

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

RENAN MORAES PIOLI

**Efeito da modificação da porção imínica de betalaínas sobre as
suas propriedades eletrônicas**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

08/11/2018

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catálogo da publicação: Marlene
Aparecida Vieira – CRB – 8/5562

P662e Pioli, Renan Moraes
Efeito da modificação da porção imínica de
betalaínas sobre suas propriedades eletrônicas /
Renan Moraes Pioli. - São Paulo, 2018.
216p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Bastos, Erick Leite

1. Betalaínas. 2. Iminas. 3. Efeito
do substituinte. 4. Efeito eletrônico. 5. Hidrólise
I. T. II. Bastos, Erick Leite, orientador.

RENAN MORAES PIOLI

**Efeito da modificação da porção imínica de betalaínas sobre as
suas propriedades eletrônicas**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química

Orientador: Erick Leite Bastos

São Paulo

2018

Dedico esta tese aos meus pais por todo apoio em
minha vida acadêmica, amor e por serem
responsáveis pela formação do meu caráter.

Agradecimentos

À minha família, pais, irmãos e avós, que sempre estiveram ao meu lado;

Ao meu eterno amor, Natalia, pela compreensão e carinho;

Ao Prof. Erick Bastos por ter me recebido transferido de outro laboratório, pelas inúmeras discussões, aprendizado e confiança no meu trabalho ao longo destes 3 anos juntos;

Ao Prof. Frank Quina pelas conversas e motivação durante a pausa para o café e a possibilidade de contribuir para os trabalhos do seu grupo de pesquisa;

Aos amigos e colegas de laboratório do lab 477 e 461 que ajudaram na execução deste trabalho;

Ao Dr. Felipe Dörr pelas amizade e análises de massas;

Aos amigos de São Paulo, que foram essenciais para minha adaptação;

À Central Analítica do IQUSP pelas análises de HRMS e RMN, em especial a Janaína, Cris, Vânia e Giovana;

Ao Joca, pela amizade e pronta disponibilidade;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta tese.

À Capes pela bolsa concedida e CNPq/FAPESP pelo financiamento dos projetos.

"Together we stand, divided we fall"

Roger Waters in *Hey You*,

The Wall (1979)

Resumo

PIOLI, R. M. **Efeito da modificação da porção imínica de betalaínas sobre as suas propriedades eletrônicas**. 2018. 216 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Betalaínas são pigmentos naturais derivados da L-tirosina encontrados em um número restrito de plantas e fungos. Sob o ponto de vista químico, betalaínas são iminas ou sais de imínio que se originam do acoplamento aldimínico entre o ácido betalâmico e aminas ou aminoácidos. Embora sejam conhecidas mais de 70 betalaínas naturais, os estudos sobre as relações entre a estrutura e as propriedades de betalaínas ainda são limitados. Esta Tese de Doutorado descreve a semissíntese e estudo da hidrólise e das propriedades fotofísicas e redox de três grupos de betalaínas não naturais: *N*-fenilbetalaínas (pBeets), *N*-metil-*N*-fenilbetalaínas (*N*-Me-pBeets) e *N,N*-difetilbetalaínas (dipBeets). O estudo de quatorze pBeets *para* substituídas sugere que a porção imina destes compostos está protonada em meio aquoso neutro e que substituintes atraentes de elétron na porção fenílica favorecem o deslocamento de carga do nitrogênio 2-piperideínico para a porção imínica. A constante de hidrólise aumenta linearmente com o aumento do valor de σ_p de Hammett do substituinte, dado o aumento da eletrofilicidade do carbono aldimínico. Por outro lado, pBeets com substituintes atraentes de elétron são mais fluorescentes. A adição de metila ou fenila ao nitrogênio da imina cria um ambiente hidrofóbico que compromete o ataque da água e diminui a constante de velocidade de hidrólise provocando, contudo, uma diminuição na fluorescência. Os resultados foram racionalizados empregando-se espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrofotometria e voltametria cíclica.

Palavras-chave – betalaínas, imina, efeito do substituinte, efeito eletrônico, hidrólise.

Abstract

PIOLI, R. M. **Effects of imine portion modification on the electronic properties of betalains**. 2018. 216 p. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Betalains are natural pigments derived from L-tyrosine that are found in a restricted number of plants and fungi. From the chemical point of view, betalains are imines or iminium salts that originate from the aldimine coupling between betalamic acid and amines or amino acids. Although more than 70 natural betalains are known, studies on structure-property relationships of betalains are still limited. This doctoral thesis describes the semi-synthesis and study of the hydrolysis as well as photophysical and redox properties of three groups of non-natural betalains: *N*-phenylbetalains (pBeets), *N*-methyl-*N*-phenylbetalines (*N*-Me-pBeets) and *N,N*-diphenylbetalines (dipBeets). The study of fourteen substituted pBeets suggests that the imine portion of these compounds is protonated in neutral aqueous medium and that attractive electron substituents on the phenyl portion favor the displacement of 2-piperidene nitrogen charge to the imine portion. The hydrolysis constant increases linearly with the increase of the Hammett's σ_p value of the substituent, given the increase in the electrophilicity of the aldimine carbon. On the other hand, pBeets with attractive electron substituents are more fluorescent. The addition of methyl or phenyl to the imine nitrogen creates a hydrophobic environment upon water attack and decreases the hydrolysis rate constant, however, causing a decrease in fluorescence. The results were rationalized using nuclear magnetic resonance spectroscopy, spectrophotometry and cyclic voltammetry.

Keywords – betalains, imine, substituent effect, electronic effect, and hydrolysis.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

BR	Tampão Britton-Robinson (acetato, fosfato, borato)
DMC	Dimetilcarbonato
$E_{p,a}$	Potencial de pico anódico – oxidação
ESI	<i>Electrospray ionization</i> - Ionização por eletrospray
f^{em}	Fenda de emissão
f^{ex}	Fenda de excitação
GC	<i>Gas Chromathography</i> – Cromatografia Gasosa
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromathography</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
m/z	Relação massa/carga
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de Massas
q	Quadrupolo
TOF	<i>Time of Flight</i> - Tempo de voo
δ	Deslocamento químico
Δv	Deslocamento de Stokes
ϵ	Épsilon – Coeficiente de atenuação molar
λ	Comprimento de onda
λ^{ABS}	Comprimento de onda de máxima absorção
λ^{EM}	Comprimento de onda de máxima emissão
λ^{EX}	Comprimento de onda de máxima excitação
$\tau_{1/2}$	Tempo de meia-vida
Φ_{FL}	Rendimento Quântico de Fluorescência
Bn	Betanina
Ind	Indicaxantina
pBeet	<i>N</i> -fenilbetalaína
<i>N</i> -Me-pBeet	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -fenilbetalaína
dipBeet	<i>N,N</i> -difenilbetalaína

Sumário

Agradecimentos	v
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xi
1. Introdução	15
1.1. Betalainas: pigmentos de plantas e fungos	15
1.1.1. Biossíntese e semissíntese	18
1.2. Relações estrutura-propriedades	19
1.2.1. Propriedades fotofísicas.....	20
1.2.2. Estabilidade hidrolítica.....	21
1.3. Betalainas: iminas solúveis em água.....	23
1.3.1. Relações lineares de energia livre	24
2. Objetivo	29
2.1. Objetivos específicos	29
3. Resultados	31
3.1. <i>N</i> -Fenilbetalainas: pBeets	31
3.2. <i>N</i> -metil- <i>N</i> -Fenilbetalainas: <i>N</i> -metil pBeets.....	50
3.3. <i>N,N</i> -Difenilbetalainas: dipBeets	62
4. Discussão	73
4.1. Semissínteses	73
4.2. Efeitos eletrônicos do substituinte	77
4.2.1. Medidas de ¹ H RMN	77
4.2.2. Medidas fotofísicas.....	87
4.3. Efeito do substituinte sobre a hidrólise de pBeets	92
4.3.1. Hidrólise em pH 2	92
4.3.2. Hidrólise em pH 5	96
4.3.3. Hidrólise em pH 8,5	98
4.4. Estabilização <i>via</i> metilação e arilação	100
5. Conclusão	104
6. Parte experimental	106
6.1. Informações gerais.....	106
6.2. Soluções de trabalho	106
6.3. Extração de ácido betalâmico	106
6.4. Síntese das aminas precursoras.....	107

6.4.1.	Síntese das <i>N</i> -metil aminas.....	107
6.4.2.	Síntese das diarilaminas	108
6.5.	Semissíntese de betalaínas	108
6.6.	Elucidação estrutural.....	109
6.6.1.	HPLC-DAD-ESI(+)-TOF.....	109
6.6.2.	GC-MS	110
6.6.3.	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	110
6.7.	Caracterização fotofísica.....	111
6.7.1.	Absorção, emissão e excitação	111
6.7.2.	Rendimento quântico de fluorescência.....	111
6.7.3.	Determinação do coeficiente de atenuação molar	112
6.8.	Estudo cinético.....	113
6.9.	Voltametria cíclica.....	114
7.	Referências	116
8.	Anexos.....	130
8.1.	Caracterização estrutural das aminas	130
8.2.	Espectros de ¹ H RMN e ¹³ C RMN das aminas	132
8.3.	Espectros de ¹ H RMN das pBeets.....	152
8.4.	Espectros de ¹ H RMN das <i>N</i> -Me-pBeets	165
8.5.	Espectros de ¹ H RMN das dipBeets.....	169
8.6.	HPLC-DAD-ESI(+)-TOF das betalaínas.....	174
8.7.	Caracterização fotofísica.....	182
8.7.1.	pBeets	182
8.7.2.	<i>N</i> -metil-pBeets.....	189
8.7.3.	dipBeets	191
8.8.	Cinéticas de decomposição das betalaínas.....	194
8.8.1.	pBeets em pH 2	194
8.8.2.	pBeets em pH 5	198
8.8.3.	pBeets em pH 8,5	203
8.8.4.	pBeets em pH 5, 60 °C	207
8.8.5.	<i>N</i> -metil-pBeets em pH 5, 60°C.....	209
8.8.6.	dipBeets em pH 5, a 60°C	210
8.9.	Voltamogramas	212

1. Introdução

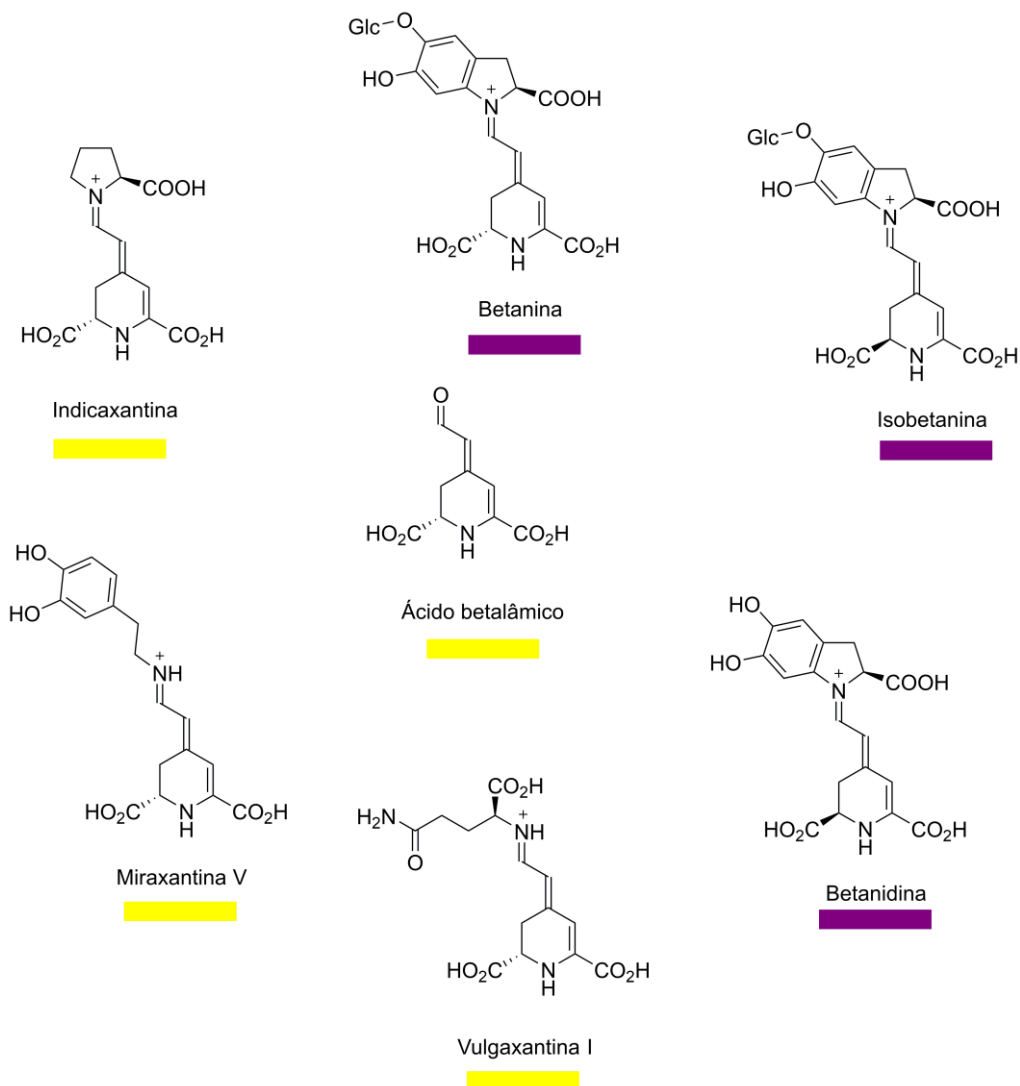
1.1. Betalaínas: pigmentos de plantas e fungos

A pigmentação de seres vivos é o resultado da evolução das espécies ao longo de milhares de anos. Substâncias coloridas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da vida e tem funções biológicas muito mais amplas do que somente a comunicação visual entre as espécies.¹ Clorofilas, por exemplo, são tetrapirróis indispensáveis para a fotossíntese. Carotenóides protegem os tecidos vivos contra o dano fotooxidativo, tendo papel fundamental prevenindo a fotodegradação do aparato fotossintetizante.^{2,3} Em plantas que produzem flores e frutos, ou angiospermas, as antocianinas são responsáveis pela coloração intensa, fotoproteção e prevenção ao dano oxidativo.⁴ Betalaínas substituem as antocianinas na pigmentação da maior parte das espécies pertencentes à ordem Caryophyllales e são encontradas também em alguns fungos basidiomicetos.^{5,6} Os motivos da mutua exclusividade de antocianinas e betalaínas na natureza são alvos de grande controvérsia.^{7,8}



Figura 1: Beterraba (*Beta vulgaris*), uma planta pertencente à ordem das Caryophyllales, e o fungo basidiomiceto agário-das-moscas (*Amanita muscaria*), ambos pigmentados por betalaínas.

Betalaínas são pigmentos vacuolares e atóxicos classificados como betacianinas ou betaxantinas. Betacianinas vermelhas são o produto do acoplamento entre o ácido betalâmico (HBt) e derivados de ciclo-DOPA e apresentam máximo de absorção (λ^{ABS}) ao redor de 540 nm. Betacianinas são abundantes, por exemplo, nas beterrabas vermelhas (*Beta vulgaris*), nas flores vermelhas e violetas da primavera (*Bougainvillea* spp.) e no píleo do agálio-das-moscas (*Amanita muscaria*). Betaxantinas são formadas quando outros aminoácidos ou aminas se acoplam ao ácido betalâmico. Algumas betaxantinas fluorescem no verde quando irradiadas com luz azul, o que não se observa com betacianinas. Desta forma, flores pigmentadas por betaxantinas amarelas (λ^{ABS} ca. 470 nm) são fluorescentes,^{9,10} e.g., *Mirabilis jalapa* e *Portulaca grandiflora*, um fenômeno natural pouco entendido.¹¹⁻¹³ As estruturas de algumas betacianinas, betaxantinas e do ácido betalâmico são apresentadas no **Esquema 1**.



Esquema 1: Exemplos de betalaínas encontrada na natureza e o seu precursor biossintético comum, o ácido betalâmico. Abaixo dos nomes das betalaínas está representada a cor destas em solução aquosa.

Betalaínas são produtos naturais que vem encontrando ampla aplicação graças à sua cor e atividade biológica.^{14,15} Uma dieta rica em betalaínas, principalmente betacianinas, previne a peroxidação lipídica e aumenta o sequestro de radicais livres relacionados a processos oxidativos que desencadeiam doenças degenerativas.¹⁶ Além disso, betalaínas são inibidores das enzima COX-2, envolvida na inflamação.^{17,18} Betalaínas possuem diversas porções oxidáveis, dentre os quais destacam-se o sistema

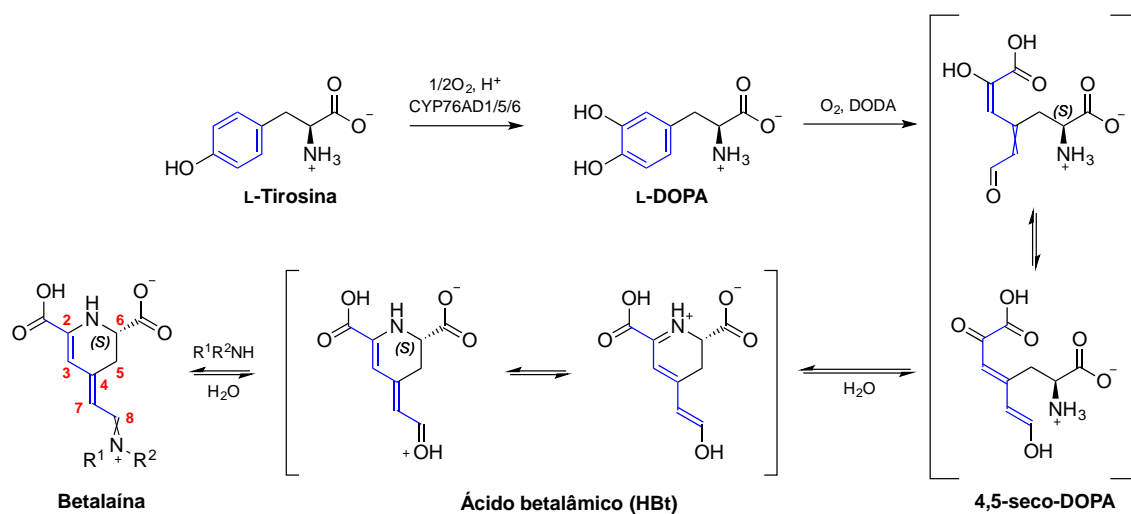
diazapolimetínico e o anel 2-piperideínico em todos os derivados e uma porção catecólica nas betacianinas. Gandia-Herrero e colaboradores investigaram o papel destas porções no potencial antioxidante de betalaínas.^{14,19,20} Betacianinas apresentam intensa cor vermelha/violeta em meio aquoso em uma faixa de pH entre 3 e 7, condições nas quais antocianinas perdem sua cor.²¹⁻²³ O pigmento magenta de beterrabas, a betanina, na presença de íons Eu(III), forma um complexo que foi utilizado como sensor colorimétrico na detecção de dipicolinato de cálcio em esporos de bactérias, como o *Bacillus anthracis*.²⁴ Betacianinas também foram utilizadas como fotosensibilizadores em células solares devido ao seu potencial redox, ao alto coeficiente de absorção molar e presença de carboxilatos que se ligam ao TiO₂.^{25,26} Betalaínas foram usadas na fabricação de nanopartículas de metais nobres, como a prata, ouro e platina, dada a sua capacidade redutora e tendência a estabilizar as nanopartículas na etapa de crescimento.^{27,28}

Betalaínas não naturais podem ser semissintetizadas a partir do acoplamento entre o ácido betalâmico e nucleófilos de nitrogênio não disponíveis na natureza. Diversos derivados têm sido utilizados no desenvolvimento de aplicações. cBeet120, uma betalaína derivada de aminocumarina, foi utilizada como marcador fluorescente de *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária, em eritrócitos.²⁹ Este desenvolvimento foi possível, em parte, graças ao entendimento do papel das características das aminas precursoras sobre as propriedades das betalaínas.

1.1.1. Biossíntese e semissíntese

A biossíntese de betalaínas pode ser resumida em quatro passos-chave (**Esquema 2**).³⁰⁻³⁴ A oxidação enzimática de L-tirosina por oxigênio, levando à L-3,4-diidróxifenilalanina (L-DOPA), a oxidação enzimática de L-DOPA a 4,5-seco-DOPA, posteriormente a HBt e o acoplamento aldimínico do ácido betalâmico com aminoácidos

ou aminas. As duas últimas etapas são espontâneas em meio ácido.^{35,36}



Esquema 2: Simplificação da biossíntese de betalaínas. Os estados de protonação são apresentados para manter as espécies em suas formas neutras e as reações balanceadas, não correspondendo, necessariamente, ao estado de protonação das espécies em água.

Schliemann e colaboradores continuaram o trabalho pioneiro de von Elbe no estudo da *síntese parcial*, ou *semissíntese*, de betalaínas.³⁶ Eles utilizaram ácido betalâmico extraído de suco de beterraba no acoplamento com aminoácidos para produzir padrões de betalaínas naturais. A reação é feita em água acidificada ou em acetato de etila acidificado com ácido clorídrico aquoso e resulta na formação rápida de betalaínas. Como o interesse em entender o comportamento de betalaínas na natureza é muito grande, betalaínas naturais semissintéticas foram mais estudadas do que betalaínas não naturais e poucos derivados oriundos de aminas não encontradas na natureza tem sido descritos.³⁷

1.2. Relações estrutura-propriedades

Os equilíbrios 4,5-seco-DOPA/(HBt, H_2O) e HBt/(betalaína, H_2O) apresentados no **Esquema 2** deixam claro que a ocorrência de hidrólise diminui a persistência de betalaínas em meio aquoso. Contudo, dada a sua ampla funcionalização, betalaínas são

susceptíveis a diversas reações químicas. O aumento da temperatura acarreta na descarboxilação nas posições C2 e C6 (**Esquema 2**)³⁸ cuja extensão é reduzida pela esterificação das porções carboxílicas.^{39,40} Na presença de oxigênio, o anel 2-piperideínico pode ser oxidado à piridina correspondente originando compostos conhecidos como neobetaláínas. Uma série de fatores externos, como atividade de água, concentração, presença de íons, afetam a persistência de betaláínas e embora essas observações tenham sido extensivamente revisadas na literatura,²¹ estudos mecanísticos que discutam os aspectos moleculares destes efeitos são raros.

1.2.1. Propriedades fotofísicas

O ácido betalâmico possui uma banda de absorção com λ^{ABS} em 424 nm em solução aquosa, enquanto os aminoácidos e derivados de ciclo-DOPA, são compostos que absorvem no UV ($\lambda^{\text{ABS}} < 300$ nm). O acoplamento aldimínico entre o Hbt e o grupo amina leva a formação do sistema 1,7-diazaeptamético, aumentando a conjugação e deslocando a banda de absorção para comprimentos de onda de menor energia. As betaxantinas naturais, ou seja, derivadas de aminoácidos, apresentam um λ^{ABS} em torno de 470 nm, enquanto que as betacianinas naturais, λ^{ABS} em torno de 535 nm. Essa diferença é devida ao aumento da conjugação do sistema, enquanto as betacianinas possuem o nitrogênio imínico diretamente conjugado com o sistema, as betaxantinas não. Além disso, o efeito retirador de densidade eletrônica do ácido carboxílico dos aminoácidos, presente em betaxantinas, leva à diminuição no deslocamento da banda de absorção no UV-vis.^{19,37}

A fluorescência das betaláínas é outra propriedade explorada com a mudança estrutural da parte imínica. Embora o rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}) não seja elevado, pois a principal via de desativação não-radiativa das betaláínas corresponde

à conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$, sem haver o cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$, diversos grupos têm a capacidade de aumentar ou diminuir estes valores. O ácido betalâmico, apesar de ser o precursor cromofórico, não apresenta fluorescência,⁴¹ assim como as betacianinas. A fluorescência de betaxantinas deve-se ao acoplamento aldimínico com aminoácidos que possuem um par de elétrons livre no nitrogênio, estendendo o sistema ressonante.⁴² No caso das betacianinas, não há essa disponibilidade e, portanto, há uma diminuição na fluorescência.

O fato da imina ser substituída, ou seja, um íon imínio, acarreta uma diminuição drástica na fluorescência, conforme verificado para derivados de betanidina¹⁹ e derivados metilados e etilados de anilina.¹² O aumento na fluorescência das betalaínas pode ser observado com a mudança na viscosidade do meio. Conforme aumenta-se a fração molar de trifluoroetanol (TFE) e glicerol (Gl), numa mistura TFE:H₂O, Gl:H₂O e Gl:TFE, aumenta consideravelmente o Φ_{FL} , variando de 0,43 até 1,60% para a betalaína derivada de aminocumarina (cBeet120) e, 0,5 para 3% para indicaxantina (Ind) em etilenoglicol, devido à restrições conformacionais.⁴³⁻⁴⁵

1.2.2. Estabilidade hidrolítica

Os estudos de estabilidade térmica e hidrolítica de Bn em meio tamponado^{46,47} sugerem que a temperatura e o pH são fatores que influenciam na degradação de betalaínas. Conforme há um aumento na temperatura, o tempo de meia-vida de degradação reduz. Esse efeito é também observado em pHs neutros ou pouco ácidos (**Figura 2**). A maior estabilidade de Bn é observada a 60 °C em pH 6. A energia de ativação (E_a), calculada por meio da equação de Arrhenius, mostrou que os maiores valores são os apresentados numa faixa de pH que varia de 5 a 8. Os valores são: 53,8 kJ mol⁻¹ (pH 2), 58,1 kJ mol⁻¹ (pH 3), 62,0 kJ mol⁻¹ (pH 4), 84,4 kJ mol⁻¹ (pH 5), 78,9 kJ

mol^{-1} (pH 6), $76,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ (pH 7), $81,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (pH 8), $70,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (pH 9), $53,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ (pH 10), $39,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ (pH 11).

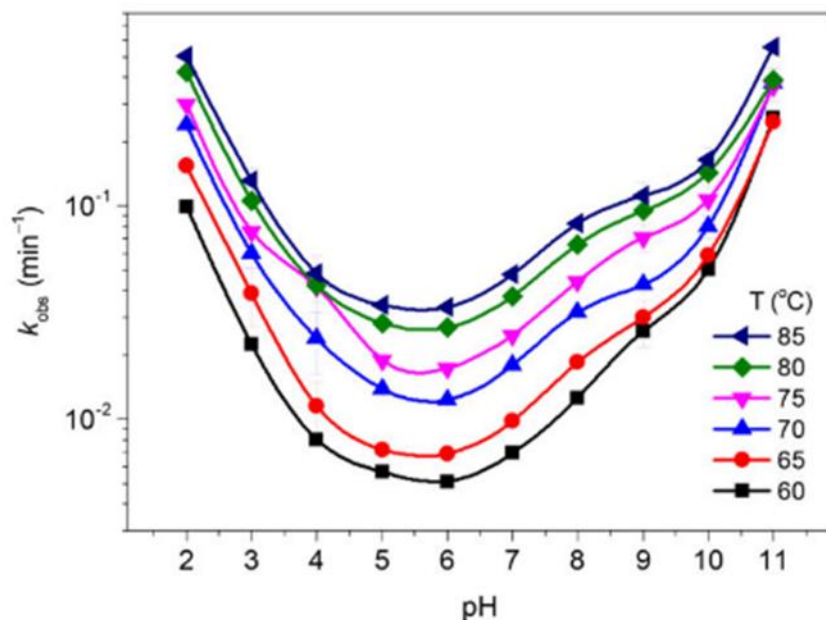


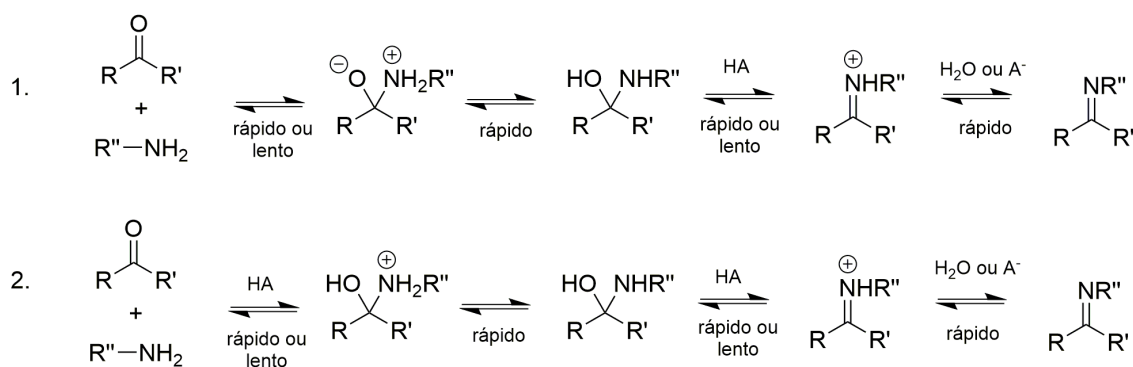
Figura 2: Efeito da temperatura sobre a hidrólise de betanina (Bn) na faixa de pH de 2 a 11. A temperatura e o pH influenciam na constante observada para a hidrólise (k_{obs}).

Betalaínas derivadas de aminoácidos ou aminas primárias, assim como as vulgaxantinas, portulacaxantinas e miraxantinas, são mais susceptíveis à hidrólise, enquanto as betalaínas derivadas de aminas secundárias, como betacianinas e indicaxantina, apresentam menor susceptibilidade. Embora a presença de uma carga positiva no nitrogênio do íon imínio sugira uma ativação do carbono aldimínico para o ataque da água ou íon hidróxido, a velocidade da reação de hidrólise é retardada pelo ambiente hidrofóbico criado pela presença de grupos alquílicos ligados ao nitrogênio. A presença de um grupo metil no nitrogênio imínico da *m*-Betalaínofenol (3-OH-*N*-Me-pBeet) aumenta em até 80 vezes o tempo de meia-vida de hidrólise, passando de 5 para 401 min, em tpBR pH 6, a 25 °C, para a betalaína.⁴⁶⁻⁴⁸

1.3. Betalaínas: iminas solúveis em água

A química do acoplamento entre nucleófilos de nitrogênio e aldeídos ou cetonas é marcada pelo estudo dos equilíbrios envolvidos e pela importância das iminas, sais de imínio e enaminas formadas no contexto biológico e aplicado.⁴⁹⁻⁵¹ A hidrólise desses produtos é normalmente evitada realizando-se as reações em solventes orgânicos na presença de agentes secantes ou empregando-se destilação azeotrópica com um aparato Dean-Stark.⁵²

As duas etapas elementares mais importantes das reações de acoplamento aldimínico e cetimínico são: (i) a formação de um intermediário tetraédrico através do ataque nucleofílico da amina ao carbono carbonílico e (ii) a desidratação deste intermediário (**Esquema 3**). Para compostos carbonílicos contendo um próton α relativamente ácido, o acoplamento com aminas primárias leva a iminas, enquanto aminas secundárias produzem enaminas.



Esquema 3: 1. Formação de iminas com aminas fortemente nucleofílicas que não necessitam de catálise ácida para o ataque, porém a desidratação torna-se a etapa lenta. 2. Formação de iminas com aminas fracamente nucleofílicas que necessita de catálise ácida para o ataque e a desidratação.

Considerando-se o **Esquema 3**, pode-se concluir que o pH do meio tem profundo efeito sobre a química de iminas e enaminas. O pK_{aH} da imina influencia o equilíbrio de

hidratação. Iminas desprotonadas são menos polarizadas que sais de imínio e, portanto, mais propensas a hidrólise. Embora as informações acerca das constantes de acidez de iminas protonadas sejam limitadas, de forma geral, o pK_{aH} de iminas é cerca de duas a quatro unidades mais baixo do que a das aminas precursoras.⁵³ A protonação da amina precursora compromete o passo de ataque nucleofílico. Apesar disso, catálise ácida é necessária no passo de desidratação. Desta forma, o pH pode resultar em uma mudança na etapa lenta da reação.

Para iminas derivadas da anilina, *viz.*, anils, o substituinte na porção aromática influencia diretamente a densidade eletrônica no átomo de nitrogênio imínico e, conseqüentemente, o pK_{aH} da imina e a eletrofilicidade do carbono carbonílico. Uma das formas de quantificar esse efeito baseia-se em relações lineares de energia livre, em especial, seguindo o método desenvolvido por Hammett.

1.3.1. Relações lineares de energia livre

Independentemente, Hammett e Burkhardt observaram que a constante de ionização de ácidos benzóicos *para*-substituídos dependiam da capacidade do substituinte de doar ou atrair densidade eletrônica. A diferença entre o pK_a do ácido benzóico ($pK_a^H = 4,2$) e o pK_a do ácido benzóico substituído (pK_a^X) foi usada para calcular o parâmetro σ , uma medida direta do efeito de substituinte na estabilização da carga negativa do benzoato, *i.e.*, $\sigma = 4,2 - pK_a^X = \log(K_a^X/K_a^H)$. Assim, para o ácido *para*-nitrobenzóico ($pK_a = 3,42$) o valor de σ_p é +0,78 e para o ácido *para*-metoxibenzóico ($pK_a = 4,48$) o valor de σ_p é -0,28. Desta forma, grupos doadores de elétrons (GDE) possuem valores de σ negativos ($\sigma_x < 0$) e os grupos atraentes de elétrons (GAE) têm valores de σ positivos ($\sigma_x > 0$). Os valores de σ de substituintes em *para* e *meta* são muito mais comuns que valores de σ para substituintes em *orto* para evitar que eventuais efeitos

estéricos sejam considerados.

O estudo da hidrólise de ésteres benzóicos substituídos revelou que as constantes cinéticas de hidrólise para cada éster substituído variavam de acordo com os valores de σ dos substituintes (σ^X). Hammett então observou que o gráfico de $\log(k^X/k^H)$ vs σ^X para esta reação era linear e inferiu que a variação da energia de ativação dos processos se correlacionava com a variação de energia da reação, uma *relação linear de energia livre*. O coeficiente angular ρ obtido de gráficos deste tipo (Eq. 1) reflete o aumento ou diminuição da densidade de carga na etapa lenta de uma dada reação (sinal de ρ , +/-) a sensibilidade da reação a efeitos de substituinte (magnitude de ρ entre 0 e 3). Por exemplo, quando $\rho > 1$, a reação é mais sensível ao efeito do substituinte do que a reação padrão (quando o substituinte é hidrogênio) e há um desenvolvimento de carga negativa (ou redução de densidade de carga positiva) no centro reacional na etapa lenta da reação.⁵⁴

$$\log \left(\frac{k_X}{k_H} \right) = \rho \sigma_X \quad \text{Equação 1}$$

A descoberta de Hammett foi fundamental para o estudo mecanístico de uma infinidade de reações. Para correlações lineares nos gráficos de Hammett as reações o ρ é sempre uma reta, indicando que independentemente do substituinte a quantidade de carga formada no estado de transição é a mesma. Porém, são observados desvios nessa linearidade. Se considerarmos que há uma mudança na quantidade de carga desenvolvida no estado de transição com a mudança na característica eletrônica do substituinte, a correlação chega a ponto que não é mais linear. Essa abrupta mudança no coeficiente angular, com o gráfico de Hammett no formato de uma curva côncava para baixo, indica a mudança na etapa lenta ou, no formato de uma curva côncava para cima, a mudança do

mecanismo da reação para determinados substituintes. De modo que a energia dos intermediários varia ao longo da coordenada da reação a reação toma um rumo diferente.

Na hidrólise iminas do tipo salicilidenos substituídos⁵⁵ em meio aquoso ácido com pH 5,5 e meio aquoso básico com pH 12 observou-se um desvio na linearidade para substituintes com propriedades eletrônicas distintas que caracteriza uma mudança na etapa lenta da reação de hidrólise (Curva côncava para baixo). O ponto de intersecção das curvas, tanto no primeiro quanto no segundo caso, foi próximo ao valor 0 no eixo x (σ^0).

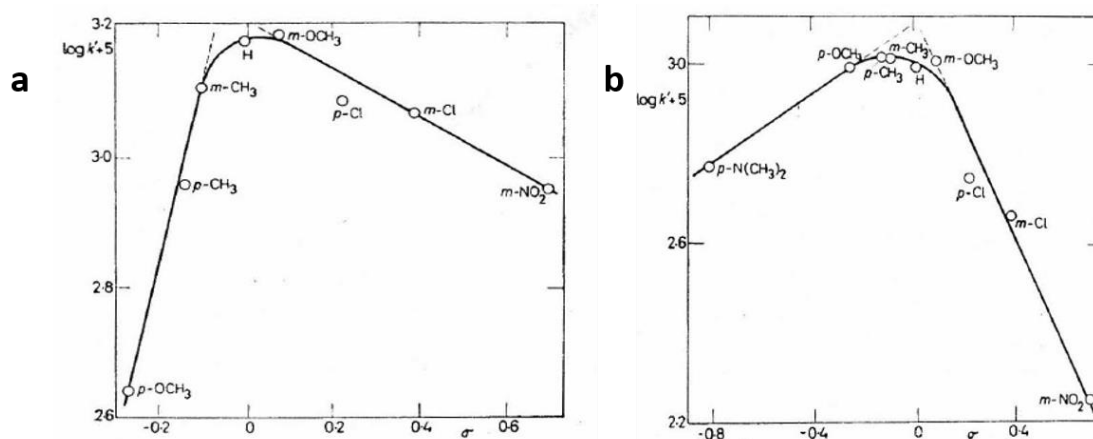
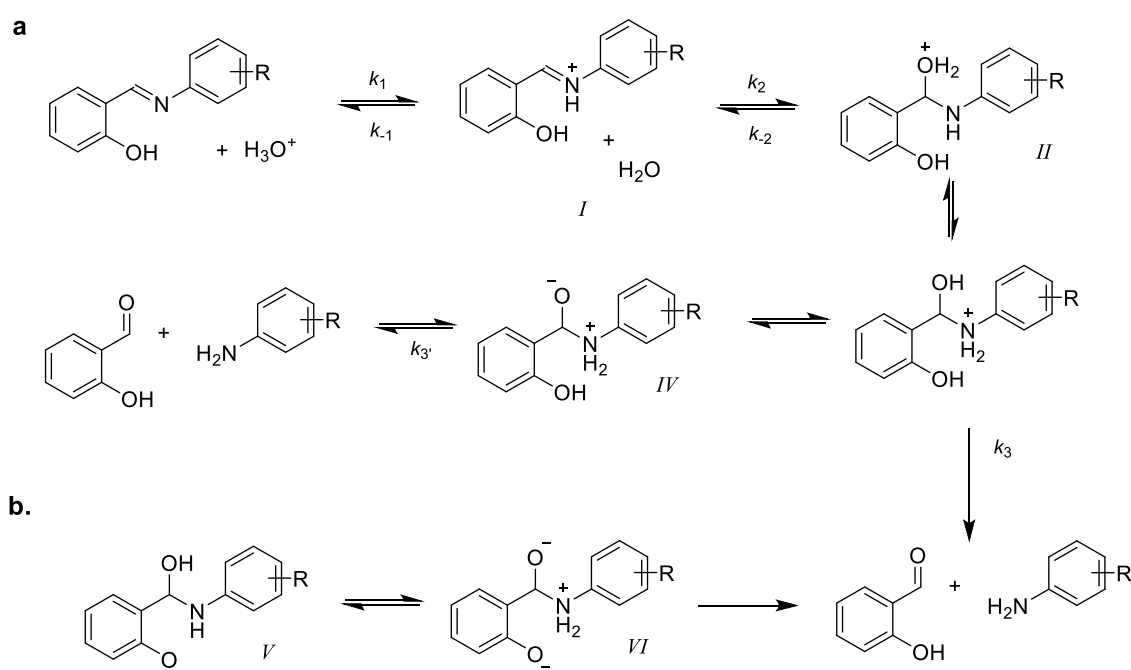


Figura 3: Gráficos de Hammett para a hidrólise de salicilidenos em **a.** solução aquosa com pH 5,5; **b.** solução aquosa com pH 12, mostram a mudança da etapa lenta da reação de hidrólise para substituintes atraentes de densidade eletrônica.

Em pH levemente ácido (*c.a.* pH 5,5) a adição de água à imina protonada é a etapa lenta da reação. Substituintes atraentes de densidade eletrônica facilitam a saída do grupo amina do intermediário formado, a carbinolamina protonada. Substituintes doadores de densidade eletrônica dificultam a saída do grupo amina da carbinolamina protonada a tal ponto que a reação inversa, a transferência de próton para o grupo OH e a desidratação, é mais rápida e a saída do grupo amina torna-se o passo lento da reação (**Figura 3a**).

Em pH alcalino (*c.a.* pH 12) também é observada uma quebra na linearidade no gráfico de Hammett. A adição de água, ou íon hidróxido, neste pH é facilitada para a

formação da carbinolamina intermediária e a etapa lenta da reação deveria ser a saída do grupo amina, porém o valor de ρ para os substituintes atraentes de densidade eletrônica deveria ser positivo, mas apresenta-se negativo. Portanto a influência do substituinte na reação exclui esse mecanismo. A presença do grupo hidroxila em *orto* ao centro da reação tem de ser levada em conta já que participa das etapas de reação. Os valores das constantes de dissociação deste grupo para os derivados foram determinados espectrofotometricamente e o gráfico de Hammett apresentou um $\rho = 1,9$. Portanto, a a divisão da carga negativa é a etapa lenta da reação para grupos atraentes de densidade eletrônica.



Esquema 4: Mecanismo de hidrólise de salicilidenoanilinas em **a.** pH 5,5 e **b.** pH 12.

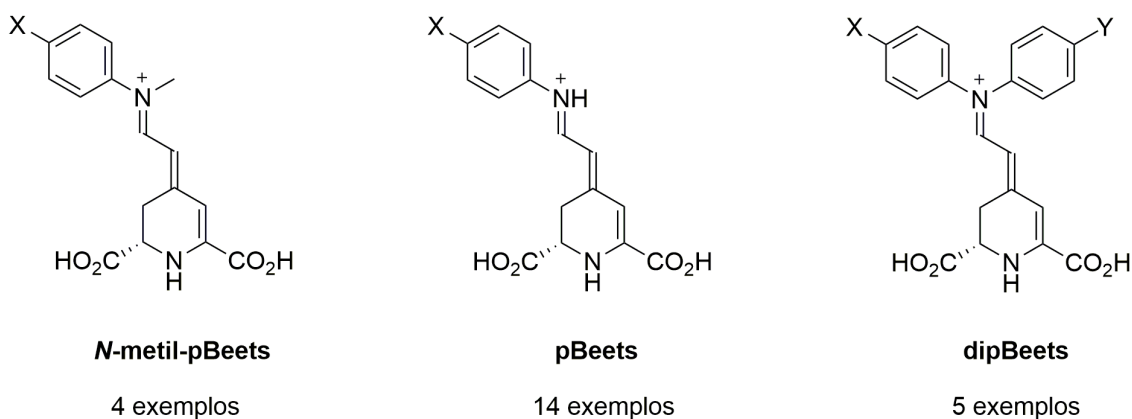
2. Objetivo

Entender como alterações da porção imínica de betalaínas afetam sua estabilidade hidrolítica e suas propriedades eletrônicas.

2.1. Objetivos específicos

- Semissintetizar fenilbetalaínas *para*-substituídas, *N*-metil fenilbetalaínas *para*-substituídas e difenilbetalaínas com dois substituintes com propriedades eletrônicas idênticas ou opostas;
- Entender como os substituintes afetam a cinética de hidrólise destas betalaínas em pH 2, 5 e 8,5 e as suas propriedades fotofísicas e redox;
- Entender os efeitos do grupo metila e do grupo fenila sobre a estabilidade hidrolítica e propriedades eletrônicas de fenilbetalaínas.

Um resumo dos compostos propostos neste trabalho é apresentado no **Esquema 5**.



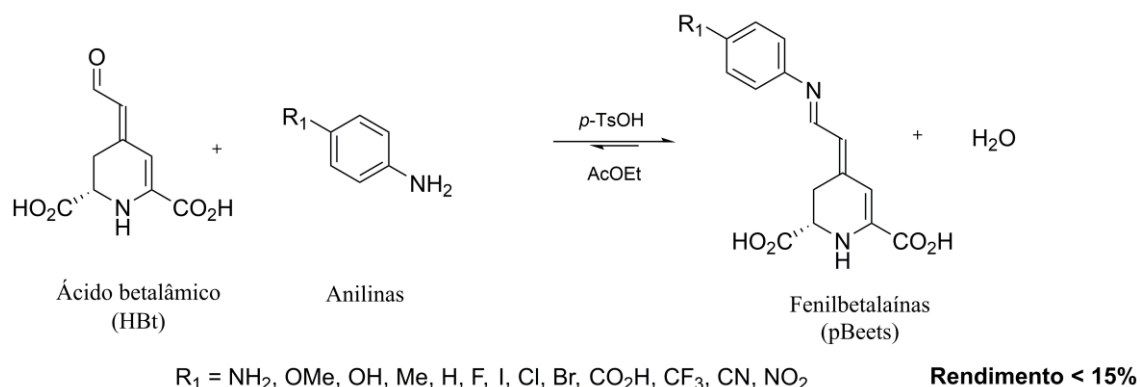
Esquema 5: Famílias de betalaínas semissintetizadas para os estudos de estrutura-propriedade.

3. Resultados

Para investigar a mudança da porção imínica e a influência do substituinte sobre as propriedades eletrônicas e estabilidade frente à hidrólise foram semissintetizadas três classes de betalaínas modelo não-naturais: 1. pBeets: fenilbetalaínas contendo como substituintes grupos doadores de elétrons (GDE) ou grupos atraentes de elétrons (GAE) na posição *para* ($-0,66 < \sigma_p < 0,78$), 2. N-Me-pBeets: N-metil-N-fenilbetalaínas com substituintes metoxila ($\sigma_p = -0,27$) e nitrila ($\sigma_p = 0,66$) e 3. dipBeets: N,N-difenilbetalaínas com substituintes metoxila e nitrila simétricos e assimétricos.

3.1. N-Fenilbetalaínas: pBeets

Para realizar a semissíntese de betalaínas anilínicas (pBeets) foram selecionadas 13 anilinas comerciais com substituintes (R) na posição *para* ao nitrogênio com propriedades de doadores ou atraentes de elétrons ($-0,66 < \sigma_p < 0,78$): NH₂, OH, OMe, Me, H, F, I, Cl, Br, CO₂H, CF₃, CN, NO₂ e 1 anilina com dois substituintes CN nas posições *meta* e *para*. Diante disso, as anilinas foram misturadas com uma solução concentrada de HBt (*ca.* 3 mmol L⁻¹) e ácido *para*-toluenossulfônico (*p*-TsOH) em acetato de etila e, imediatamente, a coloração da solução mudou de amarelo para laranja ou magenta, dependendo da amina utilizada. Foi observado que em muitos casos ocorreu a precipitação das betalaínas com a adição de *p*-TsOH, deixando a solução límpida. O rendimento da semissíntese sempre foi inferior a 15% e a análise de HPLC-DAD-(ESI+)-TOF mostrou que as amostras estavam puras para a realização das análises posteriores.



