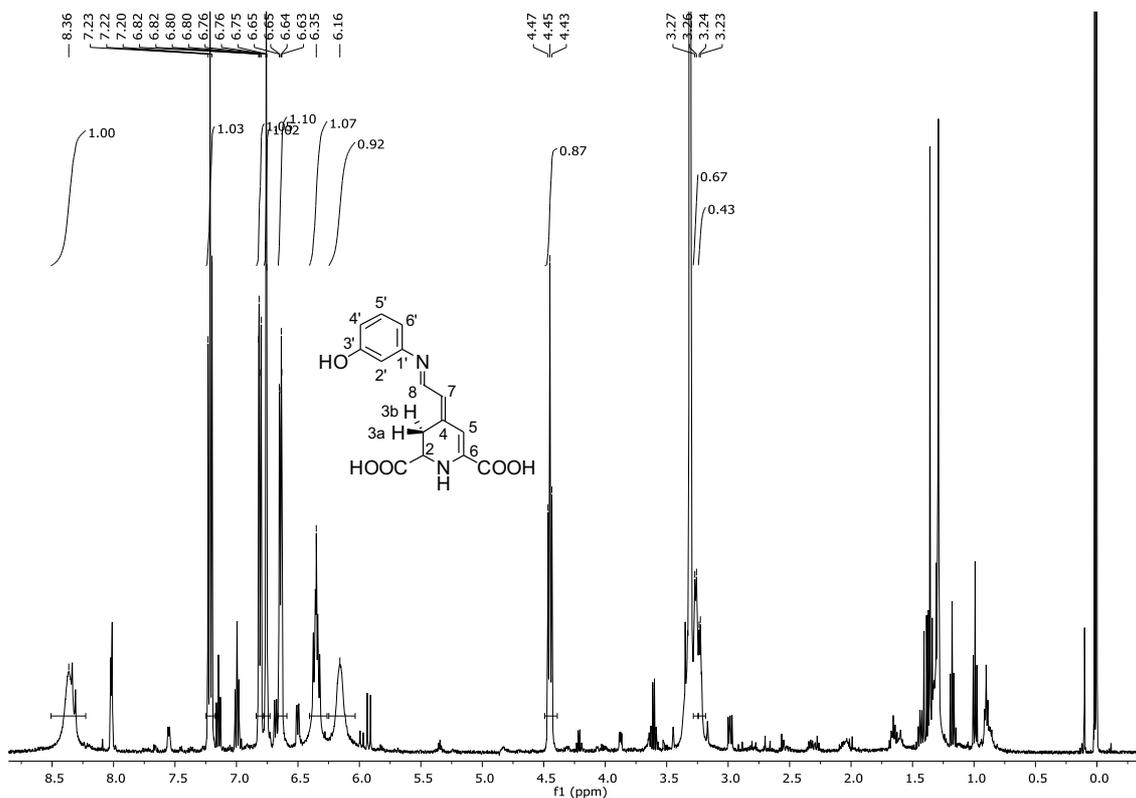
1. Gonçalves, L. C. P.; Marcato, A. C.; Rodrigues, A. C. B.; Pagano, A. P. E.; Freitas, B. C. de; Machado, C. de O.; Nakashima, K. K.; Esteves, L. C.; Lopes, N. B.; Bastos, E. L. Betalaínas: das cores das beterrabas à fluorescência das flores. *Rev. Virtual. Quim.* 2014, 7, p. 292-309.

Resumos publicados em anais de congresso

1. Nakashima, K. K.; Bastos, E. L. Semissíntese e propriedades fotofísicas de betalaínas benzotiazólicas. In: 37^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. Resumos da 37^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, São Paulo: SBQ, 2014. p. FOT-023-FOT-023.
2. Nakashima, K. K. ; Bastos, E. L. Bio-inspired design of betalains with high antioxidant potential. In: 15th International Conference on Oxidative Stress reduction, redox homeostasis and antioxidants, 2015, Paris. Abstracts book of the 15th International Conference on Oxidative Stress reduction, redox homeostasis and antioxidants, Paris: ISANH, 2015. p. 189.

8. Anexos

8.1. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de 1



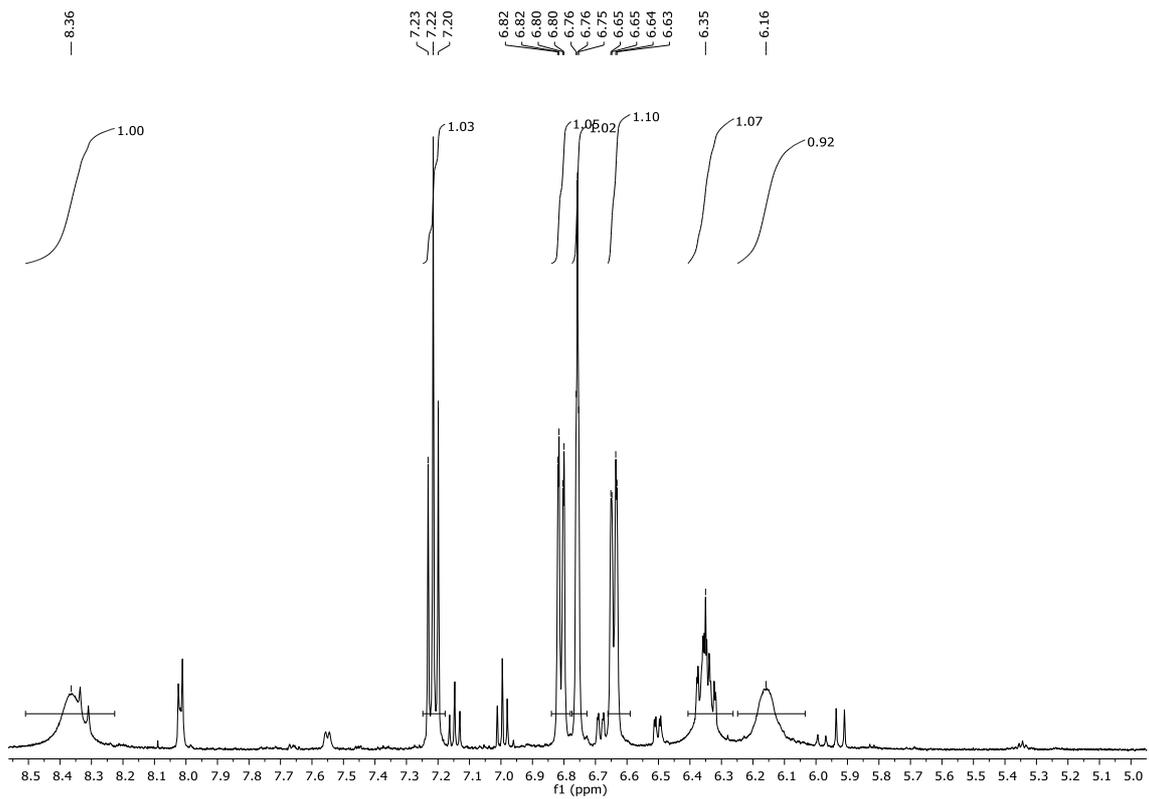
m-Betainofenol em metanol- d_4 .

Aspecto: sólido magenta.

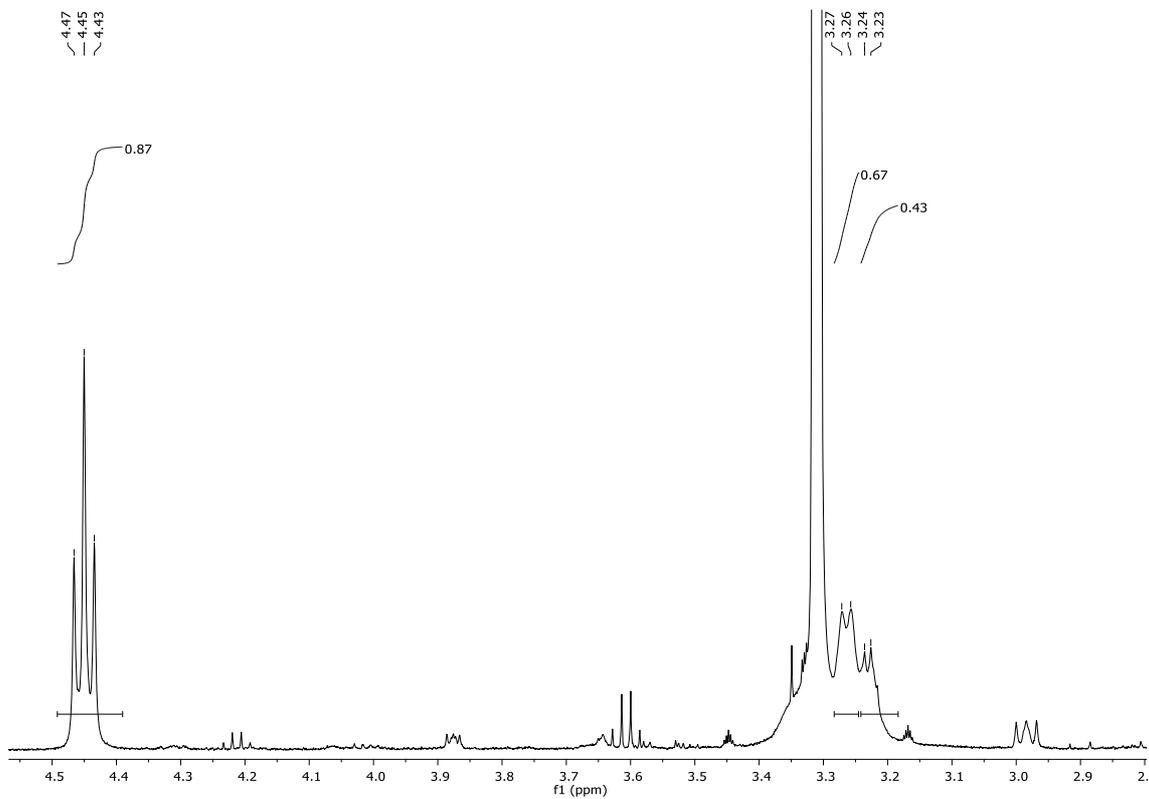
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 8,36 (1H, bs, H-8), δ 7,21 (1H, t, $^3J_{5',4'} = 8,1$, $^3J_{5',6'} = 8,1$ Hz, H-5'), δ 6,81 (1H, dd, $^3J_{6',5'} = 8,1$, $^3J_{6',2'} = 2,2$, $^3J_{6',4'} = 1,8$ Hz, H-6'), δ 6,76 (1H, t, $^3J_{2',4'} = 2,2$, $^3J_{2',6'} = 2,2$ Hz, H-2'), δ 6,64 (1H, dd, $^3J_{4',5'} = 8,1$, $^3J_{4',2'} = 2,2$, $^3J_{4',6'} = 1,8$ Hz, H-4'), δ 6,35 (1H, m, H-5), δ 6,16 (1H, bs, H-7), δ 4,45 (1H, t, $^3J_{2,3a} = 7,9$, $^3J_{2,3b} = 7,9$ Hz, H-2), δ 3,26 (1H, d, $^3J_{3b,2} = 6,7$ Hz, H-3b), δ 3,23 (1H, d, $^3J_{3a,2} = 4,7$ Hz, H-3a).

HPLC-MS: $t_R = 4,7$ min, m/z 303,1.

UV-Vis/FL: $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 508$ nm (tpBR pH = pH = 6), $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 563$ nm (tpBR pH = pH = 6, $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm), $\epsilon^{508} = 6,4 \times 10^4$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$ (água), $\Phi_{\text{FI}} = 8,5 \times 10^{-4}$ (água) vs. rodamina B.

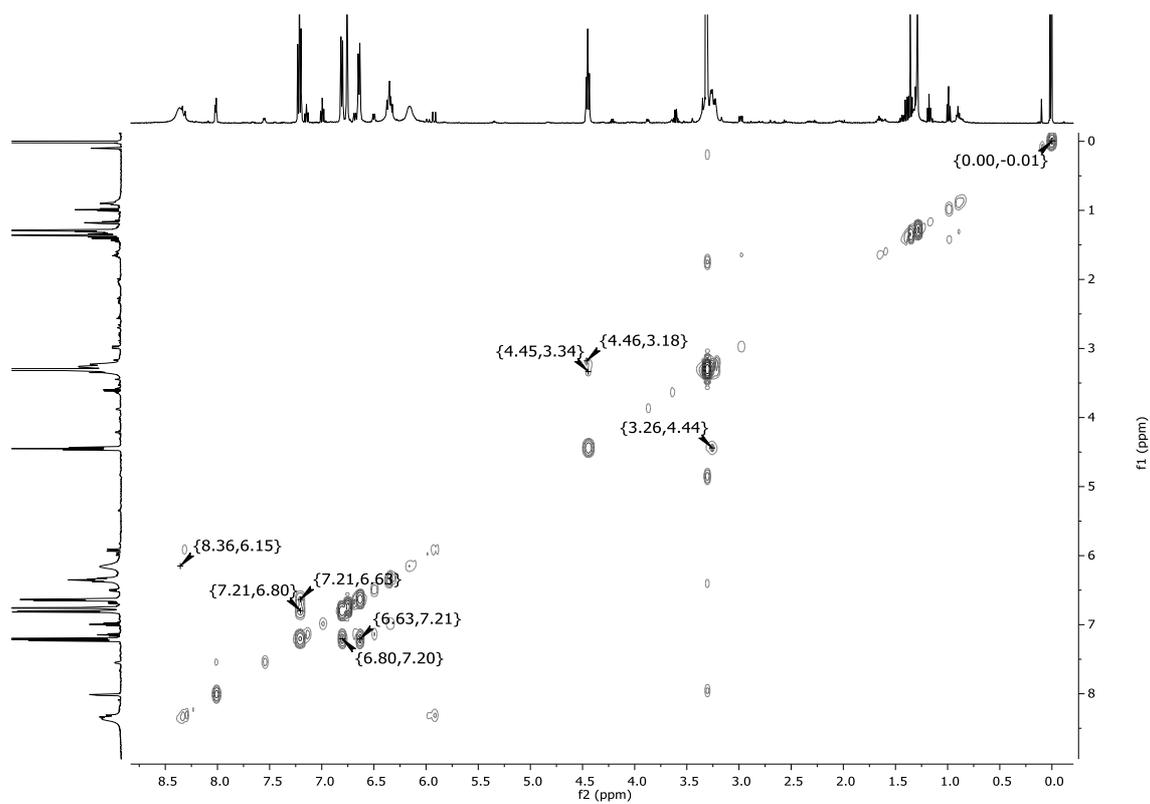


m-Betalainofenol em metanol-*d*₄. Ampliação da região δ 8,5 - 5,0 ppm.



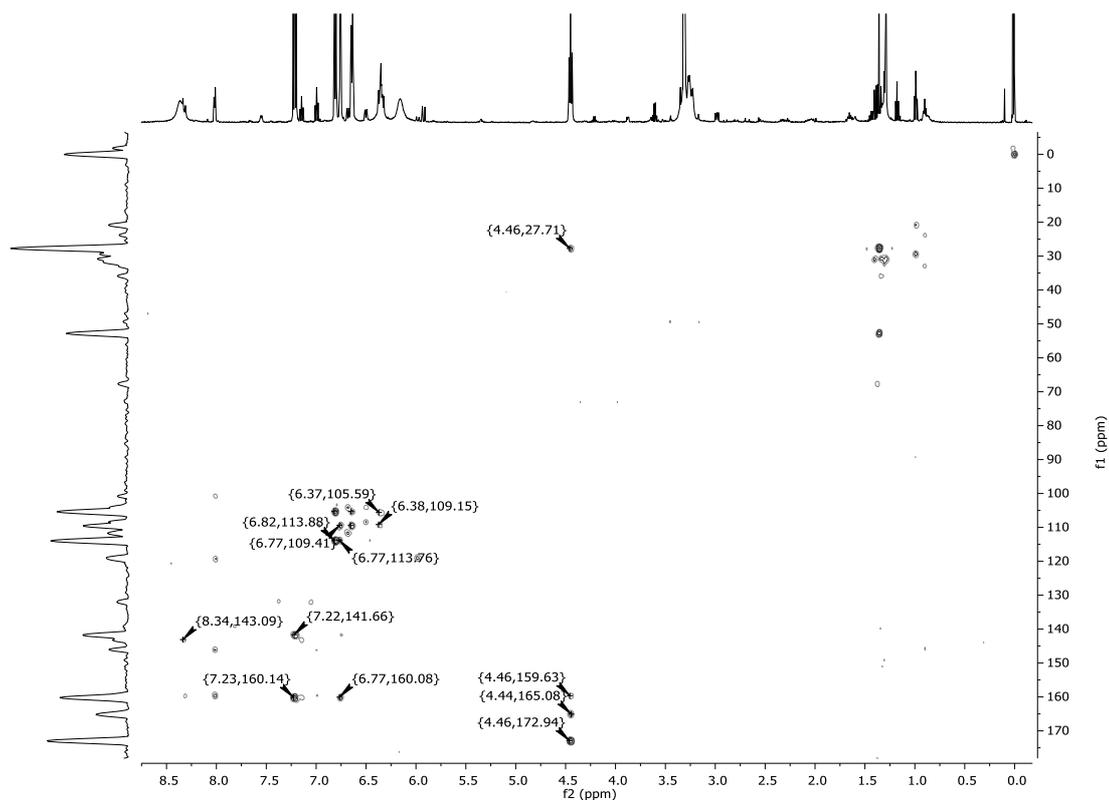
m-Betalainofenol em metanol-*d*₄. Ampliação da região δ 4,5 - 3,0 ppm.

8.2. Espectro de ^1H , ^1H -COSY (500 MHz) de 1



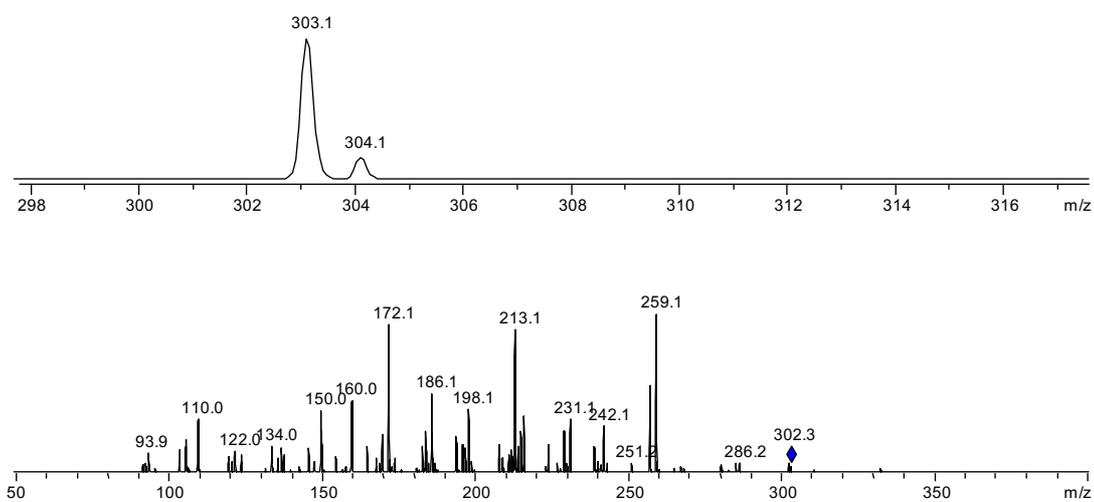
m-Betalainofenol em metanol- d_4 .

8.3. Espectro de ^1H , ^{13}C -HMBC (500 MHz) de 1



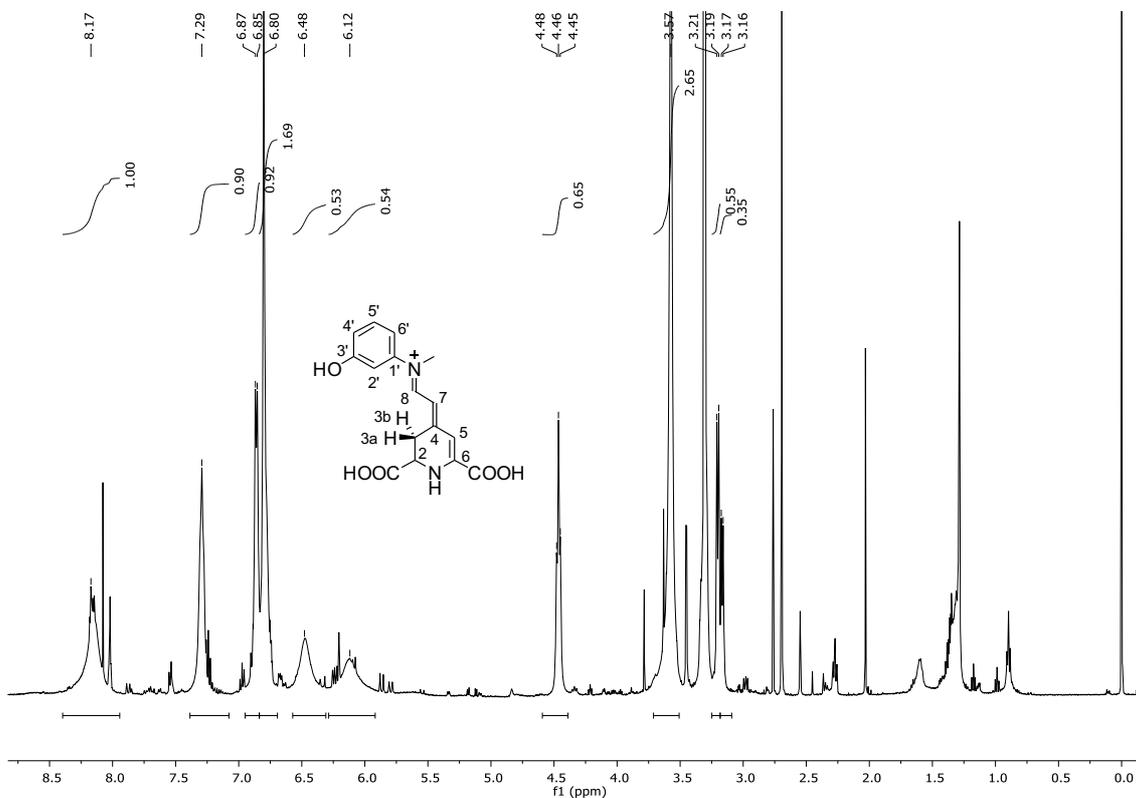
m-Betalainofenol em metanol- d_4 .

8.4. Espectro de massas (HPLC-MS e MS²) de 1



m-Betalainofenol.

8.5. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de 2



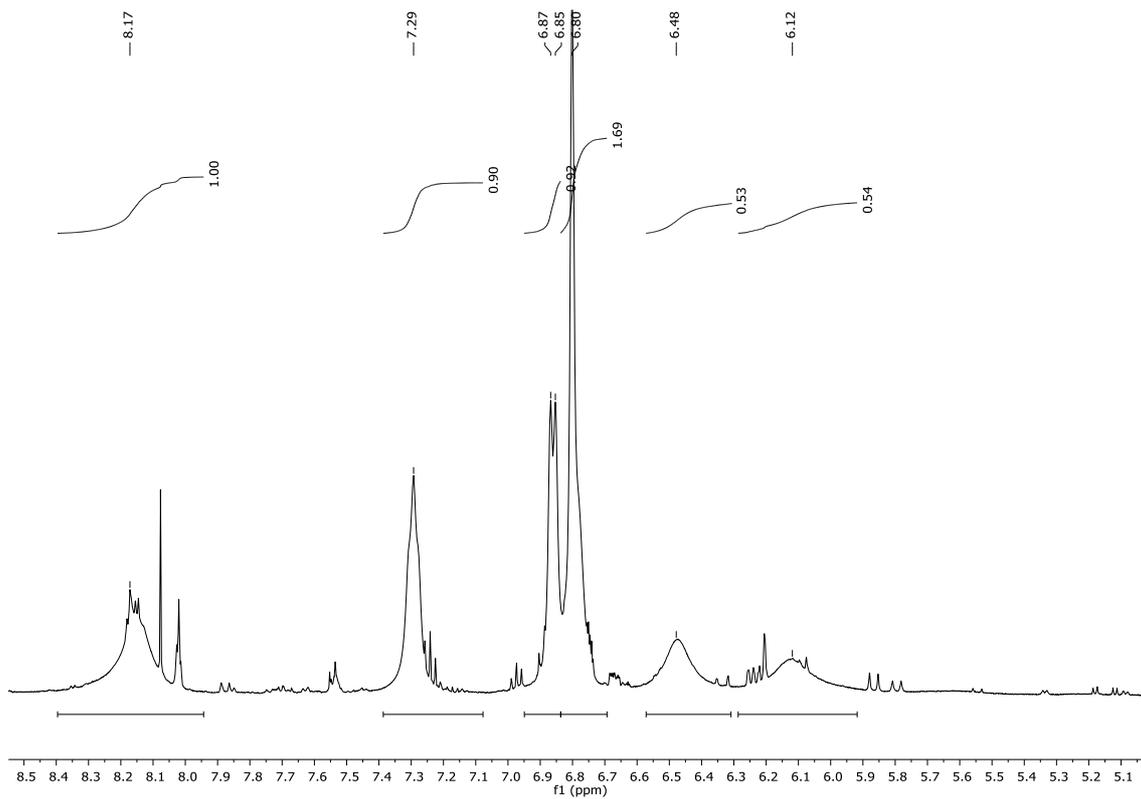
N-Metil-*m*-betalaínol em metanol- d_4 .

Aspecto: sólido vermelho.