Esquema 6: Semissíntese de fenilbetalaínas (pBeets) a partir de HBt e anilinas comerciais.

BOX 1. Caracterização estrutural das pBeets com dados de ^1H RMN e HPLC-DAD-ESI(+)-TOF e rendimento da reação.

4-NH₂-pBeet (1a). Sólido roxo; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,33 (br s, 1H), δ 7,23 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), δ 6,91 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), δ 6,22 (d, $J = 13,4$, 1H), δ 6,15 (s, 1H), δ 4,28 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), δ 3,29 (m, 1H), δ 3,16 (dd, $J = 16,5, 7,1$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4$ 302,1135, expt 302,1128 (2,5 ppm). Rendimento 14%.

4-OH-pBeet (1b), Sólido roxo; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,33 (br s, 1H), δ 7,28 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), δ 6,96 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), δ 6,22 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H), δ 6,17 (s, 1H), δ 4,30 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), δ 3,31 (m, 1H), δ 3,16 (dd, $J = 16,7, 7,1$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_5$ 303,0975, expt 303,0974 (0,4 ppm). Rendimento 12%.

4-OMe-pBeet (1c). Sólido roxo; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,33 (m, 1H), δ 7,34 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), δ 7,07 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), δ 6,22 (d, $J = 12,7$ Hz, 1H), δ 6,18 (s, 1H), δ 4,31 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H), δ 3,86 (s, 3H), δ 3,31 (m, 1H), δ 3,16 (dd, $J = 17,4, 7,2$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5$ 317,1132, expt 317,1120 (3,2 ppm). Rendimento 14%.

4-Me-pBeet (1d). Sólido vermelho; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,34 (br s, 1H), δ 7,31 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), δ 7,26 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), δ 6,20 (m, 2H), δ 4,32 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), δ 3,31 (m, 1H), δ 3,17 (dd, $J = 16,7, 7,1$ Hz, 1H), δ 2,34 (s, 3H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ 301,1183, expt 301,1175 (2,6 ppm). Rendimento 13%.

pBeet (1e). Sólido laranja; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,37 (br s, 1H), 7,47 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,35 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,27 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 6,23 (br s, 2H), 4,35 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 3,34 (m, 1H), 3,17 (dd, $J = 17,3, 7,7$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4$ 287,1026, expt 287,1025 (0,4 ppm). Rendimento 12%.

4-F-pBeet (1f). Sólido roxo; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,31 (br s, 1H), δ 7,35 (dd, $J = 9,0, 4,6$ Hz, 2H), δ 7,21 (t, $J = 9,0$ Hz, 2H), δ 6,22 (s, 1H), δ 6,17 (br s, 1H), δ 4,33 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), δ 3,35 (m, 1H), δ 3,17 (dd, $J = 17,2, 7,3$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{O}_4$ 305,0932, expt 305,0925 (2,2 ppm). Rendimento 12%.

4-I-pBeet (1g). Sólido vermelho; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,30 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H), δ 7,80 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), δ 7,12 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), δ 6,28 (s, 1H), δ 6,19 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H), δ 4,36 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), δ 3,34 (m, 1H), δ 3,17 (dd, $J = 17,4, 7,9$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{IN}_2\text{O}_4$ 412,9993, expt 413,0000 (1,8 ppm). Rendimento 9%.

4-Cl-pBeet (1h). Sólido vermelho; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,30 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), δ 7,46 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), δ 7,30 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), δ 6,27 (s, 1H), δ 6,20 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), δ 4,35 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), δ 3,34 (m, 1H), δ 3,17 (dd, $J = 17,4, 7,4$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_4$ 321,0637, expt 321,0639 (0,8 ppm). Rendimento 10%.

4-Br-pBeet (1i). Sólido vermelho; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,29 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), δ 7,60 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), δ 7,23 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), δ 6,27 (s, 1H), δ 6,18 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), δ 4,35 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), δ 3,33 (m, 1H), δ 3,16 (dd, $J = 17,4, 7,4$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}_4$ 365,0131, expt 365,0114 (4,5 ppm). Rendimento 9%.

4-CO₂H-pBeet (1j). Sólido vermelho; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,34 (d, $J = 12,3$ Hz, 1H), δ 7,97 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), δ 7,35 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), δ 6,33 (s, 1H), δ 6,23 (d, $J = 12,3$ Hz, 1H), δ 4,40 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), δ 3,38 (dd, $J = 17,5, 7,6$ Hz, 1H), δ 3,20 (dd, $J = 17,5, 7,3$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6$ 331,0925, expt 331,0914 (3,1 ppm). Rendimento 10%.

4-CF₃-pBeet (1k). Sólido laranja; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,32 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H), δ 7,74 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), δ 7,41 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), δ 6,33 (s, 1H), δ 6,23 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H), δ 4,40 (dd, $J = 7,8, 6,9$ Hz, 1H), δ 3,38 (dd, $J = 17,4, 6,9$ Hz 1H), δ 3,19 (dd, $J = 17,4, 7,8$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$ 355,0900, expt 355,0937 (2,1 ppm). Rendimento 8%.

4-CN-pBeet (1l). Sólido laranja; ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) δ 8,25 (d, $J = 12,7$ Hz, 1H), δ 7,78 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), δ 7,37 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), δ 6,39 (s, 1H), δ 6,25 (d, $J = 12,7$ Hz, 1H), δ 4,43 (dd, $J = 8,2, 6,6$ Hz, 1H), δ 3,40 (dd, $J = 17,6, 6,6$ Hz, 1H), δ 3,20 (dd, $J = 17,6, 8,2$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4$ 312,0979, expt 312,0972 (2,2 ppm). Rendimento 9%.

4-NO₂-pBeet (1m). Sólido laranja; ¹H RMN (D₂O, 500 MHz) δ 8,28 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H), δ 8,23 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), δ 7,37 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H), δ 6,42 (s, 1H), δ 6,27 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), δ 4,45 (dd, *J* = 8,3, 6,5 Hz, 1H), δ 3,41 (dd, *J* = 17,8, 6,5 Hz, 1H), δ 3,20 (dd, *J* = 17,8, 8,3 Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd para C₁₅H₁₄N₃O₆ 332,0877, expt 332,0875 (0,7 ppm). Rendimento 9%.

3,4-CN-pBeet (1n). Sólido laranja; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M]⁺ Calcd para C₁₇H₁₃N₄O₄ 337,0931, expt 337,0943 (3,4 ppm). Rendimento 5%.

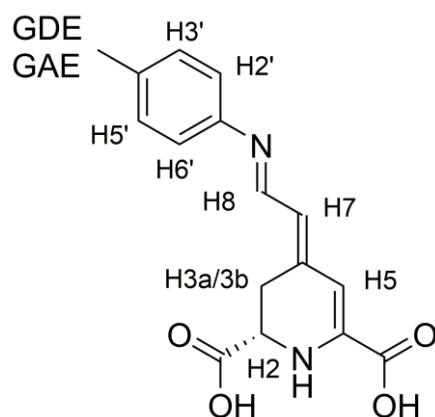


Figura 4: Estrutura química das pBeets com a numeração dos átomos de hidrogênios atribuídos com auxílio do ¹H RMN.

Nos espectros de ¹H RMN das betalainas há um padrão de sinais que podem ser observados. A porção que provém do ácido betalâmico (**HBt**) é igual para todas as betalainas existentes, e diante disso, os sinais dos deslocamentos químicos (δ) sempre são observados numa faixa com pequena variação. Há duas regiões que os espectros podem ser divididos: antes, onde podem ser encontrados os H2, H3a e H3b, e depois do sinal do D₂O (em 4,7 ppm), onde são encontrados os H5, H7, H8 e os aromáticos.

Os espectros de ¹H RMN das pBeets foram superpostos a fim de comparar os δ dos hidrogênios e verificar a influência do substituinte nas propriedades eletrônicas. A

primeira parte analisada foi a região dos aromáticos, que é muito informativa, pois está sendo diretamente influenciada pela característica eletrônica do substituinte. Observou-se que, quando a pBeet possui GDE, os hidrogênios mais blindados (H3') são os mais próximos aos substituintes. No momento em que se substituiu os GDE por GAE, ocorreu a inversão da posição dos H2' e H3' no espectro de ¹H RMN. O H3' foi desblindado nos derivados com GAE. O poder de atração de densidade eletrônica do grupo nitro (4-NO₂-pBeet) é tão grande que o deixou mais desblindado que o H8.

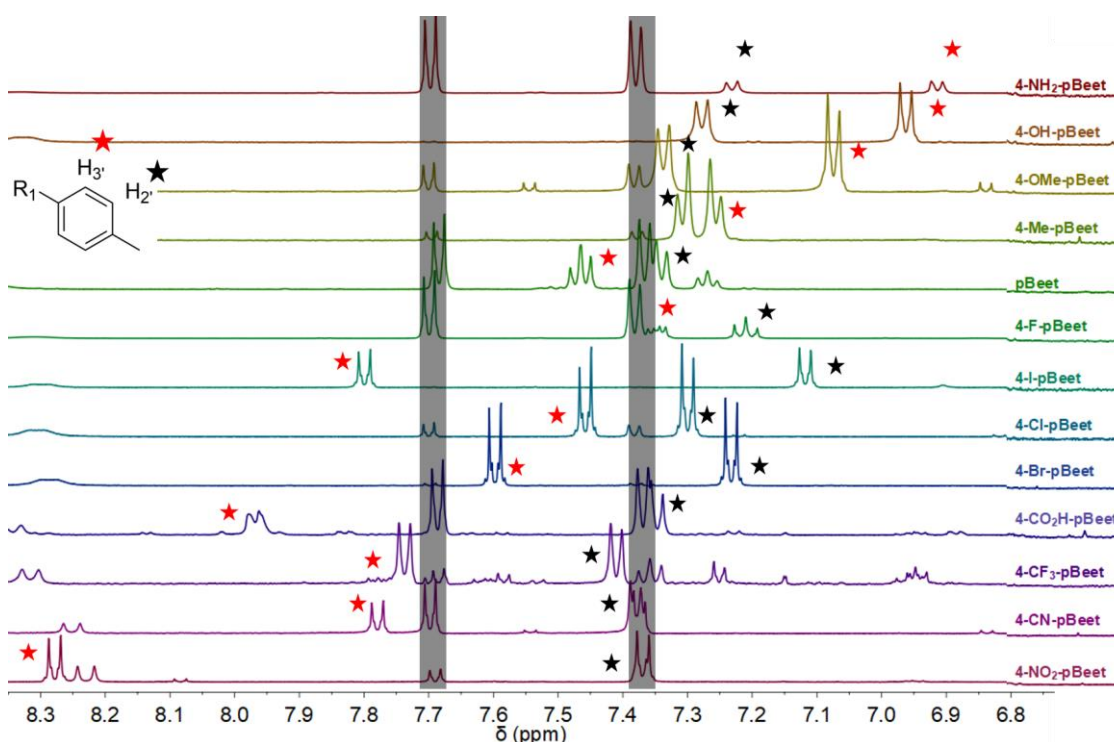


Figura 5: Superposição dos hidrogênios aromáticos das pBeets. Em cinza estão os H do *p*-TsOH, a estrela preta representa o H2' e a vermelha, o H3'. ¹H RMN (D₂O, 500 MHz).

Partindo do espectro de referência, ¹H RMN da pBeet (X = H), observou-se uma mudança nos deslocamentos químicos de todos os hidrogênios, algumas sutís, outras mais pronunciadas. Um grande efeito é observado no deslocamento químico do H5 (singlete). Conforme se substitui o H (pBeet) por NH₂ (4-NH₂-pBeet) e NO₂ (4-NO₂-pBeet), a variação passa de $\Delta\delta = 0,08$ ppm para $\Delta\delta = 0,19$ ppm e ocorre a inversão da posição deste

sinal com o dubleto do H7, que sofre pouca variação no espectro ($\Delta\delta < 0,04$ ppm). Conforme aumenta o poder de atração da densidade eletrônica do substituinte há o deslocamento do H5 para regiões mais desblindadas (**Figura 5**). Embora seja esperado que grupos atraentes de densidade eletrônica desblindem os núcleos de H conectados ao carbono conjugado, no caso do hidrogênio olefínico H8 há uma blindagem desse núcleo com a presença de GAE. Em contrapartida, GDE não alteram o deslocamento químico do H8. Apesar do H2 ser pouco sensível, variando menos de 0,1 ppm, para os dois grupos eletronicamente diferentes, a adição de GDE o blindam e a de GAE, desblindam. Os δ dos hidrogênios H3a e H3b são pouco sensíveis ao efeito do substituinte e, portanto, apresentam pouca variação no deslocamento químico, quando o composto é substituído por GDE o $\Delta\delta = 0,05$ e 0,01 ppm, respectivamente, e quando substituído por GAE, $\Delta\delta = 0,07$ e 0,03 ppm.

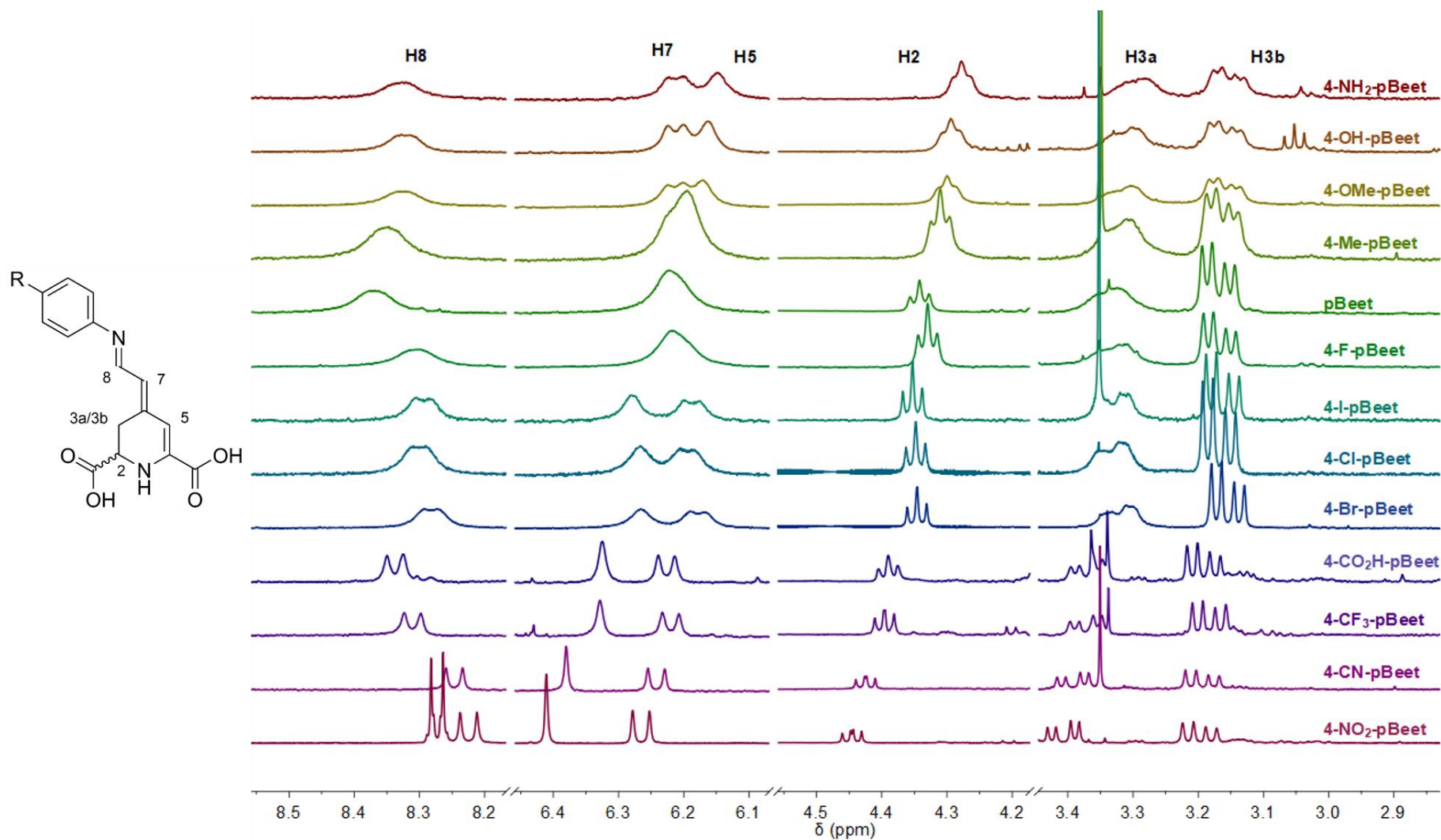


Figura 6: Superposição do ¹H RMN das pBeets para mostrar a influência do substituinte nos deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios.

Com auxílio da ferramenta GSD (*Global Spectral Deconvolution*) do software MestreNova, um algoritmo que faz um ajuste de curvas dentro da área selecionada, foi possível medir a constante de acoplamento (J) dos hidrogênios que possuíam multiplicidade não muito bem definida e foi observada uma variação nesses valores (em Hz). Não há uma tendência na variação dos J das pBeets, como se observa no deslocamento químico de alguns hidrogênios, porém observou-se que para o J_{H2} os GAE diminuem a constante de acoplamento, enquanto que para o J_{H3b} ocorre o aumento.

Tabela 1: Constantes de acoplamento dos hidrogênios das pBeets em D₂O a 25 °C.

Composto	<i>J</i> (em Hz)		
	³ <i>J</i> _{2,3a} ; ³ <i>J</i> _{2,3b}	³ <i>J</i> _{3b,2} ; ³ <i>J</i> _{3b,3a}	³ <i>J</i> _{7,8}
4-NH ₂ -pBeet	7,1	7,1, 16,5	13,4
4-OH-pBeet	7,1	7,1, 16,7	11,6
4-OMe-pBeet	6,1	7,2, 17,4	12,7
4-Me-pBeet	7,1	7,1, 16,7	-
pBeet	7,3	7,7, 17,3	-
4-F-pBeet	7,3	7,3, 17,2	-
4-I-pBeet	7,9	7,9, 17,4	12,2
4-Cl-pBeet	7,4	7,4, 17,4	9,4*
4-Br-pBeet	7,4	7,4, 17,4	9,4*
4-CO ₂ H-pBeet	7,3	7,3, 17,5	12,3
4-CF ₃ -pBeet	6,9, 7,8	7,8, 17,4	12,6
4-CN-pBeet	6,6, 8,2	8,2, 17,6	12,7
4-NO ₂ -pBeet	6,5, 8,3	8,3, 17,8	12,9

* Há uma incongruência com estes valores, possivelmente dadas as limitações de medida do software.

Os sinais de deslocamentos químicos dos hidrogênios nos espectros de ¹H RMN das betalainas variam de acordo com característica eletrônica dos grupos vizinhos e trazem informações sobre o ambiente eletrônico. As medidas espectrofotométricas informam sobre as propriedades eletrônicas na molécula como um todo. As pBeets, de um modo geral, apresentaram perfil de absorção no UV-Vis quase sempre parecidos com

as betalaínas naturais, uma banda em formato de sino, com o ponto máximo de absorção λ^{ABS} na faixa que compreende de 505 a 520 nm em água. A outra banda que pode ser encontrada em torno de $\lambda^{ABS} = 250-350$ nm pode estar relacionada ao excesso de amina.

O perfil de emissão de fluorescência das pBeets possui um formato padrão: uma banda bem definida, que tem apresentado o λ^{EM} variando de 550 a 596 nm. Apesar da mudança nos λ^{EM} não ser pronunciada, observou-se um deslocamento das bandas das betalaínas 4-OH-pBeet (**1b**) e 4-OMe-pBeet (**1c**) para comprimentos de onda maiores, além do alargamento da banda. A betalaína 3,4-CN-pBeet (**1n**) teve a banda deslocada, porém foi para comprimento de onda menor, i.e., ipsocrômico, mais energético.

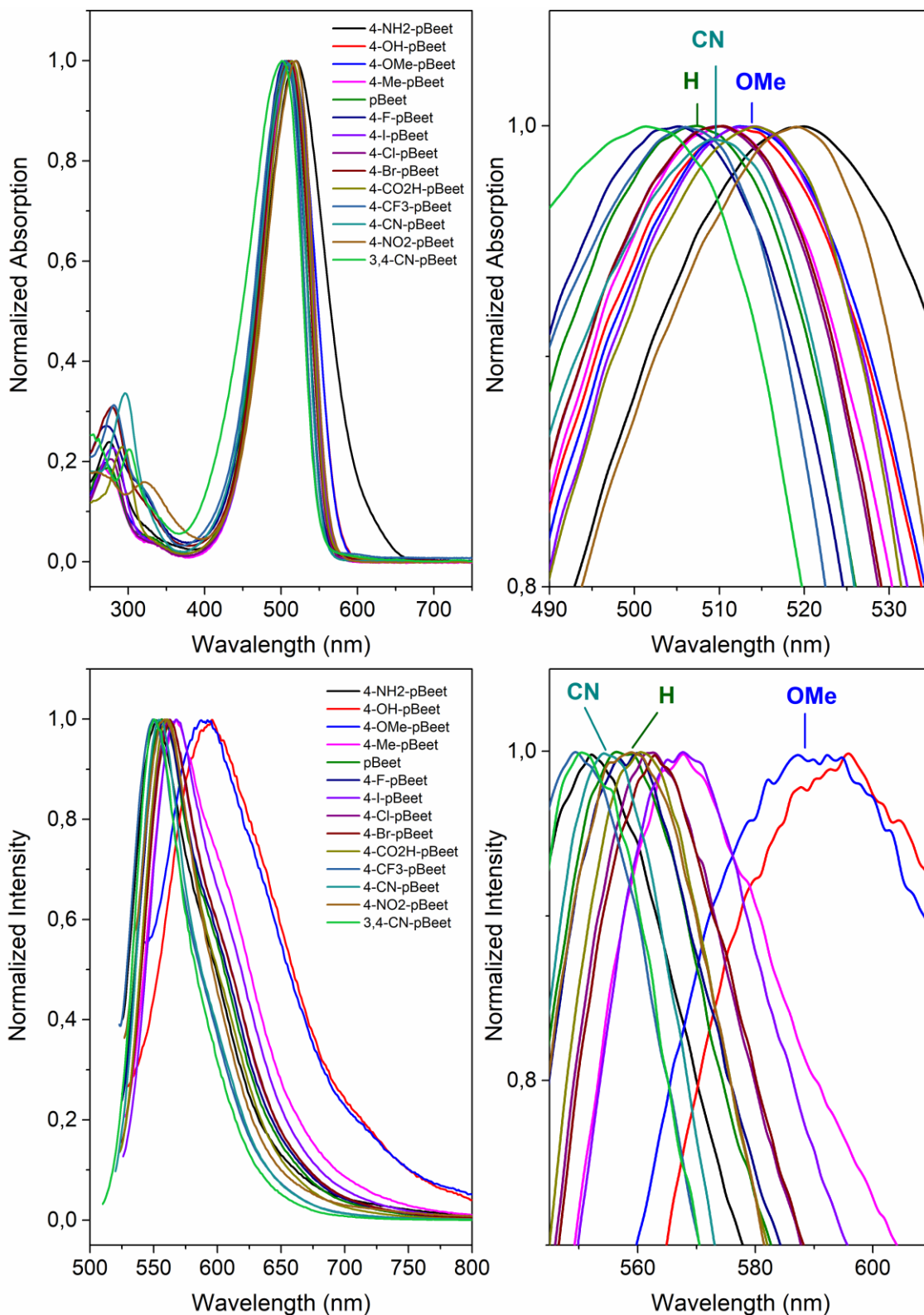


Figura 7: Espectros de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência das pBeets.

Neste trabalho, o rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}) das pBeets foram medidos em solução aquosa a 25 °C utilizando como padrão secundário de fluorescência a Rodamina B ($\Phi_{FL} = 0,5$ em etanol). Os valores variaram de $0,04 \times 10^{-2}$ até $1,23 \times 10^{-2}$ conforme o substituinte (**Tabela 2**). Como a presença de um grupo nitrila em *para* aumentou consideravelmente o Φ_{FL} , mais um grupo nitrila foi adicionado à molécula e o Φ_{FL} aumentou quase que 4 vezes, com valor de $4,65 \times 10^{-2}$. Observou-se que, apesar dos valores de Φ_{FL} serem baixos, há a influência do substituínte sobre esta propriedade. As betalaínas que possuem GDE apresentaram os menores valores, enquanto que as que possuem GAE, os maiores valores. O deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$), diferença entre o máximo de absorção λ^{ABS} e máximo de emissão de fluorescência λ^{EM} , variou entre 1115 a 2752 cm^{-1} sendo que substituintes doadores provocam variações de menor energia. As betalaínas presentes neste estudo apresentaram valores de coeficiente de atenuação molar (ϵ) que compreenderam a faixa descrita na literatura para os compostos naturais, de 48000 para betaxantinas e de $65000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para betacianinas^{43,47,54} e não houve indicações do efeito do substituinte sobre essa propriedade. Estas, além de serem sólidos higroscópicos, não apresentam informação sobre o contra-íon, portanto fez-se necessário o uso de métodos indiretos de análise, o método do ponto final (*end point method*), para a obtenção destes valores.

Tabela 2: Propriedades fotofísicas das pBeets, em água, a 25 °C.

Composto	ID	λ^{ABS} (nm)	λ^{EM} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$(\Phi_{FL} \pm dp) 10^{-2}$
4-NH ₂ -pBeet	1a	520	552	1115	54.700	0,04 ± 0,002
4-OH-pBeet	1b	512	596	2752	66.300	0,22 ± 0,001
4-OMe-pBeet	1c	512	592	2639	61.100	0,25 ± 0,001
4-Me-pBeet	1d	510	568	2002	61.200	0,08 ± 0,001
pBeet	1e	507	556	1738	59.100	0,17 ± 0,007
4-F-pBeet	1f	505	560	1944	57.800	0,18 ± 0,007
4-I-pBeet	1g	514	568	1849	62.900	0,20 ± 0,003
4-Cl-pBeet	1h	509	560	1789	62.800	0,18 ± 0,004
4-Br-pBeet	1i	510	562	1814	67.200	0,22 ± 0,003
4-CO ₂ H-pBeet	1j	514	560	1598	72.900	0,46 ± 0,031
4-CF ₃ -pBeet	1k	506	550	1581	47.700	0,74 ± 0,057
4-CN-pBeet	1l	509	555	1628	69.600	1,23 ± 0,078
4-NO ₂ -pBeet	1m	519	559	1379	53.600	0,04 ± 0,001
3,4-CN-pBeet	1n	501	550	1778	-	4,65 ± 0,021

As cinéticas de degradação de pBeets foram investigadas em tampões Britton-Robinson (acetato/fosfato/borato, Tampão BR) em pH 2, pH 5 e pH 8,5 a 25 °C. A constante cinética observada (k_{obs}) de decomposição e o tempo de meia-vida ($\tau_{1/2}$) foram calculadas a partir do ajuste não linear do decaimento dos máximos de absorção das betalaínas em função do tempo. Diferentes processos podem ocorrer nessa faixa de pH, porém a degradação de pBeets gerou o aumento da banda de absorção com λ^{ABS} em 420 nm em função do tempo e observou-se a maior estabilidade em pH próximo de neutro, pH 5, independentemente do substituinte.

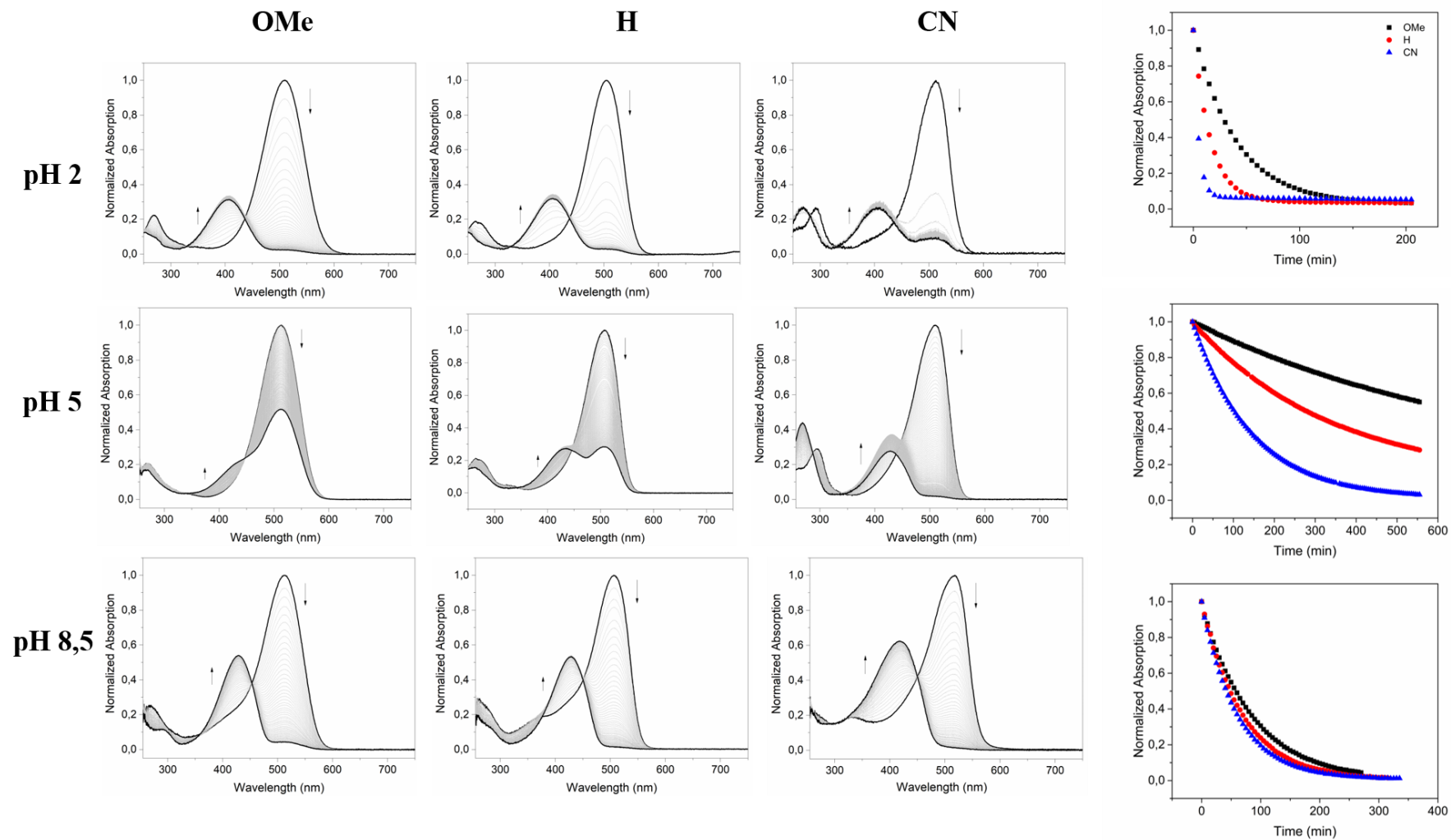


Figura 8: Cinéticas de degradação das 4-OMe-, 4-CN- e pBeet em tpBR pH 2, 5 e 8,5.

Em todos os pHs avaliados, observou-se que os compostos que possuem GDE são mais persistentes (**Tabela 3**). No pH 2 a adição de GDE aumentou o tempo de meia-vida ($\tau_{1/2}$) em até 3,5 vezes, enquanto que a substituição por GAE reduziu em até 5 vezes. Em pH 5, a adição de grupos doadores aumentou o tempo de meia-vida em 2 vezes e a de grupos retiradores, reduziu o tempo pela metade. Em pH 8,5 o aumento do $\tau_{1/2}$ pela adição de grupos doadores foi de até 2 vezes, enquanto que os substituintes atraentes pouco modificaram.

Tabela 3: Constantes de cinética (k_{obs}) de degradação e tempo de meia-vida ($\tau_{1/2}$) das pBeets em tpBR pH 2, 5 e 8.5 a 25 °C.

Compound	σ_p	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$			$\tau_{1/2} (\text{min})$		
		pH 2	pH 5	pH 8.5	pH 2	pH 5	pH 8.5
4-NH₂-pBeet	-0.66	$1,95 \times 10^{-3}$	$4,02 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-4}$	5,91	287	88,2
	0.60						
4-OH-pBeet	-0.37	$3,29 \times 10^{-4}$	$2,13 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-4}$	35,1	543	71,7
4-OMe-pBeet	-0.27	$4,24 \times 10^{-4}$	$2,36 \times 10^{-5}$	$1,86 \times 10^{-4}$	27,3	489	62,1
4-Me-pBeet	-0.17	$6,37 \times 10^{-4}$	$2,85 \times 10^{-5}$	$2,10 \times 10^{-4}$	18,1	405	55
pBeet	0	$1,06 \times 10^{-3}$	$4,90 \times 10^{-5}$	$2,66 \times 10^{-4}$	10,9	236	43,4
4-F-pBeet	0.06	$1,06 \times 10^{-3}$	$4,41 \times 10^{-5}$	$2,70 \times 10^{-4}$	10,9	262	42,8
4-I-pBeet	0.18	$1,70 \times 10^{-3}$	$7,04 \times 10^{-5}$	$2,52 \times 10^{-4}$	6,78	164	45,8
4-Cl-pBeet	0.23	$1,77 \times 10^{-3}$	$6,60 \times 10^{-5}$	$2,66 \times 10^{-4}$	6,51	175	43,4
4-Br-pBeet	0.23	$1,98 \times 10^{-3}$	$7,03 \times 10^{-5}$	$2,64 \times 10^{-4}$	5,84	164	43,7
4-CO₂H-pBeet	0.45	$4,05 \times 10^{-3}$	$7,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-4}$	2,85	146	60,2
	0						
4-CF₃-pBeet	0.54	$3,48 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-4}$	$2,93 \times 10^{-4}$	3,32	105	39,4
4-CN-pBeet	0.66	$4,25 \times 10^{-3}$	$1,15 \times 10^{-4}$	$2,77 \times 10^{-4}$	2,72	101	41,7
4-NO₂-pBeet	0.78	$3,82 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-4}$	$2,56 \times 10^{-4}$	3,03	110	45

*Os valores de sigma de Hammett foram retirados da literatura⁵⁷. Os substituintes que possuem dois valores de sigma são referentes às espécies protonadas/desprotonadas.

A voltametria cíclica das pBeet com eletrodo de carbono vítreo permitiu determinar os potenciais de pico catódico e anódico, relacionados a processos de redução e oxidação, respectivamente, e foram encontrados potenciais relacionados a processos reversíveis. Também foram observados processos irreversíveis em quase todas as betalaínas. No estudo eletroquímico com essa família a janela de trabalho foi reduzida de -1,0 a +1,0 V vs. Ag/AgCl para 0,3 a +1,0 V vs. Ag/AgCl.

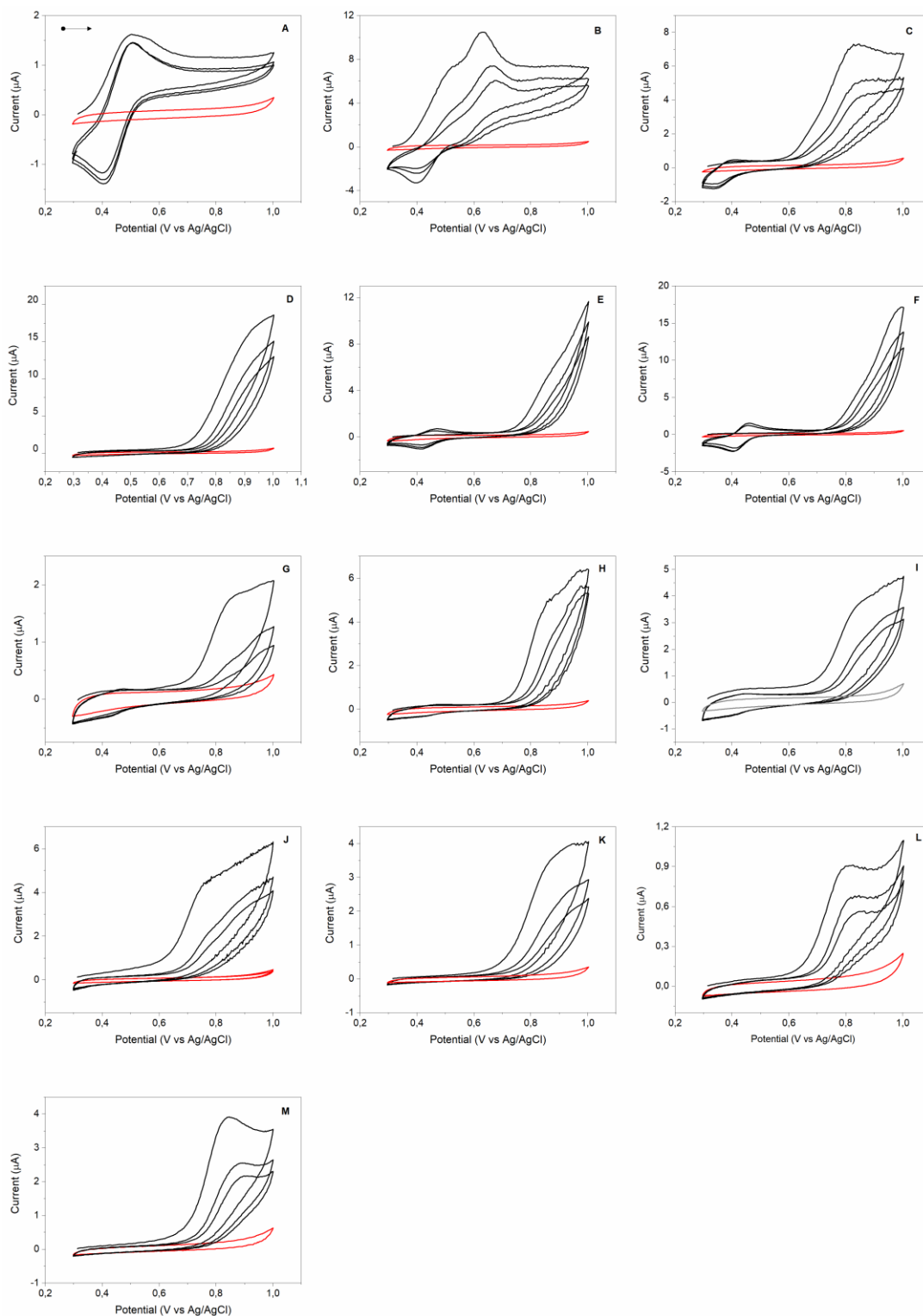


Figura 9: Voltamograma das pBeets: (a)-NH₂, (b)-OH, (c)-OMe, (d)-Me, (e) pBeet, (f)-F, (g)-I, (h)-Cl, (i)-Br, (j)-CO₂H, (k)-CF₃, (l)-CN e (m)-NO₂.

Os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{cat}), referentes a processos de oxidação e redução, respectivamente, das pBeets foram extraídos dos voltamogramas cíclicos e apresentados em forma de tabela (**Tabela 4**). Os potenciais de oxidação (E_{pa}) encontrados para a betanina (404, 616 e 998 mV) e para a indicaxantina (611 e 895 mV) em tampão fosfato não foram atribuídos à processos de oxidação que poderiam ocorrer em betalaínas,⁵⁸ porém para betanidina estudos correlacionaram o pH do meio com os potenciais de oxidação e concluíram que conforme diminuía o pH, os potenciais de oxidação aumentavam.⁵⁹ Os valores encontrados para os potenciais de oxidação (E_{pa}) para as pBeets são maiores do que os valores encontrados para a betanidina em tampão acetato-fosfato com pH 7.

Tabela 4: Potenciais de pico anódico (E_{ox}) e catódico (E_{cat}) das pBeets.

Composto	Número	E_{an} (mV vs. Ag/AgCl)		E_{cat} (mV vs. Ag/AgCl)	
4-NH₂-pBeet	1a	505*		408*	
4-OH-pBeet	1b	525* ¹	662* ²	398* ¹	589* ²
4-OMe-pBeet	1c	392*	842	349*	
4-Me-pBeet	1d	911			
pBeet	1e	466*	862	413*	
4-F-pBeet	1f	457*	831	951	403*
4-I-pBeet	1g	465*	851	941	430*
4-Cl-pBeet	1h	449*	875	971	422*
4-Br-pBeet	1i	433*	837	939	403*
4-CO₂H-pBeet	1j	768	866		
4-CF₃-pBeet	1k	858	934		
4-CN-pBeet	1l	817			
4-NO₂-pBeet	1m	882			

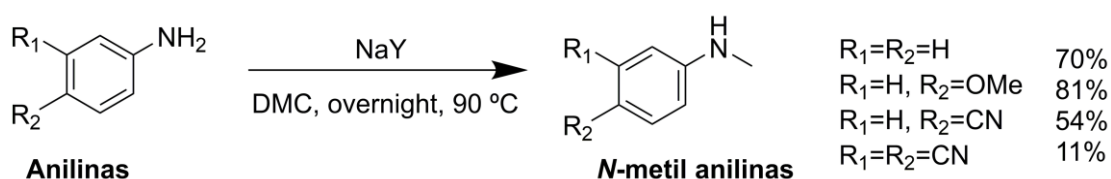
*Processo reversível

3.2. *N*-metil-*N*-Fenilbetalaínas: *N*-metil pBeets

Afim de se estudar qual o efeito da presença da metila no nitrogênio imínico nas fenilbetalaínas (pBeets) foi realizada a *N*-metilação de quatro anilinas comerciais. Foram escolhidas representantes dos GDE (metoxila) e GAE (nitrila) e a anilina (não substituída). Como a presença do grupo nitrila levou ao aumento do Φ_{FL} , também foi utilizada a 4-aminofaltonitrila que possuía grupos nitrila nas posições 3 e 4.

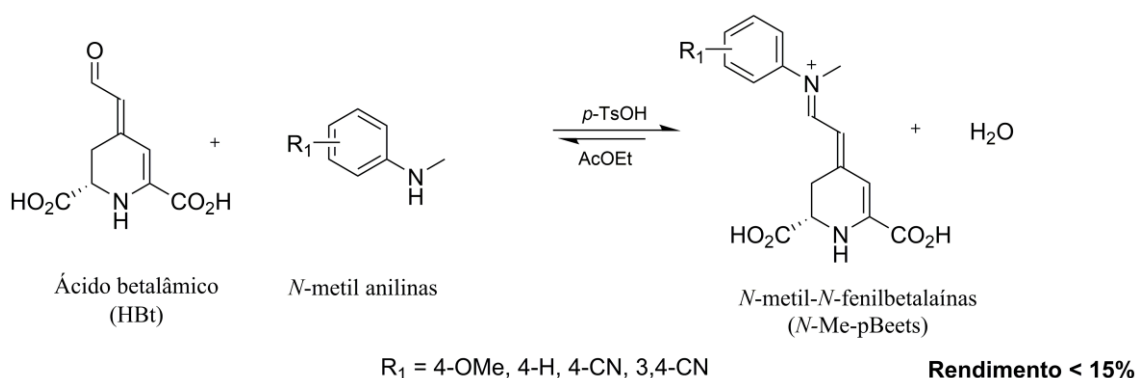
A abordagem utilizada para essa síntese envolveu a metilação de anilinas mediada

por zeólita faujasita NaY e dimetilcarbonato (DMC) em refluxo por 16 h. A característica eletrônica do substituinte influenciou diretamente nos rendimentos das reações, que variaram de 11 a 81%, visto que o poder nucleofílico do nitrogênio para atacar a metila do DMC depende da disponibilidade dos pares de elétrons, e quando substituído com GDE, há uma maior disponibilidade para efetuar o ataque nucleofílico e vice-versa.



Esquema 7: Metilação de anilinas comerciais utilizando o dimetilcarbonato e zeólita faujasita NaY.

O acoplamento aldimínico entre as *N*-metilanilinas sintéticas e Hbt na presença de *p*-TsOH foi realizado para originar as *N*-Me-pBeets. O impedimento estérico pela presença da metila dificultou o ataque nucleofílico e a mudança na coloração de amarelo para vermelho/laranja, dependendo a amina utilizada, foi menos rápida quando comparado com as pBeets. Os rendimentos das reações foram inferiores a 15%



Esquema 8: Semissíntese das *N*-metil-*N*-fenilbetalaínas (*N*-Me-pBeets).

BOX 2. Caracterização estrutural das *N*-Me-pBeets com dados de ^1H RMN e HPLC-DAD-ESI(+)-TOF e rendimento da reação.

***N*-Me-4-OMe-pBeet (2a).** Sólido vermelho; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 8,12 (d, $J = 12,4$, 1H), δ 7,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), δ 7,08 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), δ 6,26 (s, 1H), δ 6,20 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), δ 4,38 (br s, 1H), δ 3,86 (s, 3H), δ 3,58 (s, 3H), δ 3,31 (m, 1H), δ 3,12 (m, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M}]^+$ Calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5$ 331,1288, expt 331,1290 (0,6 ppm). Rendimento: 16%.

***N*-Me-pBeet (2b).** Sólido vermelho; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 8,22 (br s, 1H), δ 7,53 (br s, 2H), δ 7,43 (br s, 3H), δ 6,31 (s, 1H), δ 6,27 (br s, 1H), δ 4,50 (br s, 1H), δ 3,63 (s, 3H), δ 3,37 (m, 1H), δ 3,17 (m, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M}]^+$ Calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ 301,1183, expt 302,1187 (1,3 ppm). Rendimento: 10%.

***N*-Me-4-CN-pBeet (2c).** Sólido laranja; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 8,13 (d, $J = 12,9$, 1H), δ 7,86 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), δ 7,55 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), δ 6,40 (s, 1H), δ 6,15 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), δ 4,39 (dd, $J = 8,1$, 6,8 Hz, 1H), δ 3,56 (s, 3H), δ 3,34 (dd, $J = 17,6$, 6,8 Hz, 1H), δ 3,17 (dd, $J = 17,6$, 8,1 Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M}]^+$ Calcd para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4$ 326,1135, expt 326,1135 (0 ppm). Rendimento: 11%.