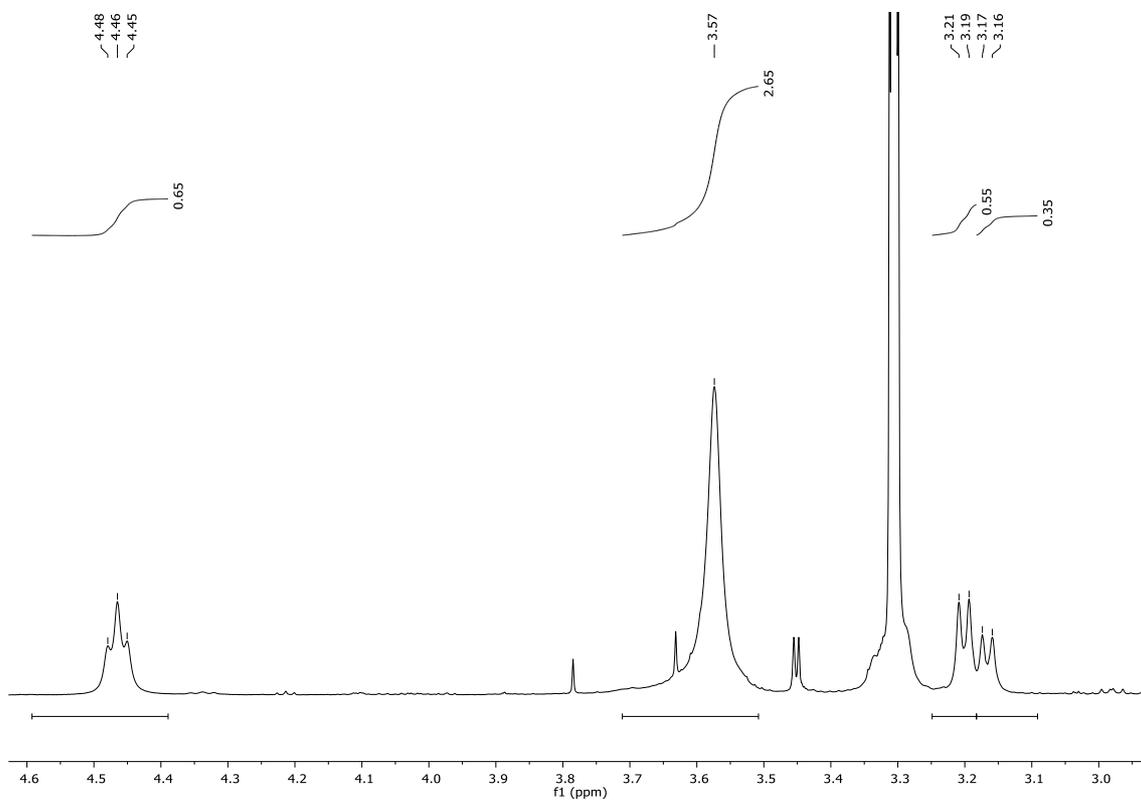
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 8,15 (1H, bs, H-8), δ 7,29 (1H, bs, $^3J_{5',4'} = 8,0$, $^3J_{5',6'} = 8,0$ Hz, H-5'), δ 6,86 (1H, d, $^3J_{6',5'} = 8,0$ Hz, H-6'), δ 6,80 (2H, bs, H-2' e H-4'), δ 6,47 (1H, m, H-5), δ 6,12 (1H, bs, H-7), δ 4,46 (1H, t, $^3J_{2,3a} = 7,6$, $^3J_{2,3b} = 7,6$ Hz, H-2), δ 3,57 (3H, s, H-10), δ 3,20 (1H, d, $^3J_{3b,2} = 7,6$ Hz, H-3b), δ 3,17 (1H, d, $^3J_{3a,2} = 7,6$ Hz, H-3a).

HPLC-MS: $t_R = 5,4$ min, m/z 317,2.

UV-Vis/FL: $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 492$ nm (tpBR pH = pH = 6), $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 550$ nm (tpBR pH = pH = 6, $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm), $\epsilon^{492} = 6,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (água), $\Phi_{\text{Fl}} = 3,9 \times 10^{-4}$ (água) vs. rodamina B.

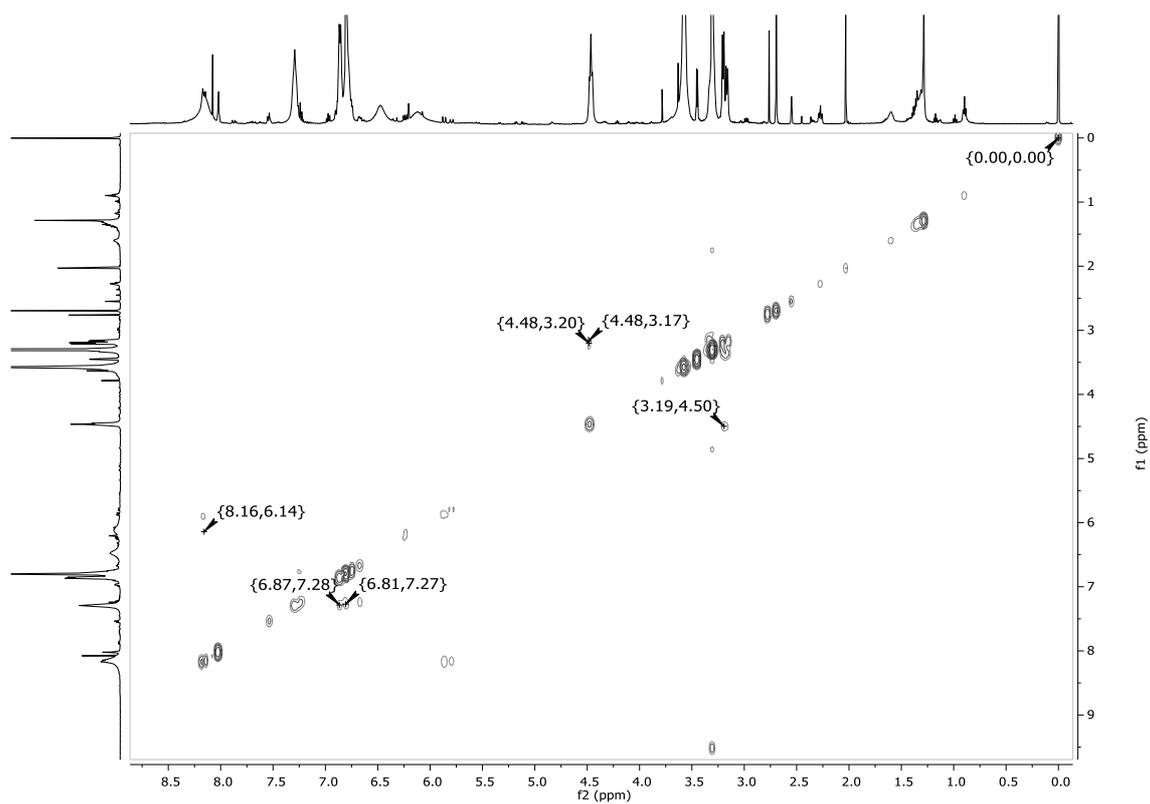


N-Metil-*m*-betalainofenol em metanol-*d*₄. Ampliação da região δ 8,5 - 5,0 ppm.



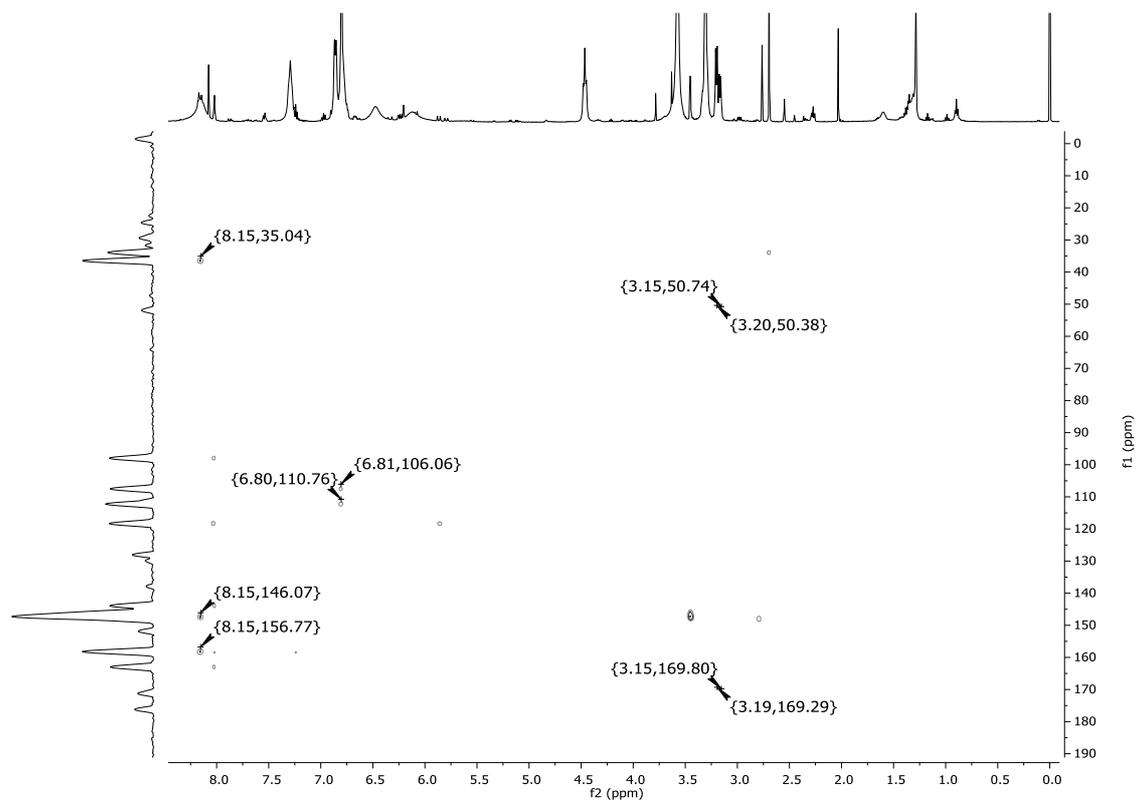
N-Metil-*m*-betalainofenol em metanol-*d*₄. Ampliação da região δ 5,0 - 2,0 ppm.

8.6. Espectro de $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY (500 MHz) de 2



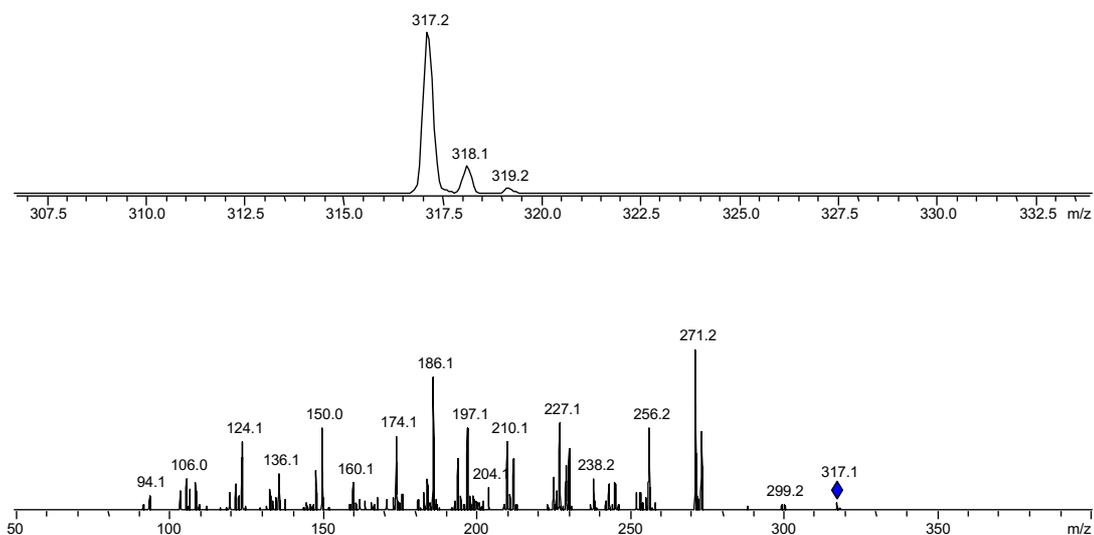
N-Metil-*m*-betainofenol em metanol- d_4 .

8.7. Espectro de $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz) de 2



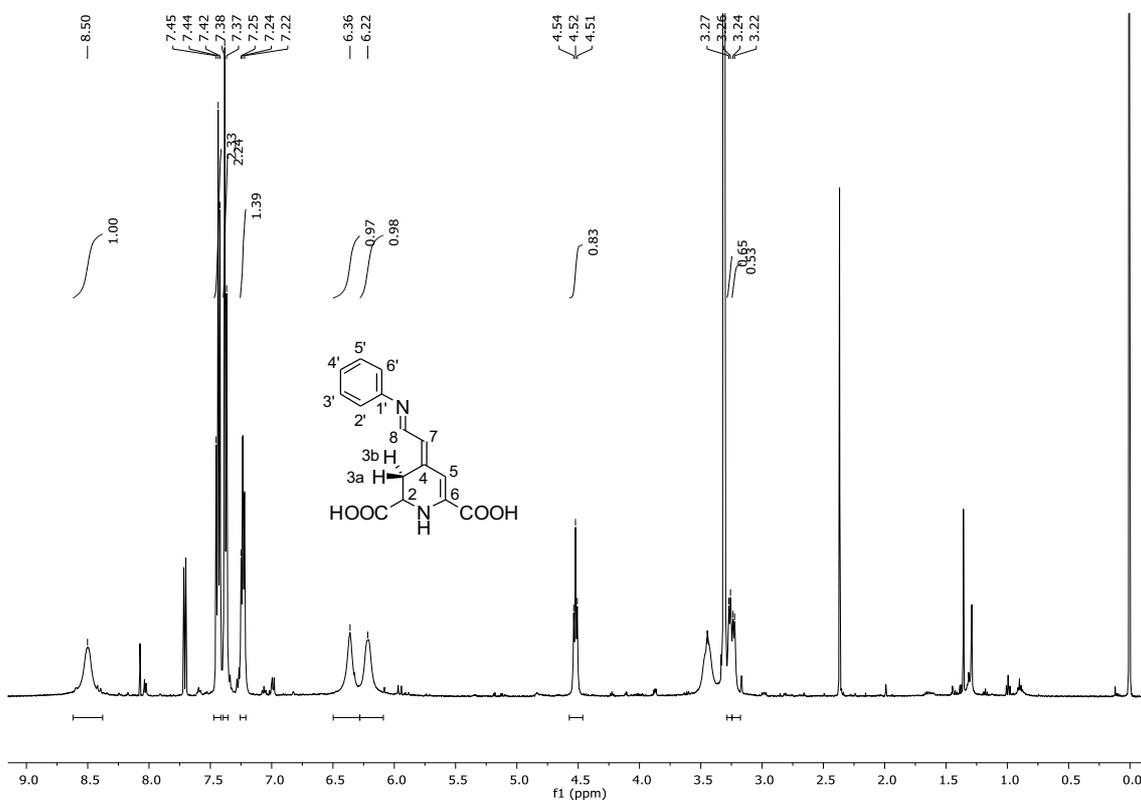
N-Metil-*m*-betalainofenol em metanol- d_4 .

8.8. Espectro de massas (HPLC-MS e MS²) de 2



N-Metil-*m*-betalainofenol.

8.9. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de 3



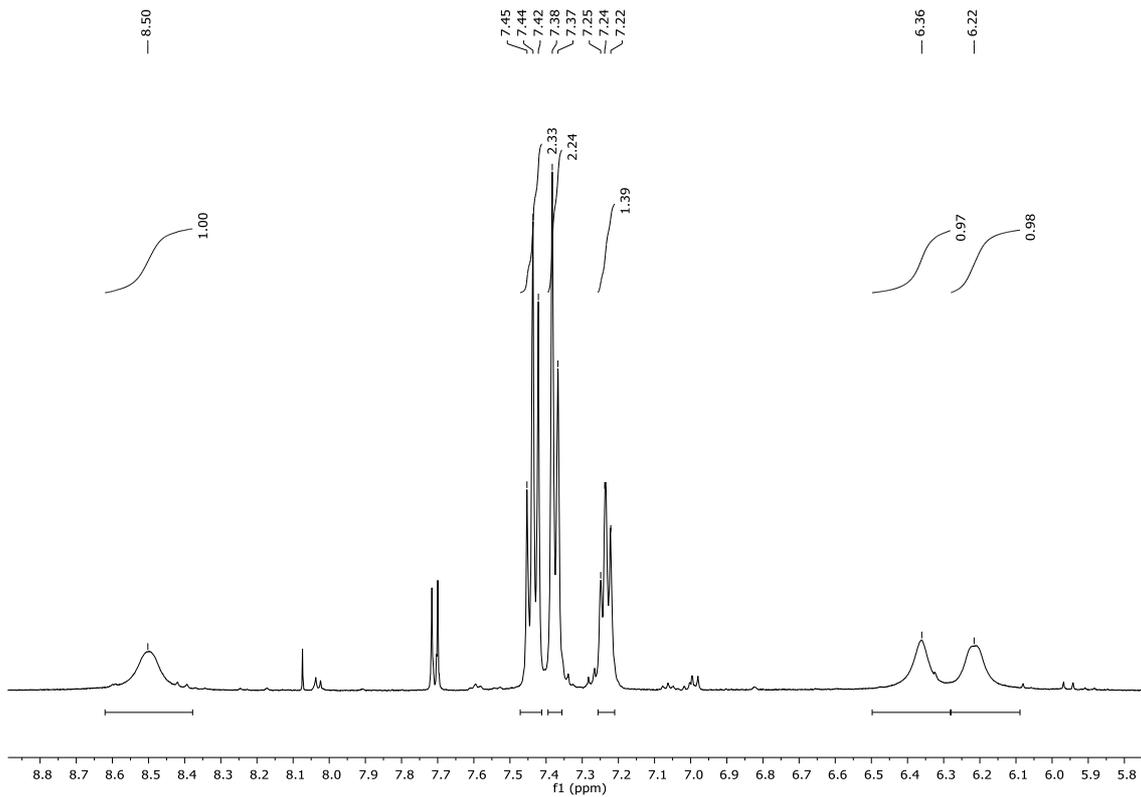
Fenilbetalaína em metanol- d_4 .

Aspecto: sólido magenta.

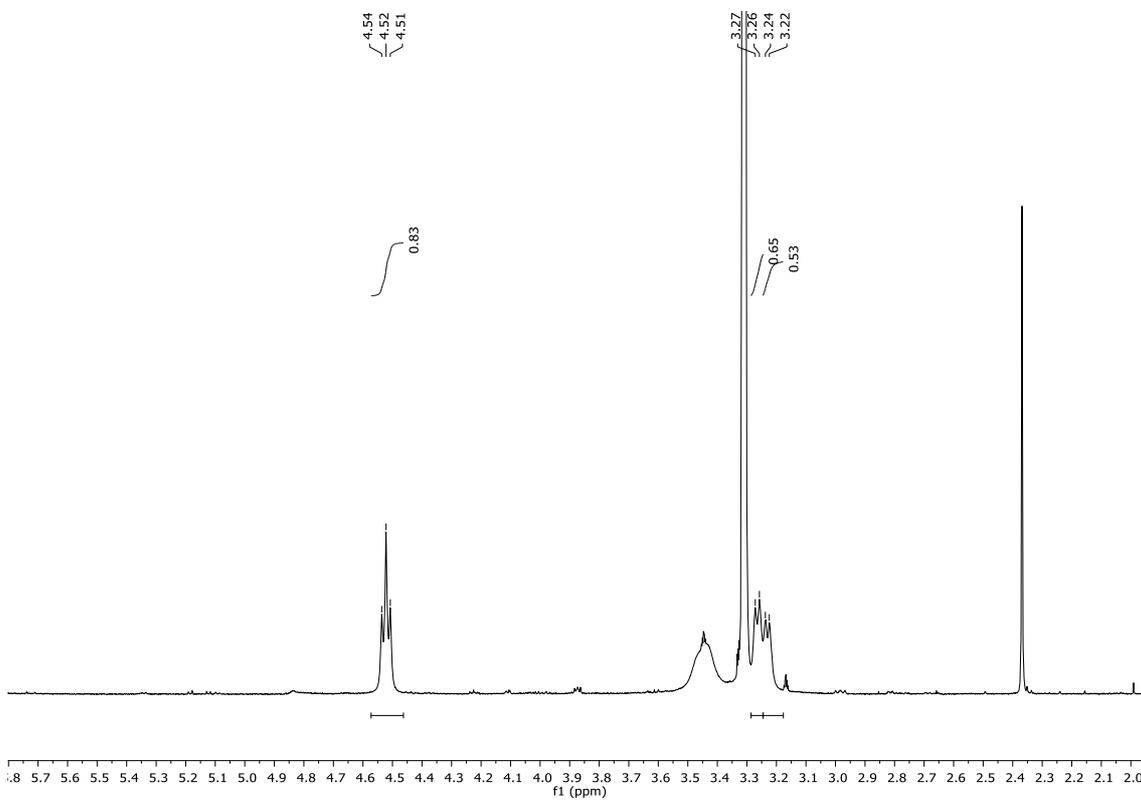
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 8,50 (1H, bs, H-8), δ 7,44 (2H, t, $^3J_{3',2'} = ^3J_{5',6'} = 7,9$, $^3J_{3',4'} = ^3J_{5',4'} = 7,9$ Hz, H-3' e H-5'), δ 7,38 (2H, d, $^3J_{2',3'} = ^3J_{6',5'} = 7,9$ Hz, H-2' e H-6'), δ 7,24 (1H, t, $^3J_{4',3'} = 6,7$, $^3J_{4',5'} = 6,7$, H-4'), δ 6,36 (1H, bs, H-5), δ 6,21 (1H, bs, H-7), δ 4,52 (1H, t, $^3J_{2,3a} = 7,2$, $^3J_{2,3b} = 7,2$ Hz, H-2), δ 3,26 (1H, d, $^3J_{3b,2} = 7,0$ Hz, H-3b), δ 3,23 (1H, d, $^3J_{3a,2} = 5,6$ Hz, H-3a).

HPLC-MS: $t_R = 6,2$ min, m/z 287,1.

UV/FL: $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 508$ nm (tpBR pH = pH = 6), $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 558$ nm (tpBR pH = pH = 6, $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm), $\epsilon^{508} = 6,1 \times 10^4$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$ (água), $\Phi_{\text{Fl}} = 1,3 \times 10^{-3}$ (água) vs. rodamina B.

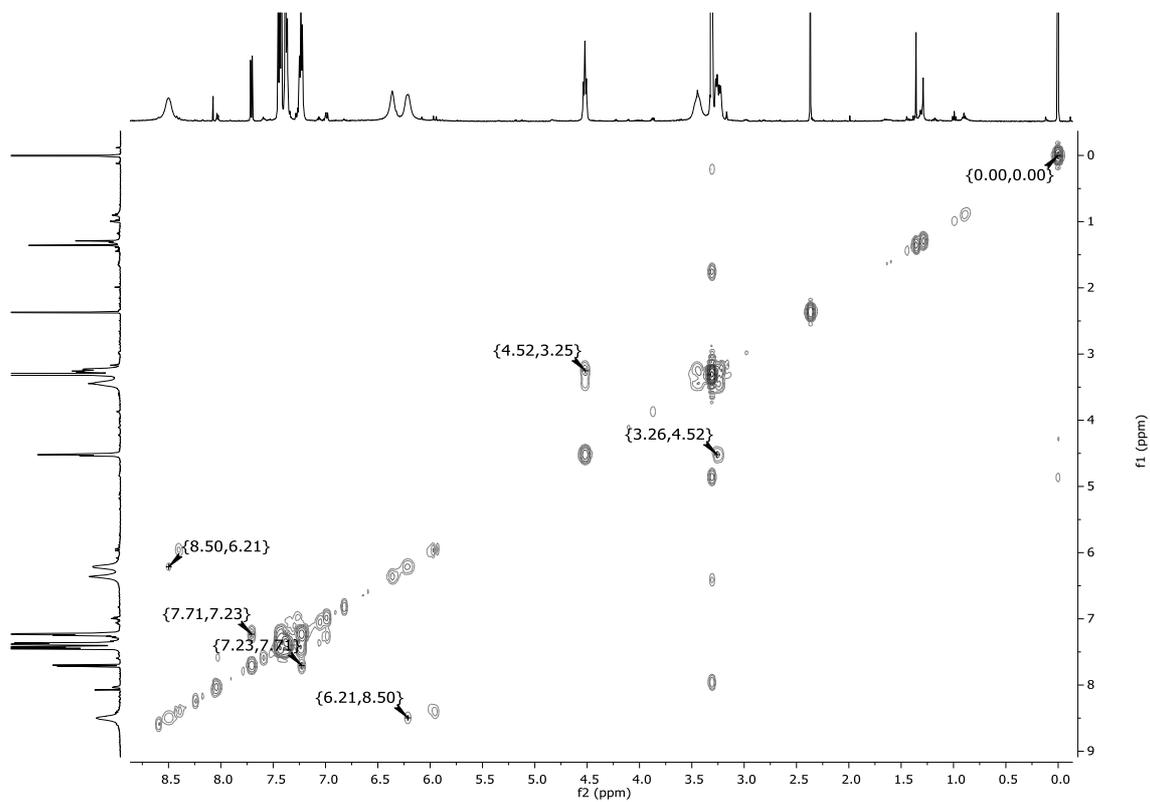


Fenilbetalaína em metanol- d_4 . Ampliação da região δ 8,8 - 5,8 ppm.



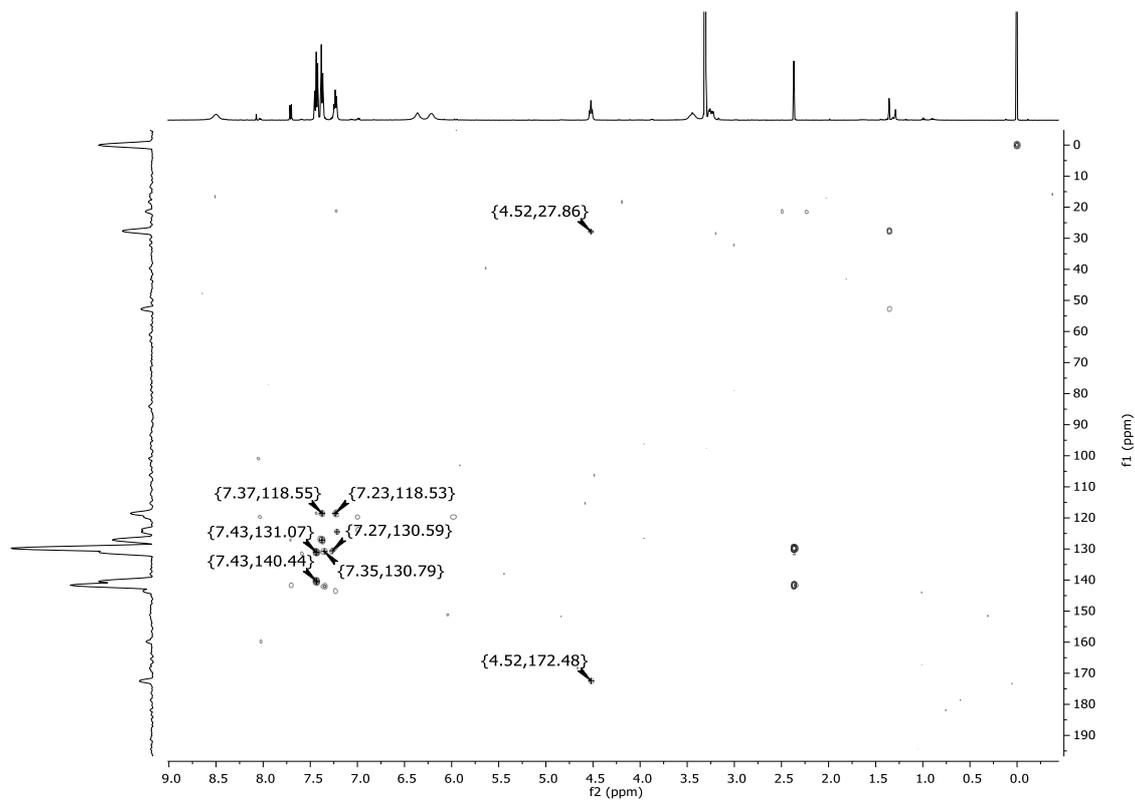
Fenilbetalaína em metanol- d_4 . Ampliação da região δ 5,8 - 2,0 ppm.