***N*-Me-3,4-CN-pBeet (2d).** Sólido laranja; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 8,05 (d, $J = 13,1$, 1H), δ 8,00 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), δ 7,99 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), δ 7,80 (dd, $J = 8,5$, 2,5 Hz, 1H), δ 6,48 (s, 1H), δ 6,23 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H), δ 4,52 (t, $J = 6,1$, 1H), δ 3,52 (s, 3,38 (dd, $J = 18,1$, 6,1 Hz, 1H), δ 3,18 (dd, $J = 18,1$, 6,1 Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M}]^+$ Calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_4$ 351,1088, expt 351,1094 (1,6 ppm). Rendimento 6%.

Os espectros de ^1H RMN da região dos hidrogênios aromáticos das *N*-Me-pBeets foram superpostos e observou-se o mesmo efeito ocorrido com as pBeets. Quando a betalaína possui um GDE, o H3' está mais blindando e, conforme ocorreu a mudança de um GDE para GAE, esse hidrogênio se desblindou.

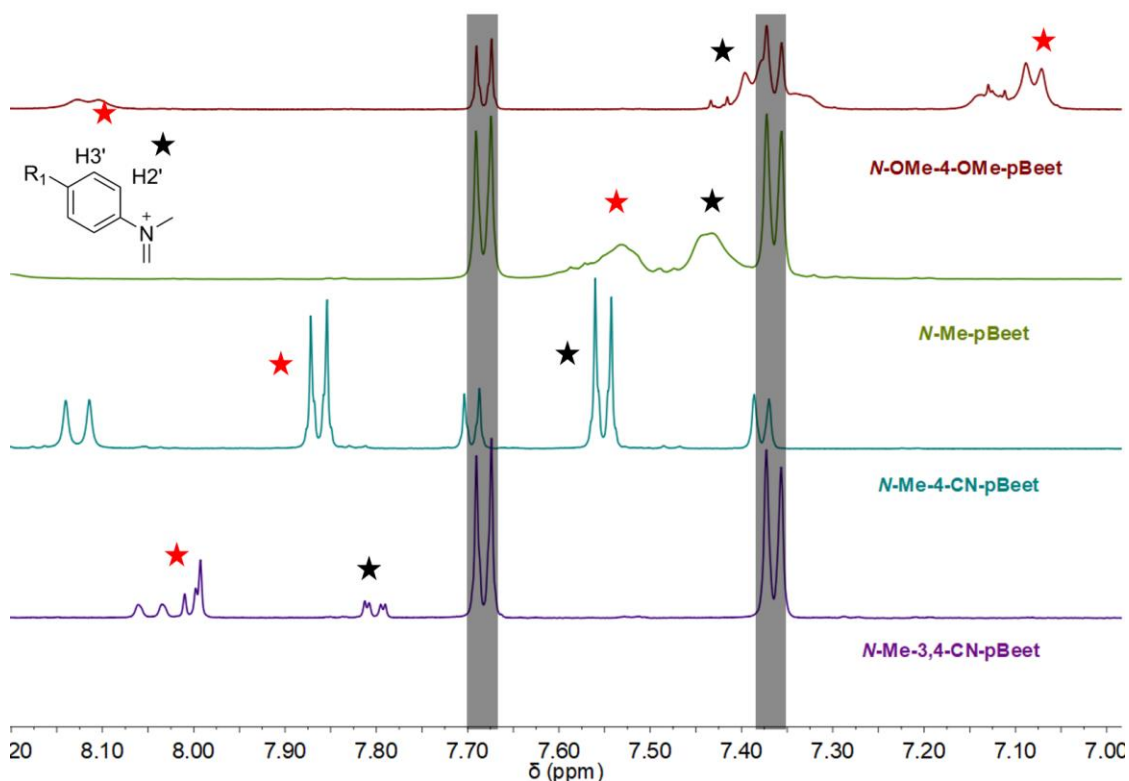


Figura 10: Superposição dos espectros de ^1H RMN da porção aromática das *N*-Me-pBeets.

Os espectros de ^1H RMN da porção betalâmica das *N*-Me-pBeets foram superpostos e observou-se no espectro das *N*-Me-OMe-pBeet (**2a**) e *N*-Me-pBeet (**2b**) o aparecimento de três sinais, H7, H5 e H8, adicionais, possivelmente referentes ao isômero *E/Z* entre as posições 6 e 7. A mudança nos deslocamentos químicos dos hidrogênios foi menos pronunciada que nas pBeets, porém observou-se a blindagem dos H7 e H8 e a desblindagem do H5, conforme foram adicionados grupos atraentes de densidade eletrônica. Os hidrogênios H2, H3a e H3b não sofreram mudanças no deslocamento químico.

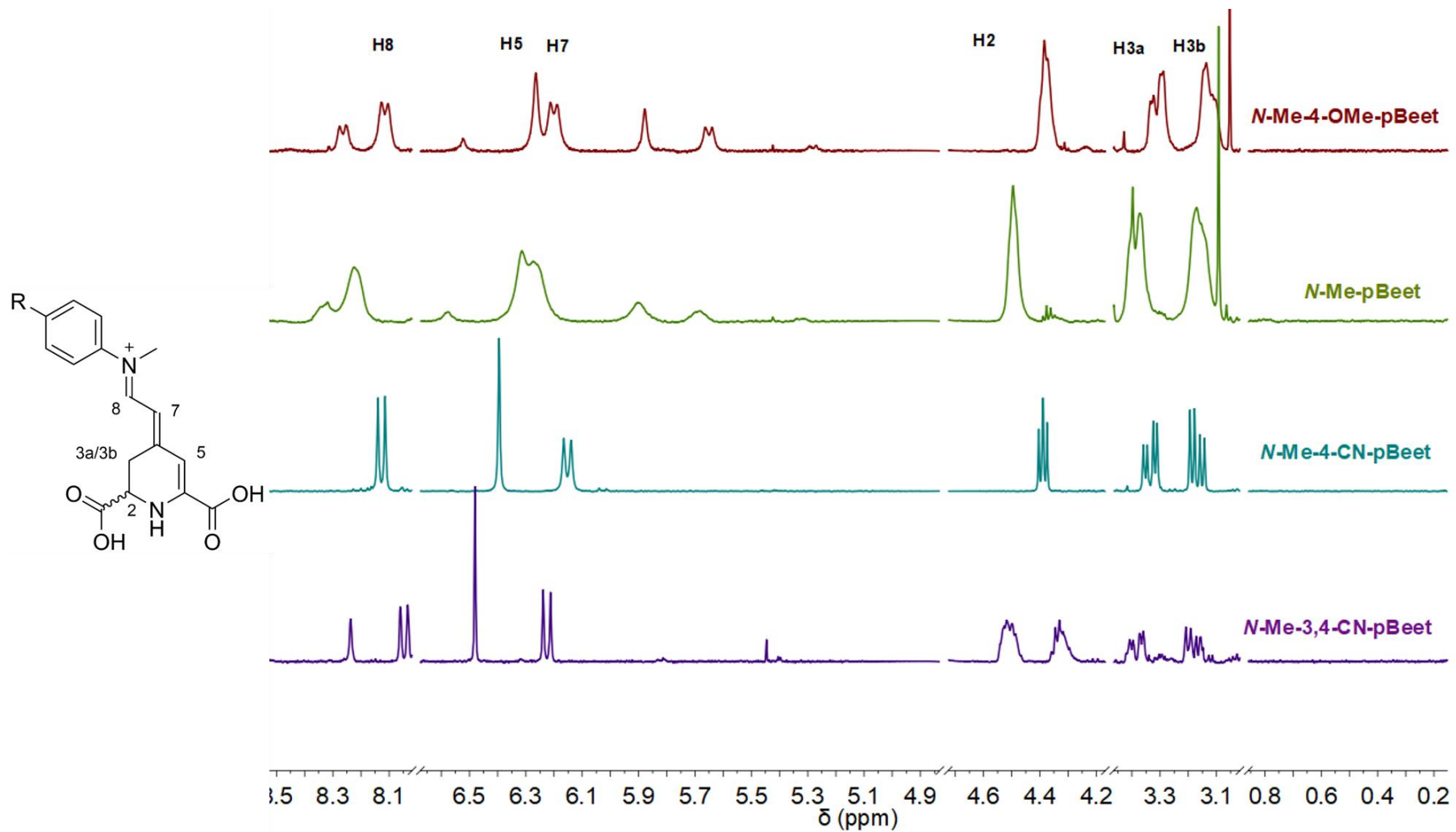


Figura 11: Superposição dos espectros de ¹H RMN das *N*-Me-pBeets.

As *N*-Me-pBeets foram submetidas a caracterização fotofísica. Observou-se um deslocamento ipsocrômico na banda de absorção das *N*-Me-pBeets quando comparadas com as pBeets, porém o perfil espectral permaneceu o mesmo. A variação dos λ^{ABS} entre as betalaínas desse grupo foi muito pequena, abrangendo de 491 a 499 nm. Não houve variação no perfil espectral da emissão de fluorescência. Apenas a *N*-Me-4-OMe-pBeet (**2a**) apresentou um alargamento da banda, mas esse efeito já havia sido observado no seu análogo não metilado, a 4-OMe-pBeet (**1c**). Os rendimentos quânticos de fluorescência, que já eram baixos no grupo das pBeets, apresentaram-se menores. A presença de um grupo metila ligado ao nitrogênio imínico diminuiu em cerca de 10 vezes o valor de Φ_{FL} dos compostos. O efeito de diminuição considerável do Φ_{FL} não foi observado para a *N*-Me-3,4-CN-pBeet (**2d**), quando comparada com seu composto análogo não metilado, 3,4-CN-pBeet (**1n**), a diminuição foi cerca de 10% do valor.

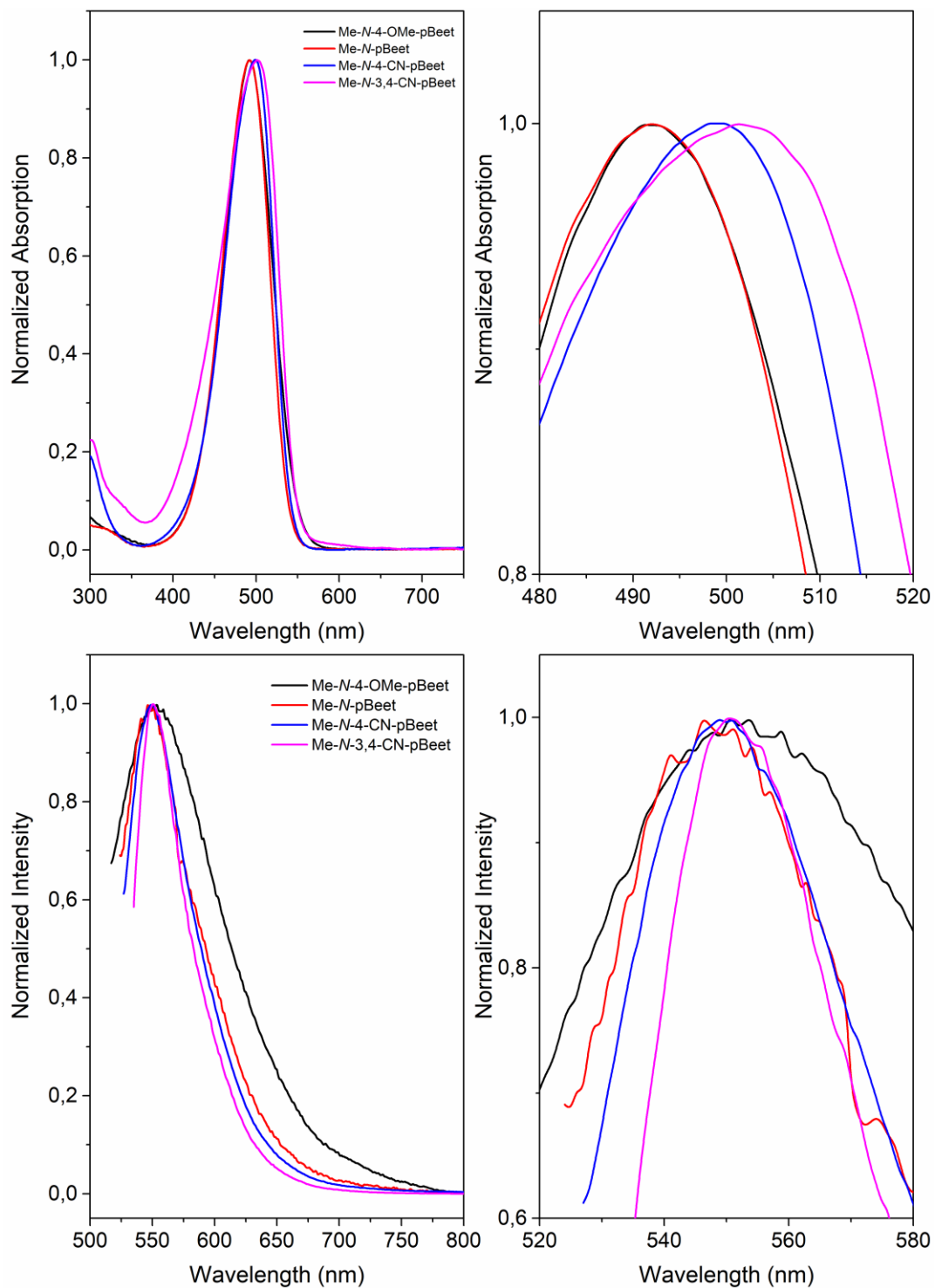


Figura 12: Espectros de (a) absorção no UV-Vis e (b) emissão de fluorescência das *N*-Me-pBeets.

Uma vez que a variação do ϵ das pBeets estava dentro dos valores encontrados na literatura e na biblioteca do nosso grupo de pesquisa, não foi realizado esse experimento para a determinação e assumiu-se o valor de $60000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para os cálculos de concentração nos experimentos que necessitaram. Os valores de Deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) apresentaram-se dentro da faixa que compreendem as betalaínas do tipo pBeets e não houve grande variação para substituintes diferentes, pois não há grande diferença dos valores de λ^{ABS} e os λ^{ABS} das *N*-Me-pBeets com substituintes diferentes.

Tabela 5: Propriedades fotofísicas das *N*-Me-pBeets em água, a 25 °C.

Composto	Número	λ^{ABS} (nm)	λ^{EM} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	$(\Phi_{FL} \pm dp) 10^{-2}$
<i>N</i> -Me-4-OMe-pBeet	2a	492	551	2176	$0,014 \pm 0,002$
<i>N</i> -Me-pBeet	2b	491	546	2052	$0,020 \pm 0,004$
<i>N</i> -Me-4-CN-pBeet	2c	499	550	1858	$0,32 \pm 0,002$
<i>N</i> -Me-3,4-CN-pBeet	2d	496	546	1846	$4,33 \pm 0,036$

As cinéticas de degradação de pBeets foram investigadas em tampões BR em pH 2, pH 5 e pH 8,5 a 25 °C. A constante cinética observada (k_{obs}) de decomposição e o tempo de meia-vida ($\tau_{1/2}$) foram calculadas a partir do ajuste não linear do decaimento monoexponencial dos máximos de absorção das betalaínas em função do tempo. Diferentes processos podem ocorrer nessa faixa de pH, porém a degradação de pBeets gerou o aumento da banda de absorção com λ^{Abs} em 420 nm em função do tempo e observou-se a maior estabilidade em pH próximo de neutro, pH 5, independentemente do substituinte.

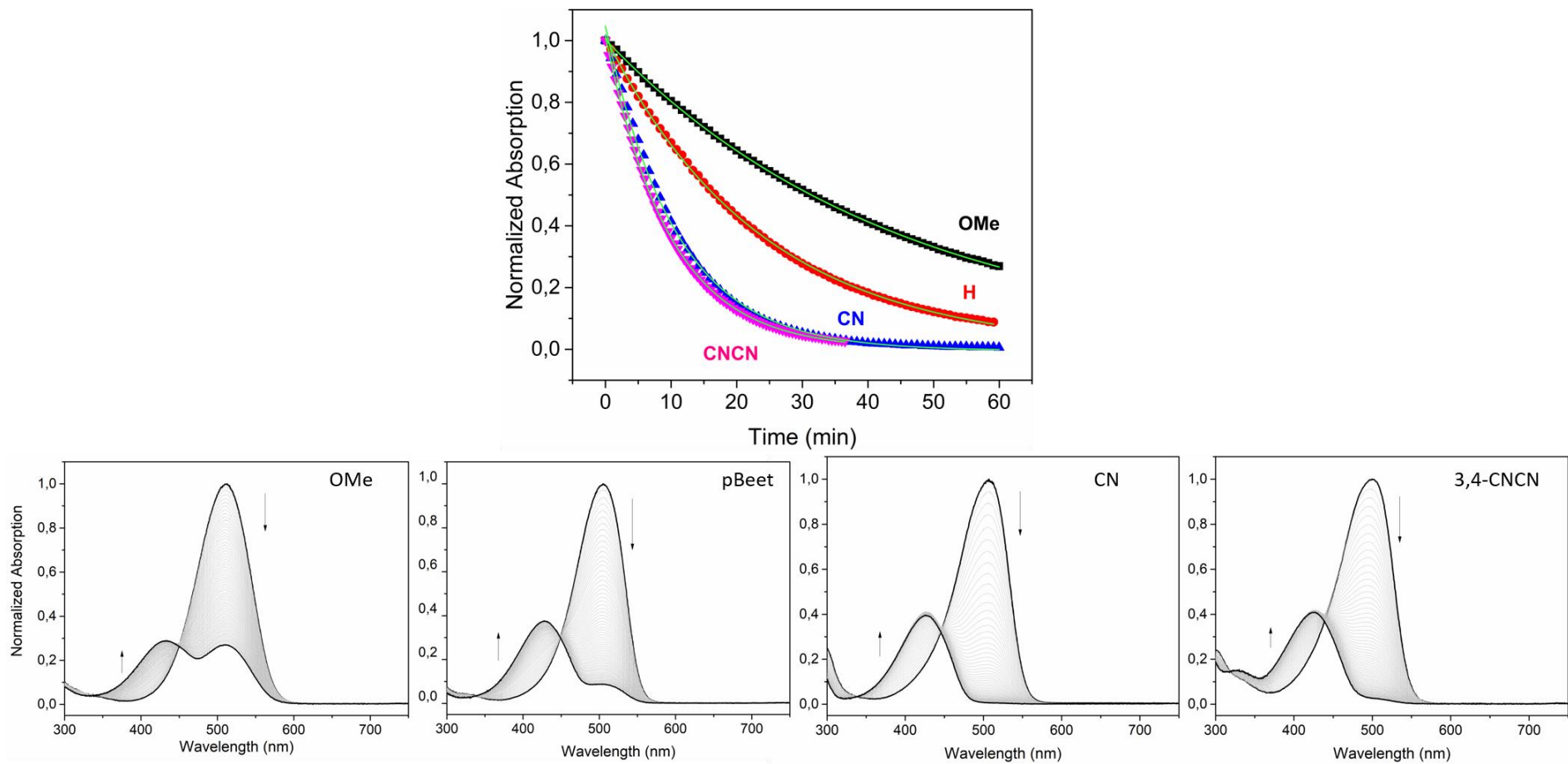


Figura 13: Cinéticas de degradação das pBeets em tpBR pH 5, a 60 °C e os ajustes para o cálculo do k_{obs} e $t_{1/2}$.

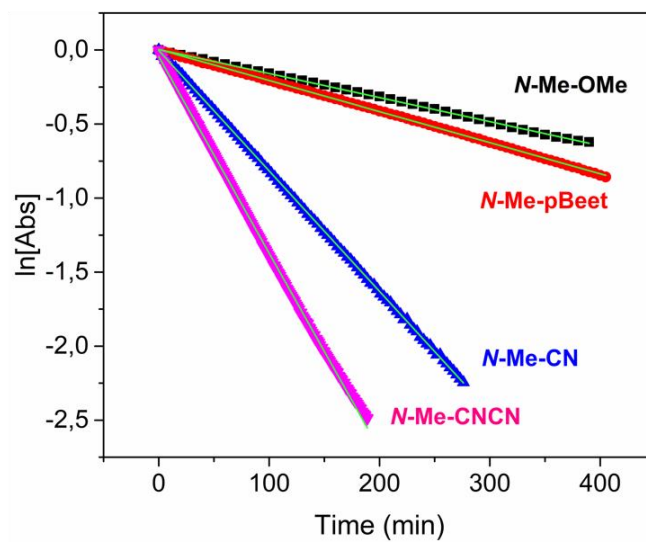
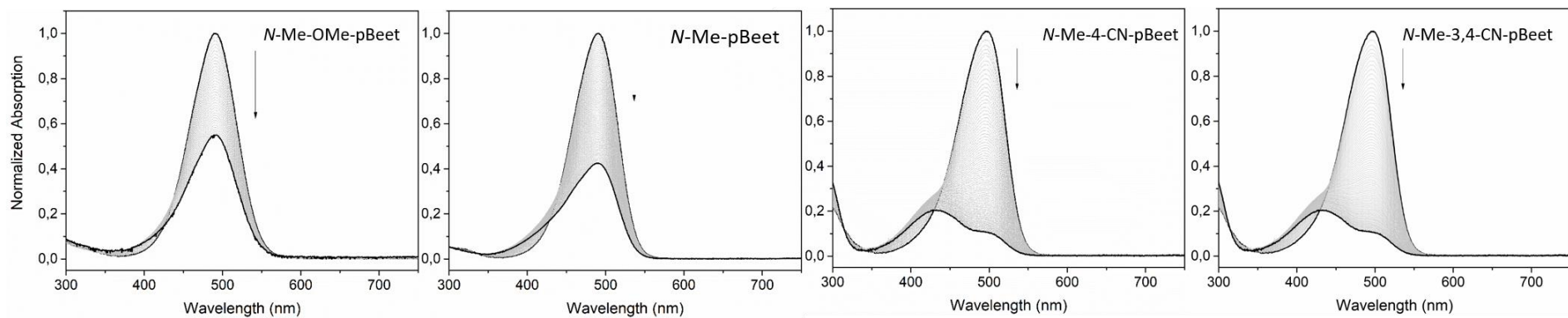


Figura 14: Cinéticas de degradação das *N*-Me-pBeets em tpBR pH 5, a 60 °C e os ajustes para o cálculo do k_{obs} e $t_{1/2}$.

As cinéticas de degradação das *N*-Me-pBeets foram investigadas em tpBR pH 5 a 60 °C, devido ao aumento da estabilidade, causado pela adição de grupos metil ao nitrogênio imínico. A constante cinética observada (k_{obs}) de decomposição e o tempo de meia-vida ($\tau_{1/2}$) foram calculados pelo método da velocidade inicial, pois a degradação das *N*-Me-pBeets é mais lenta que as pBeets. Uma alternativa era o aumento de temperatura além de 60 °C, porém esta temperatura já é a máxima de operação do banho do espectrofotômetro.

A presença do grupo metil no nitrogênio imínico, deixando-o com carga positiva, aumentou a persistência dos compostos, quando comparados com os análogos não-metilados. O tempo de meia-vida aumentou numa faixa de 6 a 20 vezes e, conforme observado para as pBeets, a influência do substituinte na degradação das betalaínas é pronunciada. Quanto maior o poder do substituinte em atrair a densidade eletrônica, menor a estabilidade, portanto mais susceptível à degradação. Foi observado que o tempo de meia-vida da *N*-Me-4-CN-pBeet (**2c**, 91 min) foi maior que a da *N*-Me-3,4-CN-pBeet (**2d**, 90 min). Os efeitos de atração de elétrons do grupo nitrila da posição *meta* influenciam de modo a diminuir a persistência quase que pela metade.

No estudo de voltametria cíclica das *N*-Me-pBeets, observou-se que a *N*-Me-4-OMe-pBeet (**2a**) foi a única betalaína que apresentou um processo reversível; todas as outras betalaínas sofreram processos irreversíveis. Observou-se, também, um padrão de sinais que se repetiu para quase todas as betalaínas: os processos de oxidação (anódicos) foram apresentados sempre na forma de 2 sinais na região de +0,5 a 0,9 V vs Ag/AgCl. Na região onde acontece processos de redução (catódica) foram observados sinais diferentes para a *N*-Me-pBeet (**2b**) e *N*-Me-3,4-CN-pBeet (**2d**), porém os valores encontrados são compatíveis com os apresentados para as betalaínas naturais.

Tabela 6: Constantes de cinética observadas (k_{obs}) de degradação e tempo de meia-vida das pBeets e *N*-Me-pBeets em tpBR pH 5 a 60°C.

Compound	k_{obs} (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (min)
4-OMe-pBeet	3.67×10^{-4}	31,5
pBeet	7.03×10^{-4}	16,5
4-CN-pBeet	1.61×10^{-3}	7,2
3,4-CN-pBeet	1.50×10^{-3}	7,7
<i>N</i> -Me-4-OMe-pBeet	2.57×10^{-5}	450
<i>N</i> -Me-pBeet	3.62×10^{-5}	320
<i>N</i> -Me-4-CN-pBeet	1.26×10^{-4}	91
<i>N</i> -Me-3,4-CN-pBeet	2.29×10^{-4}	50

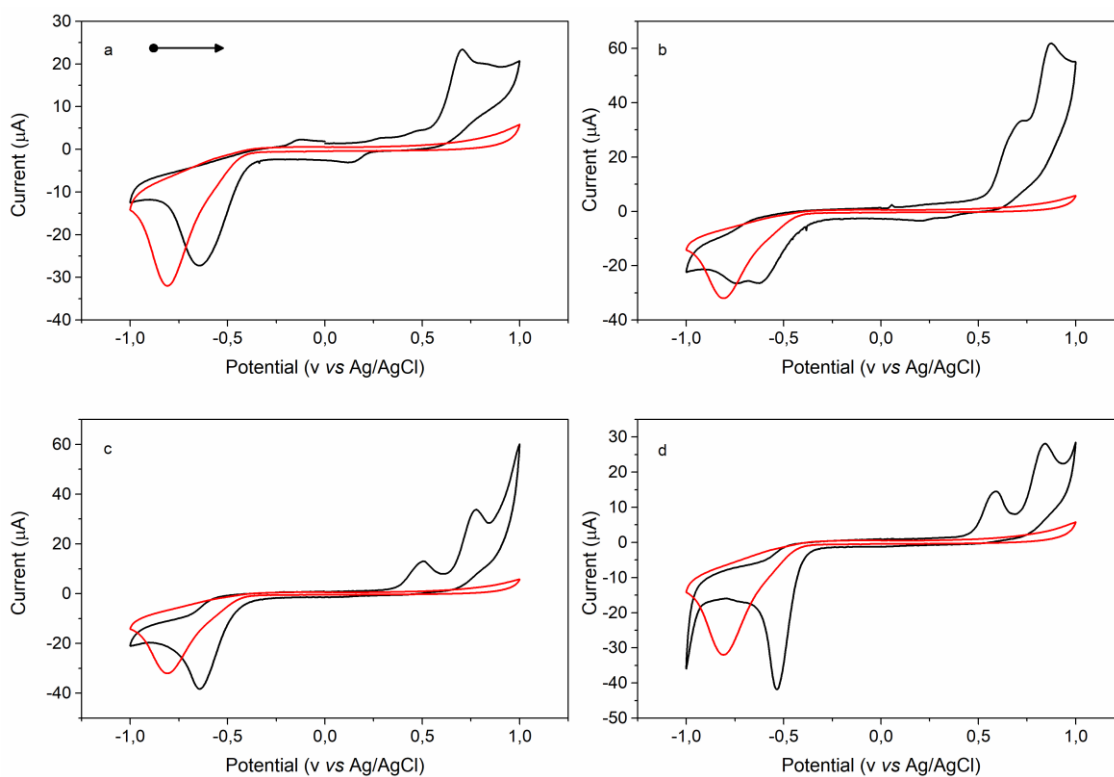


Figura 15: Voltamograma cíclico dos compostos: (a) *N*-Me-4-OMe-pBeet, (b) *N*-Me-pBeet, (c) *N*-Me-4-CN-pBeet e (d) *N*-Me-3,4-CN-pBeet.

Os potenciais de pico anódico (oxidação) e catódico (redução) foram extraídos dos voltamogramas das *N*-Me-pBeets e estão representados Tabela 7.

Tabela 7: Potenciais de pico anódico (E_{an}) e catódico (E_{cat}) das *N*-Me-pBeets.

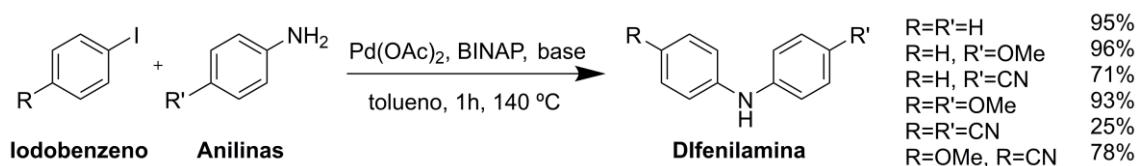
Compound	ID	E_{an} (mV)		E_{cat} (mV)	
<i>N</i> -Me-4-OMe-pBeet	2a	126*	284	133*	640?
		454	710		
<i>N</i> -Me-pBeet	2b	690	870	615	750
<i>N</i> -Me-4-CN-pBeet	2c	500	778	643	
<i>N</i> -Me-3,4-CN-pBeet	2d	584	845	537	

*Processo reversível

3.3. *N,N*-Difenilbetalaínas: dipBeets

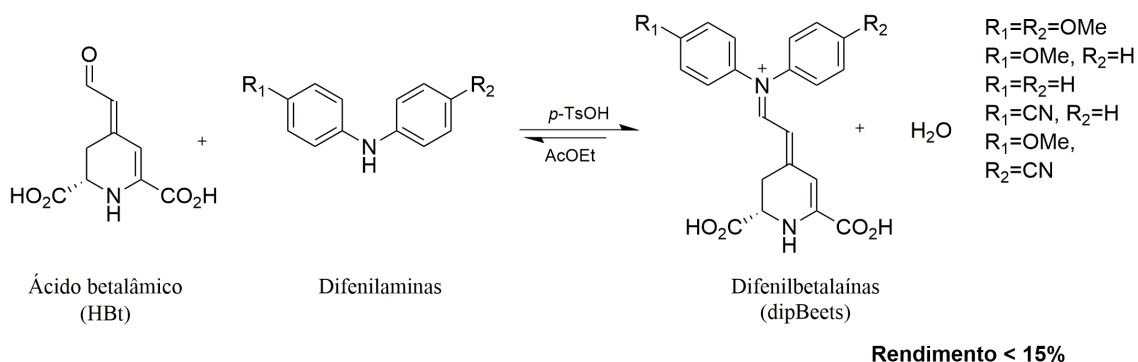
Sabendo das propriedades adquiridas das betalaínas com a *N*-metilação, foi então realizada a adição de um grupo fenil ao nitrogênio imínico. Os substituintes escolhidos foram os mesmos, ou seja, metoxila e nitrila, porém foram geradas aminas simétricas e assimétricas.

As difenilaminas foram preparadas através de metodologia desenvolvida por Buchwald-Hartwig,⁶⁰⁻⁶³ que se baseia no acoplamento cruzado entre grupos amina e haletos, neste caso, anilinas e iodobenzenos substituídos, mediado por Pd. Neste procedimento fez-se o uso de microondas para reduzir o tempo de reação de 8 h, em sistema aberto, para apenas 1 h, em sistema fechado, com o aumento da temperatura. Os rendimentos das reações variaram de 25 a 96%, dependendo do substituinte.



Esquema 9: Síntese das difenilaminas.

As difenilaminas foram misturadas com HBT na presença de *p*-TsOH para originar as *N,N*-difenilbetalaínas (dipBeets). As difenilaminas são menos solúveis que as anilinas e até mesmo as *N*-metilanilinas. A mudança na coloração de amarelo para vermelho/roxo, dependendo da amina utilizada, foi acompanhada da precipitação no fundo do tubo, deixando a solução límpida. O rendimento das reações, como já observado para as pBeets e *N*-Me-pBeets, foi inferior a 15%.



Esquema 10: Semissíntese das dipBeets.

BOX 3. Caracterização estrutural das dipBeets com dados de ¹H RMN e HPLC-DAD-ESI(+)-TOF e rendimento da reação.

4,4'-OMe-dipBeet (3a). Sólido vermelho; ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 8,31 (br s, 1H), δ 7,29 (br s, 4H), δ 7,10 (br s, 4H), δ 6,06 (br s, 1H), δ 5,84 (br s, 1H), δ 4,34 (m, 1H), δ 3,89 (s, 6H), δ 3,36 (br s, 1H), δ 3,18 (br s, 1H); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M]⁺ Calcd para C₂₃H₂₃N₂O₆ 423,1551, expt 423,1554 (0,8 ppm). Rendimento: 10%.

4-OMe-dipBeet (3b). Sólido vermelho; ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 8,36 (br s, 1H), δ 7,51 (br s, 3H), δ 7,32 (br s, 4H), δ 7,11 (br s, 2H), δ 6,11 (br s, 1H), δ 5,82 (br s, 1H), δ 4,36 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), δ 3,89 (s, 3H) δ 3,34 (m, 1H), δ 3,19 (m, 1H); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M]⁺ Calcd para C₂₂H₂₁N₂O₅ 393,1445, expt 393,1450 (1,3 ppm). Rendimento 12%.

dipBeet (3c). Sólido laranja; ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 8,38 (d, *J* = 13,0, 1H), δ 7,53 (br s, 5H), δ 7,34 (br s, 5H), δ 6,12 (br s, 1H), δ 5,81 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), δ 4,37 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), δ 3,35 (br s, 1H), δ 3,20 (br s, 1H); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M]⁺ Calcd para C₂₁H₁₉N₂O₄ 363,1339, expt 363,1350 (3,0 ppm). Rendimento 17%.

4-CN-dipBeet (3d). Sólido laranja; ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 8,33 (d, *J* = 13,0, 1H), δ 7,80 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), δ 7,62 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), δ 7,55 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), δ 7,36 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), δ 6,21 (s, 1H), δ 5,80 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H) δ 4,44 (t, *J* = 8,4, 6,6 Hz, 1H), δ 3,41 (dd, *J* = 17,8, 6,6 Hz, 1H), δ 3,21 (dd, *J* = 17,8, 8,4 Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M]⁺ Calcd para C₂₂H₁₈N₃O₄ 388,1291, expt 388,1291 (0,2 ppm). Rendimento: 7%.

4-CN-4'-OMe-dipBeet (3e). Sólido laranja; ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 8,33 (d, *J* = 13,0, 1H), δ 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), δ 7,34 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), δ 7,30 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), δ 7,18 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), δ 6,21 (s, 1H), δ 5,79 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H) δ 4,43 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), δ 3,91 (s, 3H), δ 3,39 (dd, *J* = 18,0, 7,4 Hz, 1H), δ 3,20 (dd, *J* = 18,0, 7,4 Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M]⁺ Calcd para C₂₃H₂₀N₃O₅ 418,1397, expt 418,1403 (1,4 ppm). Rendimento: 11%.

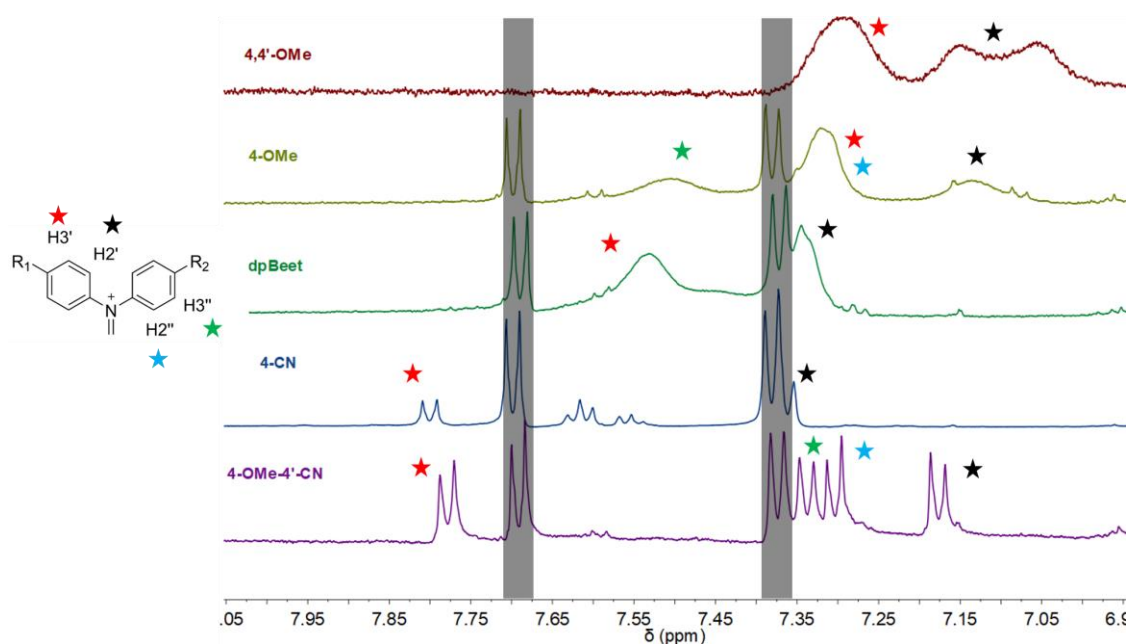


Figura 16: Superposição dos espectros de ^1H RMN da porção aromática das dipBeets.

Conforme analisado anteriormente para as duas famílias de betalaínas, pBeets e *N*-Me-pBeets, os espectros de ^1H RMN das dipBeet também foram superpostos. As mudanças observadas nos deslocamentos químicos desses hidrogênios foram ainda mais sutis, comparando com aquelas observadas para as outras famílias. A mudança mais acentuada foi a desblindagem do H5, passando de δ 6,06 ppm, com a presença de dois GDE, para δ 6,21 ppm, com a adição de um GDE e um GAE. A variação para os hidrogênios olefínicos H7 e H8 para as pBeets e *N*-Me-pBeets foi maior que a observada para as dipBeets, que neste caso apresentou um $\Delta\delta < 0,05$ ppm. Os hidrogênios H3a e H3b não deslocaram no espectro. A resolução dos sinais mudou bastante, os compostos com GDE apresentaram baixa resolução, enquanto que os com propriedades opostas apareceram bem resolvidos.

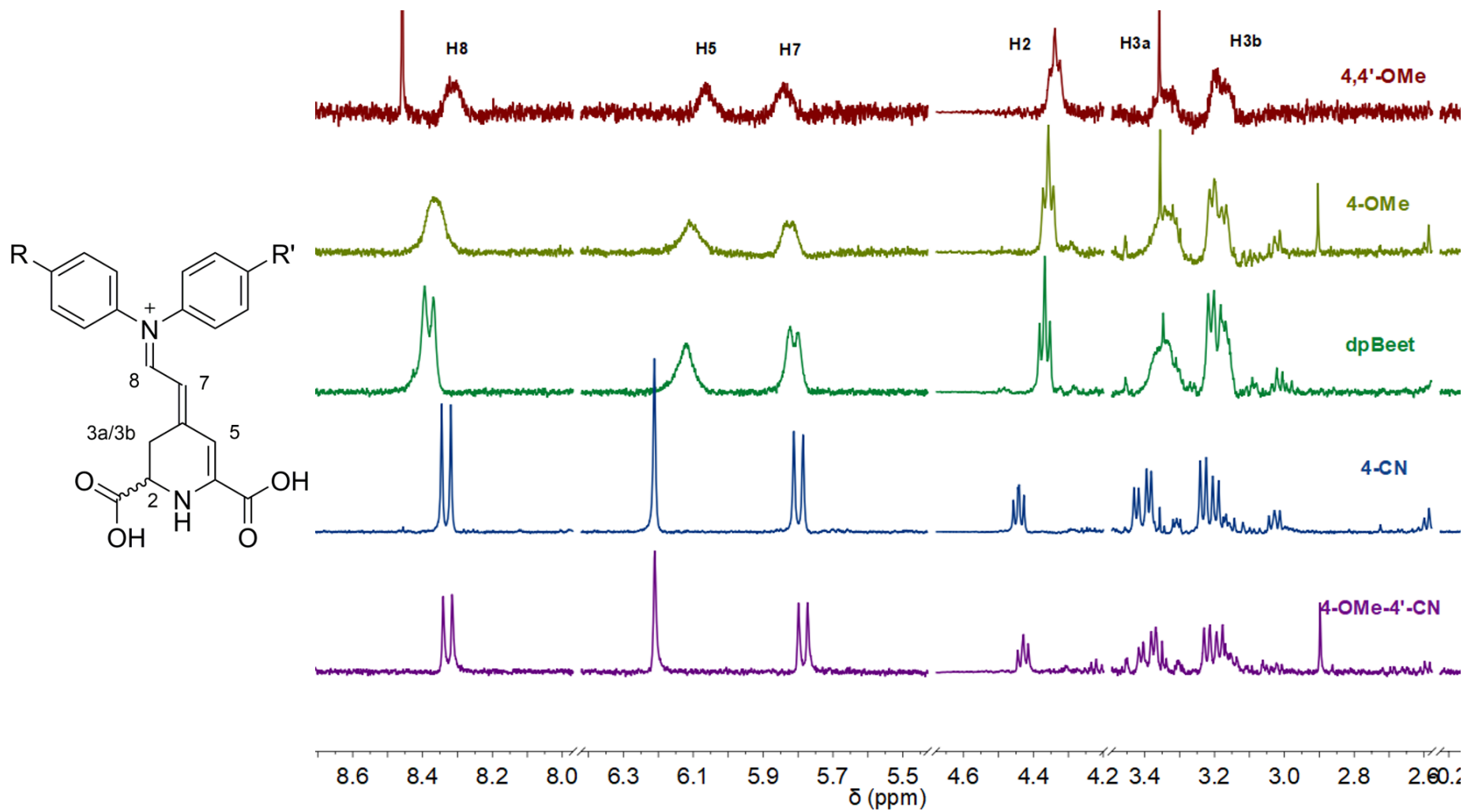


Figura 17: Superposição dos espectros de ¹H RMN das dipBeets.

Para completar o estudo sistemático de relação estrutura-propriedade das betalaínas modificadas na porção imínica, foram realizados os mesmos experimentos anteriormente descritos para as pBeets e *N*-Me-pBeets. A completa caracterização fotofísica, estudos de estabilidade hidrolítica e voltametria cíclica foram racionalizados com a mudança na estrutura. As bandas de absorção das dipBeets apresentaram o mesmo perfil espectral observado para todas as betalaínas com o máximo de absorção λ^{ABS} variando de 504 a 515 nm. Houve um deslocamento da outra banda de absorção com comprimento de onda menor, possivelmente essa banda esteja relacionada ao remanescente das aminas precursoras em solução.

O perfil espectral de emissão de fluorescência não apresentou mudanças em relação às betalaínas anteriores. O máximo de emissão λ^{EM} compreendeu uma faixa de 564 a 609 nm. Foi observado um deslocamento desses máximos para as betalaínas que possuíam grupos metoxila. A 4,4'-OMe-dipBeet (**3a**), representante com dois substituintes metóxi e a 4-OMe-dipBeet (**3b**), com um metóxi, tiveram as bandas deslocadas para comprimentos de onda maiores, conforme observado para as pBeets e *N*-Me-pBeets que continham substituintes OMe, além do alargamento da banda.

Assim como ocorrido com as *N*-Me-pBeets, o rendimento quântico de fluorescência foi menor para as dipBeets, em comparação com as pBeets. Dentro dessa classe de betalaínas o Φ_{FL} variou de $0,05 \times 10^{-2}$ a $0,53 \times 10^{-2}$ e foi possível observar o efeito do substituinte sobre essa propriedade. As dipBeets que continham GDE tiveram os menores valores, enquanto que as betalaínas com GAE tiveram os maiores valores. Observou-se que a betalaína 4-OMe-4'-CN-dipBeet, com substituintes doadores e atraentes, teve um valor de Φ_{FL} intermediário.

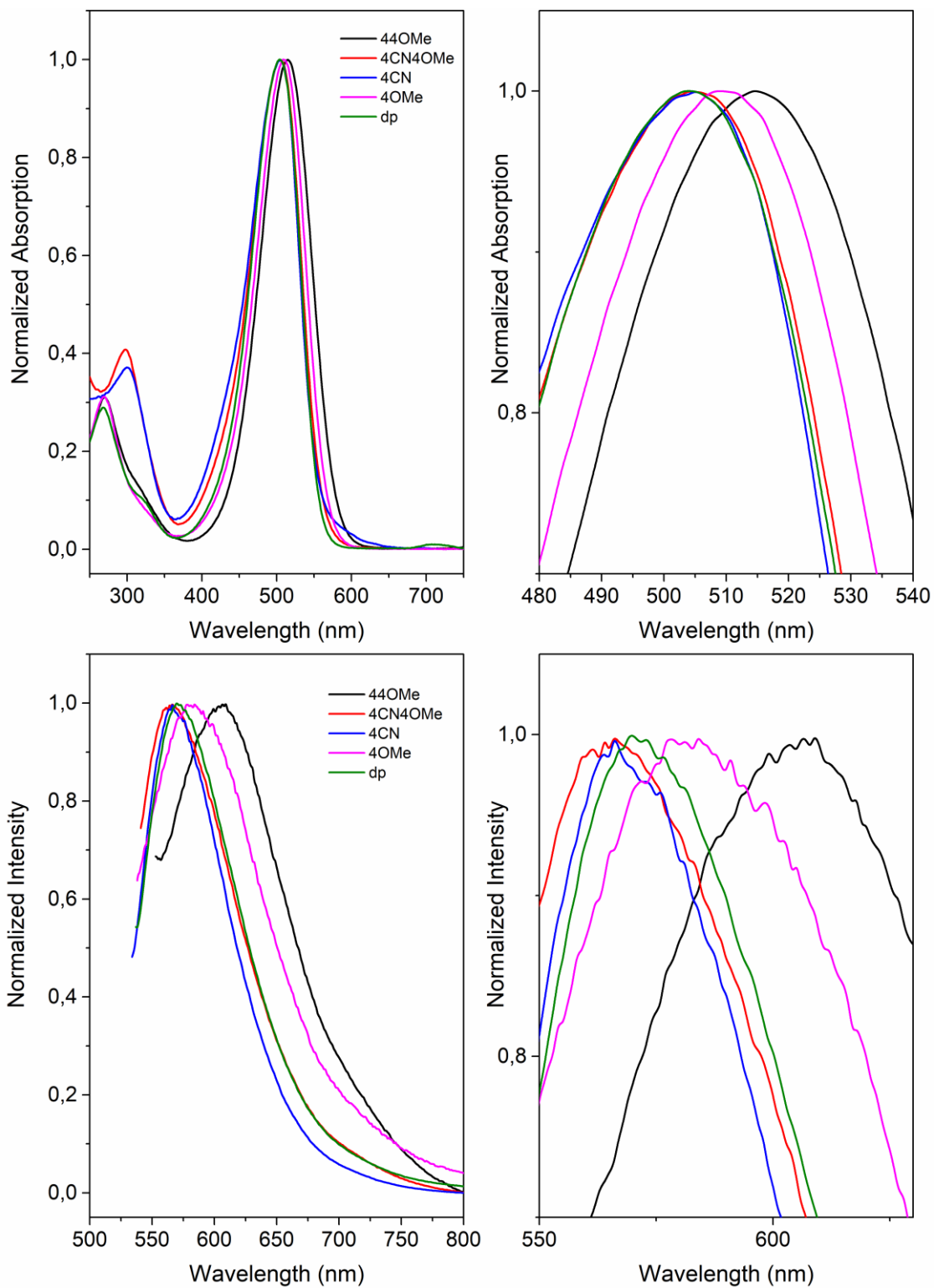


Figura 18: Espectros de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência das dipBeets.

Não foram observadas grandes diferenças no Deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) para as dipBeets, pois compreenderam uma faixa já observada para as betalaínas. Os valores de ϵ não foram obtidos e, como anteriormente mencionado, foram definidos para 60000 L mol⁻¹ cm⁻¹ para efeitos de cálculos de concentração nos experimentos posteriores.

Tabela 8: Propriedades fotofísicas das dipBeets em água a 25 °C.

Composto	Nº	λ^{Abs} (nm)	λ^{EM} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	$(\Phi_{FL} \pm dp) 10^{-2}$
4,4'-OMe-dipBeet	3a	515	609	2997	0.05 ± 0.005
4-OMe-dipBeet	3b	509	584	2523	0.07 ± 0.004
dipBeet	3c	504	570	2173	0.14 ± 0.010
4-CN-dipBeet	3d	505	566	2134	0.53 ± 0.006
4-OMe,4'-CN-dipBeet	3e	505	564	2071	0.11 ± 0.002

Assim como ocorrido com as *N*-Me-pBeets, betalaínas que derivavam de aminas secundárias, as dipBeets, também secundárias, apresentaram maiores valores de tempo de meia-vida de degradação. Na cinética de degradação em tpBR pH 5 a 60 °C foi observado o decaimento da banda das betalaínas em função do tempo, e as dipBeets que continham GDE tiveram um aumento na persistência, enquanto que a adição de GAE, diminuiu. A adição de dois grupos metóxi nas posições *para* ao nitrogênio (**3a**) aumentou cerca de duas vezes o tempo de meia-vida, passando de 302 para 572 min. A betalaína com uma nitrila, 4-CN-dipBeet (**3d**), teve o tempo de meia-vida diminuído quase que pela metade, passando de 302 para 127 min. A betalaína 4-OMe-4'-CN-dipBeet (**3e**), com OMe (GDE) e CN (GAE), apresentou a menor persistência, com um tempo de meia-vida de 98 min.

Tabela 9: Constantes cinéticas de degradação (k_{obs}) e tempo de meia-vida das dipBeets em tpBR pH 5 a 60 °C.

Composto	k_{obs} (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (min)
4,4'-OMe-dipBeet	$2,02 \times 10^{-5}$	572
4-OMedp-dipBeet	$3,75 \times 10^{-5}$	308
dipBeet	$3,82 \times 10^{-5}$	302
4-CN-dipBeet	$9,03 \times 10^{-5}$	127
4-OMe-4'-CN-dipBeet	$1,18 \times 10^{-4}$	98

Os potenciais de oxidação (E_{an}) e redução (E_{cat}) foram extraídos dos voltamogramas cíclicos. Foi observado um padrão de sinais, os mesmos encontrados para as *N*-Me-pBeets, na região de +0,5 V a 0,9 V vs. Ag/AgCl, referentes a processos de oxidação que ocorreram nas moléculas. Nas betalaínas, 4,4'-OMe-dipBeet (a), dipBeet (c) e 4-CN-4'-OMe-dipBeet (e) foram as únicas moléculas em que foram encontrados processos reversíveis. A betalaína 4-OMe-dipBeet (b) possui mais de um processo de redução na região de -0,5 V vs Ag/AgCl. Os valores encontrados para processos de oxidação foram compatíveis com os encontrados nas *N*-Me-pBeets e maiores do que os encontrados nos naturais.

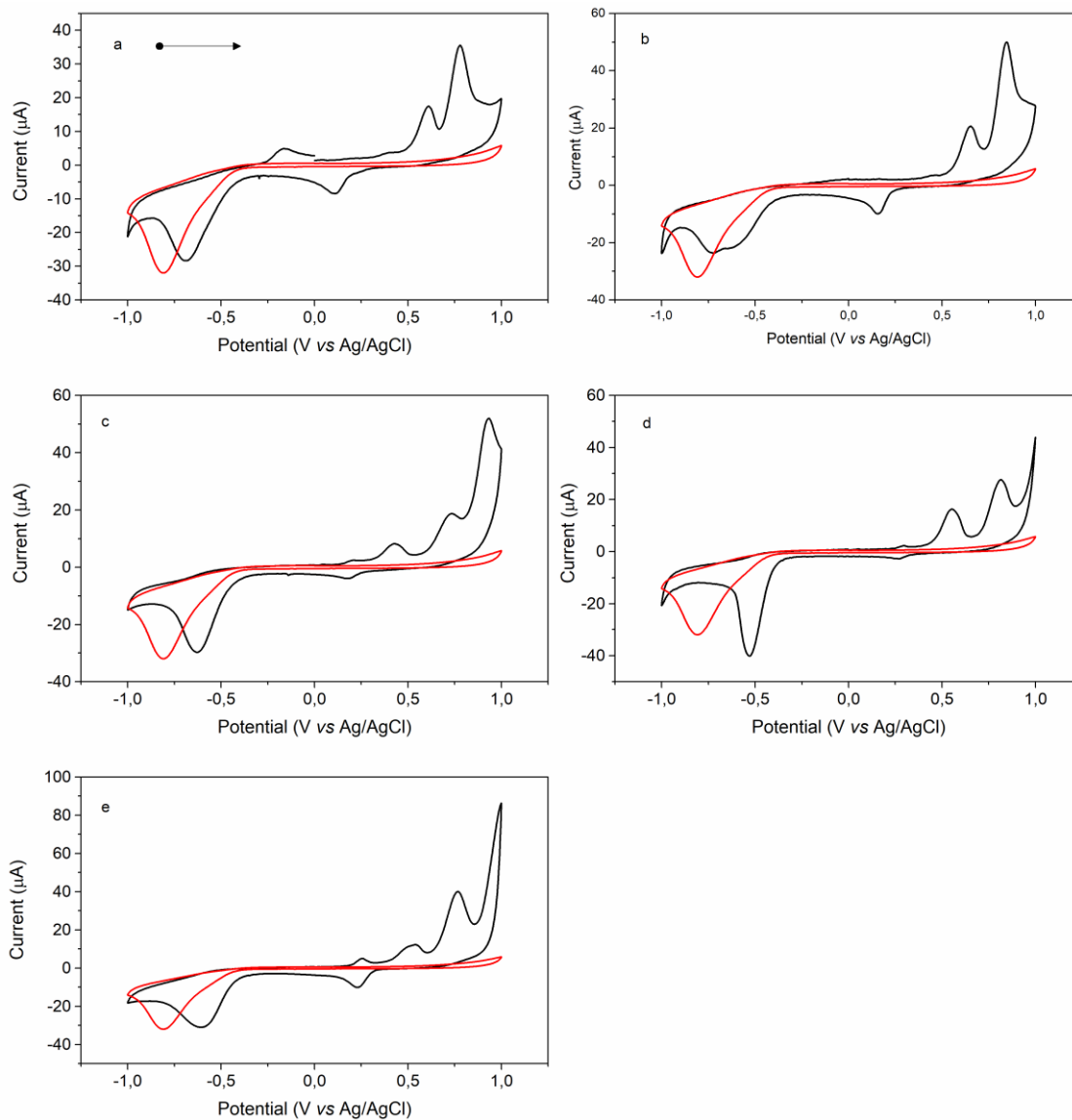


Figura 19: Voltamogramas cíclicos dos compostos: (a) 4,4'-OMe-dipBeet, (b) 4-OMe-dipBeet, (c) dipBeet, (d) 4-CN-dipBeet e (e) 4-OMe-4'-CN-dipBeet.

Os potenciais de pico anódico (oxidação) e catódico (redução) foram extraídos dos voltamogramas das dipBeets e estão representados na forma de tabela (**Tabela 10**).

Tabela 10: Potenciais de pico anódico (E_{an}) e catódico (E_{cat}) das dipBeets.

Compound	ID	E_{an} (mV vs Ag/AgCl)			E_{cat} (mV vs Ag/AgCl)	
4,4'-OMe-dipBeet	3a	170*	340 610	775	107*	-690
4-OMe-dipBeet	3b	450	650	845	158	600 740
dipBeet	3c	200*	422 730	930	173*	630
4-CN-dipBeet	3d	291*	550	816	267*	533
4-CN-4'-OMe-dipBeet	3e	248*	530	760	236*	616

*Processo reversível

4. Discussão

Nesta seção serão discutidos os resultados apresentados. Primeiro serão abordados aspectos sobre a semissíntese, seguido da influência eletrônica do substituinte do anel aromático sobre os δ no ^1H RMN das pBeets e a mudança na parte imínica com adição de grupos ao nitrogênio. Por fim, serão relacionados os dados espectroscópicos com os deslocamentos observados no RMN para atribuir uma possível estrutura que sofre a hidrólise em tpBR pH 2, 5 e 8,5, e verificar a influência do substituinte sobre a estabilidade. Contudo, os dados serão racionalizados na forma de uma figura final para ilustração das propriedades adquiridas.

4.1. Semissínteses

A abordagem mais comum na literatura⁶⁴ para a semissíntese de betalaínas não-naturais envolvia a alcalinização de uma solução de betanina (Bn) para hidrolisá-la em ácido betalâmico, seguido da adição da amina desejada para o acoplamento aldimínico e acidificação do meio, porém essa abordagem traz grandes problemas devido ao reacoplamento entre o HBt e a amina ciclo-DOPA-5-*O*-glicosídeo, formada durante a hidrólise da betanina. Essa competição leva a formação de duas betalaínas, a de interesse e a contaminante, mesmo que seja usado um excesso molar, que depois deve ser removida na etapa de purificação.

Uma abordagem aperfeiçoada do método descrito acima foi descrita por Schliemann,³⁶ na qual eles utilizaram o suco de beterraba para a extração do HBt, com a adição de acetato de etila, porém com rendimento ainda muito baixo. Este HBt foi utilizado em acetato de etila ou água, ambos acidificados com ácido clorídrico para o acoplamento com aminoácidos, originando as betalaínas naturais, porém com uma abordagem semissintética. Diante disso, nosso grupo de pesquisa otimizou as

metodologias de extração de HBt e obtém o ácido betalâmico pela hidrólise alcalina de betalaínas presentes no suco de beterrabas vermelhas (*Beta vulgaris*), em sua maioria betanina, e extração com acetato de etila. Ainda não é um método em que se consegue HBt na escala de gramas, mas dentre as disponíveis na literatura é, de longe, a mais eficaz.

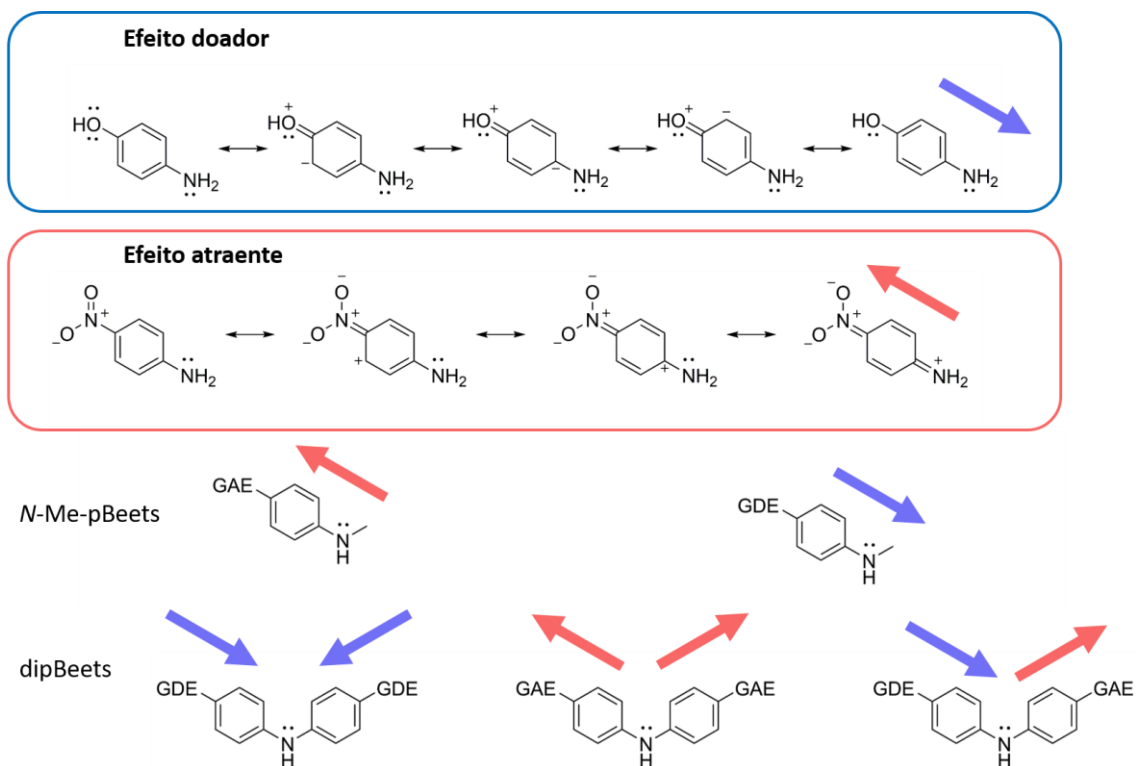
O rendimento na extração do ácido betalâmico (**HBt**), apesar de ser o mais eficiente já descrito na literatura e muito melhorado pelo nosso grupo de pesquisa, é considerado baixo, em torno de 20 mg/500 mL de suco, embora a concentração de betalaínas em beterrabas vermelhas seja de 200 mg/100 mL de suco.⁶⁵ Muito perde-se durante a hidrólise alcalina, no momento da acidificação e durante a extração com acetato de etila, pois este é degradado em pHs extremos. Outro ponto a ser considerado é a partição do ácido betalâmico vs o reacoplamento. Em pH 2, assume-se que a molécula esteja totalmente protonada, ou seja, não há carga, e isso favorece a ida para o solvente orgânico. Contudo, neste mesmo pH, há uma competição entre a partição em solvente orgânico e o reacoplamento, que é favorecido em pH ácido. Nesta etapa é necessário ser rápido para minimizar os efeitos de reacoplamento que diminuem a eficácia da extração.

A semissíntese das betalaínas no nosso grupo pesquisa é realizada misturando as aminas disponíveis comercialmente e sintetizadas com o HBt. Esta semissíntese é favorecida em meio ácido, por isso foi utilizado o ácido *p*-TsOH (ácido *para*-toluenossulfônico), de modo que ele não interage com as betalaínas, com um excesso molar de 5 equivalentes.^{5,66} Embora o rendimento esperado para o acoplamento aldimínico seja alto, perde-se muito durante a purificação em coluna preenchida com resina Sephadex LH-20. A utilização dessa resina para a separação dos reagentes e o produto betalaína mostrou-se mais eficaz, porém pode-se empregar a HPLC em escala semipreparativa. É possível observar no momento da purificação o aparecimento de

manchas amareladas com diferentes tempos de retenção na coluna, indicando possivelmente a degradação da mesma em ácido betalâmico e amina precursora, além de outros subprodutos que até o momento não foram caracterizados. Para garantir que a fração coletada não apresentasse contaminantes foram descartados o início e o final da mancha, acarretando uma diminuição no rendimento global.

Diante disso, as aminas primárias, anilinas *para*-substituídas, foram misturadas com uma solução concentrada de HBt em acetato de etila e, imediatamente, a coloração da solução mudou de amarelo para laranja, vermelho ou roxa, dependendo da amina utilizada. A adição de *p*-TsOH, turvou a solução e auxiliou a precipitação das mesmas, deixando a solução límpida.

O acoplamento entre o HBt e a amina 4,4'-azanodiildibenzonitrila, uma *N,N*-difetilamina que possui dois grupos nitrila nas posições *para* dos anéis aromáticos não pôde ser realizado. A presença de dois grupos fortemente atraentes de elétrons (GAE), que estão diretamente conjugados com o nitrogênio, retiram a densidade eletrônica do mesmo por efeitos mesoméricos (-M) e deixam o par de elétrons do nitrogênio menos disponível para efetuar o ataque nucleofílico. De modo contrário, a bis(4-metóxilfenil)amina, uma *N,N*-difetilamina que possui dois grupos metoxila (GDE) apresenta-se como um ótimo nucleófilo. Os efeitos mesoméricos (+M) das metoxilas em *para* ao nitrogênio tornam o par de elétrons mais disponíveis para o ataque nucleofílico. O **Esquema 11** representa os efeitos de doação e atração de densidade eletrônica dos grupos adicionados em *para* ao nitrogênio da amina para as anilinas, *N*-metilanilinas e *N,N*-difetilaminas.



Esquema 11: Efeitos eletrônicos dos substituintes sobre as anilinas, metilanilinas e difenilaminas. As setas indicam a o sentido da deslocalização eletrônica.

O precursor cromofórico das betalaínas (ácido betalâmico, HBt) é uma espécie conjugada que tem um $\lambda^{\text{ABS}} = 424 \text{ nm}$. As betalaínas, produto do acoplamento entre o HBt e aminas, possuem o $\lambda^{\text{ABS}} > 450 \text{ nm}$, ou seja, quando acontece o acoplamento aldimínico há um deslocamento da banda de absorção de 424 nm para comprimentos de onda maiores, neste caso para as pBeets, *N*-Me-pBeets e dipBeets, os valores são sempre superiores a 490 nm, indicando que houve um aumento na conjugação do sistema cromofórico. Esse aumento na conjugação pode ser visualizado também em merocianinas e indocianinas, compostos que apresentam um sistema pentametínico, igualmente encontrado em betalaínas, e devido a essa conjugação apresentam um λ^{ABS} em torno de 500 nm.⁶⁷

Com a formação da imina, a deslocalização eletrônica compreende além do sistema 1,7-diazaeptamético. A presença de um anel aromático e substituintes capazes de doar ou atrair densidade eletrônica na posição *para* aumentam a conjugação do sistema e, diante disso, ocorre a diminuição dos níveis de energia entre os estados fundamental e eletronicamente excitado, deslocando a banda de absorção, um deslocamento batocrômico.^{40,46,48,56,68,69}

4.2. Efeitos eletrônicos do substituinte

4.2.1. Medidas de ¹H RMN

Devido a instabilidade em solvente orgânico (e.g. CDCl₃, DMSO-d₆) e/ou insolubilidade das betalaínas (e.g. acetonitrila-d₄) a interpretação dos dados de RMN torna-se tão difícil que a literatura é escassa de informação sobre os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos hidrogênios e, mais ainda, para dados de ¹³C. A solubilidade limitada (< 1 mg mL⁻¹) e instabilidade em solvente aquoso, permitiram apenas a aquisição do espectro de ¹H RMN, visto que a aquisição do espectro de ¹³C RMN para essa concentração levaria em torno de 24 h num equipamento operando em frequência de 500 MHz com 11,4 T de campo magnético e, este tempo, é muito maior que o tempo de meia-vida de algumas betalaínas, principalmente as pBeets.

Na literatura encontra-se informações sobre deslocamentos químicos dos carbonos de betaxantinas naturais: miraxantina V e indicaxantina,⁷⁰ e algumas betalaínas não-naturais,⁷¹ porém estes foram obtidos de modo indireto, utilizando-se HSQC e HMBC. A tentativa de obtenção dos sinais de carbono *via* experimentos heteronucleares falhou e não foi possível a obtenção, pois a solubilidade limitada em D₂O e o baixo tempo de meia-vida de hidrólise prejudica a aquisição dos sinais. Uma alternativa para aquisição do espectro de ¹³C RMN é a utilização de um equipamento com um campo magnético

maior, eventualmente acoplado a uma criosonda, e diminuição da temperatura para minimizar os efeitos sobre a degradação das betalaínas. Nosso grupo realizou experimentos num equipamento operando a 800 MHz, com controle de temperatura abaixo de 25 °C e uma sequência de pulso incomum, porém cada análise heteronuclear necessitou de 24 h de aquisição a um custo superior a R\$1000,00, o que torna inviável pela quantidade de amostras, experimentos e tempo de máquina. Outra alternativa é a utilização da mistura acetonitrila:água (9:1), onde as betalaínas apresentam-se mais estáveis. Este sistema de solvente pode ser o substituto para as análises de RMN, bem como a utilização de TFE-d2, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol-d2 ou outros solventes em que os compostos se apresentam mais estáveis, porém o custo é infinitamente maior que D₂O.

Nos espectros de ¹H RMN das pBeets encontram-se sinais de impurezas e de amina precursora, pois desde o preparo da amostra até a aquisição desses espectros tomou-se aproximadamente 20 minutos, ou seja, tempo suficiente para o aparecimento de produtos de degradação. Em alguns espectros é possível ver os sinais de baixa intensidade que são atribuídos aos hidrogênios aromáticos das aminas.⁷² As pBeets que continham GAE são as mais instáveis que a sem substituição (pBeet, X = H) e, portanto, no espectro encontram-se mais sinais de impurezas devido ao processo de degradação. Também são encontrados três sinais no espectro de ¹H RMN referentes a ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TsOH) que foi utilizado na síntese. Os sinais podem ser verificados em: δ 7.70 (d, 2H), δ 7.38 (d, 2H) e δ 2.12 (s, 3H) em todos os espectros.

Os efeitos dos substituintes observados nos sinais dos ¹H RMN das pBeets quando superpostos sugerem que há mudança nos deslocamentos químicos de vários hidrogênios e também na resolução da multiplicidade dos mesmos. Apesar do sistema ser todo

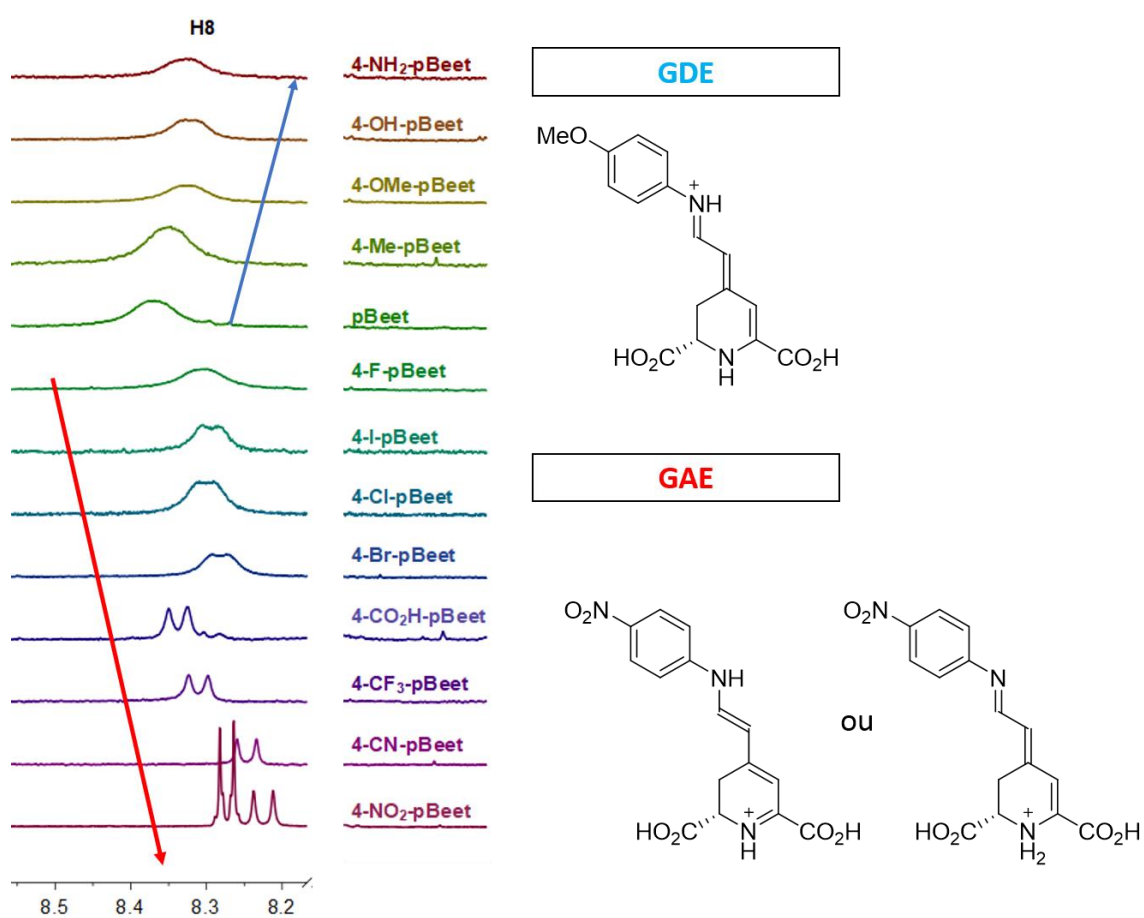
conjugado, a distância do substituinte aos hidrogênios da porção betalâmica é grande e levou-nos a inferir que não pode ser apenas o efeito da característica eletrônica do substituinte que blindou ou desblindou os núcleos. Para melhor entendimento dos resultados tem de se levar em consideração os valores de pK_{aH} das aminas (**Tabela 11**), que podem ser extrapolados para as iminas, e qual a influência sobre os nitrogênios imínico (N9) e enamínico (N1). De modo geral, o pK_{aH} das iminas é de duas a quatro unidades menor que o pK_{aH} das anilinas, portanto, é difícil afirmar que as pBeets com GAE, por exemplo a 4-NO₂-pBeet (**2m**), estão com o nitrogênio da imínia protonado. A presença desses grupos desestabiliza a carga positiva. No entanto, quando há a presença de GDE, o desenvolvimento de uma carga positiva no nitrogênio é minimizado pela doação de densidade destes grupos.

Tabela 11: pK_{aH} das anilinas para-substituídas, em solução aquosa, a 25 °C. ^{73,74}

(R)	σ_p	pK _{aH}
NH ₂	-0.66	6,08
OH	-0.37	5,50
OMe	-0.27	5,29
Me	-0.17	5,12
H	0	4,58
F	0.06	4,65
I	0.18	3,81
Cl	0.23	3,98
Br	0.23	3,91
CO ₂ H	0.45	2,50
CF ₃	0.54	2,45
CN	0.66	1,74
NO ₂	0.78	1,02

Na faixa de pH 7-7,4, a qual compreendeu as soluções de betalaínas durante o experimento de ¹H RMN,⁷⁵ nos mostrou que o sistema 1,7-diazaeptamético pode ser influenciado pelo acúmulo de carga positiva nos nitrogênios. Na posição H8, conforme modificou-se a característica de GDE para GAE, alterou-se a concentração de carga positiva, que deixou de estar localizada no N9 e ficou localizada no N1. A carga desenvolvida no N9 desblindou o H8, enquanto que a desenvolvida no N1, blindou. Porém não sabemos qual a espécie majoritária presente nos espectros das pBeets com GAE. Quando há a tautomerização e desenvolvimento de carga positiva, o caráter de

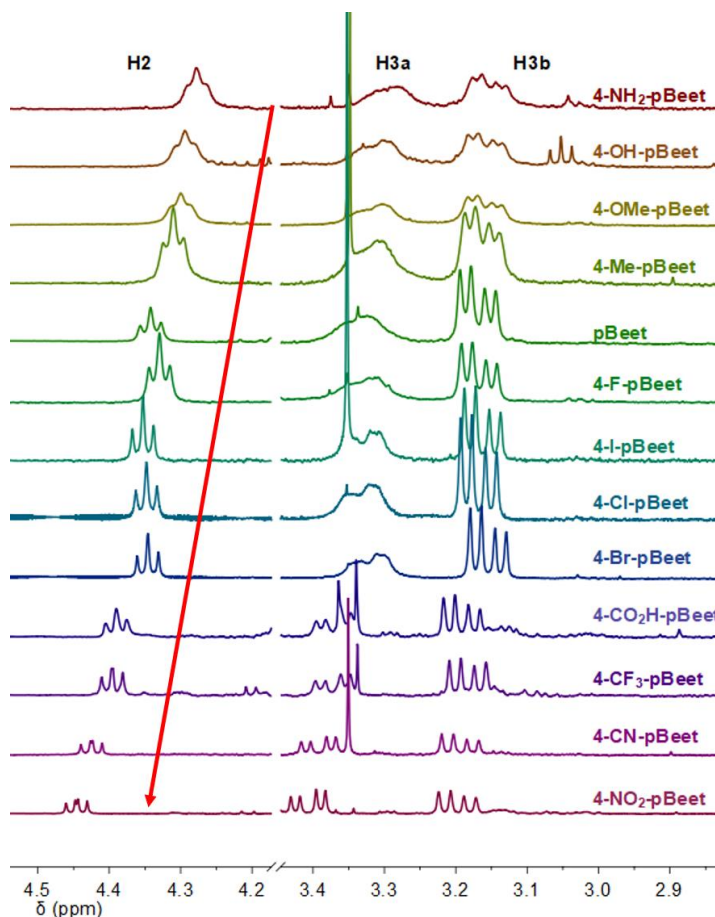
ligação dupla C7-C8 deveria apresentar um valor de $^3J_{7,8}$ maior, porém os valores praticamente não se alteram, permanecendo numa faixa de 12-13 Hz. Os valores de pK_{aH} para as espécies com dupla protonação e tautomerização (nos casos com GAE) foram calculados com auxílio do MarvinSketch 2018 e nos informou os valores de 0,86 e -1,17, respectivamente.



Esquema 12: Deslocalização da carga positiva do N9 (GDE) para o N1 (GAE) desloca o H8.

Para suportar nossa tese que houve a deslocalização da carga positiva do N9 para o N1, é necessário que ocorra mudança nos δ do H2. Essa carga positiva desenvolvida desblindou os hidrogênios, e os elétrons da posição C2 estabilizaram a carga positiva por efeitos hiperconjugativos, tornando este carbono sp^2 , portanto mais planar. Isso ficou

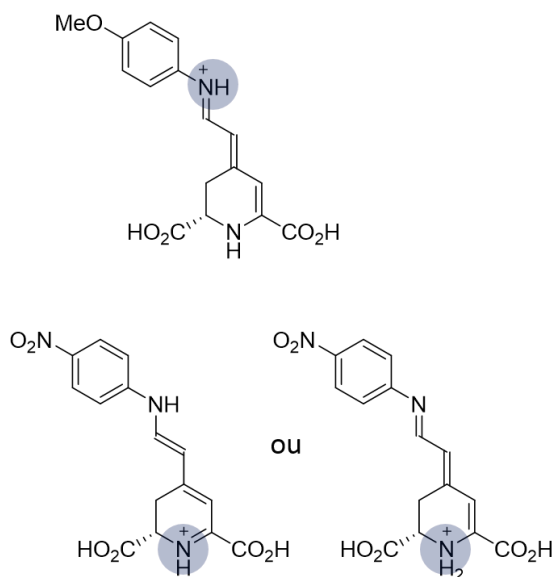
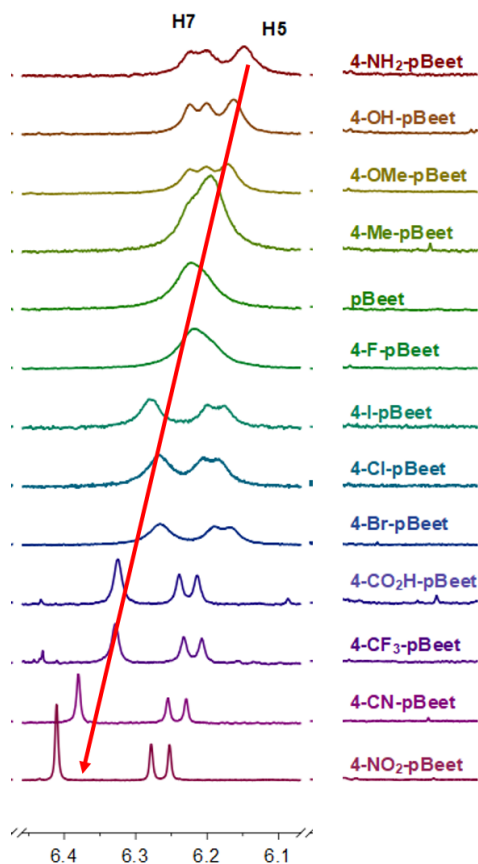
evidente na resolução dos sinais do H2, H3a e H3b conforme substituiu-se GDE por GAE. A resolução do sinal aumentou para o H3a, axial que está antiperiplanar ao H2, e para o H3b, equatorial que está sinclinal. Estes hidrogênios passaram a interagir com a adição de GAE.



Esquema 13: Deslocamento do sinal do H2, com aumento de resolução dos sinais H2, H3a e H3b conforme adiciona-se GAE.

Assim como o H8 e o H2, que estão muito próximos aos centros que desenvolveram carga positiva, o H5 também sentiu esse efeito de uma forma concentrada. O desenvolvimento de uma carga positiva no N1, quando a molécula possuía GAE foi minimizado pela doação de densidade eletrônica do C2 e também do C5, por hiperconjugação. Este efeito implicou na desblindagem dos núcleos e aumento na

resolução do sinal.

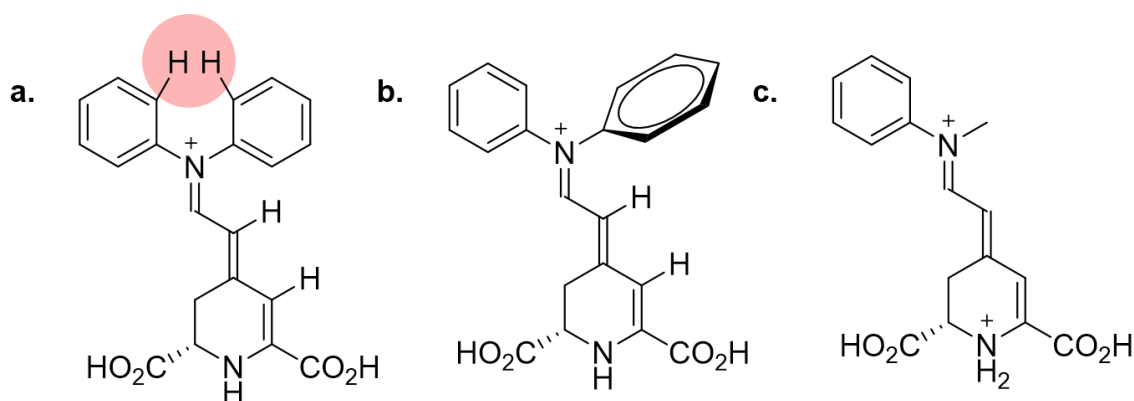


Esquema 14: Efeito da localização de carga positiva nos nitrogênios e o deslocamento do sinal do H5. Não houve alteração no δ do H7.

Para o H7 não foi observado um deslocamento pronunciado, pois está localizado próximo aos centros que podem acumular carga positiva, ele sente um efeito balanceado, ou seja, uma média das contribuições dos efeitos gerados pela carga positiva nos nitrogênios. Portanto, a presença de GAE e GDE alteram o acúmulo de carga positiva nos nitrogênios e ocorre o deslocamento dos sinais dos hidrogênios no ^1H RMN das pBeets.

O efeito da localização da carga positiva do nitrogênio na posição N9 pode ser melhor observado para as *N*-Me-pBeets e dipBeets, visto que as betalaínas são derivadas de aminas secundárias e, portanto, este nitrogênio sempre está com carga positiva. A

carga positiva no N1 desblinda o H8, conforme observado para as pBeets com GDE e *N*-Me-pBeets, porém para as dipBeets, independentemente do substituinte, ocorre a blindagem dos H5 e H7 (**Figura 20**, pág. 85 e **Figura 21**, pág. 86). Essa blindagem pode estar relacionada à torção do anel aromático, pois a adição de dois grupos fenil ao nitrogênio cria um impedimento estérico para eles estarem no mesmo plano. Contudo, esse efeito não é observado para o grupo metil, pois este é um grupo menos volumoso (**Esquema 15**).



Esquema 15: a. Impedimento estérico dos hidrogênios na posição *orto*, em vermelho. b. torção do anel aromático. c. menor impedimento estérico do grupo metila

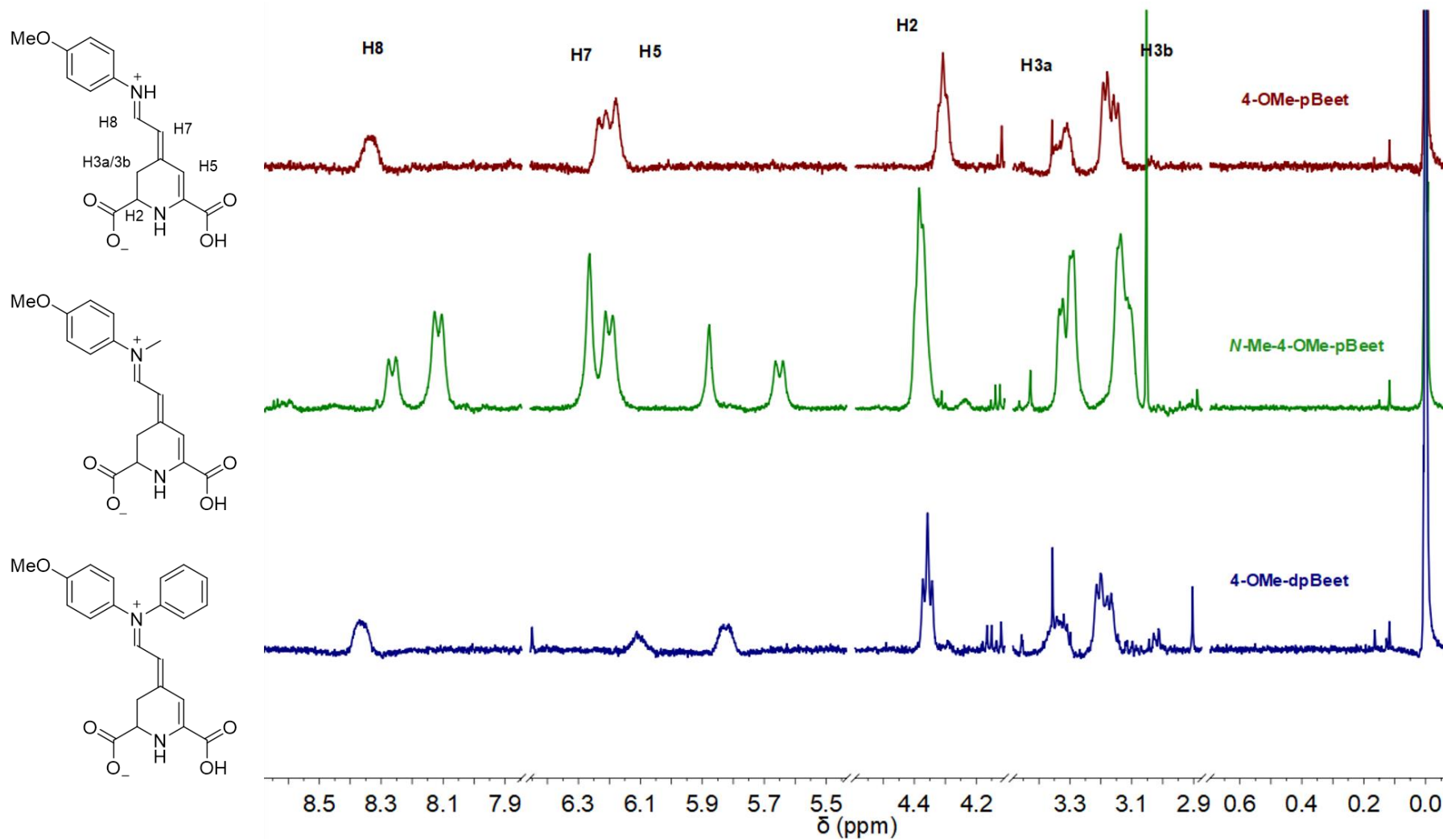


Figura 20: Superposição dos espectros de ^1H RMN das betalaínas do tipo pBeet, N-Me-pBeet e dpBeet com substituintes OMe.

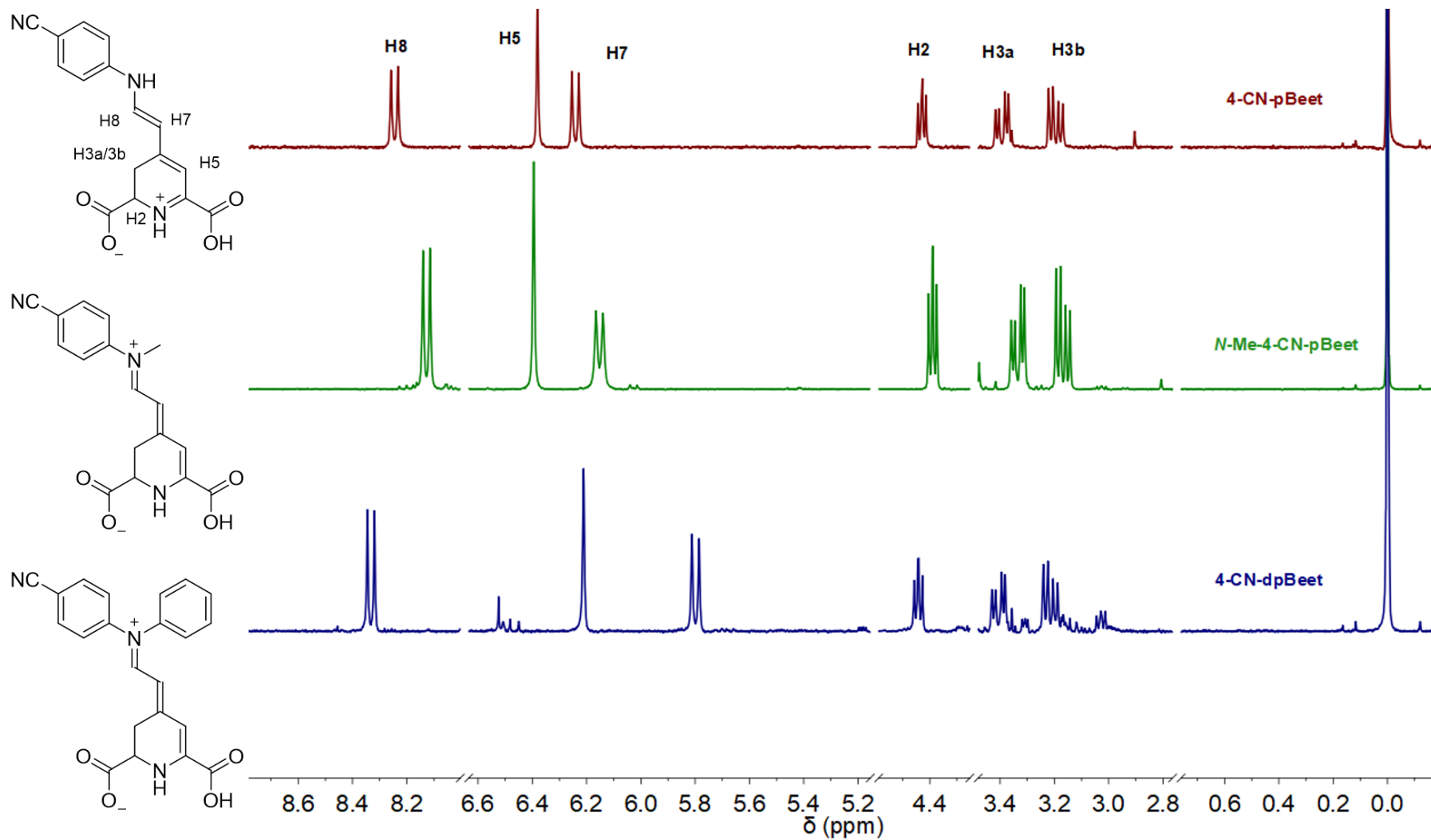
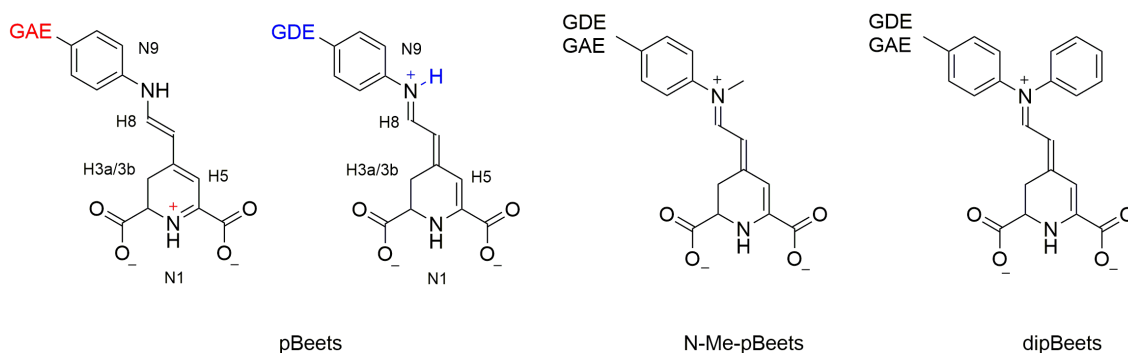


Figura 21: Superposição dos espectros de ¹H RMN das betalaínas do tipo pBeet, N-Me-pBeet e dipBeet com substituintes CN.

O sistema conjugado das betalaínas, 1,7-dHm, permite que haja diferentes espécies em solução e, de acordo com os dados de deslocamento químico (δ) e constantes de acoplamento entre hidrogênios (J) observados nos espectros de ^1H RMN, estruturas foram racionalizadas e estão apresentadas no **Esquema 16**. A carga total das betalaínas nas três famílias não foram alteradas, permanecendo sempre negativa na faixa de pH que compreendeu a análise de ^1H RMN.



Esquema 16: Racionalização das estruturas químicas das betalaínas com grupos eletronicamente diferentes.

4.2.2. Medidas fotofísicas

Os efeitos eletrônicos mais consideráveis foram observados para a hidrólise de betalaínas, bem como os deslocamentos químicos das espécies no ^1H RMN, porém algumas considerações podem ser feitas quanto às variações nas propriedades fotofísicas dentre as famílias de betalaínas. Dentro de uma mesma família, o comportamento das betalaínas não sofre variação considerável que pode ser explicada de forma sistemática, mas quando se compara famílias diferentes ocorre uma variação, mesmo que pequena. O comprimento de onda máximo nos espectros de absorção (λ^{ABS}) dentro das pBeets, N-Me-pBeets e dipBeets não sofre influência visível quando altera-se a característica eletrônica do substituinte, mas o efeito da adição de grupos metila ao nitrogênio imínico

desloca o máximo de absorção para comprimentos de onda mais energéticos pelo desenvolvimento de carga positiva no N9.