8.10. Espectro de $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY (500 MHz) de 3



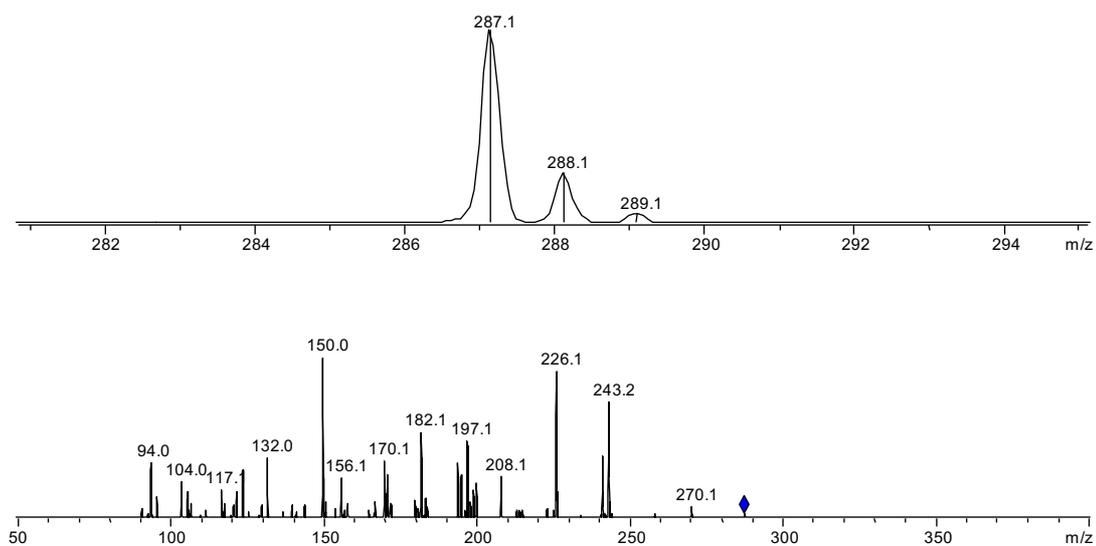
Fenilbetalaína em metanol- d_4 .

8.11. Espectro de ^1H , ^{13}C -HMBC (500 MHz) de 3



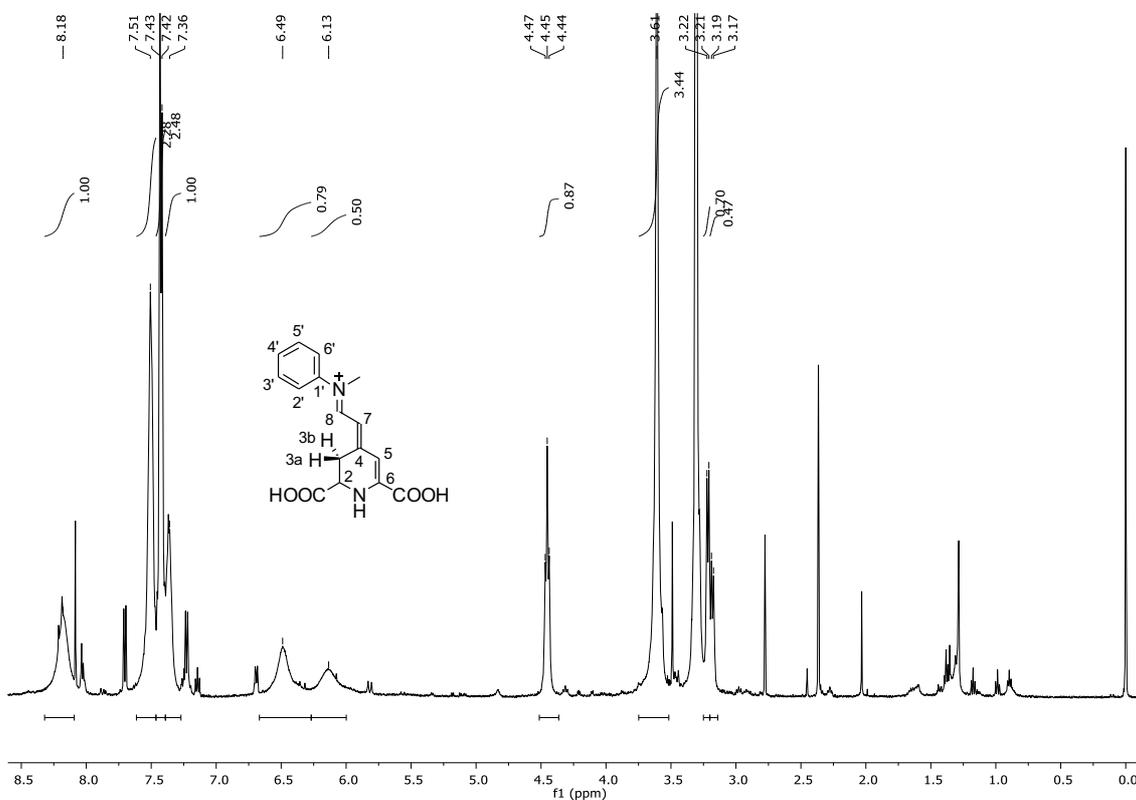
Fenilbetaína em metanol- d_4 .

8.12. Espectro de massas (HPLC-MS e MS²) de 3



Fenilbetaína.

8.13. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de 4



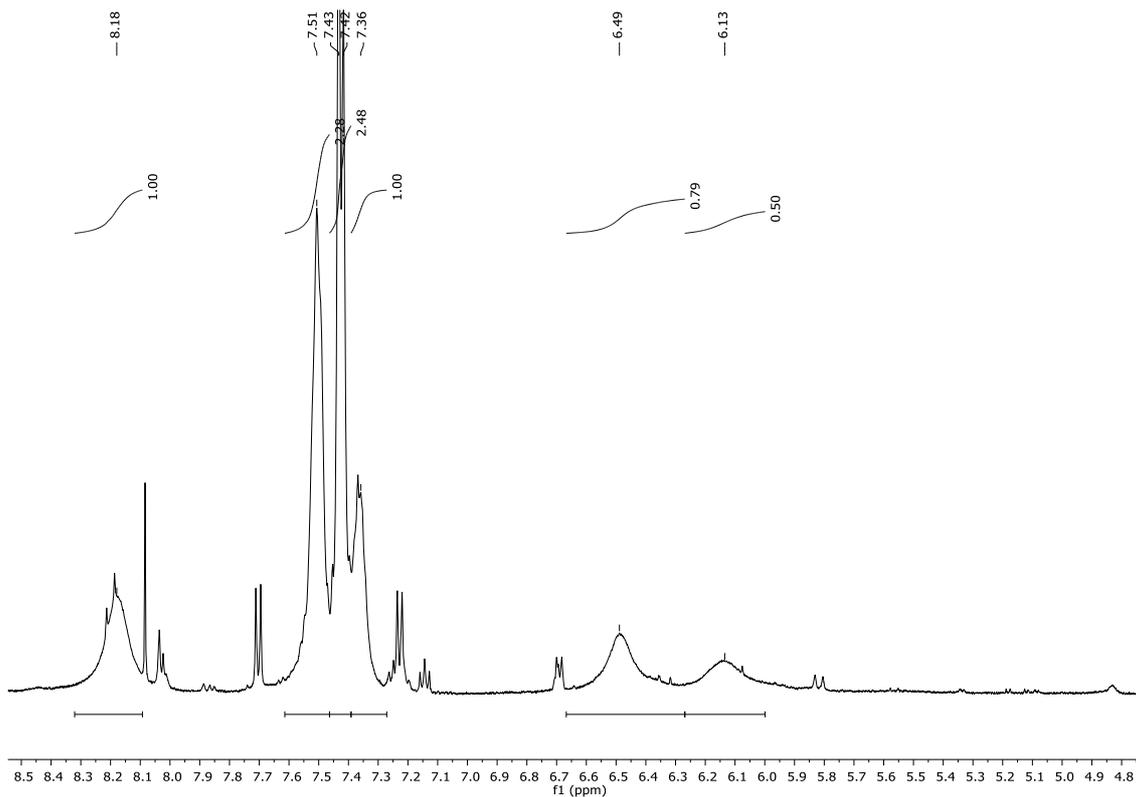
N-Metil-fenilbetaláina em metanol- d_4 .

Aspecto: sólido vermelho.

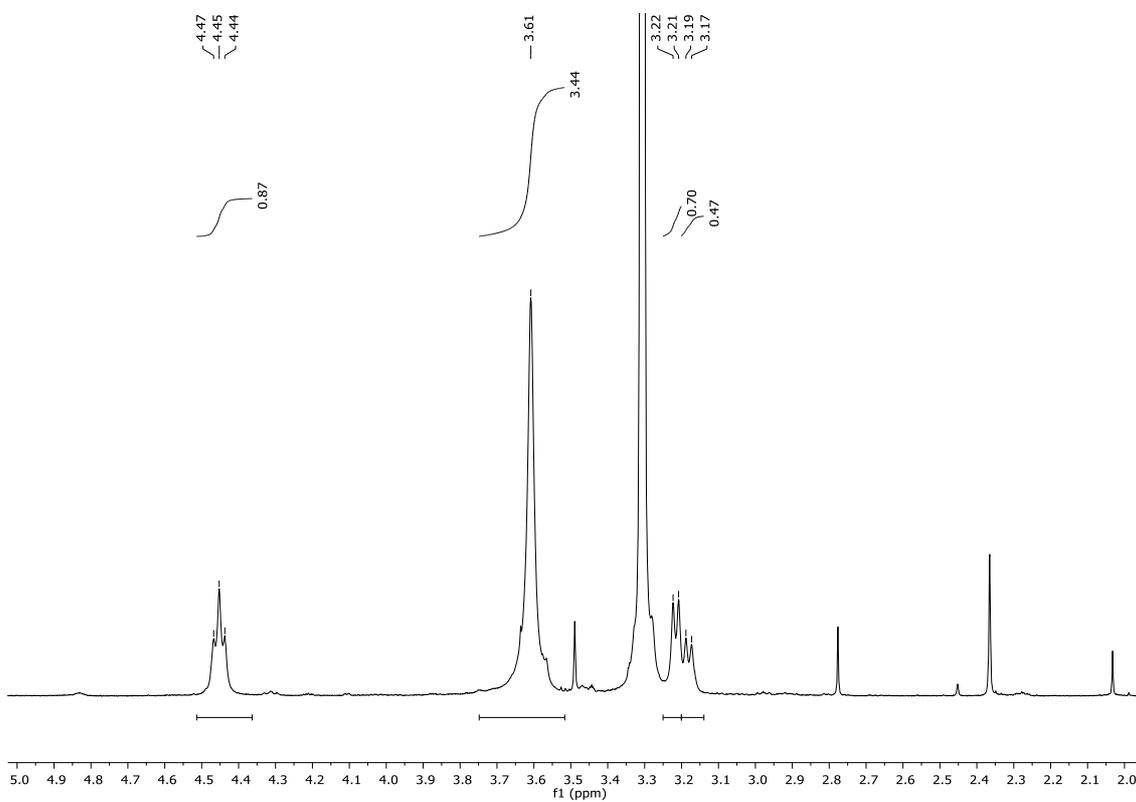
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 8,18 (1H, bs, H-8), δ 7,51 (2H, bs, H-3' e H-5'), δ 7,42 (2H, d, $^3J_{2',3'} = ^3J_{6',5'} = 7,9$ Hz, H-2' e H-6'), δ 7,36 (1H, bs, H-4'), δ 6,49 (1H, bs, H-5), δ 6,14 (1H, bs, H-7), δ 4,45 (1H, t, $^3J_{2,3a} = 7,5$, $^3J_{2,3b} = 7,5$ Hz, H-2), δ 3,61 (3H, s, H-10), δ 3,22 (1H, d, $^3J_{3b,2} = 7,5$ Hz, H-3b), δ 3,18 (1H, d, $^3J_{3a,2} = 7,8$ Hz, H-3a).

HPLC-MS: $t_R = 6,7$ min, m/z 301,2.

UV/FL: $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 492$ nm (tpBR pH = pH = 6), $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 553$ nm (tpBR pH = pH = 6, $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm), $\epsilon^{492} = 6,1 \times 10^4$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$ (água), $\Phi_{\text{Fl}} = 5,6 \times 10^{-4}$ (água) vs. rodamina B.