Outra propriedade que se mostrou praticamente invariável com a presença de substituintes eletronicamente diferentes, os máximos de emissão de fluorescência, porém em todas moléculas que continham grupos metoxila ou hidroxila, a banda espectral mostrou-se mais larga e bem deslocada para comprimentos de onda maiores. A presença desses substituintes nos leva a inferir que ocorre uma mudança drástica no p*K*a do estado excitado, pois a diferença para esses é muito maior do que para substituintes como H ou CN e a espécie emissora do estado excitado é diferente. Por exemplo, no estado excitado moléculas podem participar de reações que não seriam possíveis no estado fundamental, e duas das consideradas nestes casos são as reações de fotoácido e fotobase, que envolvem o equilíbrio entre um ácido e sua base conjugada e uma base e o ácido conjugado, respectivamente. No estado eletronicamente excitado as espécies responsáveis pela emissão são diferentes quando envolve processos fotoquímicos e tendem a deslocar os máximos de emissão fluorescência, principalmente pela adição de metila/fenila ao N9, juntamente com a metoxila/hidroxila na posição para do(s) anel(éis), deixando-o com uma carga positiva.^{76,77}

Sabe-se de antemão que as betalaínas são compostos que apresentam um rendimento quântico de fluorescência muito baixo. As bexantinas naturais *e.g.* vulgaxantina I⁷⁸ ($0,7 \times 10^{-2}$), indicaxantina⁴⁵ ($0,5 \times 10^{-2}$) e miraxantina V⁷⁹ ($0,3 \times 10^{-2}$) são mais fluorescentes que as betacianinas *e.g.* betanina⁸⁰ ($0,7 \times 10^{-3}$) e, dentre as betalaínas semissintéticas, as mais fluorescentes são as derivadas de aminocumarinas sintetizadas pelo nosso grupo de pesquisa, *e.g.* cBeet 151, cBeet 120 e csBeet 124 com valor de 2,14, 0,63 e $0,32 \times 10^{-2}$, respectivamente.⁷¹ Este último caso serve para explicar

a diferença dos valores de rendimento quântico de fluorescência entre a betalaína e a amina precursora. As cumarinas 151, 120 e carboestiril 124, exibem valores de rendimento quântico de fluorescência, em metanol, de 0,37, 0,51 e 0,68, respectivamente, ou seja, valores com ordem de grandeza 2 vezes maior que as betalaínas.⁸¹⁻⁸³ Este fato deve-se à rigidez das cumarinas, que tornam o processo de emissão de fluorescência mais eficiente e, portanto, elevados valores de Φ_{FL} . De modo contrário, as betalaínas apresentam um grau de liberdade molecular muito maior que as cumarinas, podendo perder energia por processos não-radiativos rotacionais e passando para níveis eletronicamente excitados mais baixos. Ao retornar ao estado fundamental a energia liberada por emissão é infinitamente menor que a absorvida, contudo os valores de Φ_{FL} apresentam-se baixos.⁴⁴

Embora não haja uma dependência linear do rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}) com o poder de atração/doação de densidade eletrônica (σ) os substituintes exercem funções importantes, há uma tendência, que é possível correlacionar com os valores de Φ_{FL} (**Figura 22**).

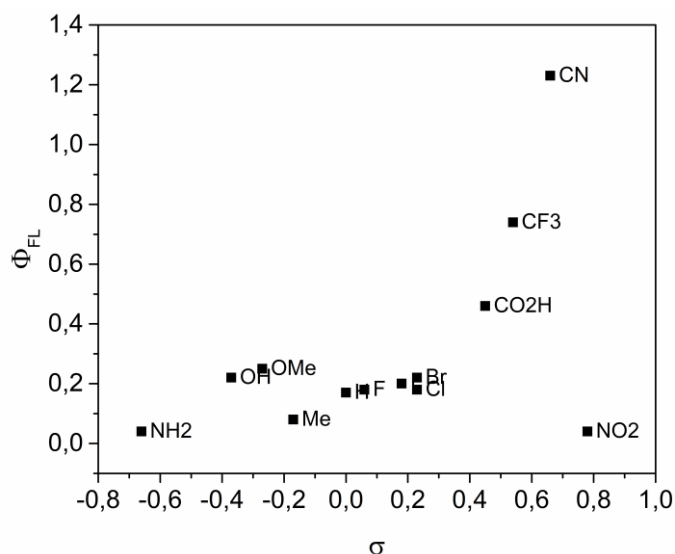


Figura 22: Gráfico de Hammett para o Φ_{FL} em função do σ .

Como as moléculas, sob o ponto de vista estrutural, são semelhantes, é difícil pensar num aumento da rigidez do sistema e a explicação mais plausível é sob a ótica da mudança do dipolo no estado eletronicamente excitado. Quando há a presença de grupos atraentes de densidade eletrônica há um aumento no dipolo da molécula, tanto que a presença de dois grupos nitrila nas posições 3 e 4 do anel aromático causa um efeito drástico, deslocando a densidade eletrônica toda para a parte de cima e aumentando o vetor momento de dipolo. Vale destacar que a 3,4-CN-pBeet (**1n**) é a betalaína mais fluorescente já sintetizada em toda a literatura. O inverso também é observado, pois quando há a presença de GDE esse dipolo é diminuído e os valores apresentados são relativamente mais baixos. A baixa fluorescência da betalaína 4-NO₂-pBeet (**1m**), assim como em hidrocarbonetos aromáticos, é devida a redução da energia de transição $n \rightarrow \pi^*$, resultando num eficiente cruzamento intersistemas, o que torna muitos compostos nitroaromáticos fluorescentes. Em alguns casos a taxa de conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$ é elevada como resultado de um alto caráter de transferência de carga no estado excitado e acoplamento vibrônico intramolecular.^{68,84} A substituição no nitrogênio imínico, metilação e fenilação, diminuiu o Φ_{FL} que já se apresentava baixo, diminuindo a energia das transições que ocorrem dos níveis vibracionais do estado eletronicamente excitado para o nível fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$).

A última, mas não menos importante, propriedade fotofísica racionalizada foi o Deslocamento de Stokes.⁸⁵ Mais do que a simples definição, o $\Delta\nu$ nos informa quanto de energia foi utilizada em processos não-radiativos. Como as betalaínas são moléculas que perdem bastante energia por esses processos, os valores de $\Delta\nu$ mostram-se elevados, porém essa variação acontece de forma sistematicamente linear quando substituintes com características eletrônicas diferentes são adicionados à molécula. O gráfico de Hammett

nos mostra que a adição de GDE aumenta os valores de $\Delta\nu$ (em cm^{-1}), ou seja, há um maior gasto energético em processos não-radiativos quando comparados com GAE, que aproximam as bandas de absorção e emissão de fluorescência.

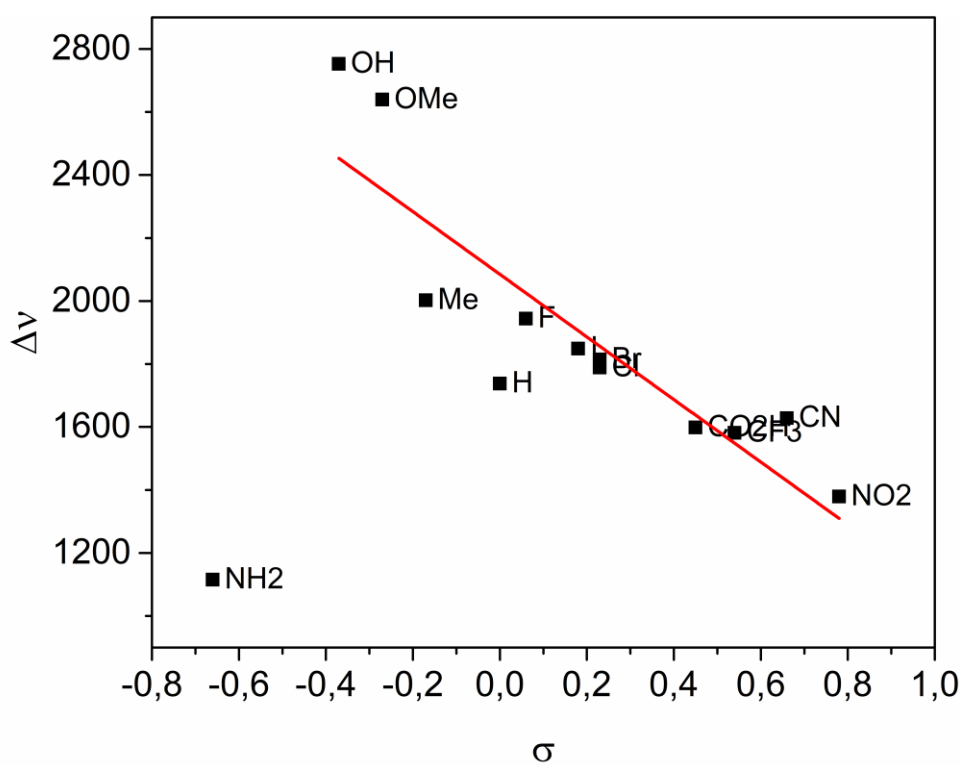


Figura 23: Gráficos de Hammett para o Deslocamento de Stokes das pBeets em função do σ .

4.3. Efeito do substituinte sobre a hidrólise de pBeets

Conforme observado por Hammett e extrapolado para este trabalho, há uma correlação linear entre o pK_a do ácido conjugado (**Tabela 11**, pág. 80) das anilinas *para* substituídas (pK_{aH}) e os valores de σ_p ($r^2 = 0,95$). Essa relação nos permite verificar a influência do substituinte sobre a hidrólise e diversas propriedades das pBeets.

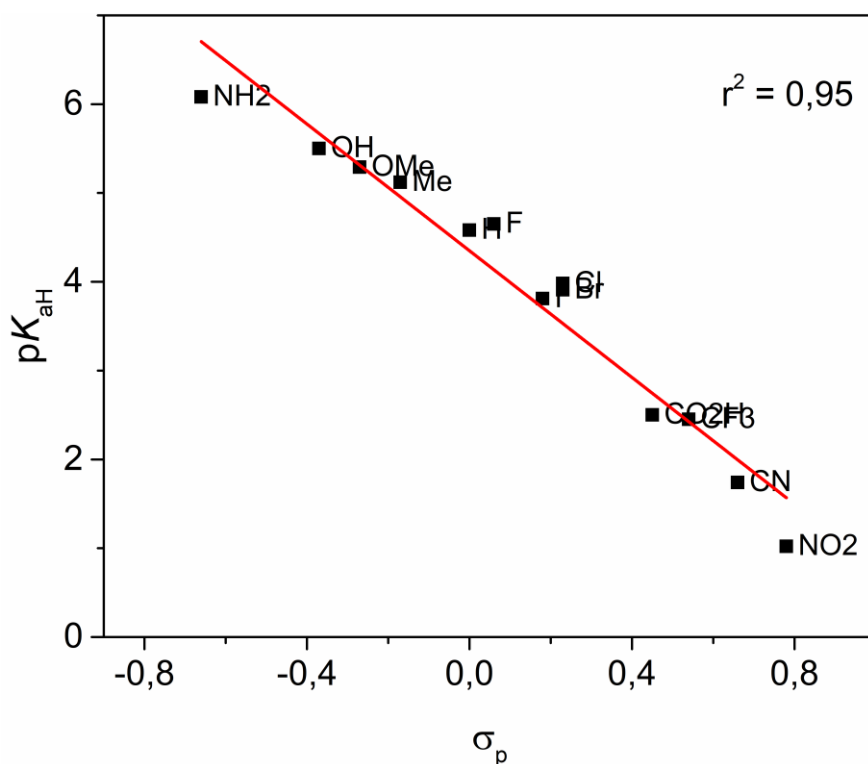


Figura 24: Correlação linear entre o pK_{aH} das anilinas substituídas e o σ_p .

4.3.1. Hidrólise em pH 2

Em meio ácido, tpBR pH 2, o gráfico da cinética de degradação no UV-Vis das pBeets apresenta uma diminuição na banda de absorção λ^{Abs} em torno de 500 nm e o aparecimento de uma banda de absorção λ^{Abs} em 420 nm ao longo do tempo, com a presença de um ponto isobéstico em 450 nm, que facilita a visualização de qual banda está decaindo e qual está aumentando. Esta banda em 420 nm é característica do ácido

betalâmico, que apresenta $\lambda^{ABS} = 424$ nm em água, reagente utilizado na semissíntese das betalaínas. O aparecimento dessa banda nos mostra que a degradação das pBeets ocorre via hidrólise ácida. Não há um deslocamento da banda de absorção do produto formado em nenhum caso de degradação de pBeets em tpBR pH 2, conseqüentemente o produto de degradação é igual para todos os casos nesse pH, porém a via de degradação pode mudar nos diferentes casos e dependendo das características eletrônicas dos substituintes.

Observou-se no gráfico de Hammett uma correlação linear entre o log da razão entre as constantes cinéticas observadas para os compostos doadores e fracamente atraentes de densidade eletrônica. Houve uma quebra da linearidade do gráfico de Hammett para compostos fortemente atraentes de densidade eletrônica. Segundo os estados de protonação das betalaínas calculados com auxílio do software MarvinSketch 18 22.0 (2018), no pH 2 a betalaína 4-NH₂-pBeet (**1a**), que contém o grupo NH₂ na posição *para* à imina, está na forma de ácido conjugado NH₃⁺, pois o pKa é de 2,7 e, desta maneira, passa a atuar como um grupo atraente de densidade eletrônica ($\sigma = 0,60$). Também estão protonados os grupos ácidos carboxílicos e a imina.

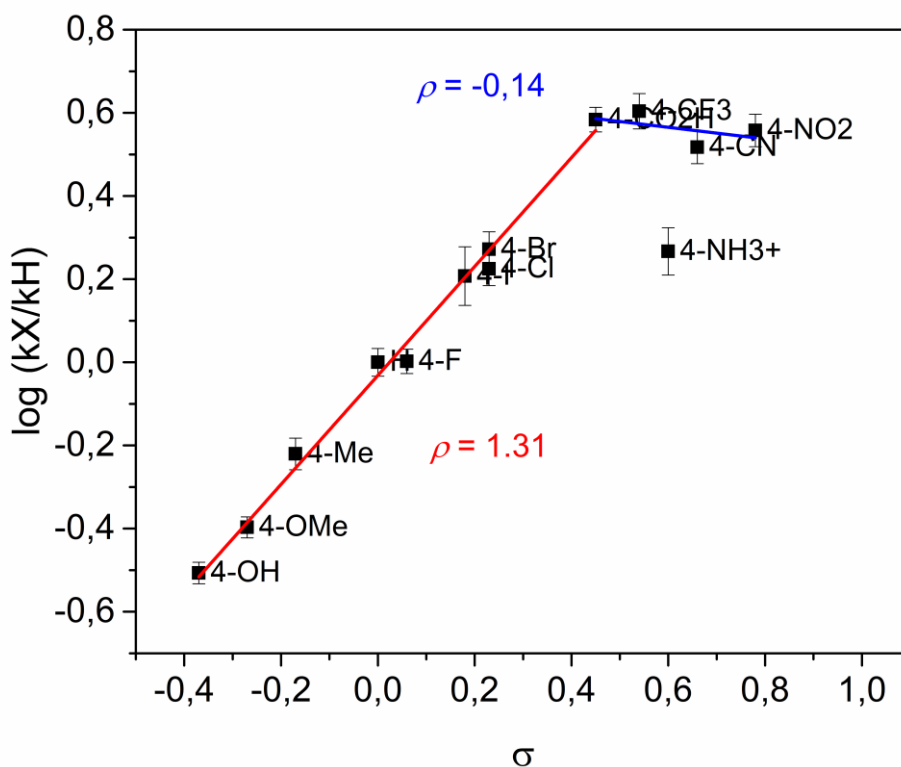


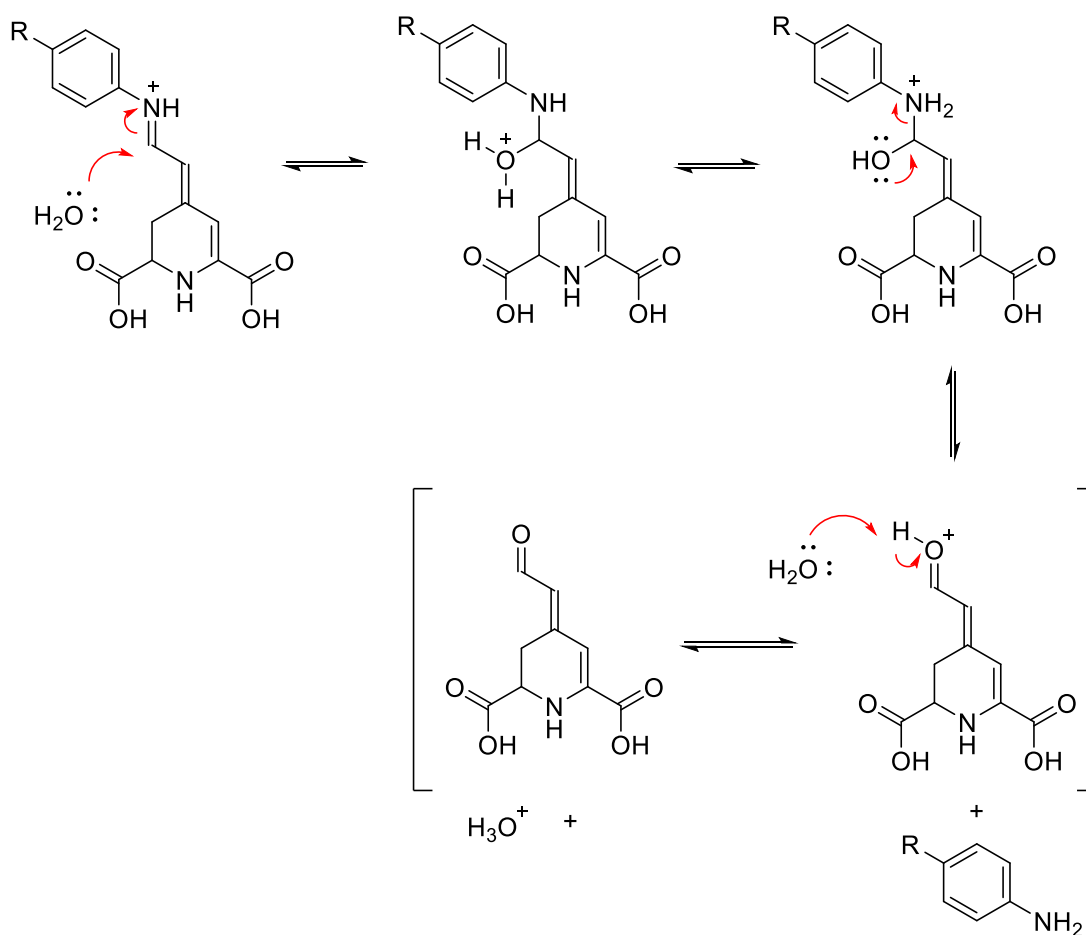
Figura 25: Gráfico de Hammett para a degradação de pBeets em tpBR pH 2 a 25 °C.

O valor de ρ positivo ($\rho = 1.31$) indica um desenvolvimento de carga negativo ou diminuição da carga positiva no centro reacional do estado de transição e a magnitude maior que 1 nos diz que a reação de degradação é mais sensível ao efeito do substituinte que a reação padrão. Conforme visto nos deslocamentos químicos das pBeets, as espécies mudaram conforme foram trocados os grupos na posição *para*. Em pH 2 os ácidos carboxílicos estão na forma protonada para todos os casos e a imina pode estar ou não protonada. Quando há grupos doadores de densidade eletrônica e fracamente atraentes a espécie majoritária é a forma de cátion imínio, quando são colocados grupos fortemente atraentes, a imina deixa de estar protonada e o N1 passa a estar protonado.

No primeiro caso, a carga positiva no N9, estabilizada por grupos doadores, ativa o carbono vizinho para o ataque nucleofílico da água, portanto a etapa lenta da reação é

a hidratação do cátion imínio e há uma diminuição da carga positiva no centro reacional.

No segundo caso, a carga positiva está no N1 e a posição C6 está ativada para o ataque nucleofílico da água e abertura do anel 2,6-dicarbóxi-tetraidropiridínico na forma seco. A etapa lenta da reação é justamente o ataque da água nessa posição. Após a abertura do anel ocorre novamente um ataque nucleofílico da água, só que desta vez na posição C8, gerando um intermediário tetraédrico carbinolamina, que desidrata, formando o aldeído e promove o ataque dos pares de elétrons no nitrogênio da parte de baixo à cetona, ciclizando novamente o anel, gerando ácido betalâmico e amina precursora sintética.



Esquema 17: Mecanismo de hidrólise proposto para pBeets com substituintes doadores (GDE) e atraentes (GAE) de densidade eletrônica.

4.3.2. Hidrólise em pH 5

Em pH levemente ácido, tpBR pH 5, as constantes cinéticas de degradação apresentam uma diminuição na banda das betalaínas ($\lambda^{\text{ABS}} \sim 500 \text{ nm}$) e aparecimento de uma banda com $\lambda^{\text{ABS}} = 420 \text{ nm}$, característica do ácido betalâmico. Nestas condições o gráfico de Hammett também apresenta uma correlação linear para os substituintes fortemente doadores e fracos atraentes de densidade eletrônica. O coeficiente angular da reta é positivo, porém a magnitude é menor que a observada em pH 2 ($\rho = 0,68$) e os substituintes não afetam tanto degradação de betalaínas, como afetam a reação padrão.

Neste pH há o equilíbrio entre as espécies protonada e desprotonada do nitrogênio imínico, que é um pouco deslocado para a última forma, portanto há uma diminuição da carga positiva desenvolvida no centro reacional do estado de transição. Grupos doadores de densidade eletrônica e fracamente atraentes estabilizam o estado de transição para minimizar os efeitos da carga positiva, no entanto apenas os grupos fortemente atraentes de densidade eletrônica desestabilizam o estado de transição pela retirada de densidade eletrônica. Assim ainda o efeito é muito pequeno, pois a magnitude do ρ é pequena ($\rho = -0,11$).

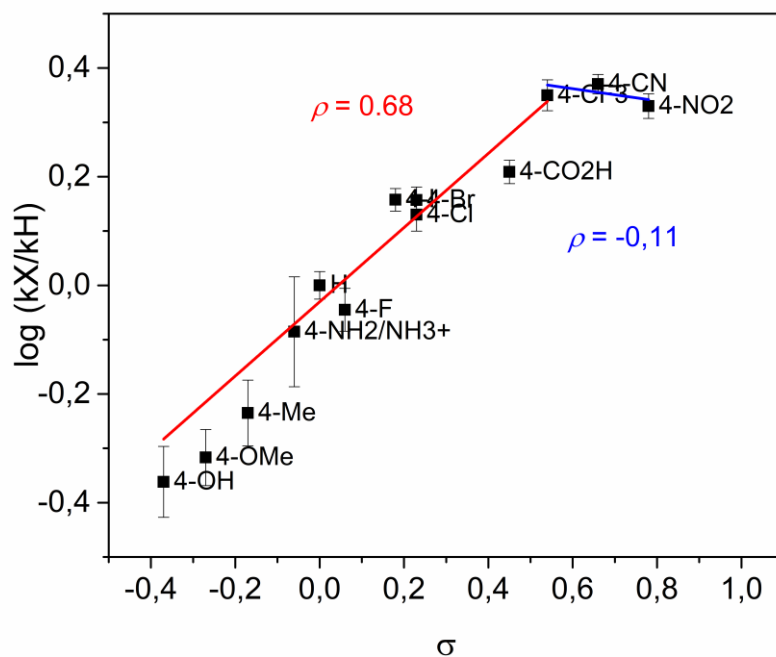
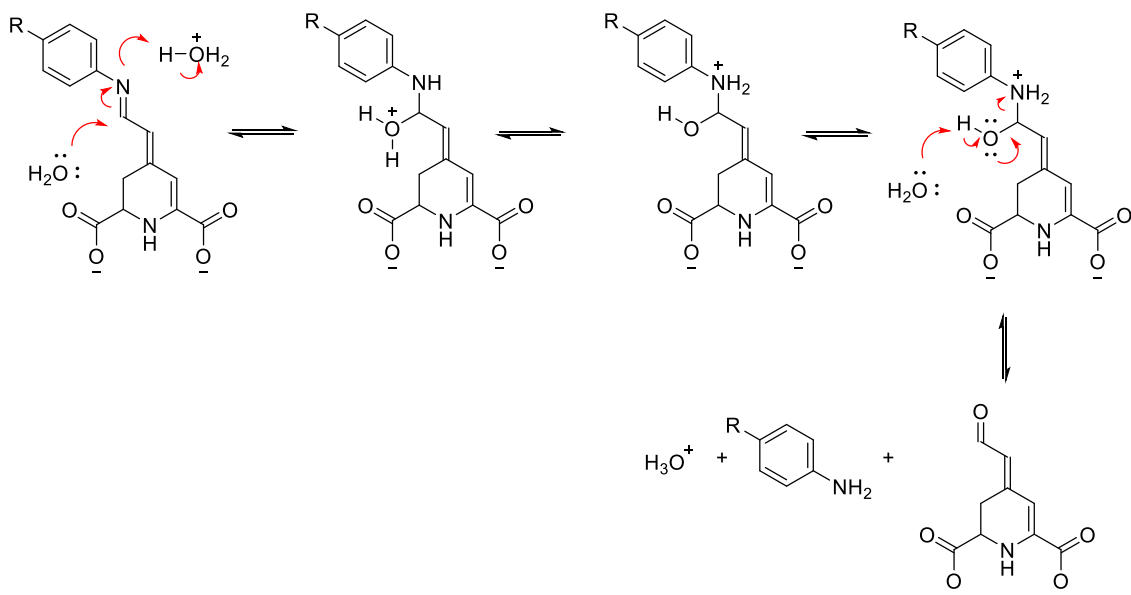


Figura 26: Gráfico de Hammett para a degradação de pBeets em tpBR pH 5 a 25 °C.

O mecanismo da reação inicia-se pelo ataque dos pares de elétrons do oxigênio da água ao carbono da imina, formando o intermediário tetraédrico carbinolamina. Nesta etapa, os GDE diminuem a eletrofilicidade do carbono do centro reacional, então a etapa lenta é a adição de água. Na etapa de abandono da amina do intermediário carbinolamina, os fortemente GAE aumentam a eletrofilicidade no carbono aldimínico, tornando esta etapa a lenta da reação de hidrólise de pBeets em pH 5.



Esquema 18: Mecanismo de hidrólise e estado de transição das pBeets em pH 5.

4.3.3. Hidrólise em pH 8,5

Em pH básico, tpBR pH 8,5, o gráfico de Hammett mostra-se linear para substituintes fortemente doadores e fracamente atraentes de densidade eletrônica ($\rho = 0,35$). No entanto, para substituintes fortemente atraentes de densidade eletrônica há uma quebra na linearidade ($\rho = -0,24$) caracterizando uma mudança na etapa lenta da reação para estes substituintes.

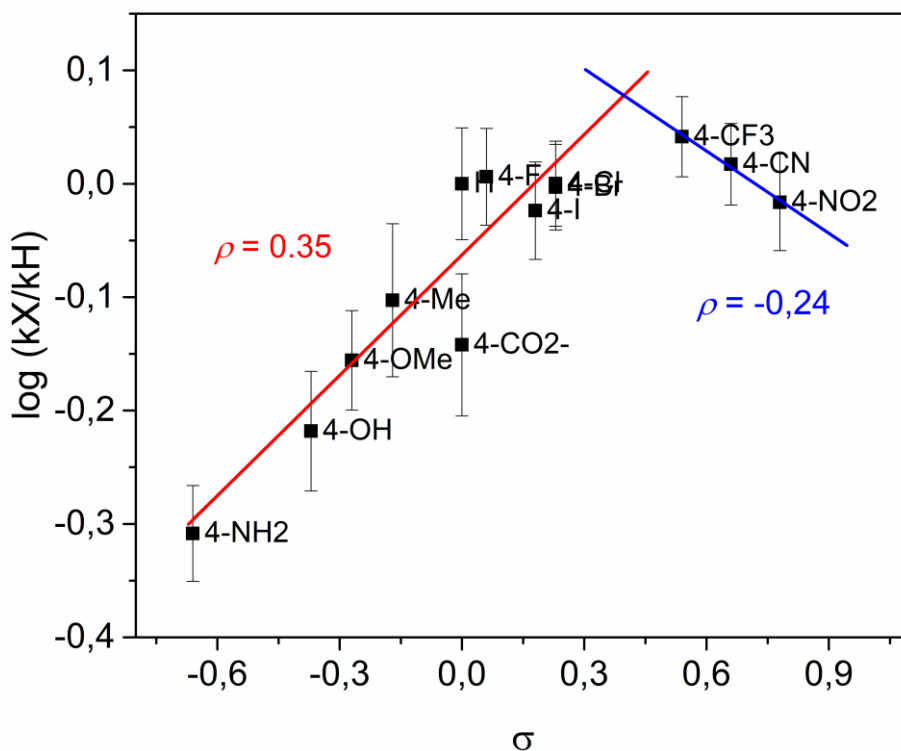
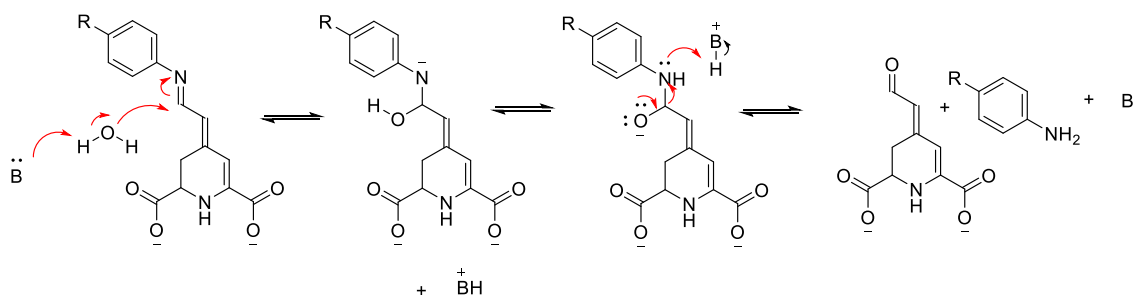


Figura 27: Gráfico de Hammett para a degradação de pBeets em tpBR pH 8,5 a 25°C.

Neste pH a betalaína apresenta-se na forma de imina, com o nitrogênio desprotonado. Na primeira etapa do mecanismo de hidrólise alcalina ocorre o ataque do par de elétrons do íon hidróxido ao carbono da imina, formando o intermediário tetraédrico carbinolamina, que posteriormente sofre abandono do grupo amina, formando o ácido betalâmico e a amina. A catálise básica acelera o passo de ataque nucleofílico e torna a etapa de desidratação lenta. Os substituintes fortemente doadores de densidade eletrônica desfavorecem o ataque nucleofílico, enquanto os atraentes favorecem a desidratação.



Esquema 19: Mecanismo de hidrólise e estado de transição das pBeets em pH 8,5.

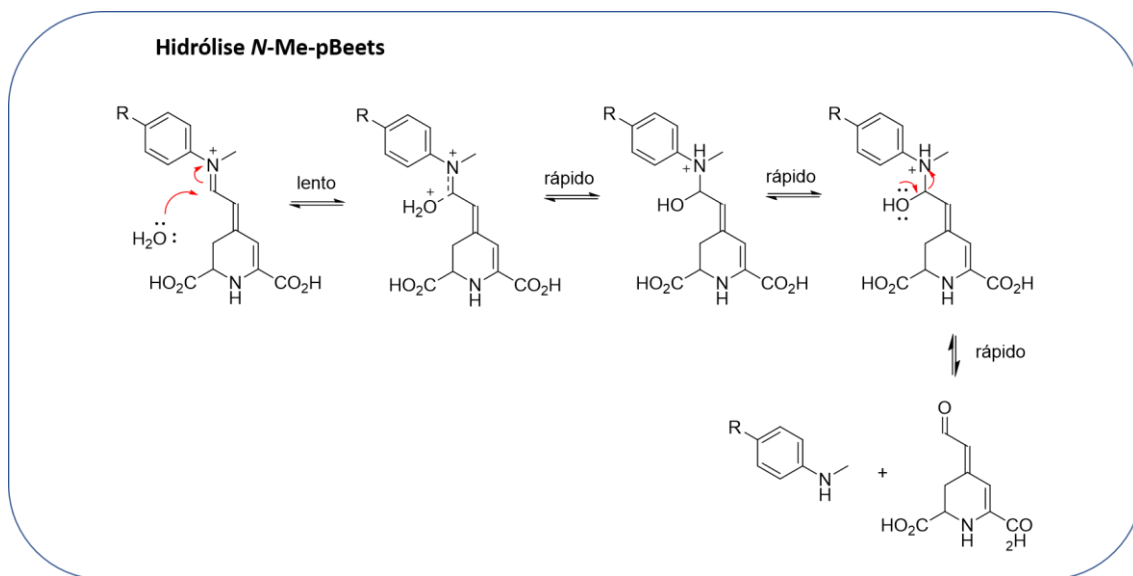
4.4. Estabilização *via* metilação e arilação

É notável a susceptibilidade das betalaínas do tipo fenílicas (pBeets) frente a hidrólise em ambientes ácidos e básicos e a influência do substituinte, que aumenta a constante cinética de degradação observada (k_{obs}) e, conseqüentemente, diminui o tempo de meia-vida conforme substitui-se grupos doadores de densidade eletrônica por grupos atraentes. Diante dos dados e analisando as betalaínas naturais, observou-se que as betalaínas derivadas de aminas secundárias, neste caso a betanina e a indicaxantina, possuem uma estabilidade maior que as derivadas de aminas primárias. Este fato é sustentado pela diminuição das constantes cinéticas observadas.⁸⁶⁻⁸⁸

Três representantes do grupo das pBeets, àquelas com substituintes metoxila (R = OMe) e nitrila (R = CN), além da molécula sem substituição (R = X), foram submetidas à degradação em tpBR pH 5, a 60 °C e foram muito mais susceptíveis a hidrólise, os tempos de meia-vida foram reduzidos em mais de 20 vezes, indicando a dependência da temperatura na degradação, como mencionado anteriormente para a Bn (**Figura 2**, pág. 22). Os análogos metilados, *N*-Me-4-OMe-pBeet (**2a**), *N*-Me-pBeet (**2b**), *N*-Me-4-CN-pBeet (**2c**) e *N*-Me-3,4-CN-pBeet (**2d**) também foram avaliados e apresentaram estabilidade muito superior aos não metilados. Também foi observado que as constantes cinéticas foram dependentes dos substituintes, os mais atraentes de densidade eletrônica apresentaram menor estabilidade.

O aumento da estabilidade das betalaínas fenílicas *N*-metiladas pode ser explicado pela diminuição do poder eletrofílico do carbono da imina que, com apesar da adição de um grupo fenil ao nitrogênio deixá-lo com carga positiva, este é estabilizado pela doação de elétrons por efeito indutivo da metila. A presença do grupo metil também aumenta a hidrofobicidade das betalaínas, repelindo as moléculas de água que poderiam atacar o carbono e hidrolisar a imina.⁸⁹

Em todos os casos para as betalaínas *N*-fenílicas, a imina está com uma carga positiva desenvolvida no N9, que é estabilizada pelo efeito indutivo de doação de densidade eletrônica da metila e a etapa lenta da reação de hidrólise é o ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio da água ao carbono aldimínico. Dentre essa família, a presença de grupos doadores estabiliza a carga positiva desenvolvida e retarda a reação de hidrólise, porém a presença de grupos que atraem a densidade eletrônica aumenta a eletrofilicidade do carbono, deixando-o mais susceptível à hidrólise. Quando há dois grupos nitrila, como substituintes no anel, o que está em posição *para* ao nitrogênio retira densidade eletrônica por efeitos mesoméricos e indutivos, enquanto que o grupo na posição *meta* retira apenas por efeitos indutivos e, diante disso, há uma delocalização da nuvem eletrônica para a extremidade da molécula, tornando o carbono aldimínico muito mais susceptível à hidrólise.

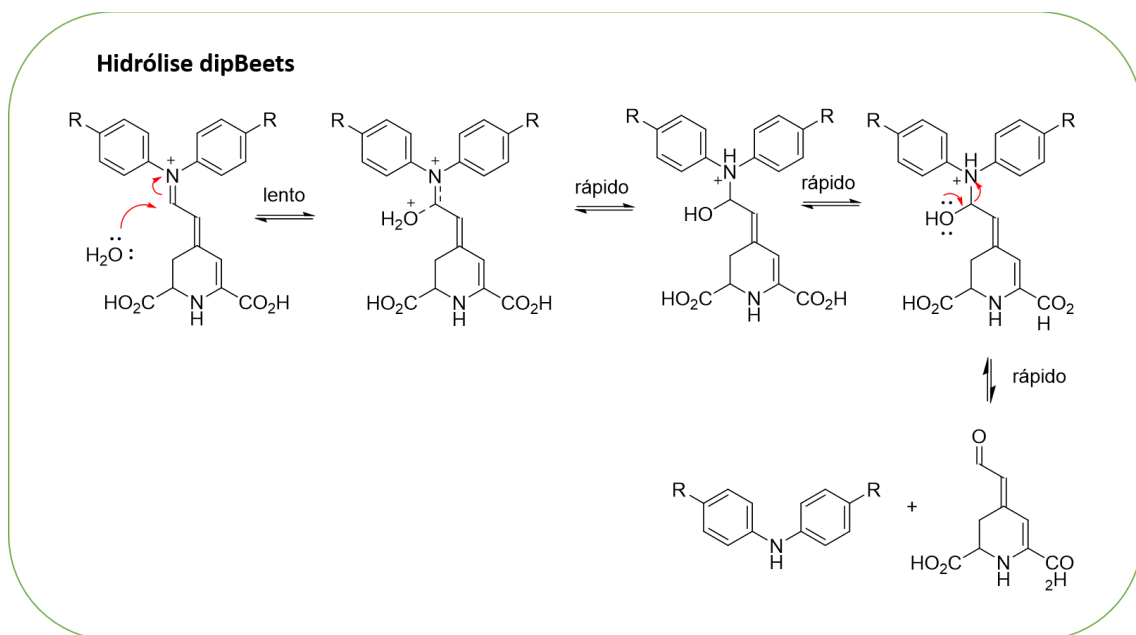


Esquema 20: Mecanismo de hidrólise para as *N*-Me-pBeets,

O mesmo efeito de estabilização das betalaínas fenilicas *N*-metiladas também acontece quando há a adição de grupos fenila ao nitrogênio e em alguns casos quando há a presença de substituintes doadores de densidade eletrônica nas fenilas a estabilização é maior que apenas a metilação desses compostos. As fenilas ligadas ao nitrogênio são doadores de densidade eletrônica por efeitos mesoméricos (+M) que estabilizam a carga positiva desenvolvida no nitrogênio e, como são grupos volumoso, criam um ambiente hidrofóbico ao redor do centro da reação, dificultando a hidrólise dessa família de betalaínas (dipBeets).⁹⁰

Quando há a presença de grupos metoxila, doadores de densidade eletrônica (4,4'-OMe-dipBeet, **3a**), ocorre a uma diminuição da eletrofilicidade do carbono aldimínico. A carga positiva desenvolvida no centro reacional é estabilizada pela doação de elétrons, bastante efetiva, por meio desses grupos. O inverso também é observado, quando há a presença da nitrila (4-CN-dipBeet, **3d**), ocorre a desestabilização e aumenta o caráter eletrofílico do carbono aldimínico. No entanto foi observado um efeito *push-pull* de densidade eletrônica quando a molécula possuía um grupo doador e outro doador de

densidade em cada fenila. Este efeito faz com que haja o aumento da eletrofilicidade do carbono causado por dois sistemas que conseguem deslocar a nuvem eletrônica. A metoxila doa densidade eletrônica e a nitrila atrai, diminuindo a estabilização das carga positiva sobre o nitrogênio imínico.^{91,92}



Esquema 21: Mecanismo de hidrólise para as dipBeets.

5. Conclusão

Foram sintetizadas 14 betalaínas fenílicas (pBeets) com substituintes doadores e atraentes de densidade eletrônica. As pBeets que possuíam grupos doadores ($\sigma < 0$) apresentaram maior estabilidade frente a hidrólise em tpBR pH 2, 5 e 8,5, quando comparadas com as que possuíam grupos atraentes de densidade eletrônica ($\sigma > 0$). O mecanismo de hidrólise depende da característica eletrônica do grupo, que influencia diretamente o estado de protonação da molécula e ativa diferentes posições para o ataque do nucleófilo, conforme observado pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios nos espectros de ^1H RMN. Porém, há a mudança na etapa lenta da reação, principalmente em pH básico, onde muda para os substituintes fortemente atraentes de densidade eletrônica. A mudança estrutural não afetou as propriedades fotofísicas, exceto o rendimento quântico de fluorescência, que aumentou significativamente quando foram adicionados dois grupos nitrila no anel, sendo até o momento a betalaína mais fluorescente reportada na literatura em meio aquoso a 25 °C.

As anilinas metiladas precursoras das N-Me-pBeets foram sintetizadas utilizando um protocolo seletivo de monometilação e as respectivas quatro betalaínas foram obtidas. A estabilidade aumentou significativamente com a mudança estrutural realizada. A adição do grupo metil ao nitrogênio imínico criou um ambiente hidrofóbico comprometeu a hidrólise, aumentando o tempo de meia-vida, porém a característica eletrônica do substituinte continua a exercer influência sobre a estabilidade, conforme visto para a família de pBeets. A metilação também levou ao deslocamento hipsocrômico dos máximos de absorção e diminuição do rendimento quântico de fluorescência, enquanto que os máximos de emissão de fluorescência não tiveram alteração considerável.

Foram sintetizadas 5 difenilaminas simétricas e assimétricas, com substituintes metóxi e nitrila nas posições 4 e 4' das partes fenílicas, bem como o composto não substituído e as respectivas difenilbetalaínas, dipBeets. Conforme observado anteriormente para as *N*-metil betalaínas, a adição de uma fenila, com ou sem substituição, causou um aumento considerável na estabilidade, mas pouco influenciou nas propriedades fotosíficas. Os máximos de absorção tiveram um deslocamento ipsocrômico e o máximo de emissão de fluorescência praticamente não foi alterado. O rendimento quântico de fluorescência foi outra propriedade que teve uma diminuição considerável, porém quando comparado com as *N*-Me-pBeets, não teve alteração.

Ao total foram sintetizadas 23 betalaínas derivadas de anilinas *para*-substituídas, *N*-metil anilinas e difenilaminas com substituintes variando desde doadores até atraentes de densidade eletrônica e, dentre as 23 betalaínas deste estudo, 19 são compostos inéditos. Pudemos avaliar todas as propriedades que sabíamos medir e concluir que, dependendo da sua aplicabilidade, as propriedades fotofísicas e de estabilidade podem ser moduladas pela simples adição/remoção de grupos. Quando acontece a transformação de uma betalaína derivada de uma amina primária, para uma betalaína derivada de amina secundária, ocorre o aumento da estabilidade frente a processos de degradação, mas diminui os rendimentos quânticos de fluorescência e desloca os máximos de absorção para comprimentos de onda mais energéticos. Porém, dentro desta mesma família é possível controlar esses efeitos com a adição de grupos atraentes ou doadores de densidade eletrônica (*e.g.* metoxila ou nitrila) e, conforme a aplicação, construir betalaínas que se adequem às necessidades desejadas.

6. Parte experimental

6.1. Informações gerais

Os solventes e anilinas comercialmente disponíveis foram utilizadas sem prévia purificação.

6.2. Soluções de trabalho

Soluções tampão: As soluções tampão preparadas foram armazenadas a 8°C para uso em até um mês. O valor de pH da solução foi verificado e, caso necessário, aferido, em temperatura ambiente, antes de cada ensaio.

Solução tampão Britton-Robinson (acetato-fosfato-borato, 40 mmol L⁻¹, pH 1,1 -11): 2,5 g de H₃BO₃ (pKa = 9,24), 2,3 mL de CH₃COOH (pKa = 4,76, d = 1,049 g/mL) e 1,9 mL H₃PO₄ (pKa1 = 2,14; pKa2 = 7,21; pKa = 12,36, d = 1,685 g/mL) foram dissolvidos em 1 L de água. Foram adicionados, sob agitação, porções de solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹ ajustando os valores de pH da solução tampão para o valor desejado.

Fases móveis para HPLC-DAD-ESI(+)-TOF: As soluções foram preparadas imediatamente antes das análises cromatográficas e agitadas em banho ultrassônico por 15 min antes de sua utilização. **Solvente A** (0,05% ácido fórmico/água): 125 µL de ác. fórmico foram diluídos em 250 mL de água. **Solvente B** (0,05% ácido fórmico/acetonitrila): 125 µL de ác. fórmico foram diluídos em 250 mL de acetonitrila.

Voltametria cíclica: Solução aquosa de KCl 0,1 mol L⁻¹: 1,864 g de KCl foram solubilizados em 250 mL de água; a solução foi mantida a temperatura ambiente.

6.3. Extração de ácido betalâmico

Em procedimento padrão do grupo⁴⁸, adaptado da literatura³⁶; cerca de 2 kg de beterrabas frescas (*Beta vulgaris*) foram cortadas e processadas em uma centrífuga de

alimentos tipo juicer (Phillips-Walita, modelo PI1855). Cerca de 500 mL de suco foi filtrado em filtro de pano e transferido para um béquer de 1 L e resfriado a 10 °C. Sob agitação mecânica, foi adicionado hidróxido de amônio 27%, até que a solução atingisse valor de pH 11,4, acompanhado com o auxílio de um eletrodo de pH mergulhado cuidadosamente no suco. Após cerca de 1h, ainda sob agitação mecânica, foi observada a mudança de coloração da solução de vinho para castanho amarelada, indicando que houve a hidrólise das betalaínas presentes no suco, formando ácido betalâmico (HBt). O béquer foi mergulhado em banho de gelo seco com etanol, de forma que a temperatura da solução ficasse próxima a 0 °C, em seguida, foi adicionado em pequenas porções, de forma que a temperatura da solução não fosse superior a 5 °C, de HCl 37% até que o valor de pH da solução fosse 1,5. Duas extrações com acetato de etila (50 mL, ou 10% do volume inicial de suco) foram realizadas. Cerca de 90 mL da suspensão contendo fase orgânica (HBt em acetato de etila), e suco foi centrifugada a 7.000xg, 2 min, 0 °C. O sobrenadante amarelo foi congelado em banho de etanol e gelo seco (-8 0 °C), de forma que cristais brancos de gelo contendo sais e água se formassem. O precipitado foi filtrado e a concentração da solução de HBt em acetato de etila foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{378\text{ nm}}^{\text{AcOEt}} = 30000$). Em uma extração são obtidos 50 mL de HBt $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, cerca de 6 mg do composto. O rendimento em mol, calculado a partir da concentração inicial de betalaínas (betacianinas e betaxantinas) no suco, é de cerca de 1%.