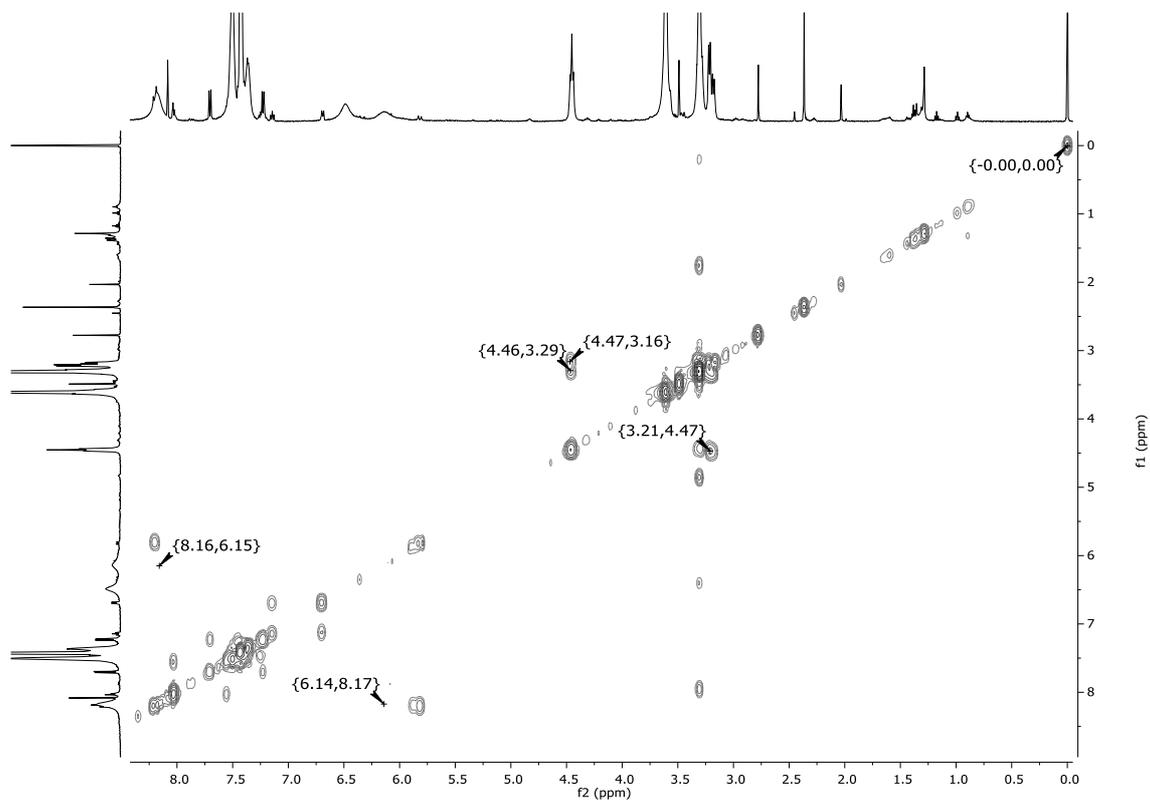


N-Metil-fenilbetalaína em metanol- d_4 . Ampliação da região δ 8,5 - 5,0 ppm.



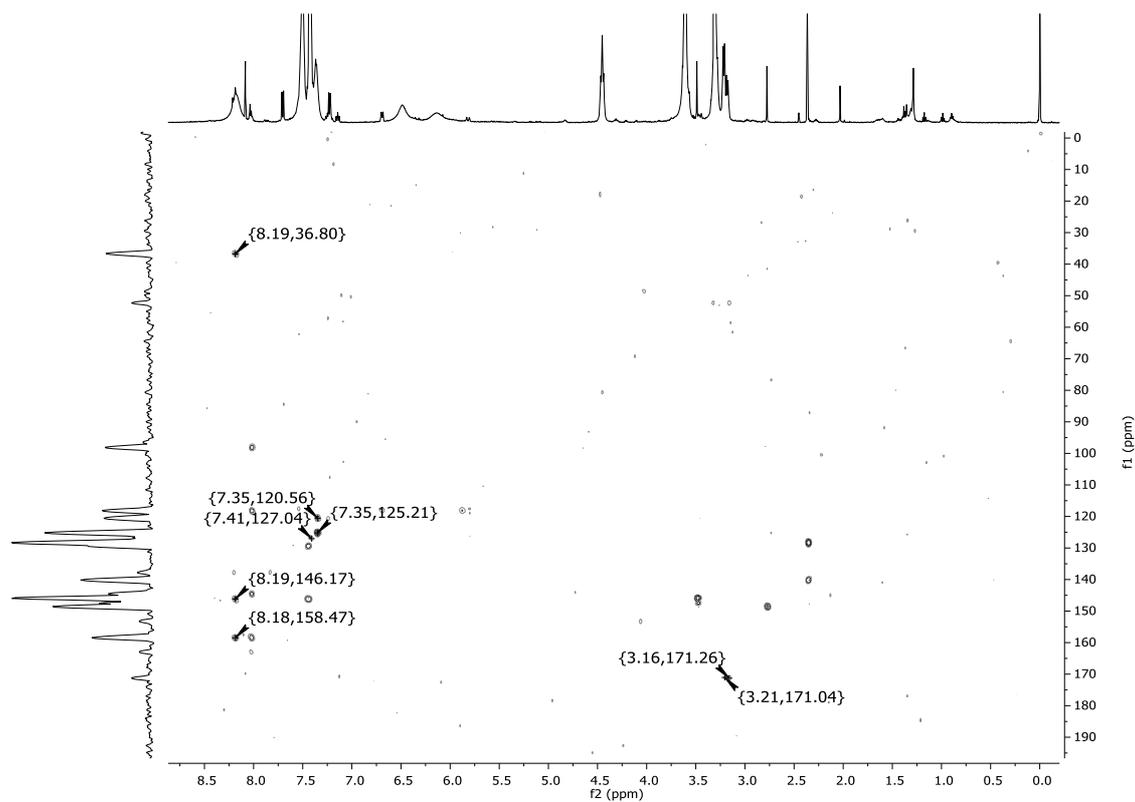
N-Metil-fenilbetalaína em metanol- d_4 . Ampliação da região δ 5,0 - 2,0 ppm.

8.14. Espectro de $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY (500 MHz) de 4



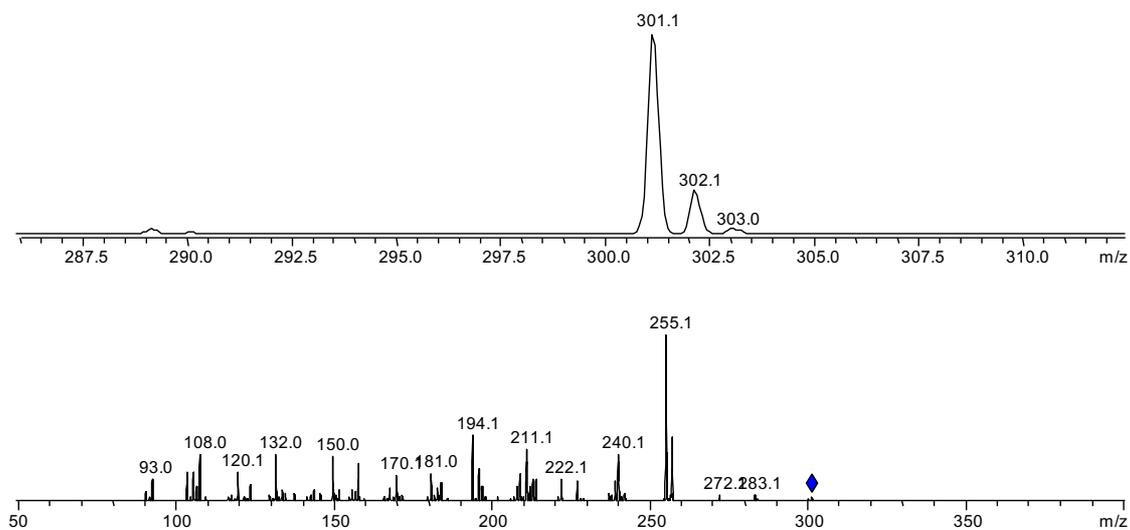
N-Metil-fenilbetalaina em metanol- d_4 .

8.15. Espectro de ^1H , ^{13}C -HMBC (500 MHz) de 4



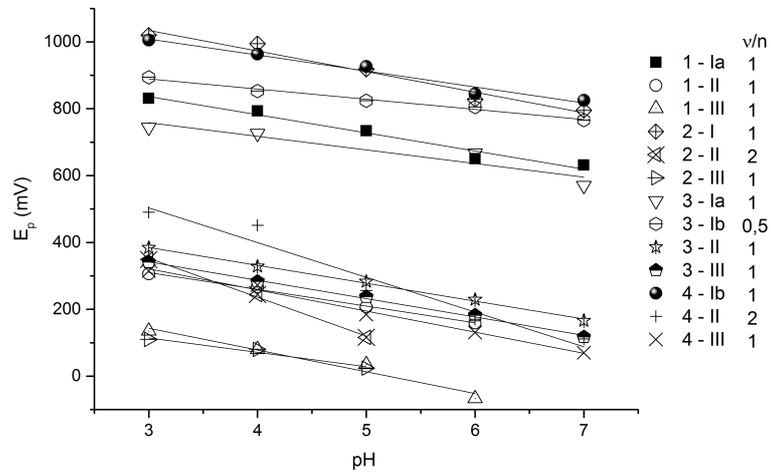
N-Metil-fenilbetalaína em metanol- d_4 .

8.16. Espectro de massas (HPLC-MS e MS²) de 4



N-Metil-fenilbetalaína.

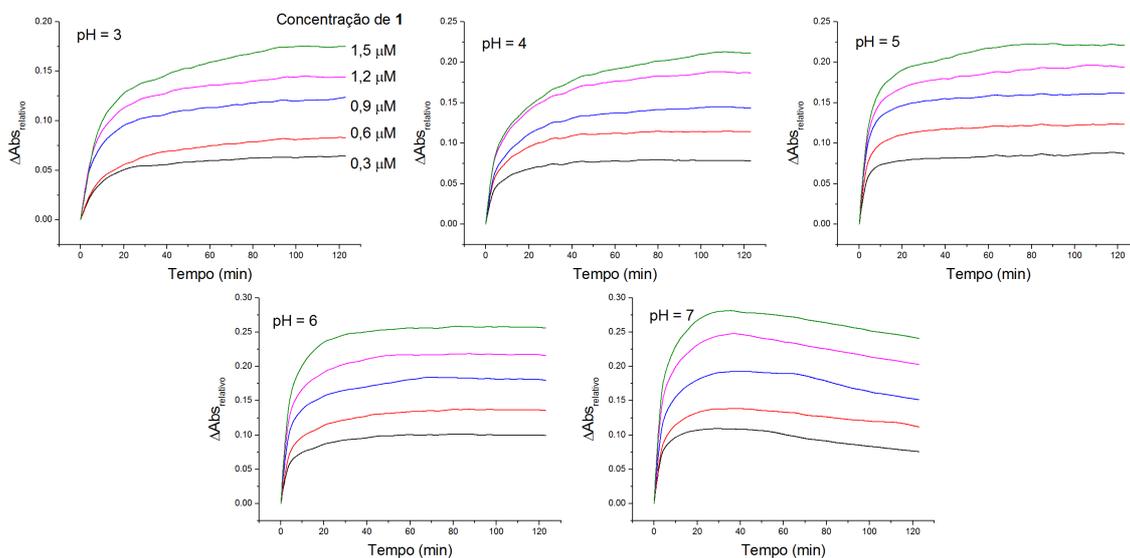
8.17. Gráficos de Nernst



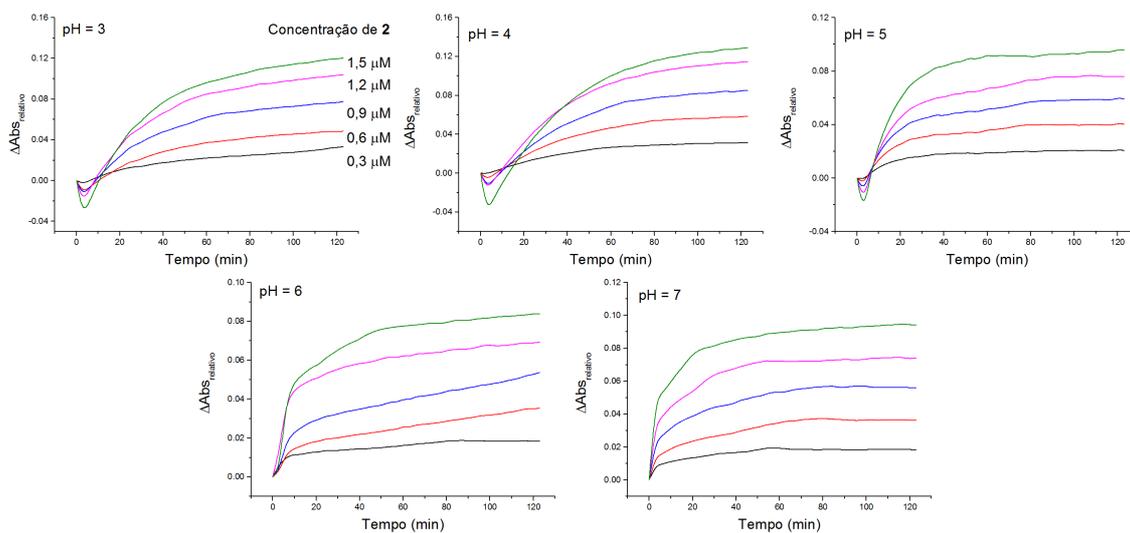
Curvas de Nernst para os alguns dos potenciais de pico identificados nos voltamogramas cíclicos das betalainas.

Dados do ajuste linear: 1-Ia ($R^2 = 0,96$, $\alpha = -54,3$); 1-II ($R^2 = 0,99$, $\alpha = -50,1$); 1-III ($R^2 = 0,96$, $\alpha = -65,1$); 2-Ib ($R^2 = 0,96$, $\alpha = -61,6$); 2-II ($R^2 = 0,99$, $\alpha = -116,5$); 2-III ($R^2 = 0,94$, $\alpha = -43,0$); 3-Ia ($R^2 = 0,85$, $\alpha = -40,7$); 3-Ib ($R^2 = 0,98$, $\alpha = -30,4$); 3-II ($R^2 = 1,00$, $\alpha = -53,5$); 3-III ($R^2 = 1,00$, $\alpha = -54,9$); 4-Ib ($R^2 = 0,96$, $\alpha = -47,8$); 4-II ($R^2 = 0,94$, $\alpha = -103,9$); 4-III ($R^2 = 0,99$, $\alpha = -63,2$). v/n é a razão de prótons/elétrons nos processos de oxidação e redução.

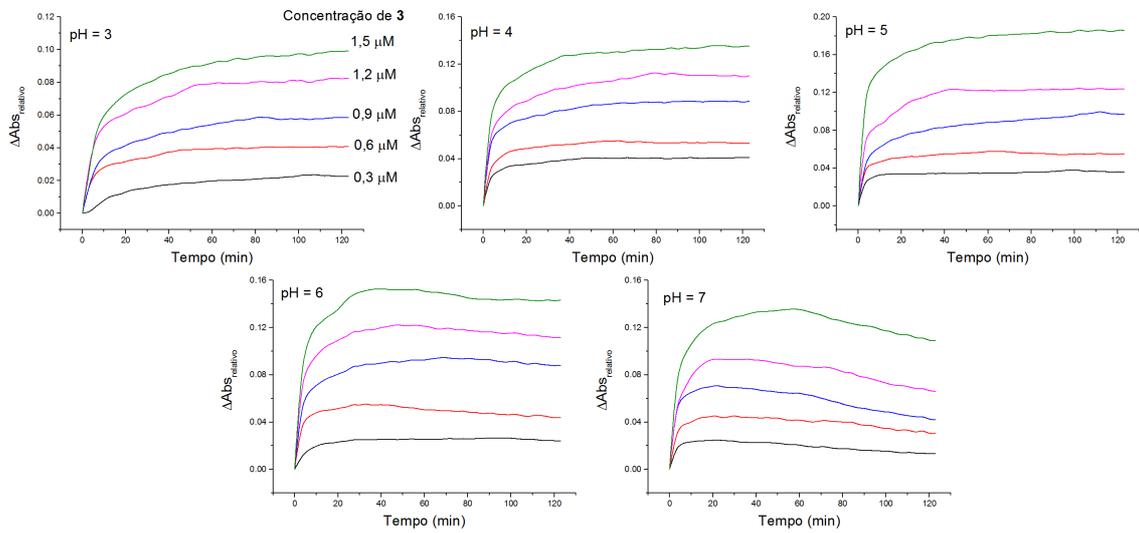
8.18. Curvas cinéticas do método ABTS com as betalaínas



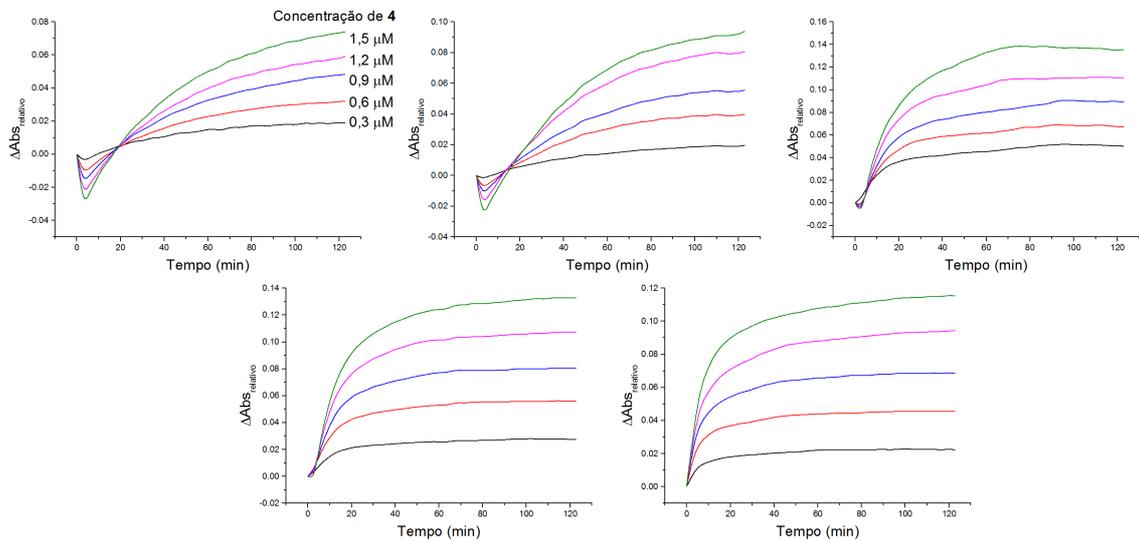
Varição relativa de absorção de misturas de ABTS^{++} e *m*-betalainofenol.



Varição relativa de absorção de misturas de ABTS^{++} e *N*-metil-*m*-betalainofenol.

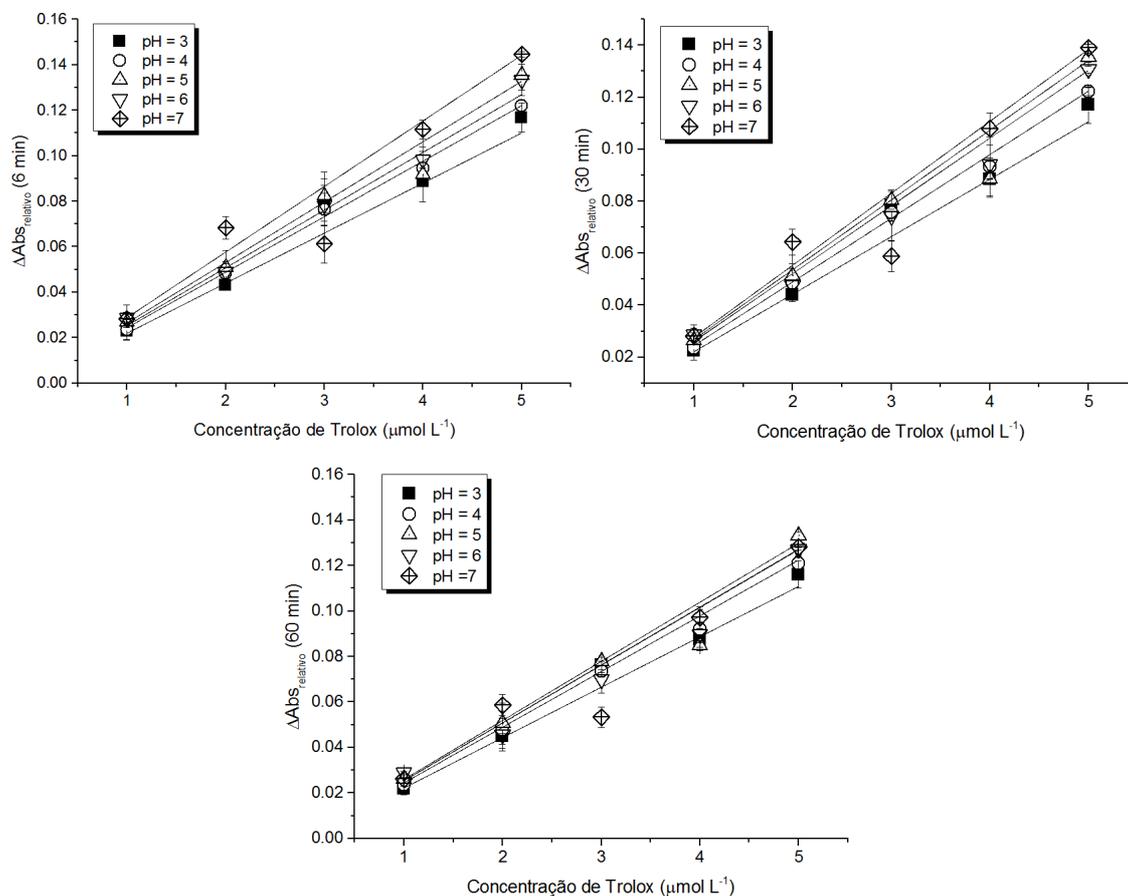


Varição relativa de absorção de misturas de ABTS^{++} e fenilbetalaína.



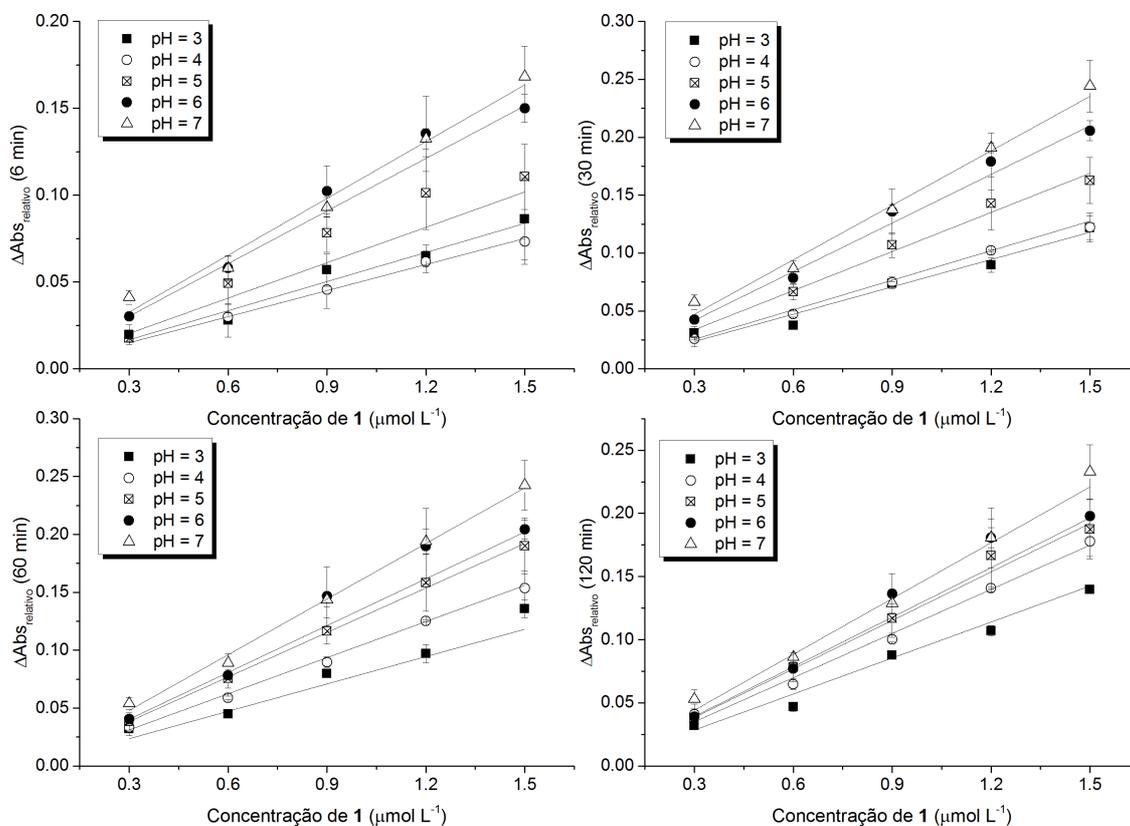
Varição relativa de absorção de misturas de ABTS^{++} e *N*-metil-fenilbetalaína.

8.19. Ajustes lineares do método ABTS



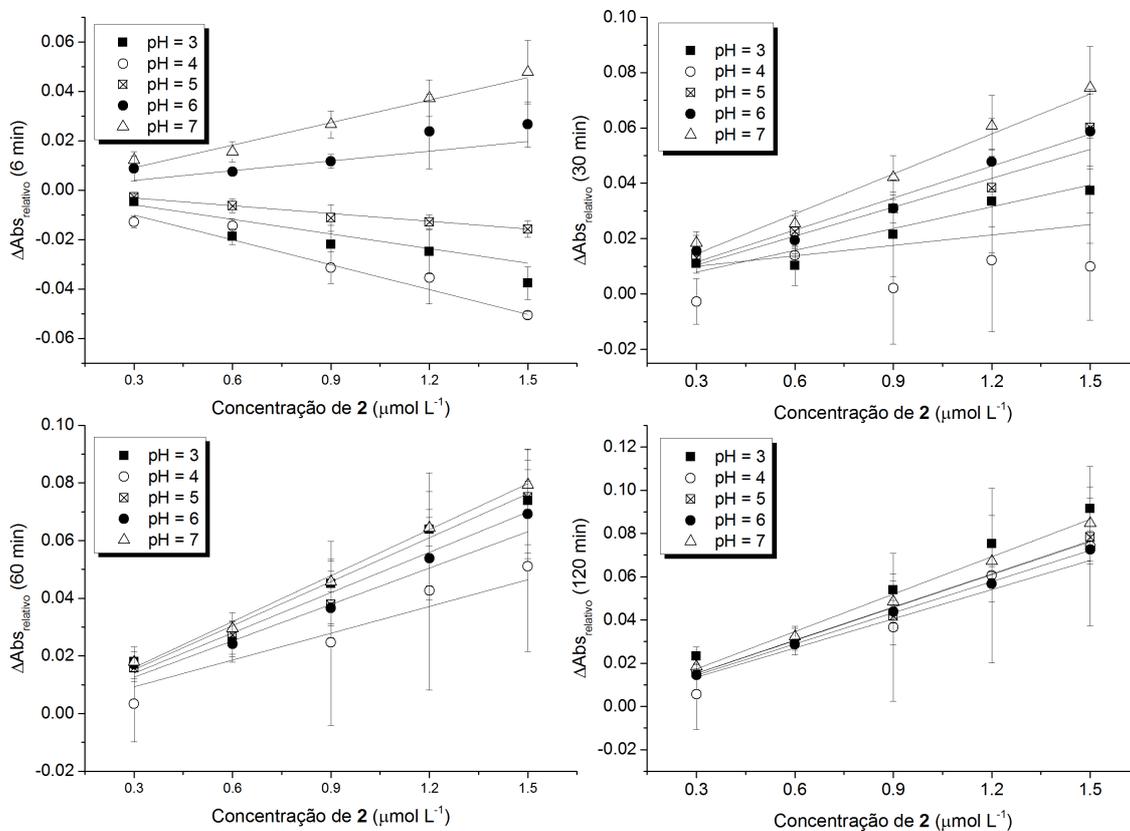
Curvas de variação relativa de absorção em 734 nm por uma solução de cátion-radical ABTS \bullet^+ que recebeu diferentes concentrações de Trolox. A variação foi calculada após 6, 30 e 60 min da adição de antioxidante.