6.4. Síntese das aminas precursoras

6.4.1. Síntese das N-metil aminas

Em um balão de duas bocas de 10 mL, equipado com um condensador de refluxo, foram adicionadas anilinas (1a-1m) (1 mmol, 1 eq.), 2 mL de DMC e o catalizador zeólita

Faujasita do tipo NaY na proporção de 1:1 para a massa da respectiva amina. A reação foi refluxada a 90 °C por 16h e finalizada com a adição de acetato de etila. O catalisador foi removido por filtração simples e a mistura foi seca por pressão reduzida. O bruto da reação foi cromatografado em fase normal e fase móvel com tolueno e metanol.⁹³

6.4.2. Síntese das diarilaminas

Em um tubo selado de 10 mL de microondas (Anton Paar G10) foram adicionados Pd(OAc)₂ (4,45 mg, 2 mol%) e *rac*-BINAP (18,68 mg, 3 mol%) com 2 mL de tolueno anidro sob atmosfera de N₂ e 20 min de agitação para a formação do complexo. Essa mistura foi adicionada com os respectivos iodobenzenos (1 mmol, 1eq.), anilinas (1.1 mmol, 1.1 eq.) e *t*-butóxido de potássio (168 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq.). A reação foi deixada a 140 °C por 1 hora em microondas Monowave 300 Anton Paar. Após esse período a reação foi esfriada e adicionado água gelada. A extração foi realizada com éter etílico (2 x 70 mL) e a fase orgânica foi seca com MgSO₄ e evaporada sob pressão reduzida. O bruto da reação foi cromatografado em coluna de fase normal e fase móvel com a combinação de n-heptano e acetato de etila.⁹⁴

6.5. Semissíntese de betalaínas

A uma solução de ácido betalâmico em acetato de etila (9 μmol, 1eq.) foram adicionados ácido *p*-toluenossulfônico (45 μmol, 5 eq.) em frasco âmbar e as respectivas anilinas comerciais e sintéticas (45 μmol, 5 eq.). A mistura reacional foi então mantida a – 20°C por 48h, para precipitação da betalaína. O precipitado foi centrifugado a 10.000 xg, 0°C, por 10 min em tubo de centrífuga de teflon, para recuperação da betalaína. O sobrenadante foi removido com pipeta de Pasteur e o precipitado foi lavado com pequenas quantidades de acetato de etila gelado (cerca de 5 mL) para remoção de excesso de amina precursora e novamente centrifugado nas mesmas condições; o sobrenadante de acetato

de etila foi removido e uma nova lavagem foi executada. O solvente remanescente nos tubos foi removido por meio de fluxo de N₂. O sólido seco da betalaína bruta foi ressuspenso em água, congelado e liofilizado, e armazenado novamente no freezer antes da purificação.

As amostras brutas das betalaínas foram purificadas por cromatografia de permeação em gel (GPC), com Sephadex LH20 como fase estacionária e água como eluente, fluxo 4 mL min⁻¹. A fração rosa resultante de cada uma das purificações foi coletada, congelada e liofilizada em seguida. A coluna de Sephadex LH20 foi então limpa com 3 volumes de coluna de metanol, posteriormente com 5 volumes de água e reempacotada novamente para ser utilizada.

6.6. Elucidação estrutural

A elucidação estrutural das betalaínas semissintetizadas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* em modo positivo (HPLC-DAD-ESI(+)-TOF) e por espectroscopia de ressonância magnética (RMN), realizadas na Central Analítica do IQ-USP.

6.6.1. HPLC-DAD-ESI(+)-TOF

A análise por HPLC-DAD-ESI(+)-TOF foi realizada num HPLC Shimadzu Prominence equipado com um detector UV/Vis PDA SPD-M20A e espectrômetro de massas Bruker Maxis 3G qTOF equipado com uma fonte *electrospray* ESI e detector qTOF. O cromatógrafo foi utilizado com uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.8 µm) mantida a 25 °C. Nitrogênio ultrapuro foi utilizado como nebulizador (2.8 Bar) e gás secante (8 L min⁻¹, 200 °C). A voltagem do capilar utilizada foi de 4.500 V. Condições da corrida: gradiente linear de 5–100% B em 7 min, sendo A uma solução

0,05% de ácido fórmico em água, e B, 0,05% de ácido fórmico em acetonitrila, para as amostras de pBeets e gradiente linear de 5-100% B em 9 min para as N-Me-pBeets e dipBeets. As corridas foram realizadas sob fluxo de 0.2 mL min⁻¹ e o volume de injeção de 5 µL.

O erro experimental da correlação massa/carga (m/z), em ppm (partes por milhão) foi obtido pela correlação⁹⁵:

$$Erro = \frac{(m_a - m_e)}{m_a} \times 10^6 \quad \text{Equação 2}$$

onde, m_a corresponde à massa exata calculada e m_e , à massa exata obtida experimentalmente.

6.6.2. GC-MS

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas num equipamento Shimadzu GCMS-QP2010 equipado com autosampler AOC-5000 Plus, um detector de massas por impacto eletrônico e uma coluna capilar RTX-5MS (difetil dimetil polisiloxano – 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm). As amostras foram injetadas a 280 °C sob uma pressão de 100 kPa no modo split. O forno foi mantido a 100 °C por 2 min e a temperatura aumentada para 280 °C numa taxa de 18 °C min⁻¹. Essa temperatura final foi mantida por 2 min e depois reduzida para a temperatura inicial. O He foi utilizado como gás de arraste sob um fluxo de 1.33 mL min⁻¹. O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo com a fonte a 260 °C. Este foi ligado em 2.5 min para evitar a detecção de solventes e a faixa de aquisição de m/z foi de 35-400.

6.6.3. Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

Os experimentos de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos a 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C, equipado com

uma sonda de tripla ressonância (TXI) de 5mm com detecção inversa. As amostras de betalaínas foram solubilizadas em D₂O, imediatamente antes da aquisição dos espectros, com concentração de cerca de 1 mg mL⁻¹. Os ensaios de 1H e 13C com supressão do sinal da água (zgpr) foram realizados com as soluções em tubos de 5mm, com ns = 128, td = 64K, ds = 4.

Os deslocamentos químicos (δ) estão representados em unidades de partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do TSP (δ 0.00) para as betalaínas e CDCl₃ (δ 7.26) and DMSO-d₆ (δ 2.50) para as aminas. As multiplidades dos sinais foram dadas como: s (singlete); br s (singlete largo); d (dubleto); t (triplete); m (multiplete) e dd (duplo dubleto).

6.7. Caracterização fotofísica

6.7.1. Absorção, emissão e excitação

Os espectros de absorção foram adquiridos em espectrofotômetro Cary 50 Varian equipado com porta cubetas Peltier termostaticado e os espectros de emissão e excitação em espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian. Na aquisição dos espectros foram utilizadas cubetas de quartzo de volume final de 1,5 mL e caminho ótico de 10 mm. A temperatura das celas foi mantida a 25°C por meio de banho termostático acoplado a ambos os equipamentos. As amostras apresentavam densidade óptica de 0,7 e a configuração do espectrofluorímetro empregada na obtenção dos espectros de emissão das betalaínas foi de: $\lambda_{EX} = 500 \text{ nm}$; $\lambda_{EM} = 520 - 570 \text{ nm}$, $f_{ex} = 20 \text{ nm}$, $f_{em} = 20 \text{ nm}$, tensão = 600 V; e de excitação: $\lambda_{EM} = 550 \text{ nm}$; $\lambda_{EX} = 300 - 530 \text{ nm}$, $f_{ex} = 20 \text{ nm}$, $f_{em} = 20 \text{ nm}$, tensão = 600 V.

6.7.2. Rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{FL}) foram determinados utilizando-

se Rodamina B (em etanol, 0.05 mol L⁻¹, 25 °C) como padrão secundário ($\Phi_f = 0.50$, excitação (EX) 500 nm e emissão (EM) 520 – 750 nm)⁹⁶ através da equação, devido a semelhança entre os espectros de absorção e emissão da rodamina B em etanol e das betalaínas estudadas. Espectros de absorção e emissão de amostras de diferentes concentrações de betalaína e padrão foram adquiridos nas mesmas condições experimentais, de forma que a densidade óptica da amostra fosse inferior a 0,1⁹⁷. Um gráfico que correlaciona a área de emissão com a absorção do composto foi construído para cada betalaína, e o coeficiente angular da reta traçada com intercepto igual a zero foi correlacionado com o padrão⁹⁷.

$$\phi_{FL}^x = \phi_{FL}^p \frac{\alpha^x}{\alpha^p} \left(\frac{\eta^x}{\eta^p} \right)^2 \quad \text{Equação 3}$$

onde, Φ_f = rendimento quântico de fluorescência, α = coeficiente angular da área sob a curva de emissão de fluorescência vs. absorção, e η = índice de refração; x e p se referem à betalaína e à rodamina B, respectivamente.

Os espectros de absorção e emissão das amostras e do padrão foram adquiridos em cubeta de quartzo de 1,5 mL com caminho ótico de 10 mm. As soluções foram diluídas de forma que em $\lambda^{ABS} = 500$ nm a absorção da amostra fosse inferior a 0,1, a fim de evitar efeitos de reabsorção da amostra. Os espectros de emissão do padrão e das betalaínas foram adquiridos nas mesmas condições do equipamento: $\lambda_{EX} = 500$ nm; $\lambda_{EM} = 520 - 750$ nm, $f_{ex} = f_{em} = 20$ nm, tensão = 600 V).

6.7.3. Determinação do coeficiente de atenuação molar

O coeficiente de atenuação molar (ϵ) das cBeets foi determinado pelo método do ponto final (*end point*)¹⁹. A decomposição das betalaínas em solução tampão Britton-Robinson pH 8,5 foi monitorada em cubeta de quartzo (caminho ótico de 1 cm, 1,5 mL)

por espectroscopia de absorção na faixa de 250–700 nm, a 25 °C, de acordo com procedimento descrito a seguir: 200 µL de solução aquosa de betalaína foi adicionada a 800 µL de tampão Britton-Robinson pH 7; após seu espectro de absorção ser registrado, a mesma diluição das betalaína foi realizada substituindo a solução tampão em pH 7 por uma solução tampão da mesma concentração em pH 8,5. A cinética de hidrólise em pH 8,5 foi acompanhada por 300 min, com aquisição de espectros de absorção a cada 5 min. Ao término da cinética, o ϵ foi determinado correlacionando a concentração final de ácido betalâmico (HBt), precursor produto da hidrólise, com valor de ϵ conhecido, com a concentração inicial da betalaína em pH 7:

$$C_{HBt}^{Final} = C_{Bet}^{Inicial} \quad \text{Equação 4}$$

Considerando-se a Lei de Beer-Lambert, temos que:

$$\frac{Abs^{Bet}}{\epsilon^{Bet}} = \frac{Abs^{HBt}}{\epsilon^{HBt}} \quad \text{Equação 5}$$

Reorganizando, o coeficiente de atenuação molar das betalaínas foi então determinado pela seguinte relação:

$$\epsilon^{Bet} = \frac{Abs^{Bet}}{Abs^{HBt}} \times \epsilon^{HBt} \quad \text{Equação 6}$$

O valor de ϵ do HBt utilizado para o cálculo foi de $\epsilon^{424 \text{ nm}} = 26.270 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.⁴⁰

6.8. Estudo cinético

As cinéticas de hidrólise em tampão Britton-Robinson 40 mM de pH 2, 5 e 8,5 a 25°C para as pBeets e pH 5 a 60 °C para as N-Me-pBeets e dipBeets foram acompanhadas com o auxílio de espectrofotômetro Varian por 12h (aquisição do espectro de absorção na faixa de 250 – 750 nm a cada 10 min). As medições foram realizadas em cubetas de quartzo de 1,5 mL, caminho ótico de 1 cm, com um volume final de solução de 1 mL. O

tempo de meia-vida de hidrólise ($\tau_{1/2}$) e a constante de hidrólise (k_{obs}) foram determinados através do gráfico do valor de absorção do máximo comprimento de onda das betalaínas vs. o tempo. Foi realizado um ajuste monoexponencial através do software Origin 2016 b9.3.226 (Academic), o qual nos fornece os valores acima mencionados.

6.9. Voltametria cíclica

Experimentos de voltametria cíclica foram conduzidos empregando-se um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT101 (Metrohm), utilizando o software NOVA 1.1. As medidas foram realizadas em cela eletroquímica adquirida do prof. Cecílio Sadao Fugivara (IQ Unesp-CAr), composta por 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 mVs^{-1} e o potencial foi varrido de -1 V a $+1$ V, em janela aberta. Em seguida de varredura em janela fechada, entre 0,3 a 1,0 V, com 8 ciclos de varredura. As soluções aquosas das betalaínas foram preparadas em KCl 0,1 mol L^{-1} , também utilizado como solução controle nos ensaios, numa concentração fixa de 8×10^{-5} mol L^{-1} para determinação do potencial de pico anódico ($E_{p,a}$).

Todas as varreduras de betalaínas 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 $K_3[Fe(CN)_6]$ 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); (iv) registro do branco do próximo voltamograma, na janela de potencial desejada, com solução de KCl 0,1 mol L^{-1} . Tal procedimento foi

realizado de forma a garantir que o eletrodo de trabalho estivesse em condições idênticas às iniciais e é fundamental, uma vez que ocorre adsorção das betalaínas na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

7. Referências

1. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2009).
2. Bartley, G. E. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *PLANT CELL ONLINE* (1995). doi:10.1105/tpc.7.7.1027
3. Grotewold, E. THE GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF FLORAL PIGMENTS. *Annu. Rev. Plant Biol.* (2006). doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105248
4. Brockington, S. F., Walker, R. H., Glover, B. J., Soltis, P. S. & Soltis, D. E. Complex pigment evolution in the. 854–864 (2011).
5. Strack, D., Vogt, T. & Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247–269 (2003).
6. Gonçalves, L. C. P. *et al.* Betalainas: Das cores das beterrabas à fluorescência das flores. *Rev. Virtual Quim.* **7**, 292–309 (2015).
7. Kimler, L., Mears, J., Mabry, T. J. & Rösler, H. On the question of the mutual exclusiveness of betalains and anthocyanins. *Taxon* (1970). doi:10.2307/1218301
8. Khan, M. I. Stabilization of betalains: A review. *Food Chem.* **197**, 1280–1285 (2016).
9. Agati, G., Matteini, P., Oliveira, J., De Freitas, V. & Mateus, N. Fluorescence approach for measuring anthocyanins and derived pigments in red wine. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 10156–10162 (2013).
10. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R. & Paredes-López, O. *Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis,*

Processing, and Stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **40**, (2000).

11. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Botany: floral fluorescence effect. *Nature* **437**, 334 (2005).
12. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta* **222**, 586–593 (2005).
13. García-Plazaola, J. I. *et al.* Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Sci.* **236**, 136–145 (2015).
14. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *J. Nat. Prod.* **75**, 1030–1036 (2012).
15. Kanner, J., Harel, S. & Granit, R. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5178–5185 (2001).
16. Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. & Jiménez-Atiénzar, M. Fluorescent bioinspired protein labeling with betalamic acid. Derivatization and characterization of novel protein-betaxanthins. *Dye. Pigment.* **133**, 458–466 (2016).
17. Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L. & Nair, M. G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *J. Agric. Food Chem.* (2005). doi:10.1021/jf051399j
18. Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B. & Rimbach, G. Betanin-A food colorant with biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 36–47 (2015).
19. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **232**, 449–460

- (2010).
20. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *J. Nat. Prod.* **72**, 1142–1146 (2009).
 21. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.* **71**, 41–50 (2006).
 22. Stintzing, F. C., Trichterborn, J. & Carle, R. Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chem.* **94**, 296–309 (2006).
 23. Wahyuningsih, S., Wulandari, L., Wartono, M. W., Munawaroh, H. & Ramelan, A. H. The Effect of pH and Color Stability of Anthocyanin on Food Colorant. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **193**, (2017).
 24. Gonçalves, L. C. P., Da Silva, S. M., DeRose, P. C., Ando, R. A. & Bastos, E. L. Beetroot-Pigment-Derived Colorimetric Sensor for Detection of Calcium Dipicolinate in Bacterial Spores. *PLoS One* **8**, e73701 (2013).
 25. Sandquist, C. & McHale, J. L. Improved efficiency of betanin-based dye-sensitized solar cells. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* (2011). doi:10.1016/j.jphotochem.2011.04.030
 26. Calogero, G. *et al.* Anthocyanins and betalains as light-harvesting pigments for dye-sensitized solar cells. *Sol. Energy* (2012). doi:10.1016/j.solener.2012.02.018
 27. Pavliuk, M. V. *et al.* Nano-hybrid plasmonic photocatalyst for hydrogen production at 20% efficiency. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
 28. Fernandes, D. L. A. *et al.* Green microfluidic synthesis of monodisperse silver nanoparticles via genetic algorithm optimization. *RSC Adv.* **6**, 95693–95697

- (2016).
29. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. *PLoS One* **8**, e53874 (2013).
 30. Sunnadeniya, R. *et al.* Tyrosine hydroxylation in betalain pigment biosynthesis is performed by cytochrome P450 enzymes in beets (*Beta vulgaris*). *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
 31. Hatlestad, G. J. *et al.* The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nat. Genet.* **44**, 816–820 (2012).
 32. Terradas, Fernand; Wyler, H. 2,3- and 4,5-Secodopa, the Biosynthetic Intermediates Generated from L-Dopa by an Enzyme System Extracted from the Fly Agaric, *Amanita muscaria* L., and Their Spontaneous Conversion to Muscaflavin and Betalamic Acid, Respectively, and Betalains. *Helv. Chim. Acta* **74**, 124–140 (1991).
 33. Roberts, M. F., Strack, D. & Wink, M. *Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition* **40**, (2010).
 34. Gandía-Herrero, F. & García-Carmona, F. Characterization of recombinant *Beta vulgaris* 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase active in the biosynthesis of betalains. *Planta* **236**, 91–100 (2012).
 35. Mueller, L. A., Hinz, U. & Zryd, J. P. The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant DOPA- dioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry* **44**, 567–569 (1997).
 36. Schliemann, W., Kobayashi, N. & Strack, D. The Decisive Step in Betaxanthin Biosynthesis Is a Spontaneous Reaction. *Plant Physiol.* **119**, 1217–1232 (1999).
 37. Grewal, P. S., Modavi, C., Russ, Z. N., Harris, N. C. & Dueber, J. E. Bioproduction

- of a betalain color palette in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **45**, 180–188 (2018).
38. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Stability and color changes of thermally treated betanin, phyllocactin, and hylocerenin solutions. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 390–398 (2006).
 39. Steglich, W. & Strack, D. -Chapter 1 - Betalains. in *The Alkaloids* **39**, (1990).
 40. Gonçalves, L. C. P. Betalaínas: semissíntese, capacidade antirradicalar e aplicação como sondas em sistemas biológicos. (Universidade Federal do ABC, 2012).
 41. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins. *J. Chromatogr. A* **1078**, 83–89 (2005).
 42. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Fluorescent pigments: New perspectives in betalain research and applications. *Food Res. Int.* **38**, 879–884 (2005).
 43. Rodrigues, A. C. B. Efeitos do meio sobre as propriedades fotofísicas de betalaínas e sua estabilidade na presença de Cu(II). (Universidade Federal do ABC, 2012).
 44. Bartoloni, F. H. *et al.* Photophysics and hydrolytic stability of betalains in aqueous trifluoroethanol. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **144**, 567–571 (2013).
 45. Wendel, M. *et al.* Photophysical properties of indicaxanthin in aqueous and alcoholic solutions. *Dye. Pigment.* **113**, 634–639 (2015).
 46. Esteves, L. C. Estudo cinético da hidrólise de betalaínas-modelo. (Universidade de São Paulo, 2016).
 47. Esteves, L. C. *et al.* Revisiting the Mechanism of Hydrolysis of Betanin. *Photochem. Photobiol.* n/a-n/a doi:10.1111/php.12897

48. Nakashima, K. K. Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalaínas. (Univesidade de São Paulo, 2015).
49. Carey, F. A. & Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*. (Springer, 2007).
50. Clayden, J., Greevs, N., Warren, S. & Wothers, P. *Organic Chemistry. The Chemical Educator* (2001). doi:10.1086/278635
51. Smith, M. B. & March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* (John Wiley & Sons, Inc, 2006). doi:10.1002/9780470084960
52. Waser, M. Iminium Catalysis. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **96**, 45–68 (2012).
53. Novak, M. *et al.* Hydrolysis of N-Acetyl-p-benzoquinone Imines : pH Dependence of the Partitioning of a Tetrahedral Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4447–4456 (1989).
54. Quina, F. H. & Bastos, E. L. Fundamental Aspects of Quantitative Structure-Reactivity Relationships. in *Encyclopedia of physical organic chemistry* (eds. Wang, Z., Wille, U. & Juaristi, E.) 437–490 (John Wiley & Sons, Inc., 2017). doi:10.1002/9781118468586.epoc1013
55. Hoffmann, J., Licnar, J. K., Sterba, V. & Vecera, M. KINETICS OF HYDROLYSIS OF SUBSTITUTED SALICYLIDENEANILINES. *Collect. Czechoslov. Chem. Commum.* **35**, 1387–1398 (1970).
56. Rodrigues, A. C. B. Betalaínas cBeet e csBeet: semissíntese, propriedades fotofísicas e interações intermoleculares. (Universidade de São Paulo, 2017).
57. Hansch, C., Leo, a & Taft, R. W. A Survey of Hammett Substituent Constants and

- Resonance and Field Parameters. *Chem. Rev.* **91**, 165–195 (1991).
58. Butera, D. *et al.* Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *J Agric Food Chem* **50**, 6095–6901 (2002).
59. Wybraniec, S. *et al.* Antioxidant activity of betanidin: electrochemical study in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 12163–12170 (2011).
60. Guram, A. S. & Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with in situ Generated Aminostannanes. *J. Am. Chem. Soc.* (1994). doi:10.1021/ja00096a059
61. Guram, A. S., Rennels, R. A. & Buchwald, S. L. A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines. *Angew. Chemie Int. Ed. English* (1995). doi:10.1002/anie.199513481
62. Paul, F., Patt, J. & Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Formation of Carbon-Nitrogen Bonds. Reaction Intermediates and Catalyst Improvements in the Hetero Cross-Coupling of Aryl Halides and Tin Amides. *Journal of the American Chemical Society* (1994). doi:10.1021/ja00092a058
63. Louie, J. & Hartwig, J. F. Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents. *Tetrahedron Lett.* (1995). doi:10.1016/0040-4039(95)00605-C
64. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem. Anal.* **17**, 262–269 (2006).
65. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem.* **131**, 231–238 (2012).

66. Qin, W., Long, S., Panunzio, M., Biondi, S. & Neuf, V. Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. *Molecules* **18**, 12264–12289 (2013).
67. Reichardt, C. Chiral polymethine dyes: A remarkable but forgotten conjugated ? system. *J. Phys. Org. Chem.* (1995). doi:10.1002/poc.610081202
68. Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. John Wiley & Sons (2012). doi:10.1002/9783527650002
69. Qin, C. & Clark, A. E. DFT characterization of the optical and redox properties of natural pigments relevant to dye-sensitized solar cells. *Chem. Phys. Lett.* **438**, 26–30 (2007).
70. Stintzing, F. C., Kugler, F., Carle, R. & Conrad, J. First ¹³C-NMR Assignments of Betaxanthins. *Helv. Chim. Acta* **89**, 1008–1016 (2006).
71. Rodrigues, A. C. B. *et al.* Bioinspired water-soluble two-photon fluorophores. *Dye. Pigment*. in press (2018). doi:10.1016/j.dyepig.2017.11.020
72. Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B. & Mizrahi, Y. ¹H and ¹³C NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1725–1728 (2006).
73. Perrin, D. D. Dissociation constants of inorganic acids and bases in aqueous solution. *Pure Appl. Chem.* **20**, 8–42 (1969).
74. Gross, K. C. & Seybold, P. G. Substituent effect on the physical properties and pK_a of aniline. *Int. J. Quantum Chem.* **80**, 1107–1115 (2000).
75. Mesmer, R. E. & Herting, D. L. Thermodynamics of Ionization of D₂O and D₂PO₄⁻. *J. Solution Chem.* **7**, 901–913 (1978).
76. Anslyn, E. V & Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry. interactions* **69**, (2006).

77. Chang, C. T. Propriedades fotofísicas e fotoquímicas de derivados de naftol e quinolina. Um estudo de fotoácido e fotobase como possíveis fios moleculares. (University of São Paulo, 2002).
78. Wendel, M. *et al.* Photophysical properties of betaxanthins: Vulgaxanthin I in aqueous and alcoholic solutions. *J. Lumin.* **167**, 289–295 (2015).
79. Niziński, S. *et al.* Photophysical properties of betaxanthins: miraxanthin V – insight into the excited-state deactivation mechanism from experiment and computations. *RSC Adv.* **7**, 6411–6421 (2017).
80. Wendel, M. *et al.* Time-resolved spectroscopy of the singlet excited state of betanin in aqueous and alcoholic solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 18152–18158 (2015).
81. Nad, S. & Pal, H. Unusual Photophysical Properties of Coumarin-151. *J. Phys. Chem. A* **105**, 1097–1106 (2001).
82. Pal, H., Nad, S. & Kumbhakar, M. Photophysical properties of coumarin-120: Unusual behavior in nonpolar solvents. *J. Chem. Phys.* **119**, 443–452 (2003).
83. Saroja, G., Sankaran, N. B. & Samanta, A. Photophysical study of two carbostyryl dyes: investigation of the possible role of a rotary decay mechanism. *Chem. Phys. Lett.* **249**, 392–398 (1996).
84. Hachiya, S., Asai, K. & Konichi, G. Unique solvent-dependent fluorescence of nitro-group-containing naphthalene derivatives with weak donor–strong acceptor system. *Tetrahedron Lett.* **54**, 1839–1841 (2013).
85. Jin, H., Liang, M., Arzhantsev, S., Li, X. & Maroncelli, M. Photophysical characterization of benzylidene malononitriles as probes of solvent friction. *J. Phys. Chem. B* **114**, 7565–7578 (2010).

86. Pasch, J. H. & von Elbe, J. H. Betanine degradation as influenced by water activity. *J. Food Sci.* **40**, 1145–1147 (1975).
87. Huang, A. & von Elbe, J. Kinetics of the Degradation of Betanine. *J. Food Sci.* **50**, 1115–1120 (1983).
88. HUANG, A. S. & ELBE, J. H. VON. Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. *J. Food Sci.* **52**, 1689–1693 (1987).
89. Barreiro, E. J., Kümmerle, A. E. & Fraga, C. A. M. The methylation effect in medicinal chemistry. *Chem. Rev.* **111**, 5215–5246 (2011).
90. Silva, P. J. & Fernando, U. V. Inductive and Resonance Effects on the Acidities of Phenol, Enols, and Carbonyl α -Hydrogens. 914–916 (2009).
91. Raczyn, E. D. & Maria, P. Enhanced Basicity of Push – Pull Nitrogen Bases in the Gas Phase Jean-Francois. (2016). doi:10.1021/acs.chemrev.6b00224
92. Ricci, F. *et al.* Photobehavior and Nonlinear Optical Properties of Push-Pull, Symmetrical, and Highly Fluorescent Benzothiadiazole Derivatives. *J. Phys. Chem. C* **120**, 23726–23739 (2016).
93. Selva, M., Tundo, P. & Perosa, A. Reaction of Functionalized Anilines with Dimethyl Carbonate over NaY Faujasite. 3. Chemoselectivity toward Mono- *N* -methylation. *J. Org. Chem.* **68**, 7374–7378 (2003).
94. Maiti, D. & Buchwald, S. L. Orthogonal Cu- and Pd-Based Catalyst Systems for the O- and N-Arylation of Aminophenols. *J. Am. Chem. Soc.* 17423–17429 (2009). doi:10.1021/ja9081815
95. Brenton, A. G. & Godfrey, A. R. Accurate mass measurement: Terminology and treatment of data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1821–1835 (2010).
96. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 2006).

97. Fery-Forgues, S. & Lavabre, D. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. *J. Chem. Educ.* **76**, 1260 (1999).

Súmula Curricular

I DADOS PESSOAIS

Nome: Renan Moraes Pioli

Local e data de nascimento: Itapira, 19 de dezembro de 1988

II EDUCAÇÃO

DOUTORADO EM QUÍMICA - Universidade de São Paulo - 2014-2018

MESTRADO EM QUÍMICA – Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara – 2012-2014

LICENCIATURA EM QUÍMICA – Universidade Polis das Artes – 2015

BACHARELADO EM QUÍMICA – Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara – 2008-2012

III FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

IV ATIVIDADES ACADÊMICAS

V. PUBLICAÇÕES

V. I. Artigos completos publicados em periódicos

1. VALLI, M.; ALTEI, W.; SANTOS, R.; LUCCA, E.; DESSOY, M.; **PIOLI, R.**; COTINGUIBA, F.; CACHET, X.; MICHEL, S.; FURLAN, M.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A.; BOLZANI, V. S. Synthetic analogue of the natural product piperlongumine as a potente inhibitor of breast cancer cell line migration. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 1. p. 1-10, 2017. Citações: 5.

2. C. P. SILVA; **R. M. PIOLI**; L. LIU; S. ZHENG; G. T. M. SILVA; V. M. T. CARNEIRO; F. H. QUINA. Improved synthesis of analogs of red wine pyranoanthocyanins pigments. **ACS Omega**. v. 3, p. 954-960, 2018. Citações: 3.

3. L. C. ESTEVES; A. C. PINHEIRO; **R. M. PIOLI**; T. C. PENNA; T. C. CORRERA; W. J. BAADER; E. L. BASTOS. Revisiting the mechanism of hydrolysis of betanin. **Photochemistry and Photobiology**. 2018. Citações: 1.

4. E. BOSCH; M. VALLI; J. NASTRI; V. LEFORT; F. COTINGUIBA; **R. M. PIOLI**; M. FURLAN; V. S. BOLZANI; C. AMI; REBOUD-RAVAUX. Piperlongumine and some of its analogs inhibit selectively the human immunoprotease over the constitutive proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 495, p.1-6, 2018. Citações 0.

V. II. Trabalhos publicados em anais de congressos (resumos)

SOARES, D. M. M.; PIOLI, R. M.; HOTTA, C. T.; BASTOS, E. L. Why are there yellow beets? IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS. Ouro Preto – MG. Junho de 2017

PIOLI, R. M.; DÖRR, B. C. F.; PINHEIRO, A. C.; RODRIGUES, A. C. B.; FERNANDES, A. B.; BAADER, W. J.; BASTOS, E. L. Substituent effect on the rate of hydrolysis and photophysical properties of phenylbetalains. IUPAC. São Paulo – SP. Julho de 2017.

VI OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

VII. Estágios de pesquisa realizados durante o doutorado

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina QFL0314-Química Orgânica Experimental, do Instituto de Química ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Universidade de São Paulo

8. Anexos

8.1. Caracterização estrutural das aminas

***N*-metilanilina.** Líquido amarelo (75 mg, 0,7 mmol, 70 %); ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,19 (dd, *J* = 8,6, 7,3 Hz, 2H), δ 6,71 (tt, *J* = 7,3, 1,1 Hz, 1H), δ 6,62 (dd, *J* = 8,6, 1,1 Hz, 2H), δ 3,69 (br s, 1H), δ 2,84 (s, 3H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 149,47, 129,34, 117,39, 112,55, 30,88; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 107 (0,8), 106 (1).

4-metoxi-*N*-metilanilina. Sólido cinza (111 mg, 0,81 mmol, 81 %); ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 6,80 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), δ 6,59 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), δ 3,75 (s, 3H), δ 3,43 (br s, 1H), δ 2,80 (s, 3H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 152,20, 143,83, 115,03, 113,77, 56,00, 31,76; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 137 (0,5), 122 (1).

4-(metilamino)benzonitrila. Sólido branco (71 mg, 0,54 mmol, 54 %); ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,19 (dd, *J* = 8,6, 7,3 Hz, 2H), δ 6,71 (tt, *J* = 7,3, 1,1 Hz, 1H), δ 6,62 (dd, *J* = 8,6, 1,1 Hz, 2H), δ 3,69 (br s, 1H), δ 2,84 (s, 3H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 152,34, 133,63, 120,69, 111,82, 98,20, 29,93; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 132 (0,7), 131 (1).

4-(metilamino)ftalonitrila. Sólido branco (28 mg, 0,11 mmol, 11 %); ¹H RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 7,68 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), δ 7,17 (q, *J* = 5,0 Hz, 1H), δ 7,07 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), δ 6,87 (dd, *J* = 8,8, 2,5 Hz, 1H), δ 2,77 (d, *J* = 5,0 Hz, 3H); ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ 152,85, 134,60, 117,60, 116,53, 115,56, 97,51, 29,01; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 157 (0,7), 156 (1).

Difenilamina. Sólido branco (161 mg, 0,95 mmol, 95 %); ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,29-7,24 (m, 4H), δ 7,10-7,05 (m, 4H), δ 6,92 (tt, *J* = 7,34, 7,34, 1,12, 1,12 Hz), δ 5,69 (br s, 1H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 143,24, 129,46, 121,12, 117,93; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 169 (1), 168 (0,5).

4-Metóxi-N-fenilamina. Sólido cinza (191 mg, 0,96 mmol, 96 %); ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,24-7,17 (m, 2H), δ 7,11-7,04 (m, 2H), δ 6,93-6,89 (m, 2H), δ 6,87-6,81 (m, 3H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 155,38, 145,29, 135,85, 129,42, 122,32, 119,67, 115,76, 114,79, 55,70; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 199 (0,6) 184 (1).

4-(fenilamino)benzonitrila. Sólido cinza escuro (137 mg, 0,71 mmol, 71 %); ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,51-7,46 (m, 2H), δ 7,40-7,33 (m, 2H), δ 7,19-7,15 (m, 2H), δ 7,12 (tt, *J* = 7,34, 1,17 Hz, 1H), δ 6,99-6,95 (m, 2H), δ 6,06 (br s, 1H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 148,14, 140,11, 133,90, 129,77, 124,12, 121,38, 120,02, 115,05, 101,65; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 194 (1) 193 (0,5).

Bis(4-metóxfenil)amina, Sólido marrom (213 mg, 0,93 mmol, 93 %); ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 6,97-6,91 (m, 4H), δ 6,84-6,80 (m, 4H), δ 5,28 (br s, 1H), δ 3,78 (s, 6H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 154,35, 138,07, 119,66, 114,84, 55,78; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 229 (0,75), 214 (1).

4,4'-azanodiildibenzonitrila. Sólido branco (55 mg, 0,25 mmol, 25 %); ¹H RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 9,45 (s, 1H), δ 7,70 (d, *J* = 8,4 Hz, 4H), δ 7,26 (d, *J* = 8,4 Hz, 4H); ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ 145,76, 133,79, 119,45, 117,30, 102,12; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 219 (1).

4-((4-metóxfenil)amino)benzonitrila. Sólido marrom (174 mg, 0,78 mmol, 78 %); ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,42 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), δ 7,12 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), δ 6,91 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), δ 6,79 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), δ 5,93 (s, 1H), δ 3,82 (s, 3H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 157,17, 149,77, 133,87, 132,63, 125,23, 120,27, 115,01, 113,87, 100,47, 55,67; GCMS *m/z* (intensidade relativa): 224 (0,8), 209 (1).

8.2. Espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN das aminas

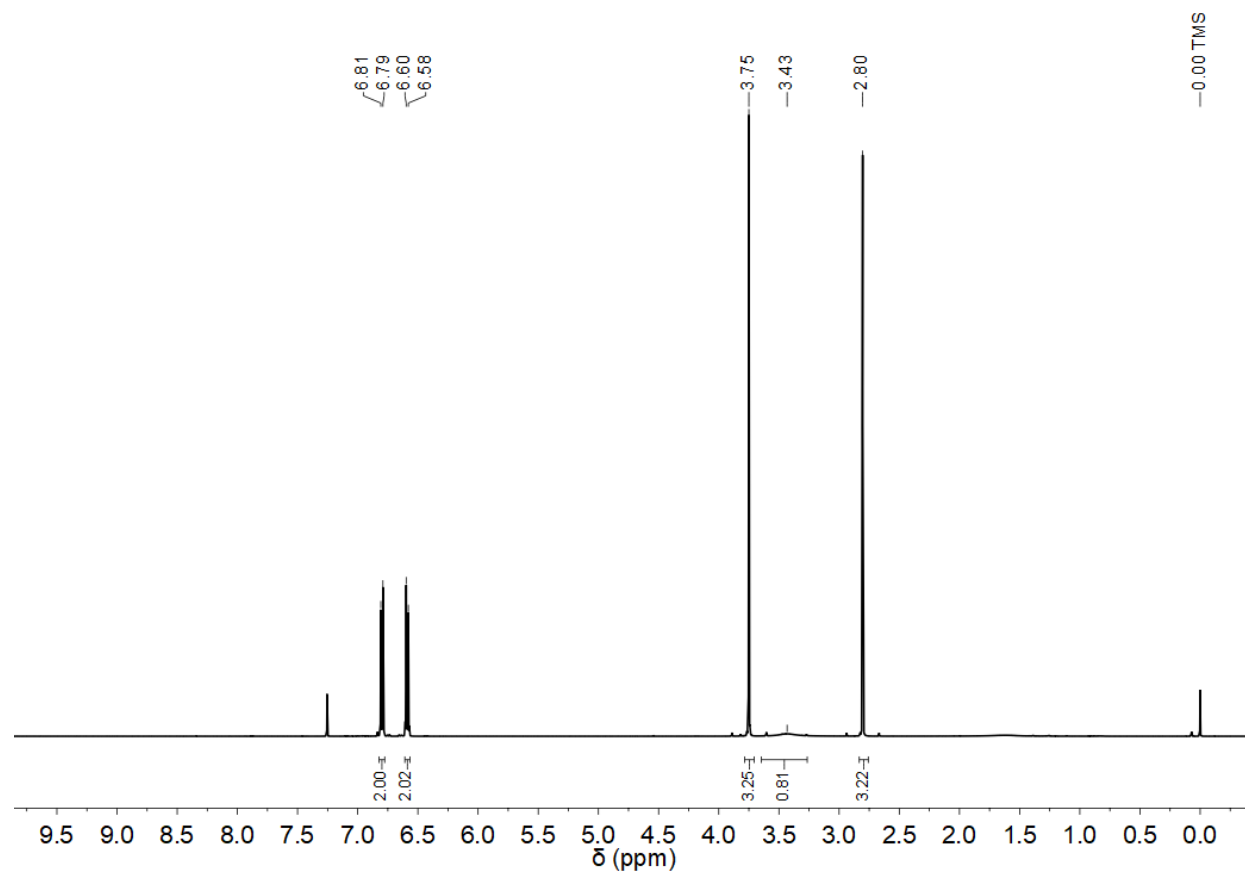


Figura 28: Espectro de ^1H RMN da 4-metóxi-*N*-metilanilina (CDCl_3 , 500 MHz).

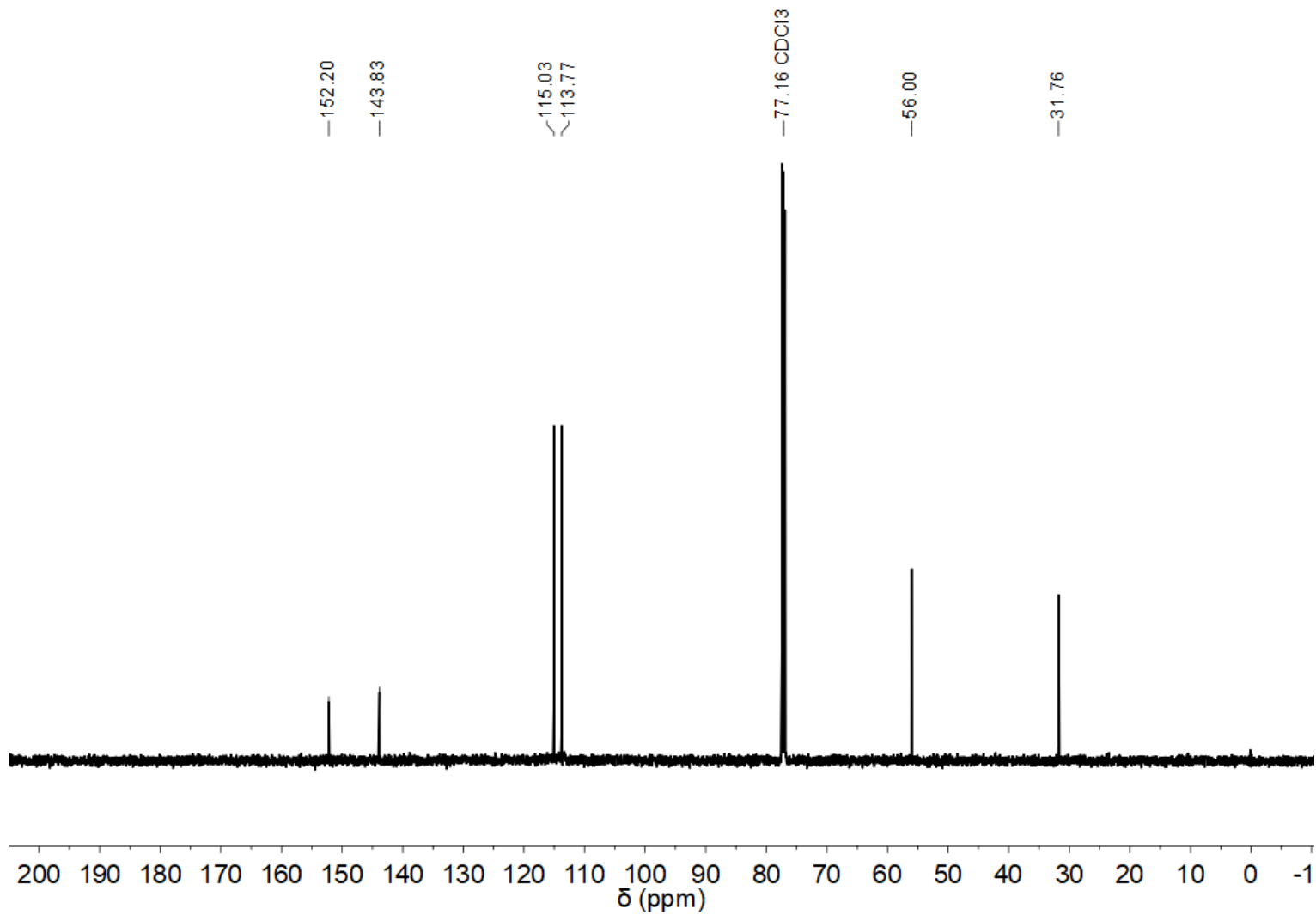


Figura 29: Espectro de ¹³C RMN da 4-metóxi-*N*-metilanilina (CDCl₃, 125 MHz).

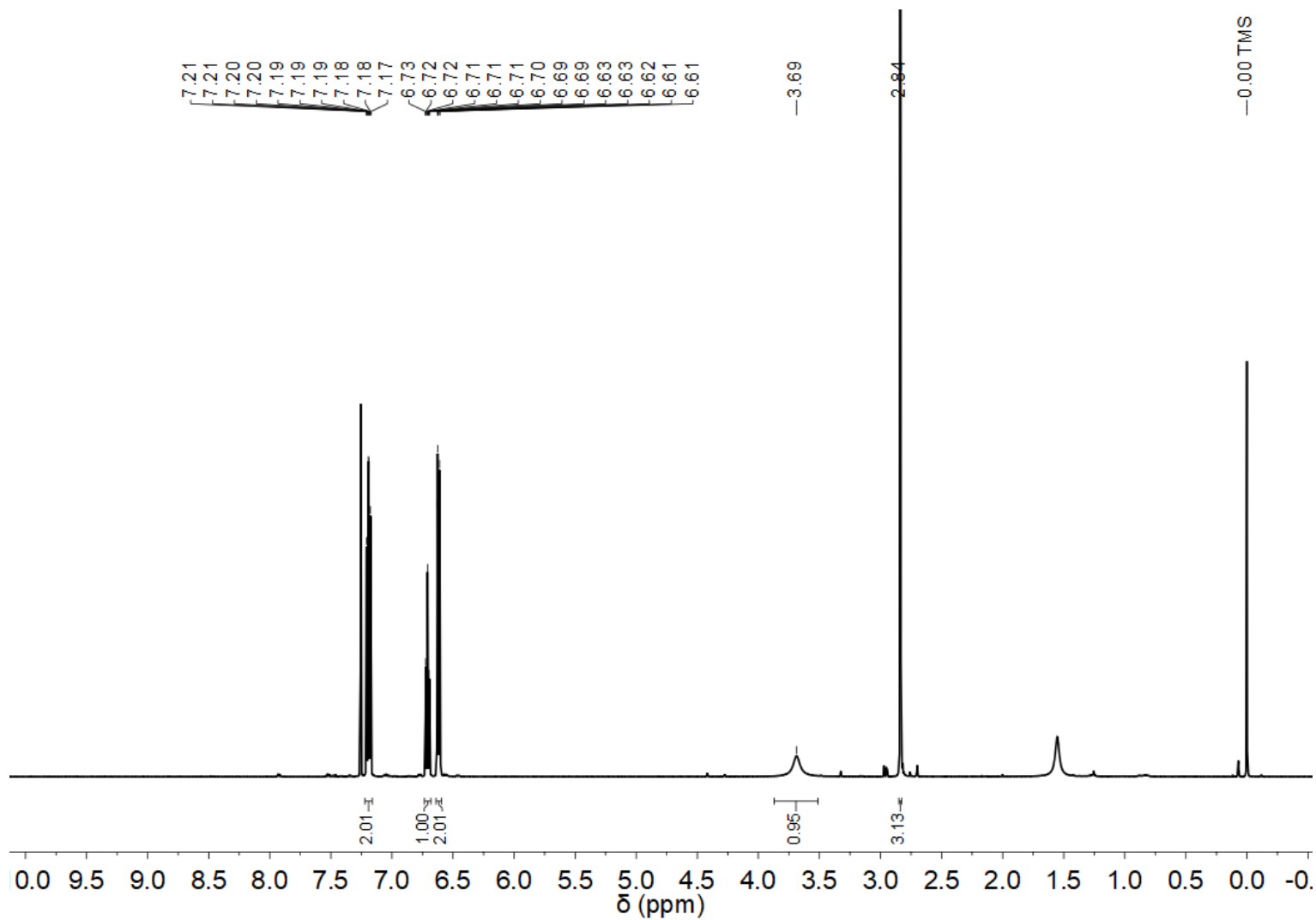


Figura 30: Espectro de ^1H RMN da *N*-metilanilina (CDCl_3 , 500 MHz).