Coefficiente angular da regressão linear (α) e coeficiente de determinação ajustado (Adj-R^2) das curvas. **6 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,022$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 4 ($\alpha = 0,024$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 5 ($\alpha = 0,027$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,025$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,029$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$). **30 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,022$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 4 ($\alpha = 0,024$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 5 ($\alpha = 0,027$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,026$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,028$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$). **60 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,022$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 4 ($\alpha = 0,024$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 5 ($\alpha = 0,026$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,025$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,025$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$).



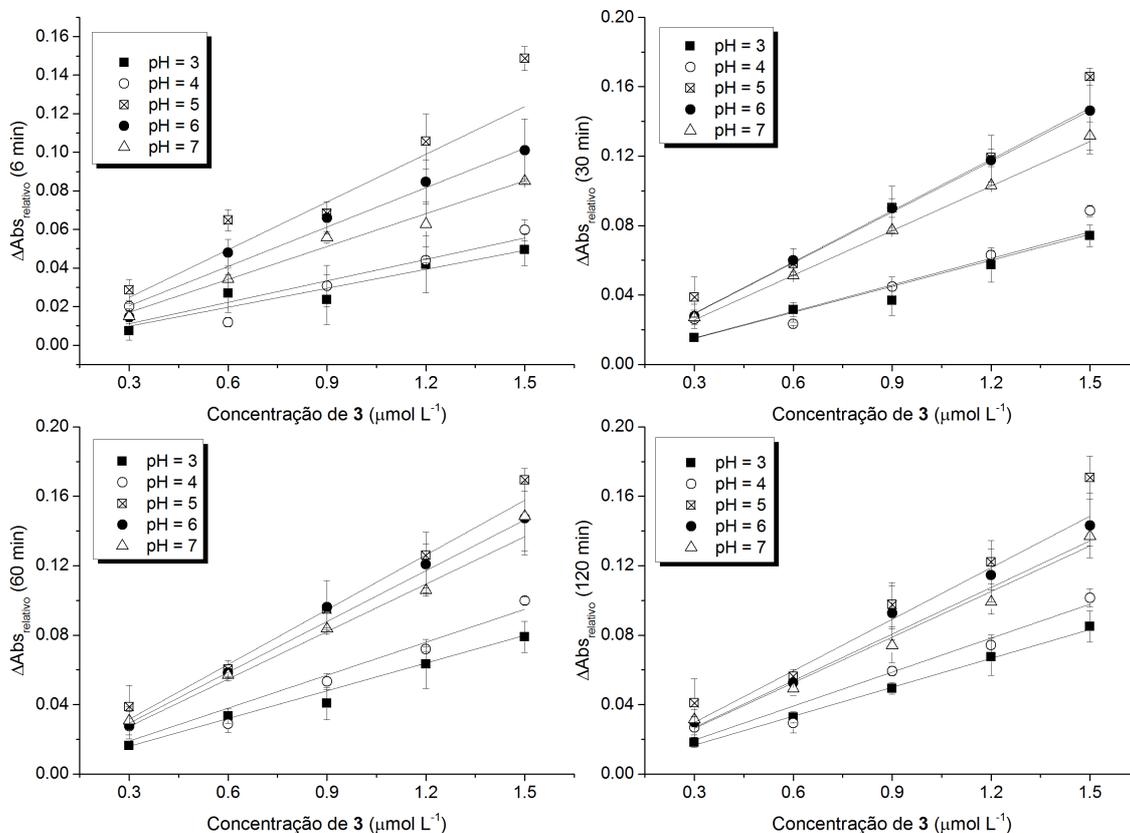
Curvas de variação relativa de absorção em 734 nm por uma solução de cátion-radical ABTS•+ que recebeu diferentes concentrações de *m*-betalaína. A variação foi calculada após 6, 30, 60 e 120 min da adição de betalaína.

Coefficiente angular da regressão linear (α) e coeficiente de determinação ajustado (Adj- R^2) das curvas. **6 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,037$, Adj- $R^2 = 0,96$); 4 ($\alpha = 0,052$, Adj- $R^2 = 0,99$); 5 ($\alpha = 0,078$, Adj- $R^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,082$, Adj- $R^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,102$, Adj- $R^2 = 1,00$). **30 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,071$, Adj- $R^2 = 1,00$); 4 ($\alpha = 0,085$, Adj- $R^2 = 1,00$); 5 ($\alpha = 0,107$, Adj- $R^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,122$, Adj- $R^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,142$, Adj- $R^2 = 1,00$). **60 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,080$, Adj- $R^2 = 1,00$); 4 ($\alpha = 0,103$, Adj- $R^2 = 1,00$); 5 ($\alpha = 0,114$, Adj- $R^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,129$, Adj- $R^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,140$, Adj- $R^2 = 1,00$). **120 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,087$, Adj- $R^2 = 1,00$); 4 ($\alpha = 0,106$, Adj- $R^2 = 1,00$); 5 ($\alpha = 0,117$, Adj- $R^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,130$, Adj- $R^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,125$, Adj- $R^2 = 1,00$).



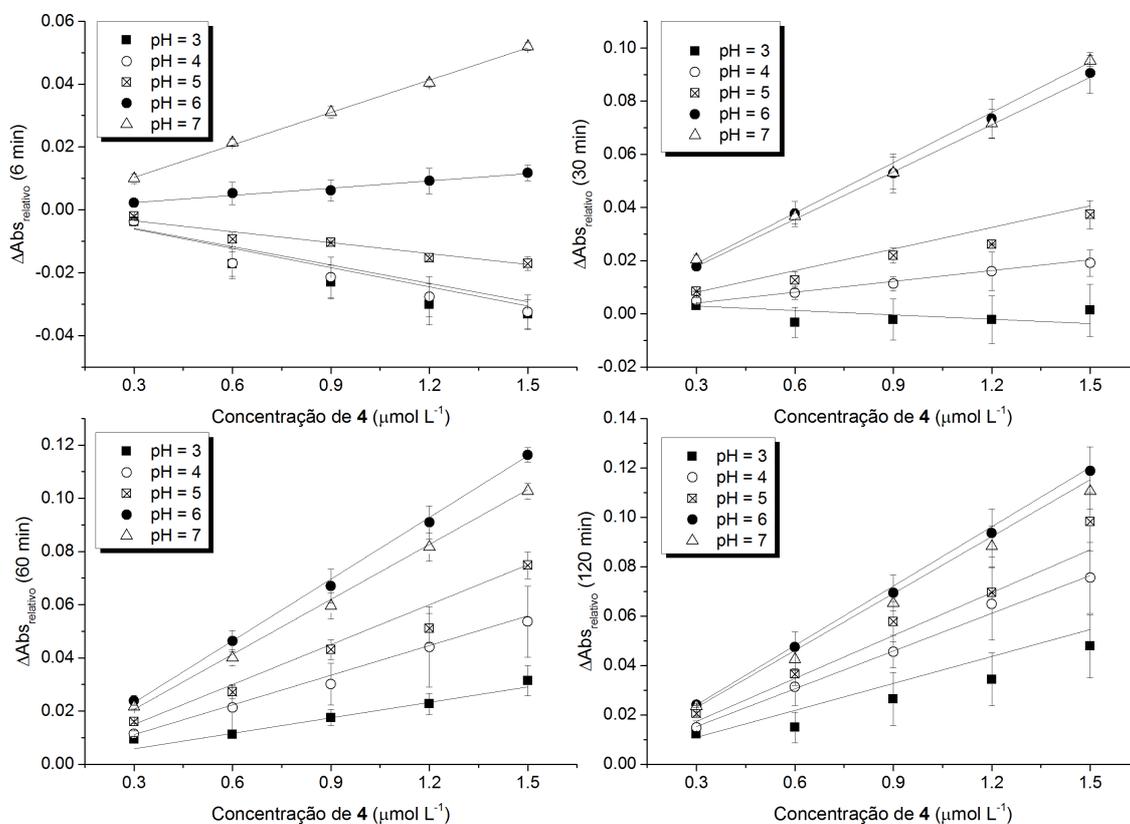
Curvas de variação relativa de absorção em 734 nm por uma solução de cátion-radical ABTS^{•+} que recebeu diferentes concentrações de *N*-metil-*m*-betalaínofenol. A variação foi calculada após 6, 30, 60 e 120 min da adição de betalaína.

Coefficiente angular da regressão linear (α) e coeficiente de determinação ajustado (Adj-R²) das curvas. **6 min**, pH: 3 ($\alpha = -0,020$, Adj-R² = 0,91); 4 ($\alpha = -0,034$, Adj-R² = 1,00); 5 ($\alpha = -0,010$, Adj-R² = 0,99); 6 ($\alpha = 0,013$, Adj-R² = 0,97); 7 ($\alpha = 0,030$, Adj-R² = 0,98). **30 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,026$, Adj-R² = 0,91); 4* ($\alpha = 0,013$, Adj-R² = 0,40); 5 ($\alpha = 0,038$, Adj-R² = 0,99); 6 ($\alpha = 0,035$, Adj-R² = 0,98); 7 ($\alpha = 0,048$, Adj-R² = 0,98). **60 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,051$, Adj-R² = 0,98); 4 ($\alpha = 0,031$, Adj-R² = 0,94); 5 ($\alpha = 0,047$, Adj-R² = 0,98); 6 ($\alpha = 0,042$, Adj-R² = 0,99); 7 ($\alpha = 0,053$, Adj-R² = 0,99). **120 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,051$, Adj-R² = 0,99); 4 ($\alpha = 0,045$, Adj-R² = 0,95); 5 ($\alpha = 0,051$, Adj-R² = 1,00); 6 ($\alpha = 0,048$, Adj-R² = 1,00); 7 ($\alpha = 0,058$, Adj-R² = 1,00). *Ajuste realizado sem fixar $y_0 = 0$.



Curvas de variação relativa de absorção em 734 nm por uma solução de cátion-radical ABTS^{•+} que recebeu diferentes concentrações de fenilbetalaína. A variação foi calculada após 6, 30, 60 e 120 min da adição de betalaína.

Coefficiente angular da regressão linear (α) e coeficiente de determinação ajustado (Adj-R²) das curvas. **6 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,033$, Adj-R² = 0,98); 4 ($\alpha = 0,037$, Adj-R² = 0,96); 5 ($\alpha = 0,082$, Adj-R² = 0,98); 6 ($\alpha = 0,068$, Adj-R² = 0,97); 7 ($\alpha = 0,057$, Adj-R² = 1,00). **30 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,051$, Adj-R² = 1,00); 4 ($\alpha = 0,050$, Adj-R² = 0,93); 5 ($\alpha = 0,098$, Adj-R² = 1,00); 6 ($\alpha = 0,098$, Adj-R² = 1,00); 7 ($\alpha = 0,086$, Adj-R² = 1,00). **60 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,053$, Adj-R² = 1,00); 4 ($\alpha = 0,063$, Adj-R² = 0,99); 5 ($\alpha = 0,105$, Adj-R² = 1,00); 6 ($\alpha = 0,098$, Adj-R² = 1,00); 7 ($\alpha = 0,091$, Adj-R² = 1,00). **120 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,056$, Adj-R² = 1,00); 4 ($\alpha = 0,065$, Adj-R² = 0,99); 5 ($\alpha = 0,099$, Adj-R² = 0,99); 6 ($\alpha = 0,088$, Adj-R² = 1,00); 7 ($\alpha = 0,090$, Adj-R² = 0,99).



Curvas de variação relativa de absorção em 734 nm por uma solução de cátion-radical ABTS•+ que recebeu diferentes concentrações de *N*-metil-fenilbetalaína. A variação foi calculada após 6, 30, 60 e 120 min da adição de betalaína.

Coefficiente angular da regressão linear (α) e coeficiente de determinação ajustado (Adj-R^2) das curvas. **6 min**, pH: 3 ($\alpha = -0,020$, $\text{Adj-R}^2 = 0,91$); 4 ($\alpha = -0,019$, $\text{Adj-R}^2 = 0,91$); 5 ($\alpha = -0,012$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,007$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,034$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$). **30 min**, pH: 3* ($\alpha = -0,005$, $\text{Adj-R}^2 = 0,34$); 4 ($\alpha = 0,014$, $\text{Adj-R}^2 = 0,98$); 5 ($\alpha = 0,027$, $\text{Adj-R}^2 = 0,99$); 6 ($\alpha = 0,059$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,063$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$). **60 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,019$, $\text{Adj-R}^2 = 0,98$); 4 ($\alpha = 0,037$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 5 ($\alpha = 0,050$, $\text{Adj-R}^2 = 0,99$); 6 ($\alpha = 0,077$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,069$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$). **120 min**, pH: 3 ($\alpha = 0,036$, $\text{Adj-R}^2 = 0,97$); 4 ($\alpha = 0,051$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 5 ($\alpha = 0,058$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 6 ($\alpha = 0,080$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$); 7 ($\alpha = 0,077$, $\text{Adj-R}^2 = 1,00$). *Ajuste realizado sem fixar $y_0 = 0$.