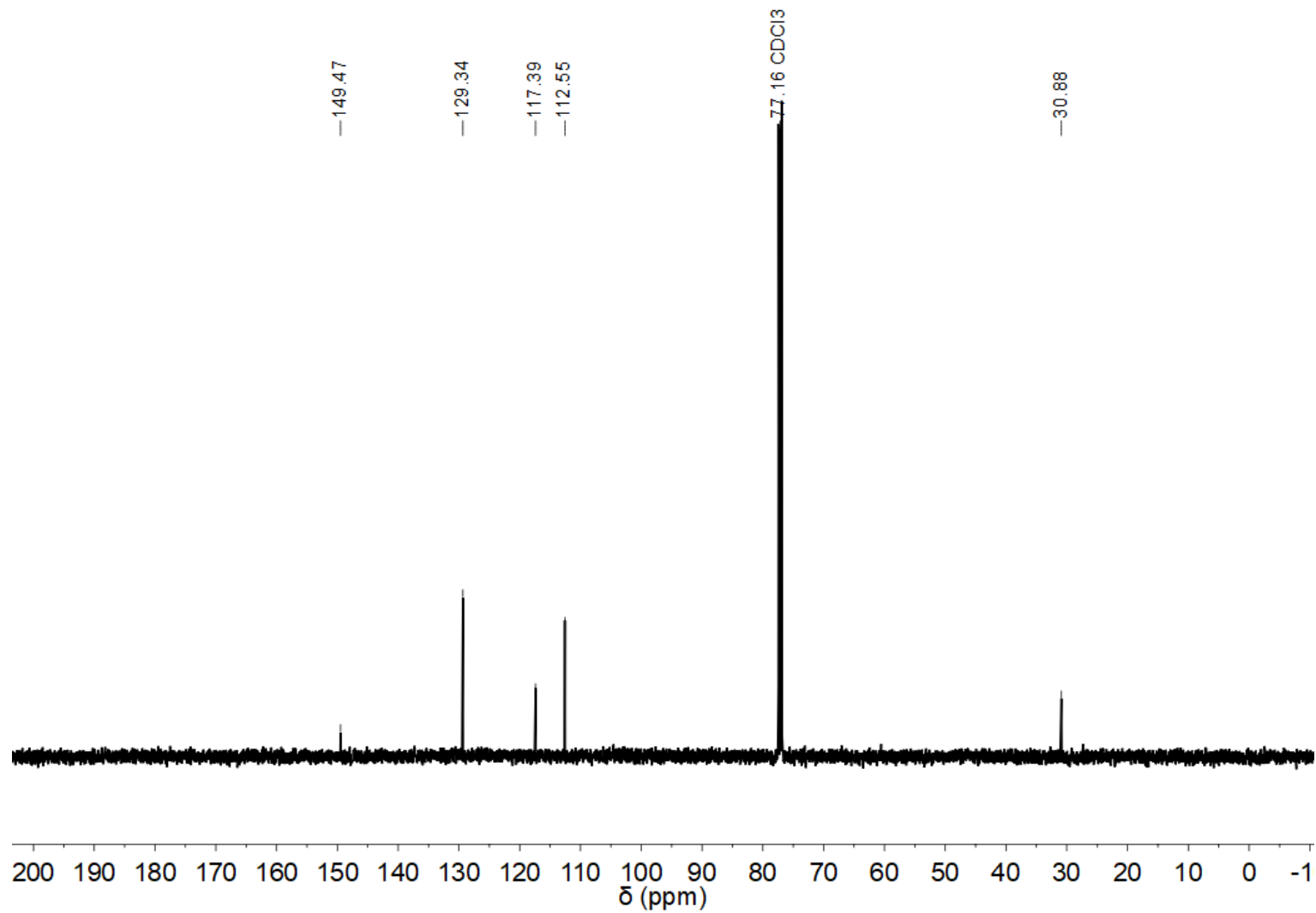


Figura 31: Espectro de ^{13}C RMN da *N*-metilanilina (CDCl_3 , 125 MHz).

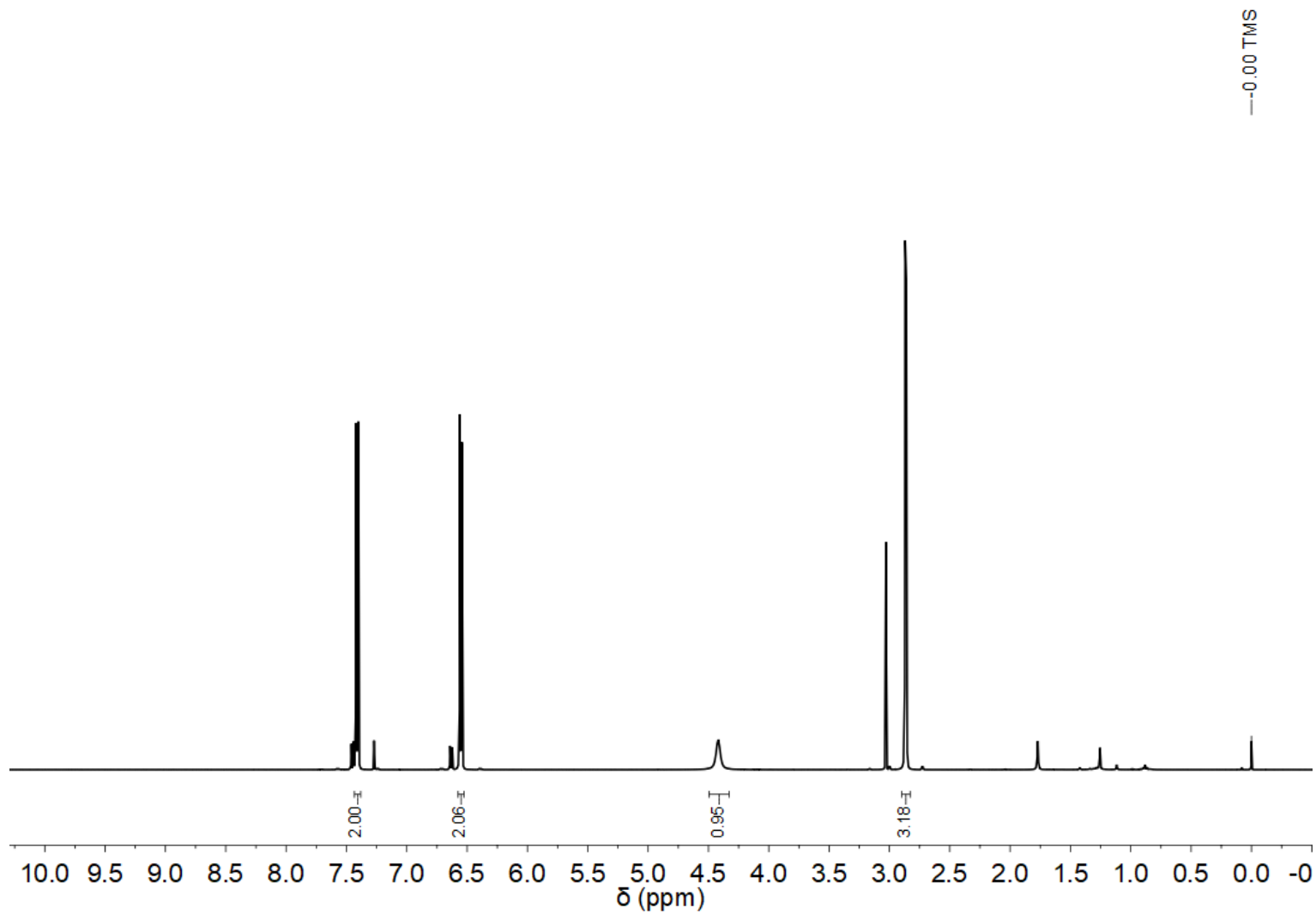


Figura 32: Espectro de ¹H RMN da 4-(metilamino)benzotrila (CDCl₃, 500 MHz).

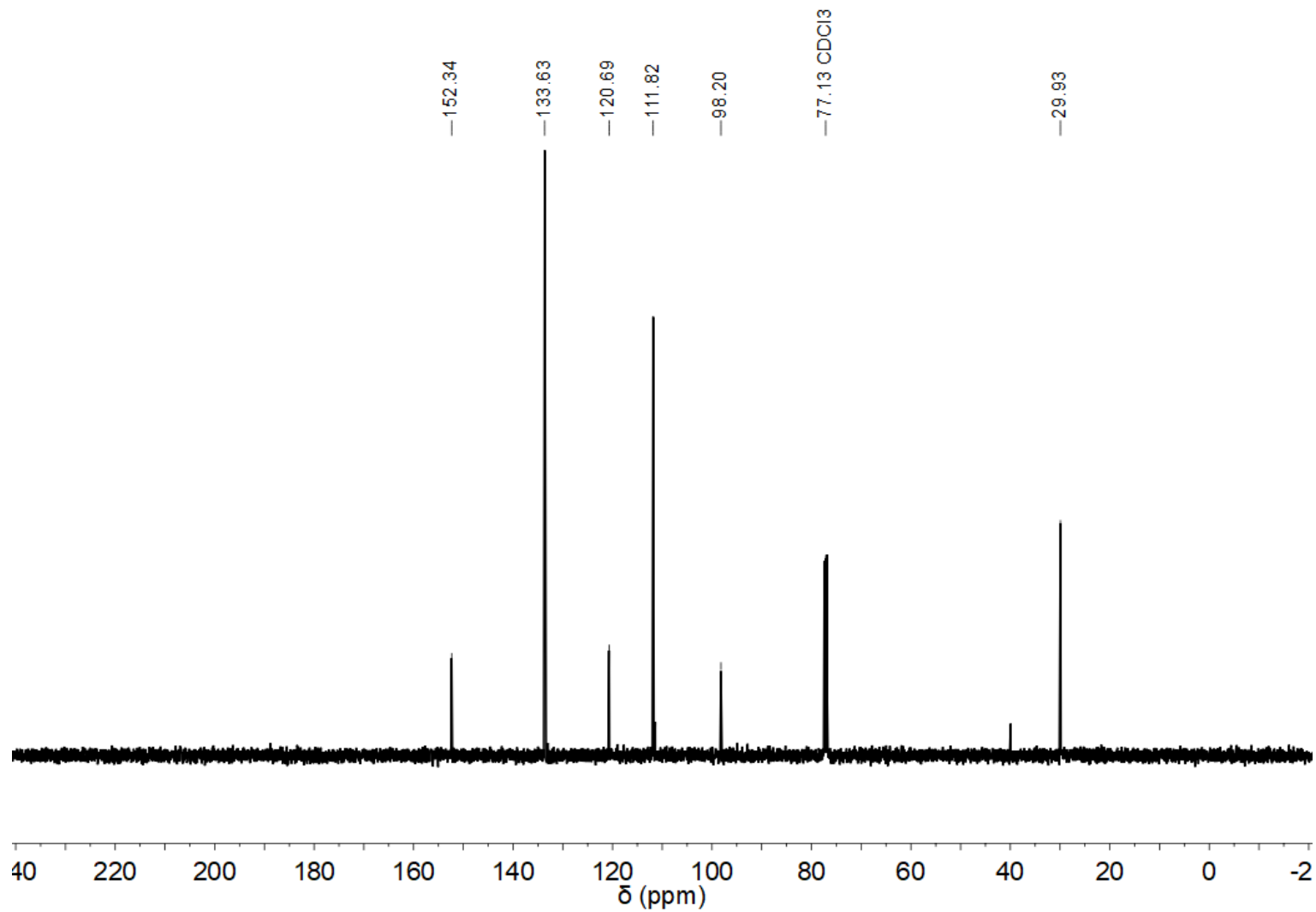


Figura 33: Espectro de ¹³C RMN da 4-(metilamino)benzonitrila (CDCl₃, 125 MHz).

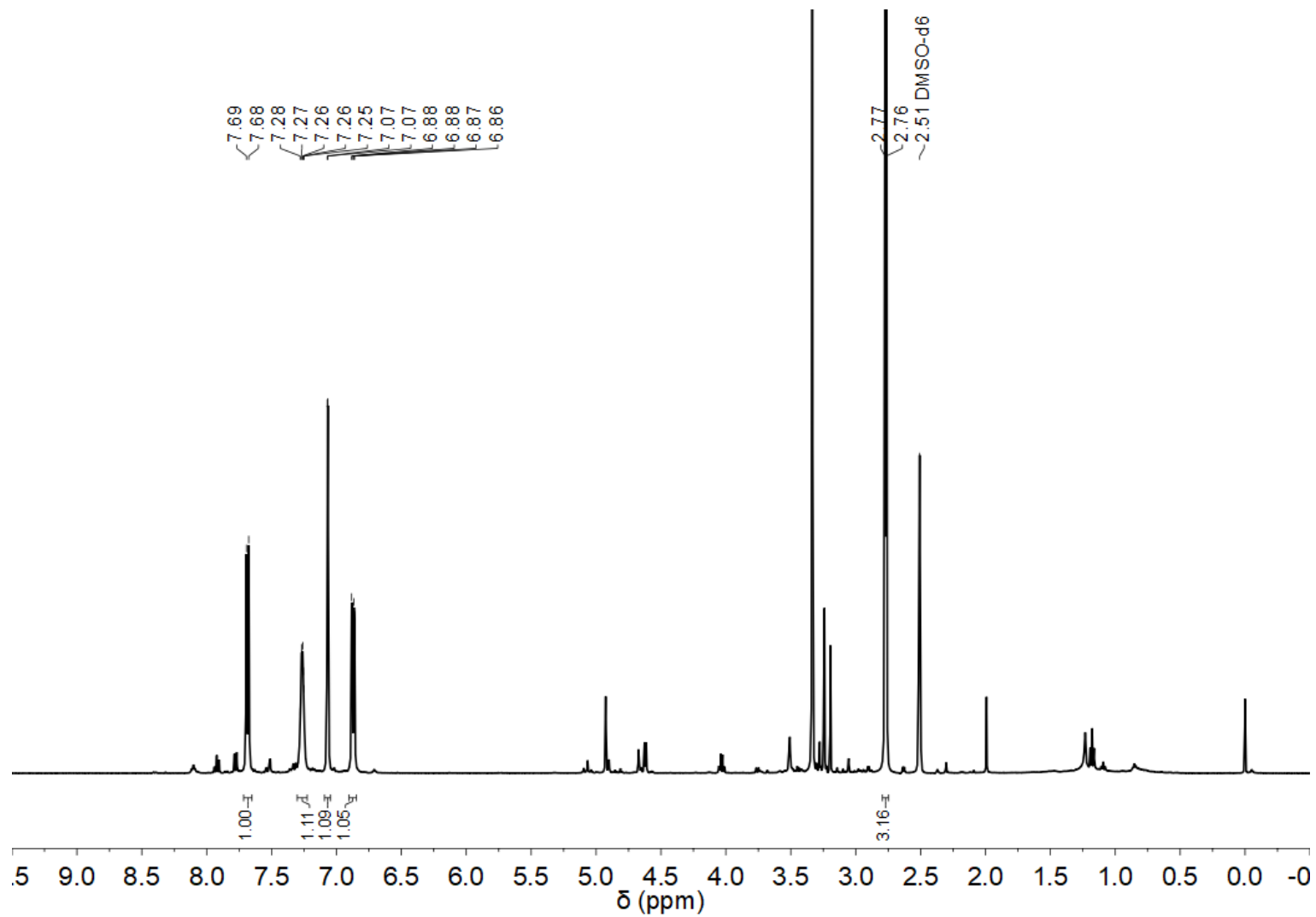


Figura 34: Espectro de ^1H RMN da 4-(metilamino)ftalonitrila (DMSO-d₆, 500 MHz).

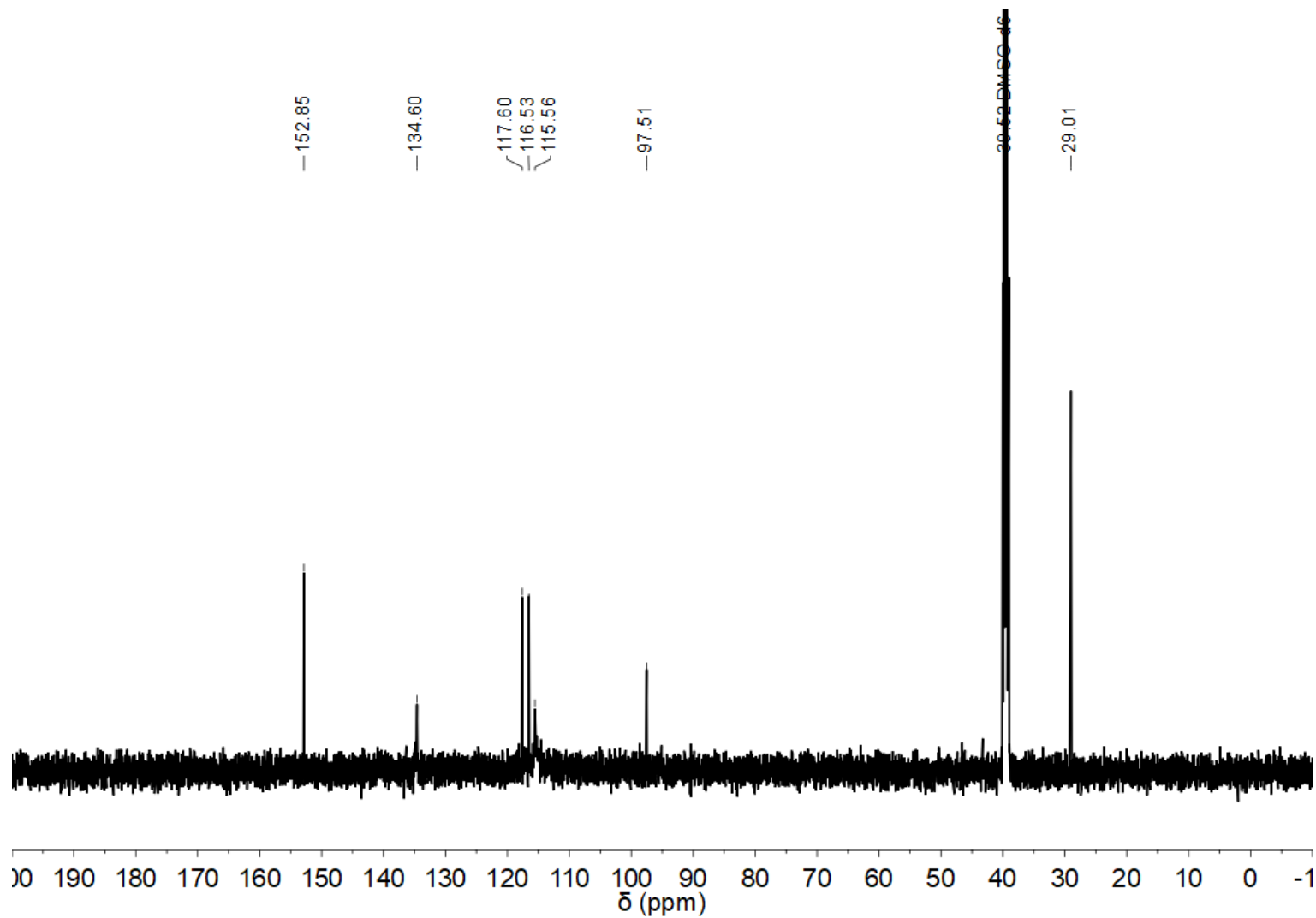


Figura 35: Espectro de ¹³C RMN da 4-(metilamino)ftalonitrila (DMSO-d₆, 125 MHz).

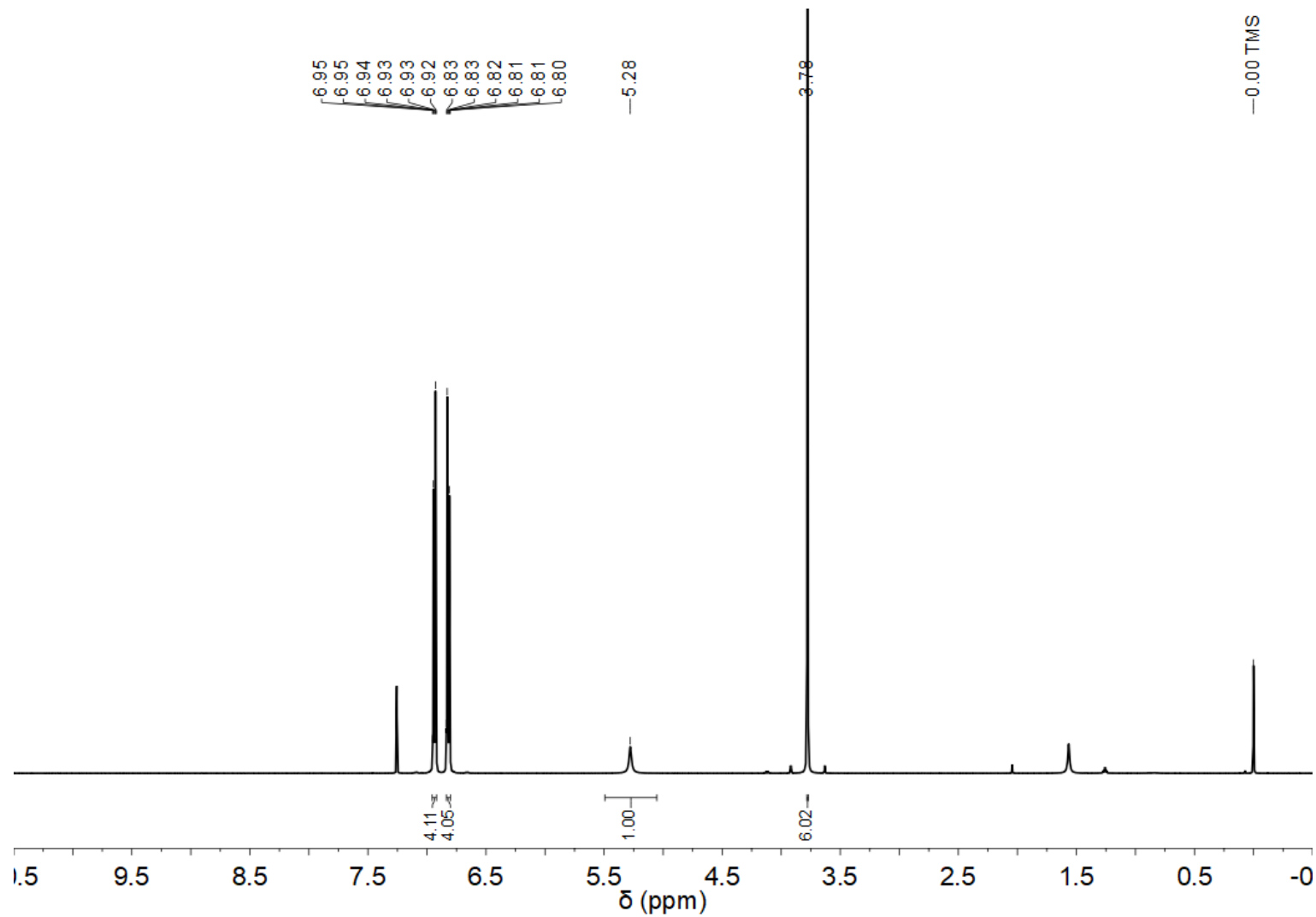


Figura 36: Espectro de ^1H RMN da bis(4-metóxfenil)amina (CDCl_3 , 500 MHz).

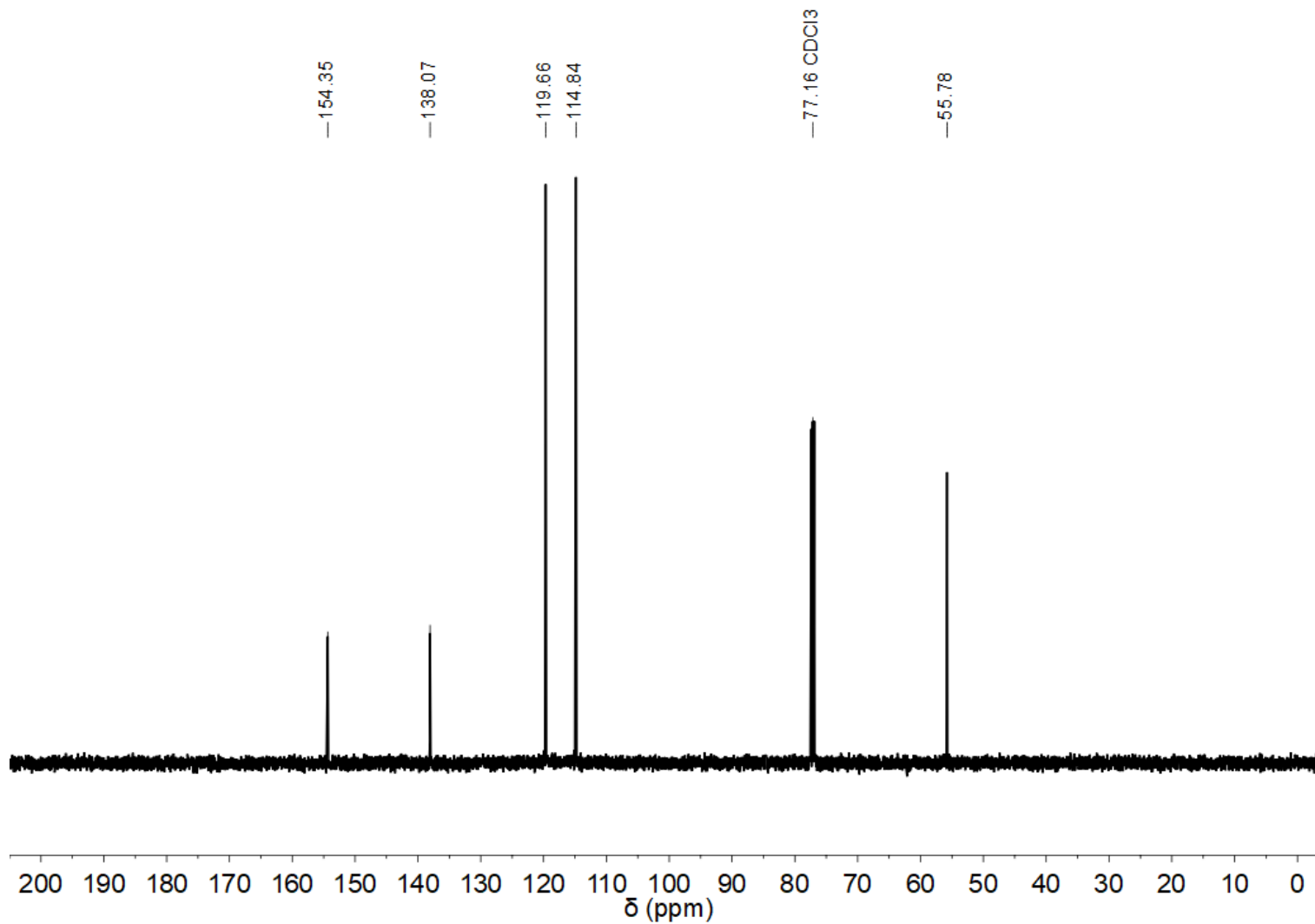


Figura 37: Espectro de ¹³C RMN da bis(4-metóxfenil)amina (CDCl₃, 125 MHz).

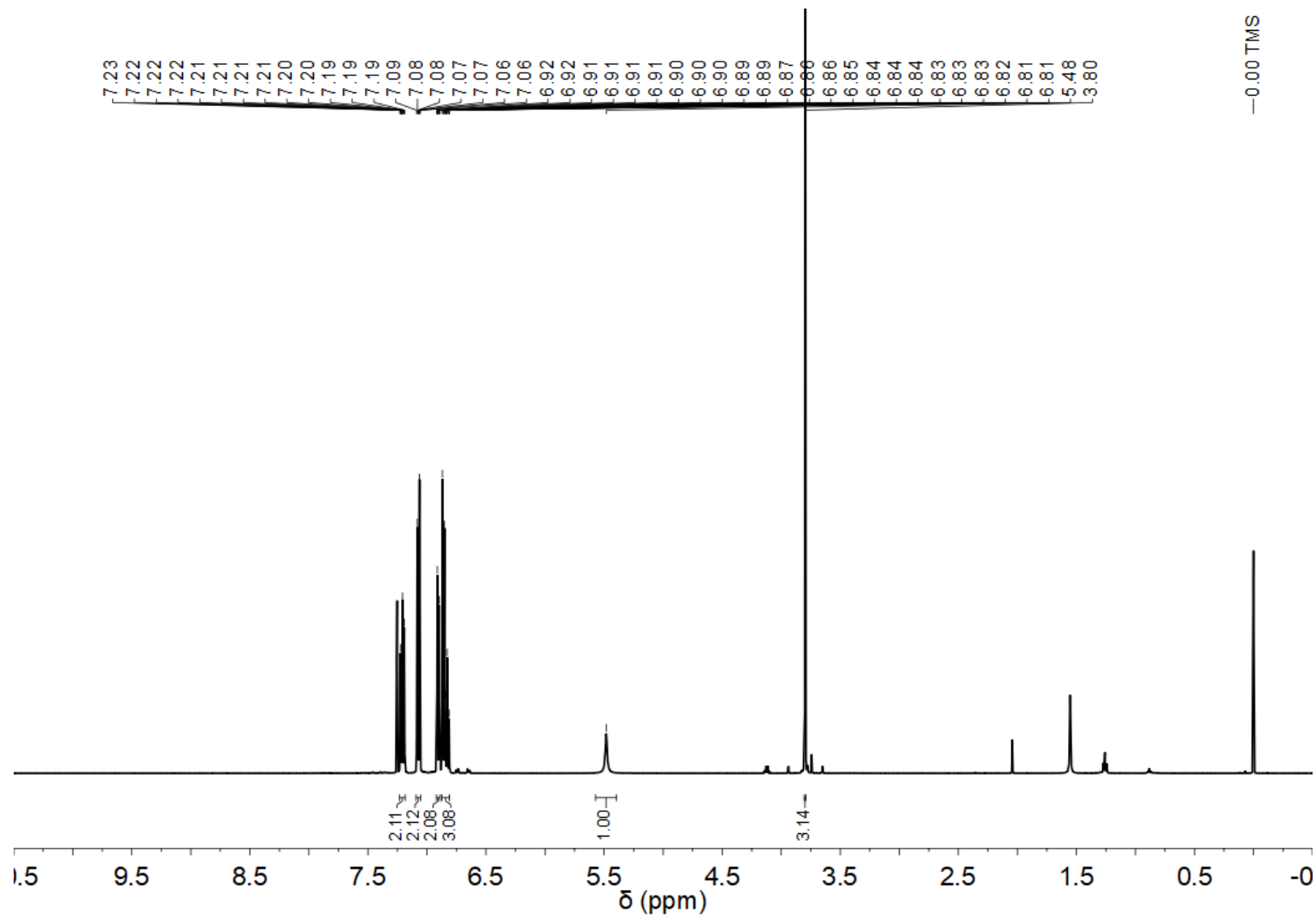


Figura 38: Espectro de ^1H RMN da 4-metóxi-*N*-fenilamina (CDCl_3 , 500 MHz).

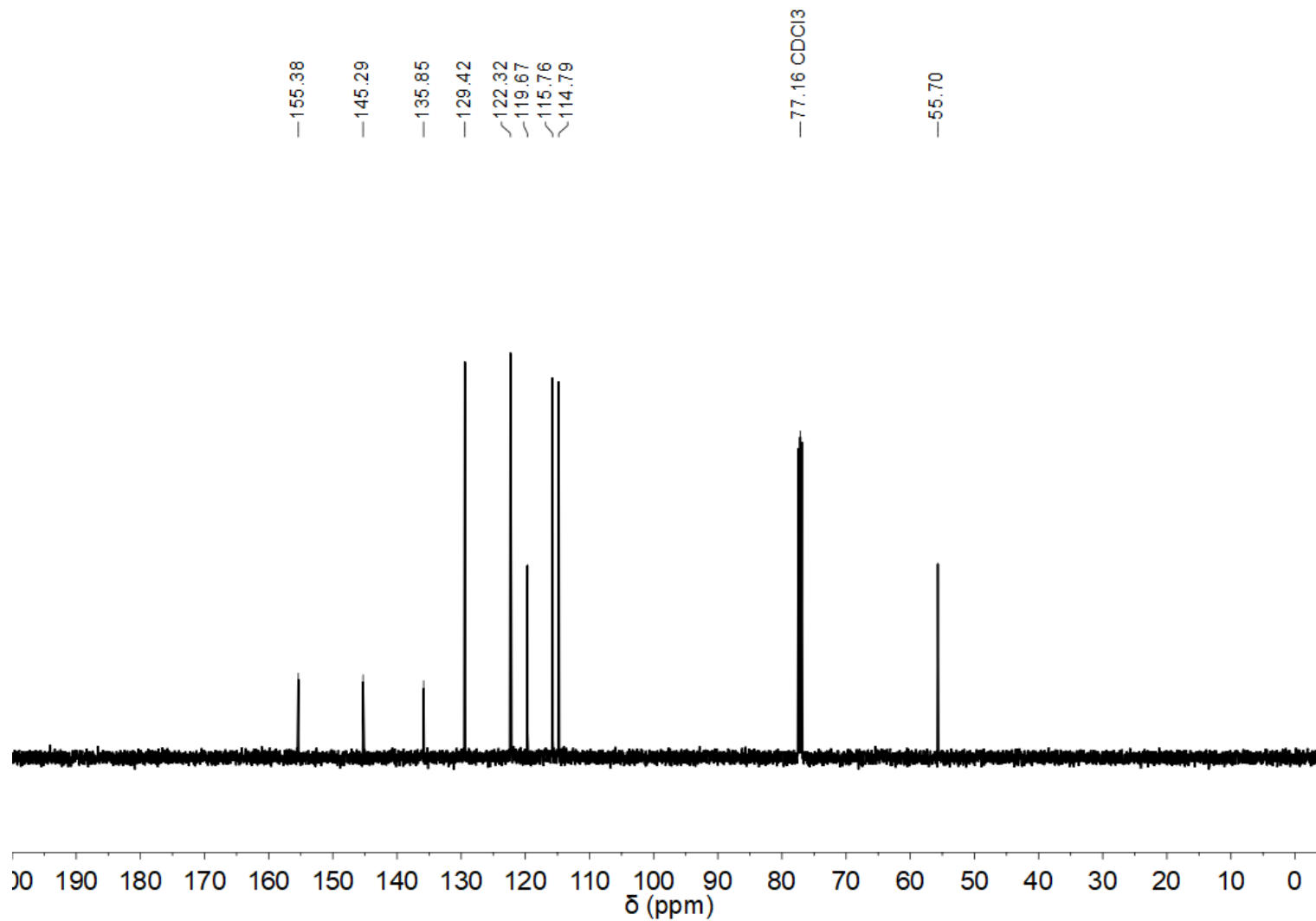


Figura 39: Espectro de ¹³C RMN da 4-metóxi-*N*-fenilamina (CDCl₃, 125 MHz)

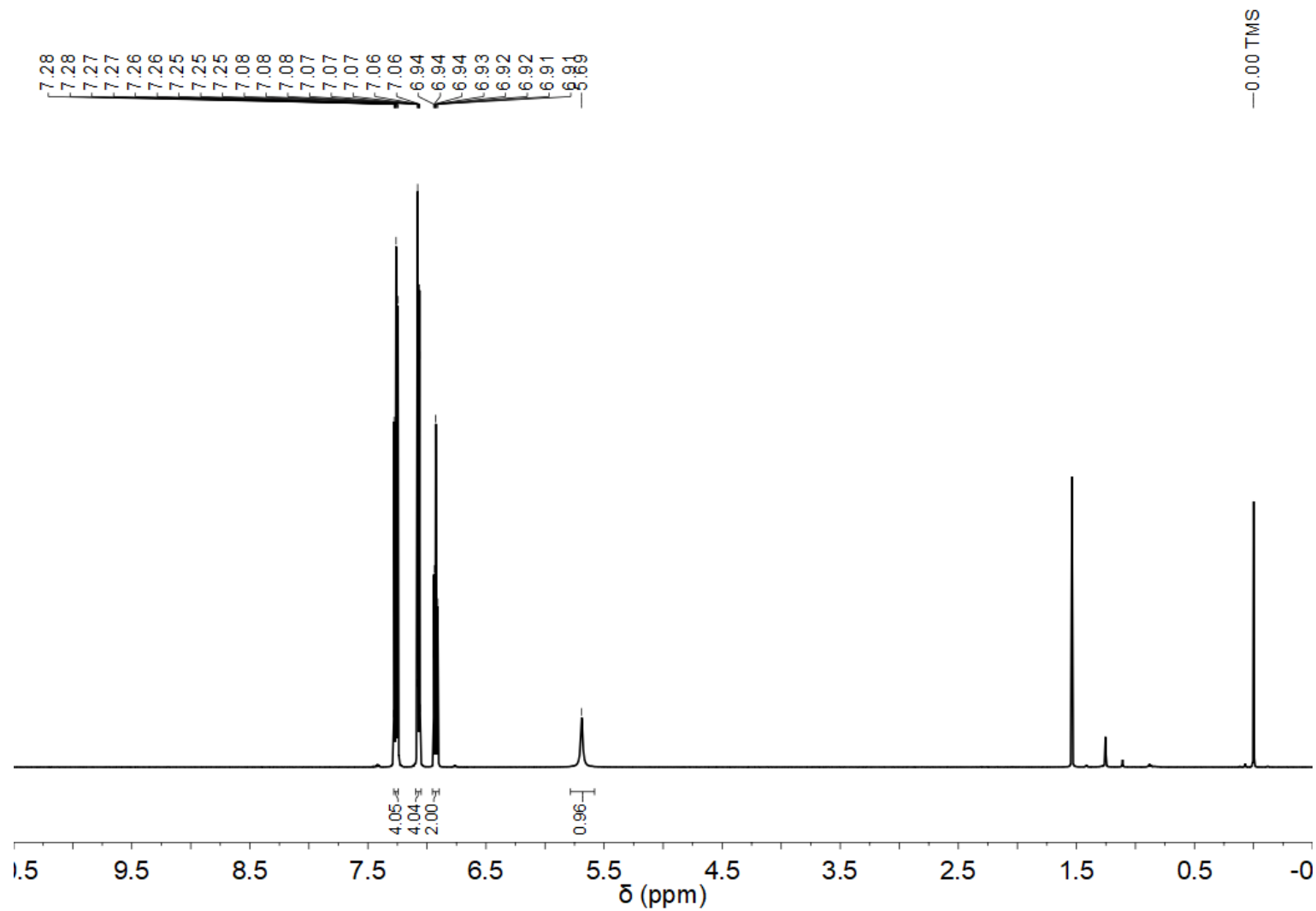


Figura 40: Espectro de ¹H RMN da difenilamina (CDCl₃, 500 MHz).

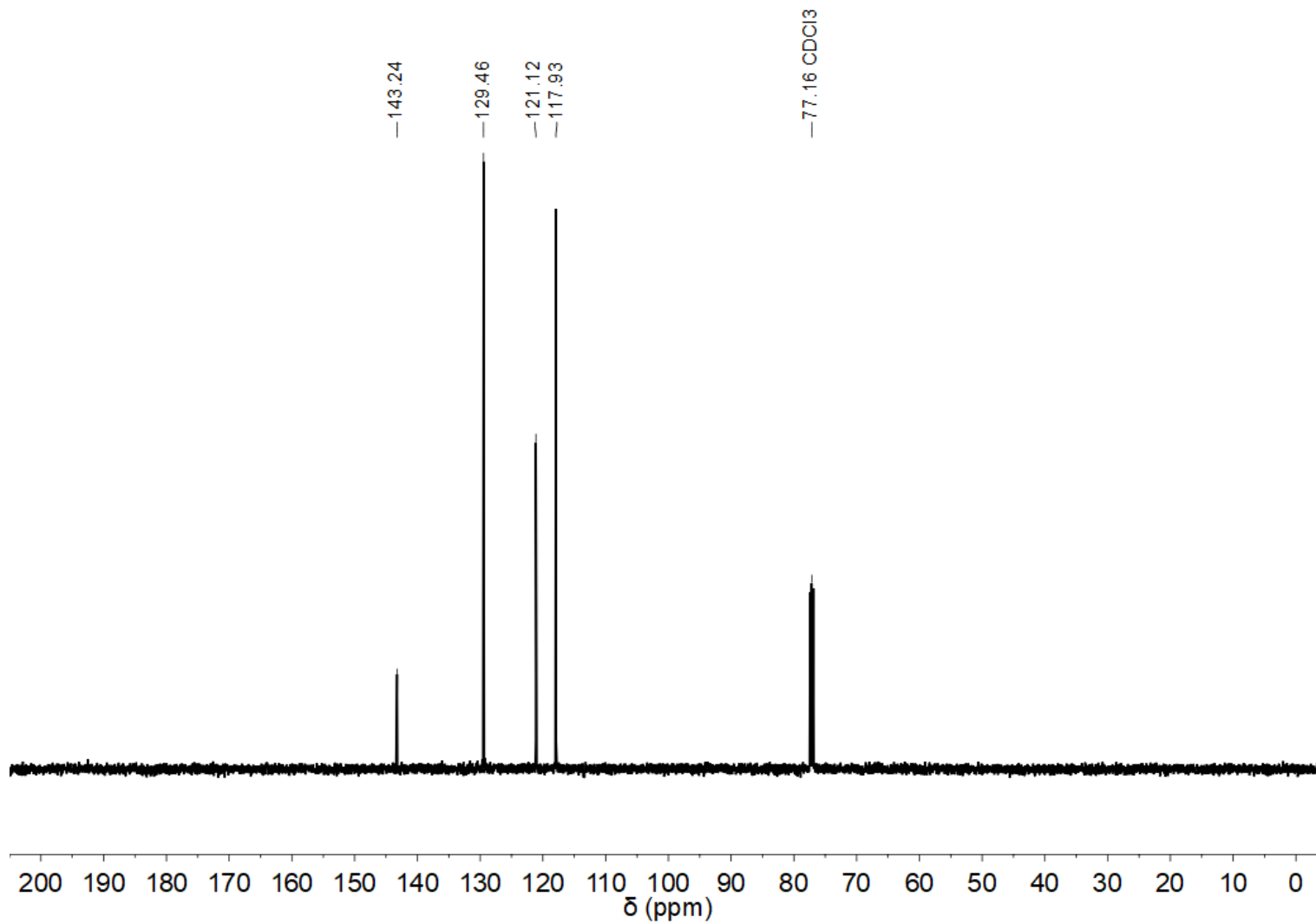


Figura 41: Espectro de ¹³C RMN da difenilamina (CDCl₃, 125 MHz).

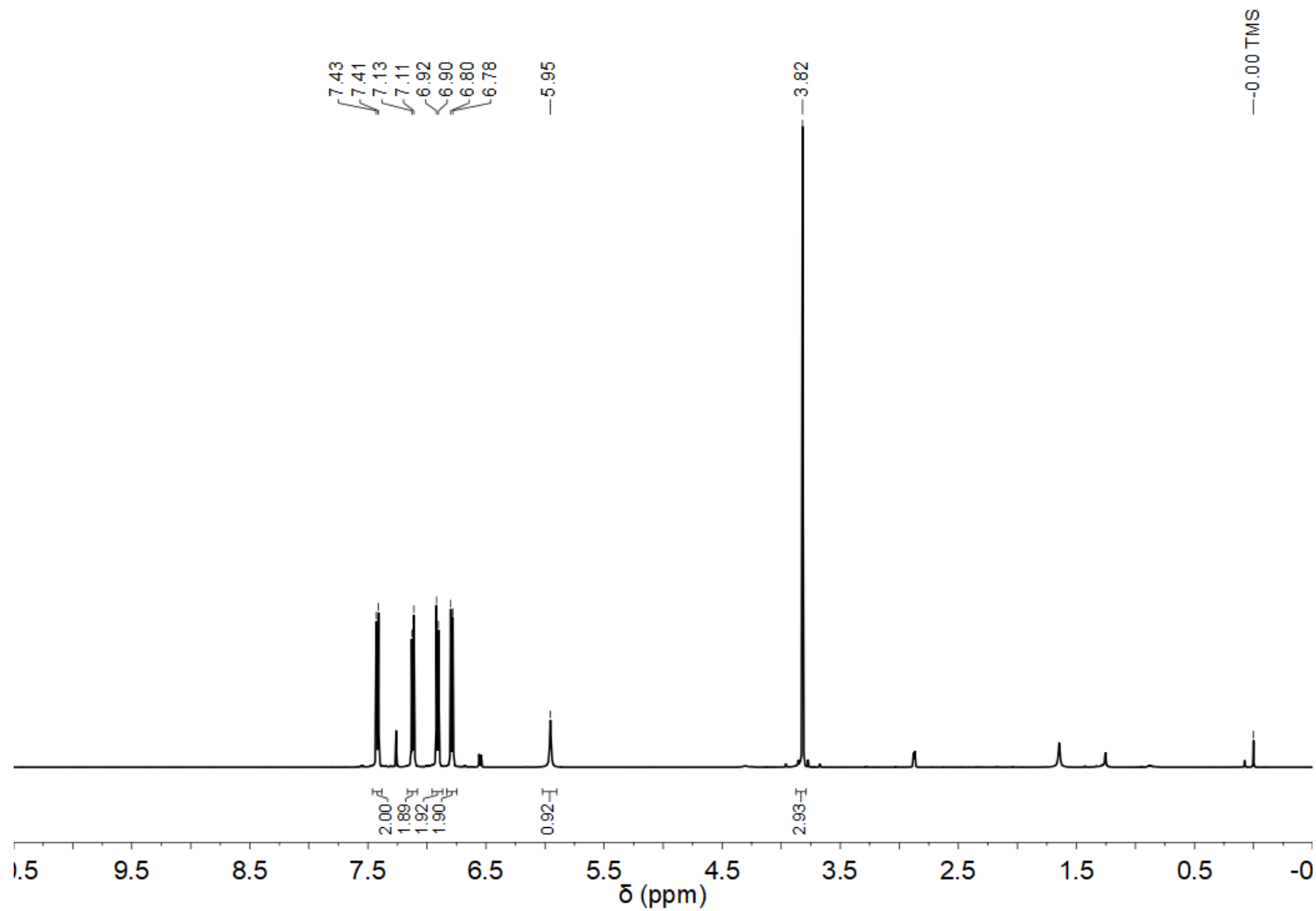


Figura 42: Espectro de ^1H RMN da 4-((4-metóxfenil)amino)benzotrila (CDCl_3 , 500 MHz).

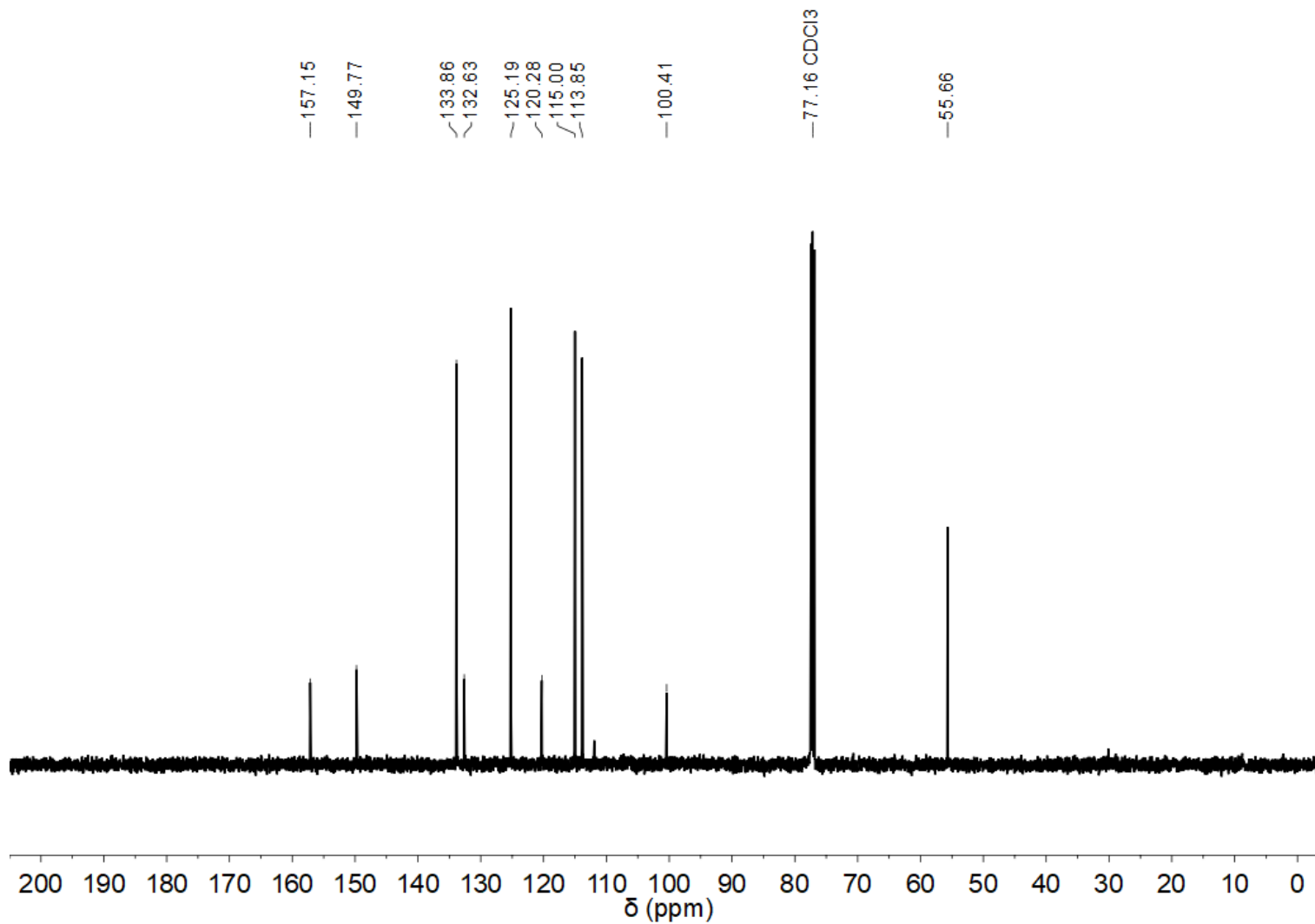


Figura 43: Espectro de ¹³C RMN da 4-((4-metóxi-fenil)amino)benzonitrila (CDCl₃, 125 MHz).

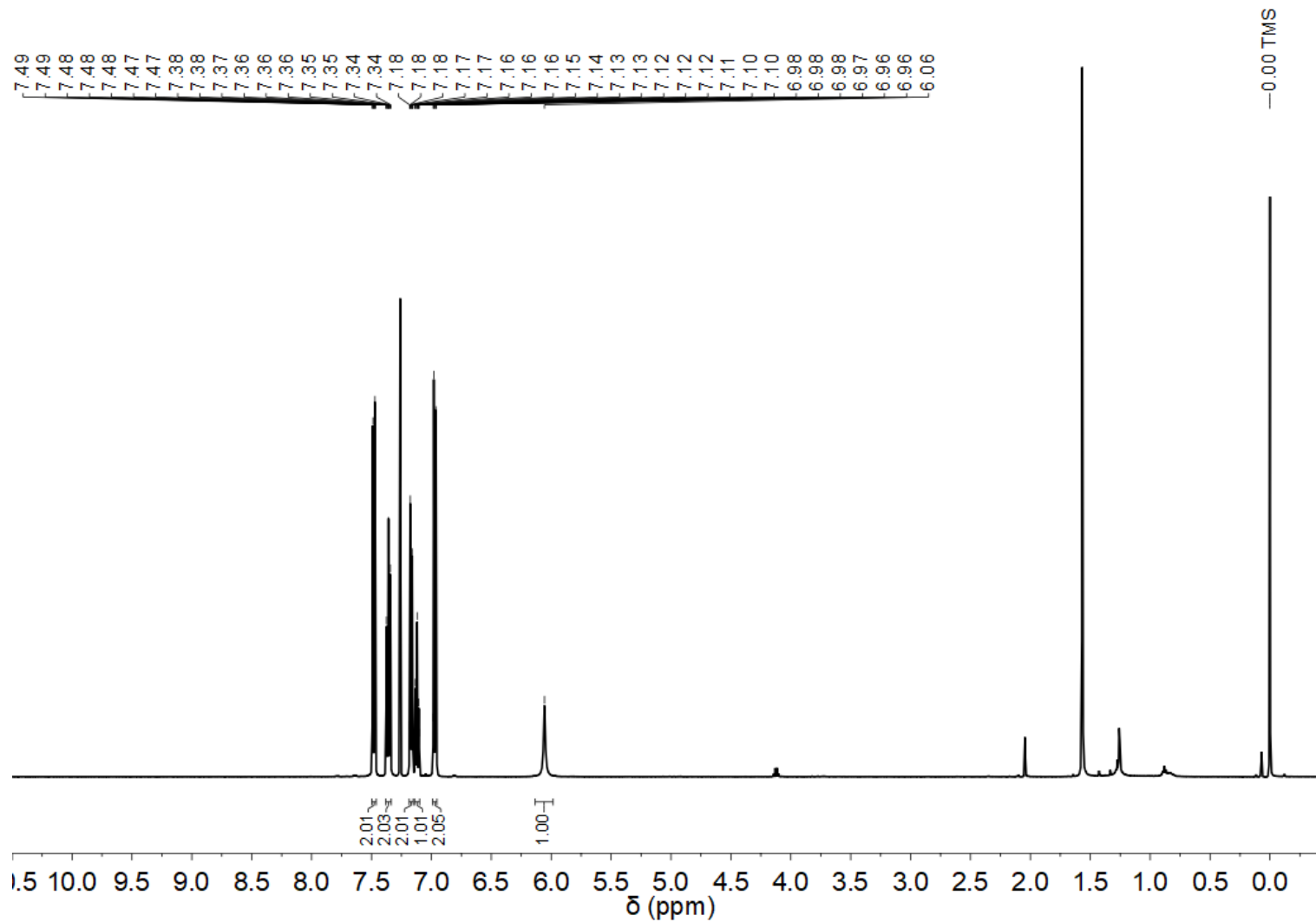


Figura 44: Espectro de ^1H RMN da 4-(fenilamino)benzotrila (CDCl_3 , 500 MHz).

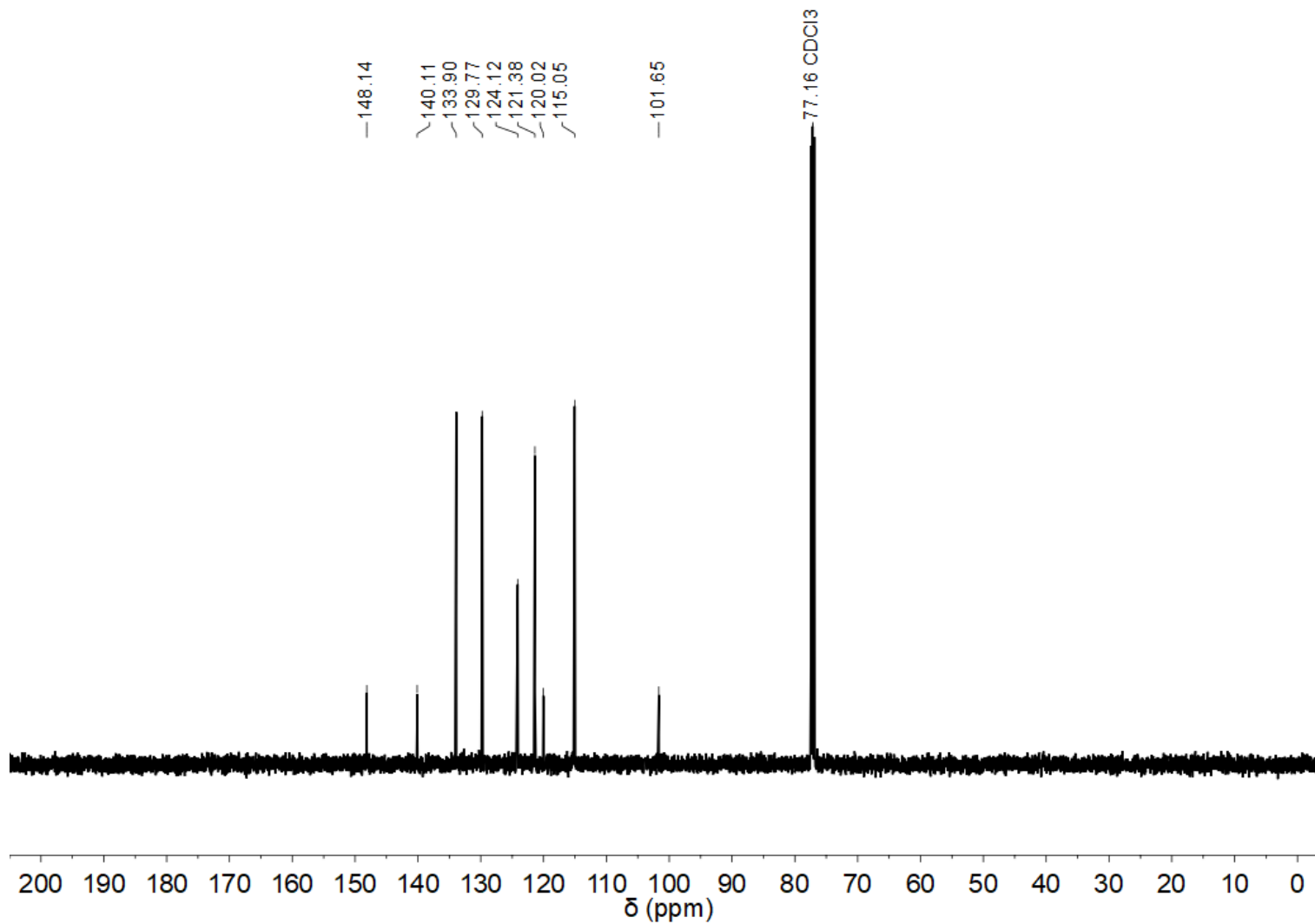


Figura 45: Espectro de ¹³C RMN da 4-(fenilamino)benzonitrila (CDCl₃, 125 MHz).

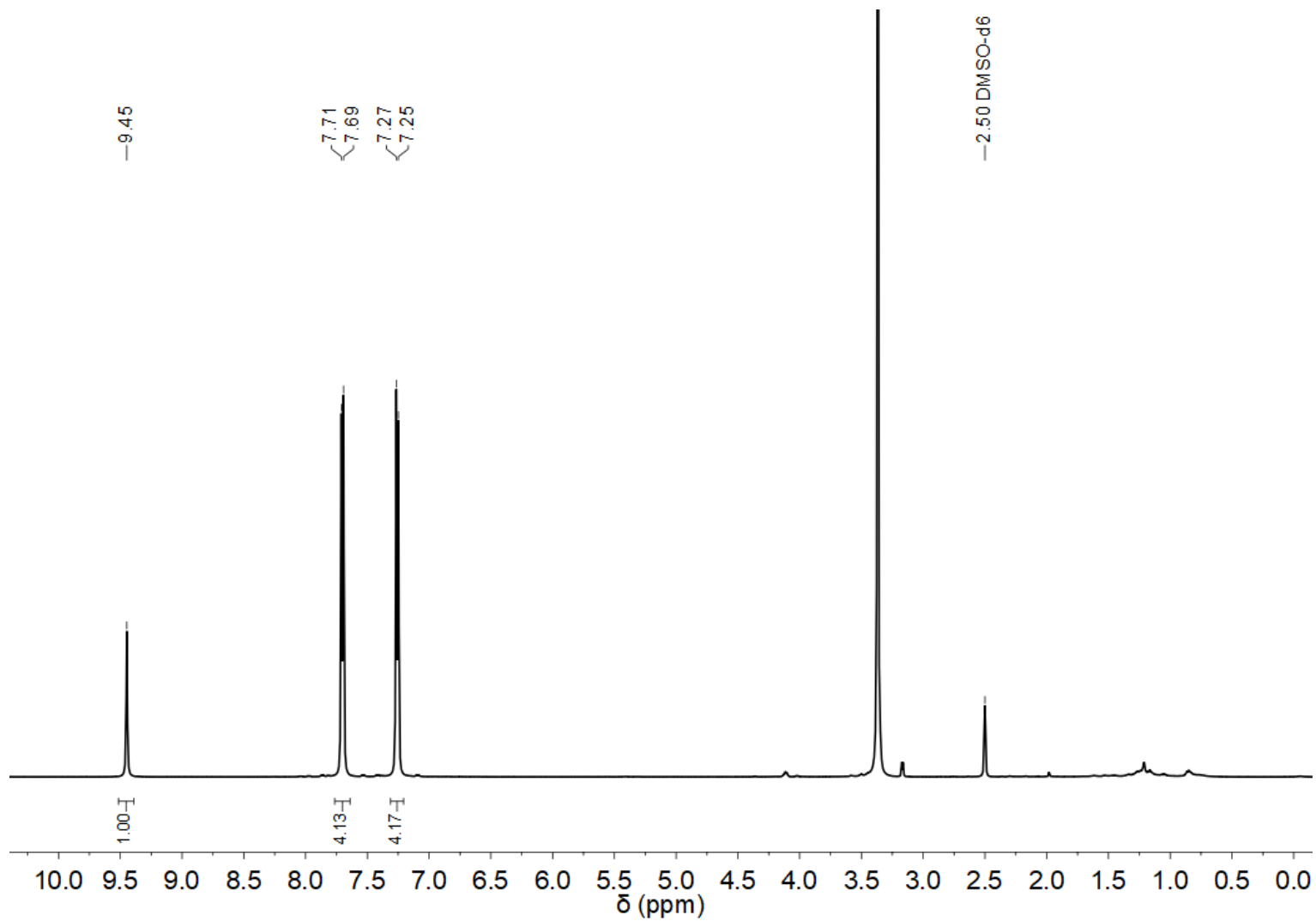


Figura 46: Espectro de 1H RMN da 4,4'-azanodiildibenzonitrila (DMSO-d6, 500 MHz).

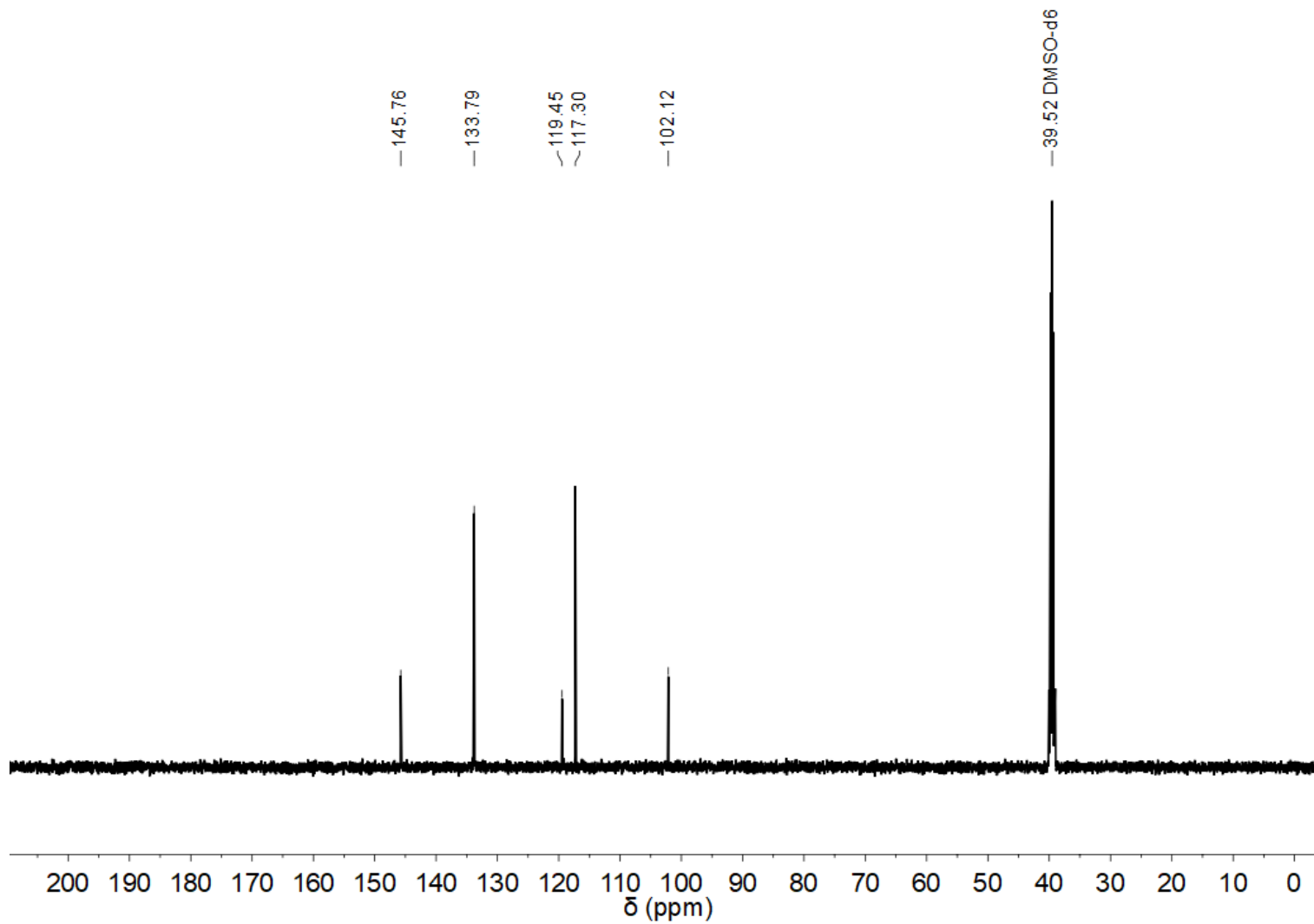


Figura 47: Espectro de ¹³C RMN da 4,4'-azanodiildibenzonitrila (DMSO-d₆, 125 MHz).

8.3. Espectros de ^1H RMN das pBeets

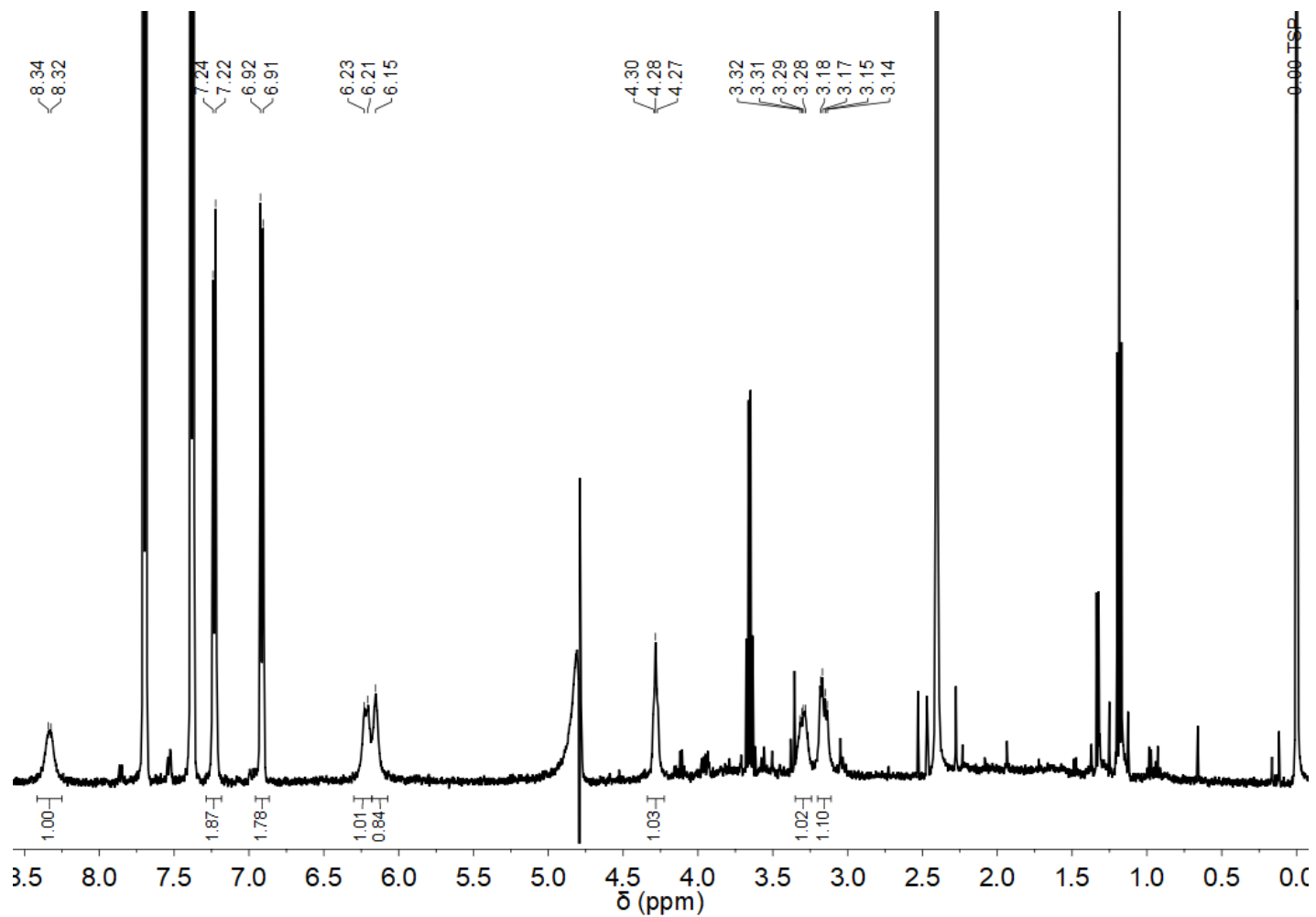


Figura 48: Espectro de ^1H RMN da 4-NH₂-pBeet (D₂O, 500 MHz).

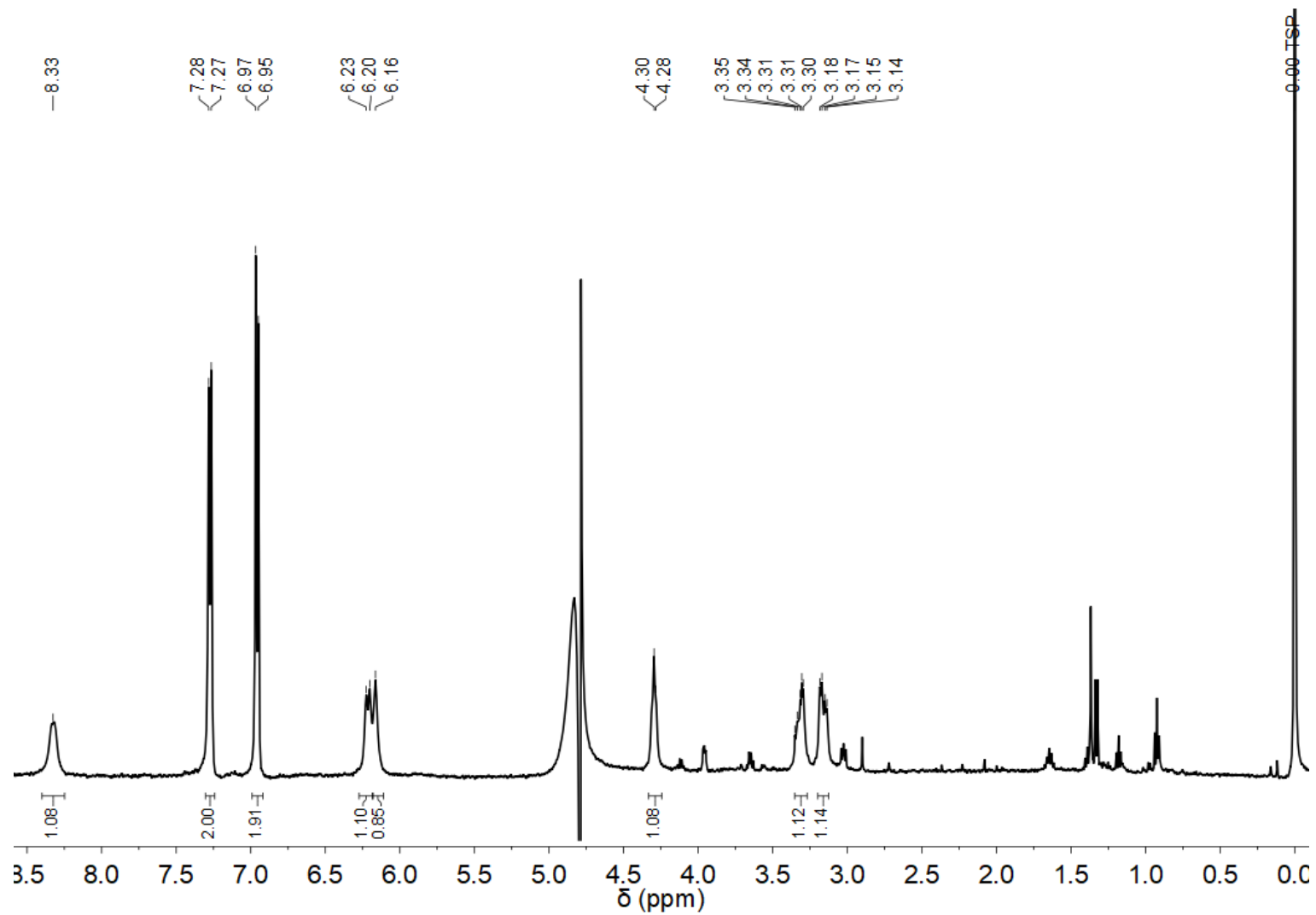


Figura 49: Espectro de ^1H RMN da 4-OH-pBeet (D_2O , 500 MHz).

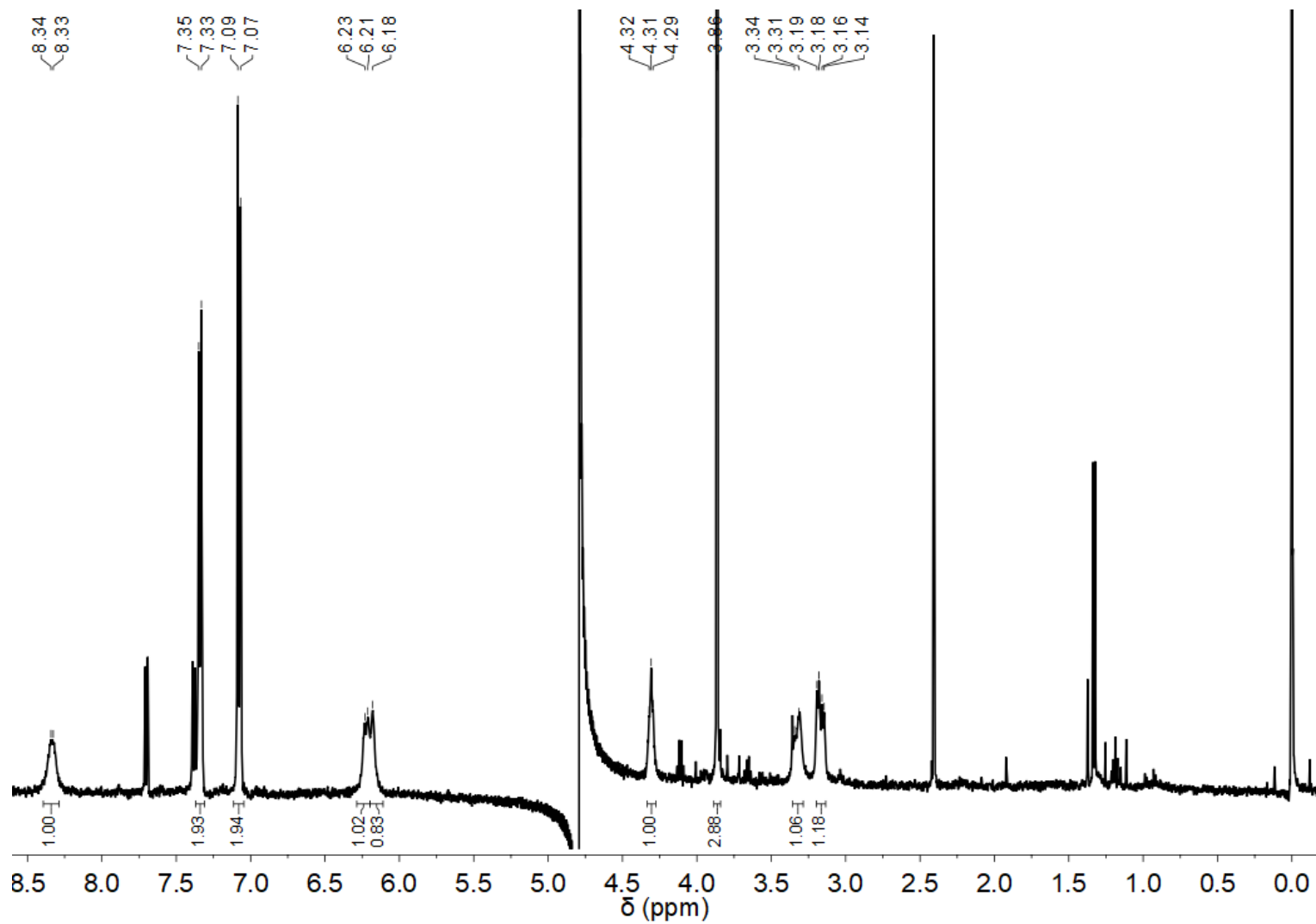


Figura 50: Espectro de ¹H RMN da 4-OMe-pBeet (D₂O, 500 MHz).

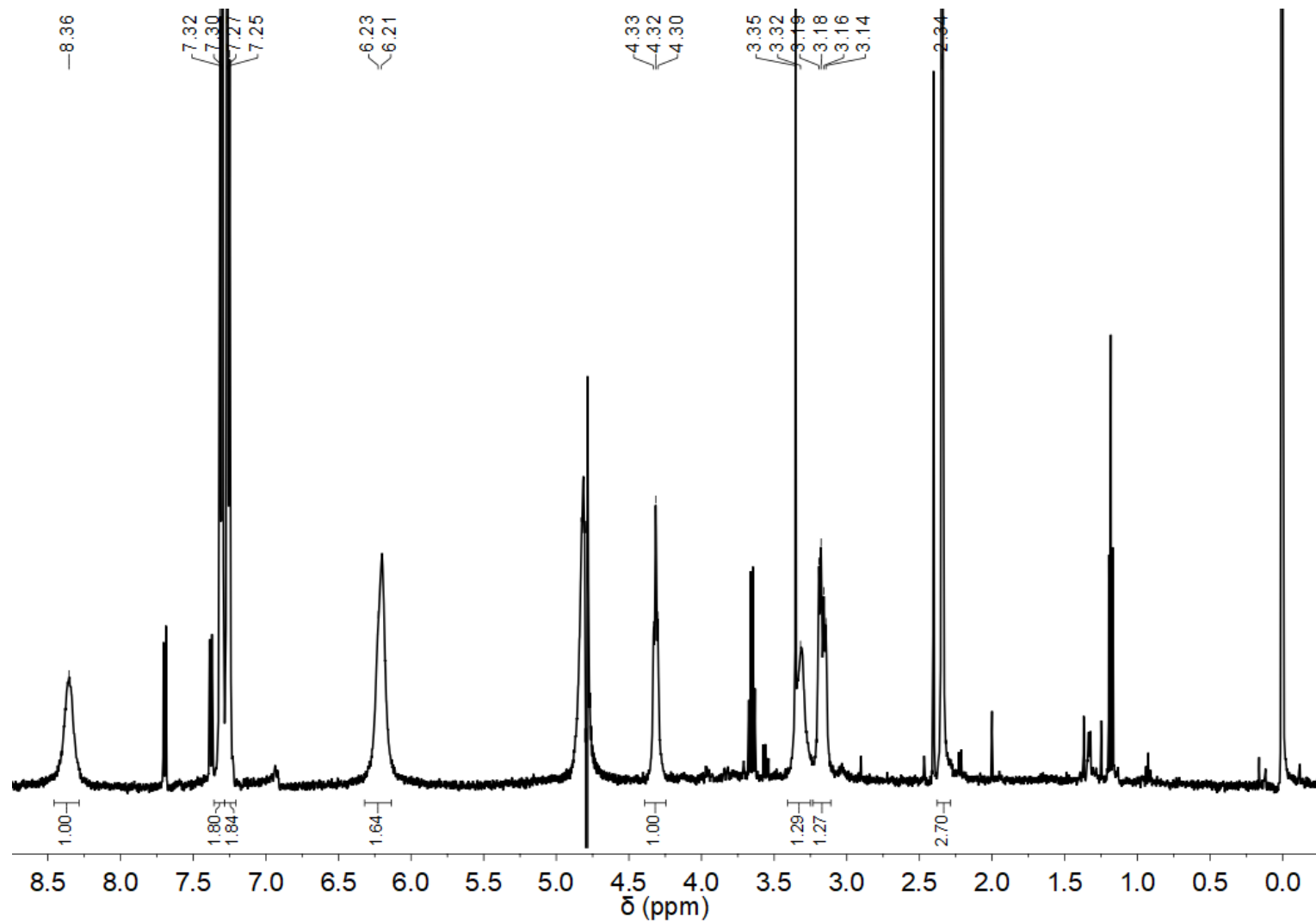


Figura 51: Espectro de 1H RMN da 4-Me-pBeet (D₂O, 500 MHz).

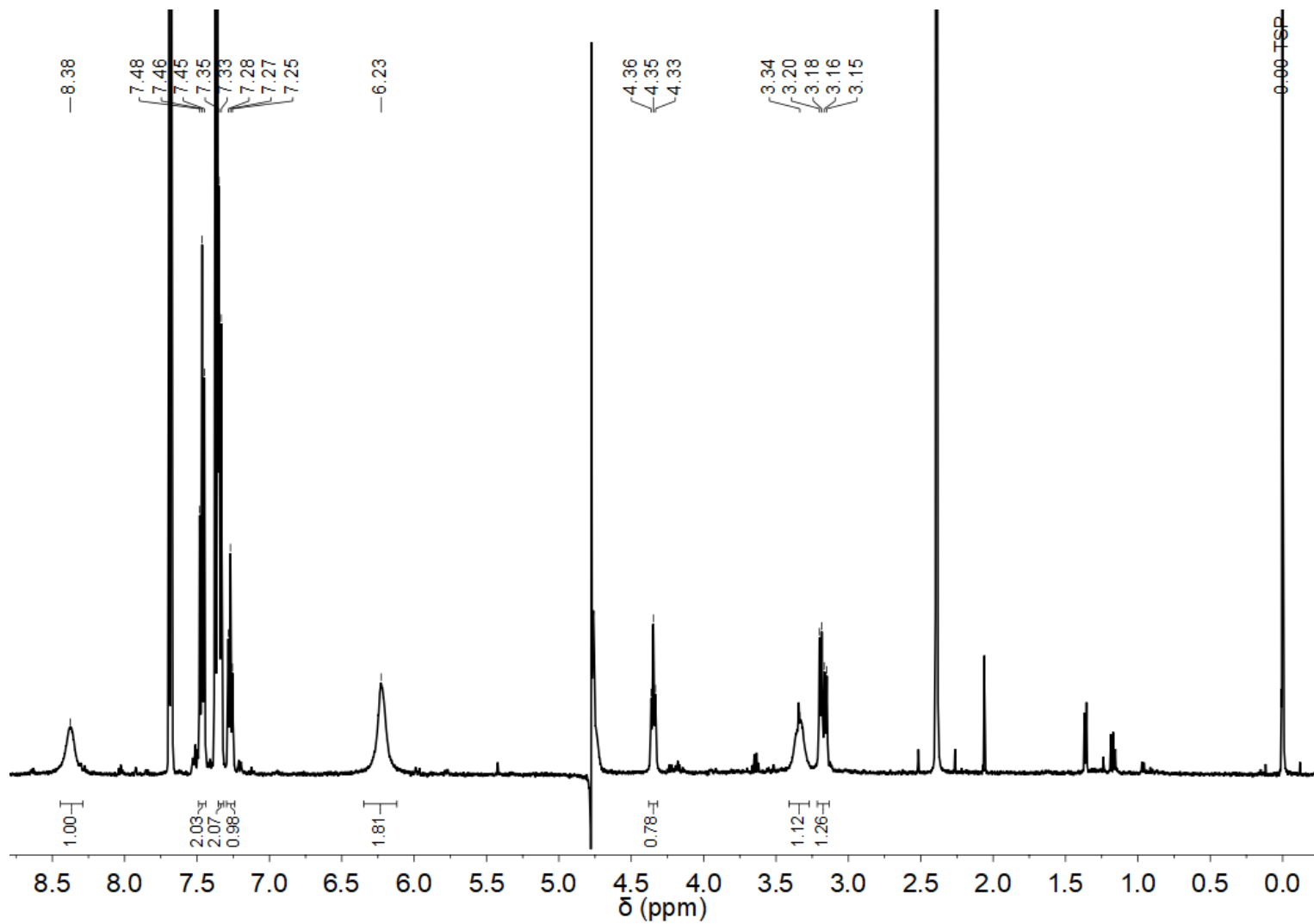


Figura 52: Espectro de ^1H RMN da pBeet (D_2O , 500 MHz).

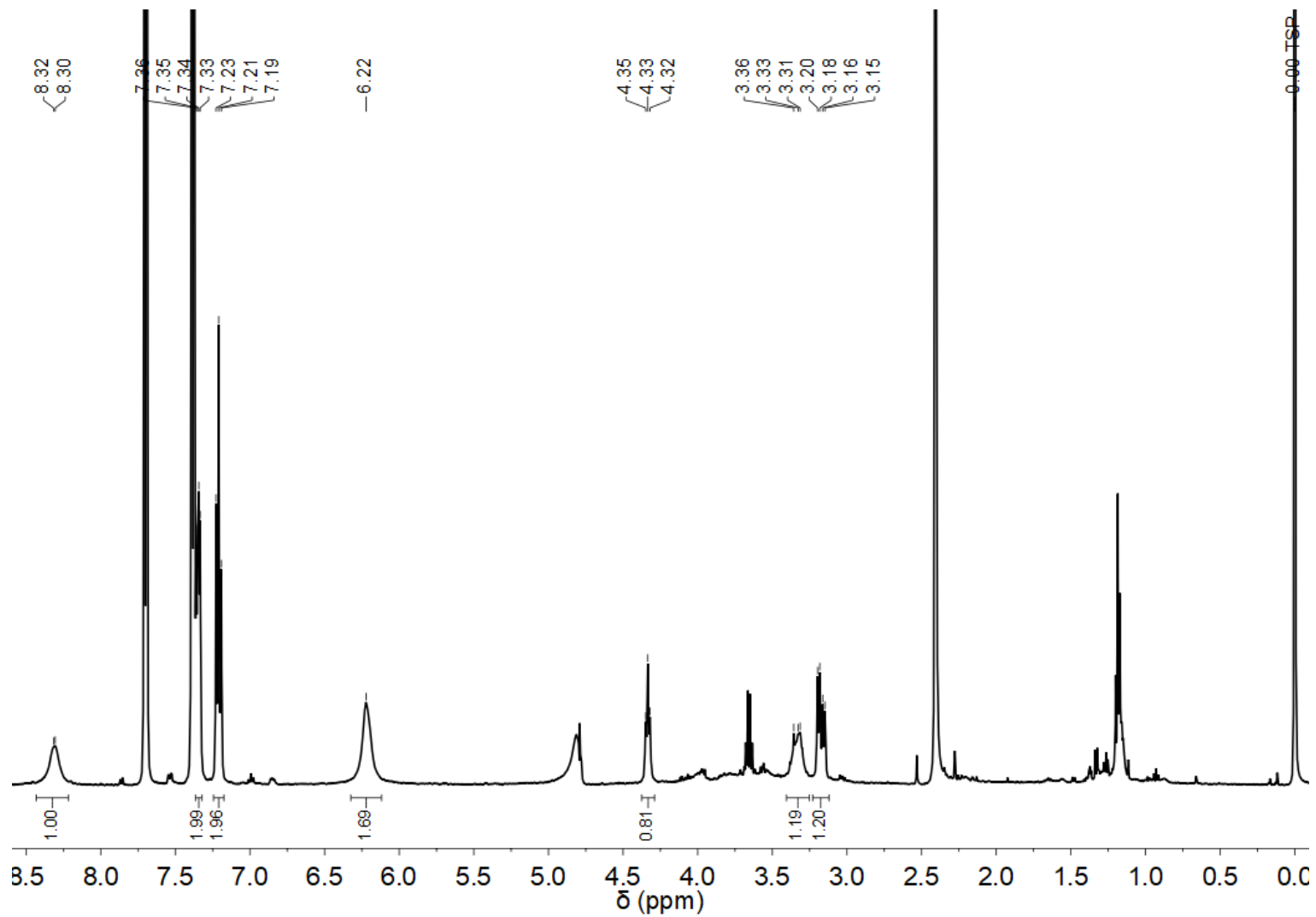


Figura 53: Espectro de ¹H RMN da 4-F-pBeet (D₂O, 500 MHz).

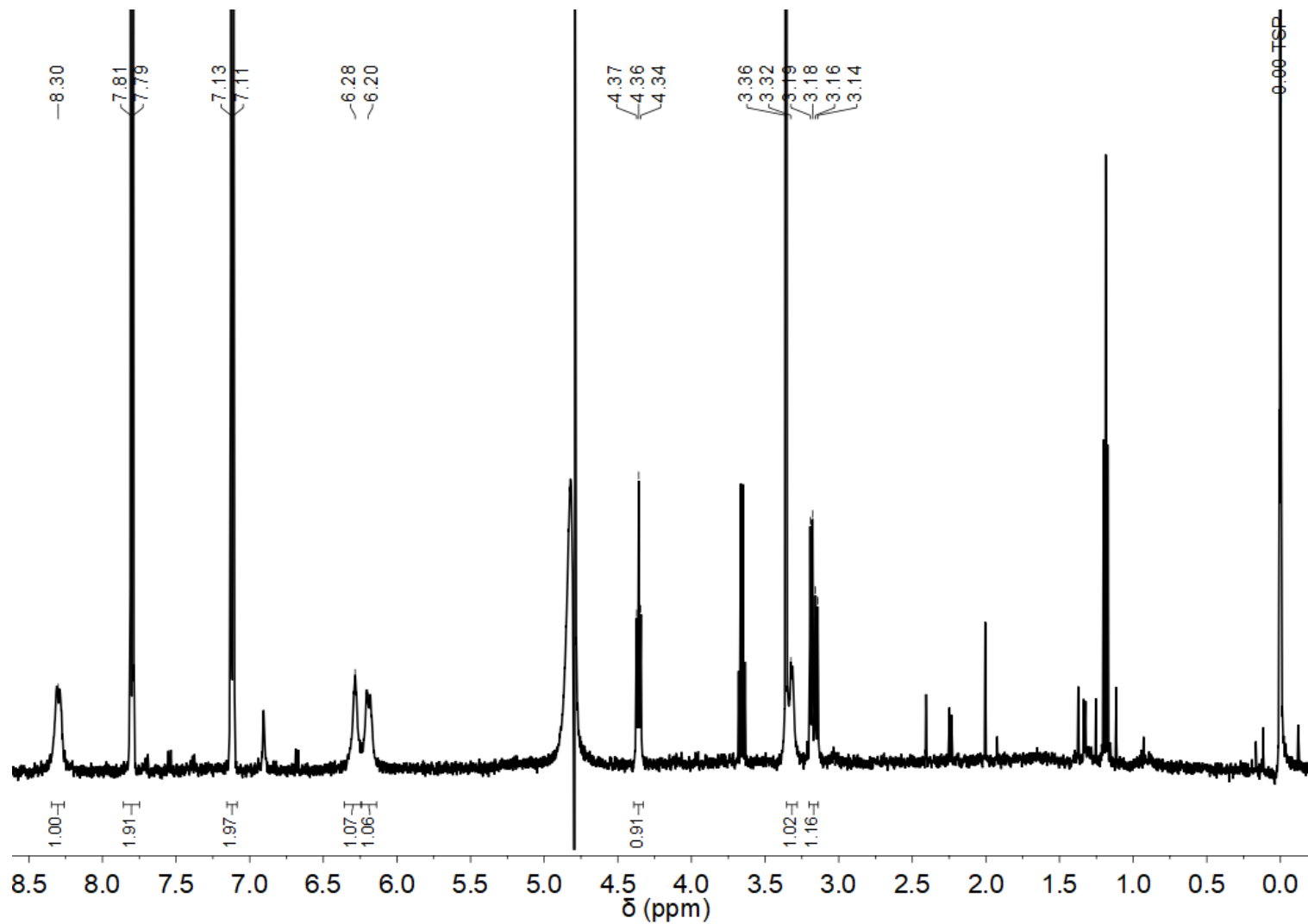


Figura 54: Espectro de 1H RMN da 4-I-pBeet (D₂O, 500 MHz).

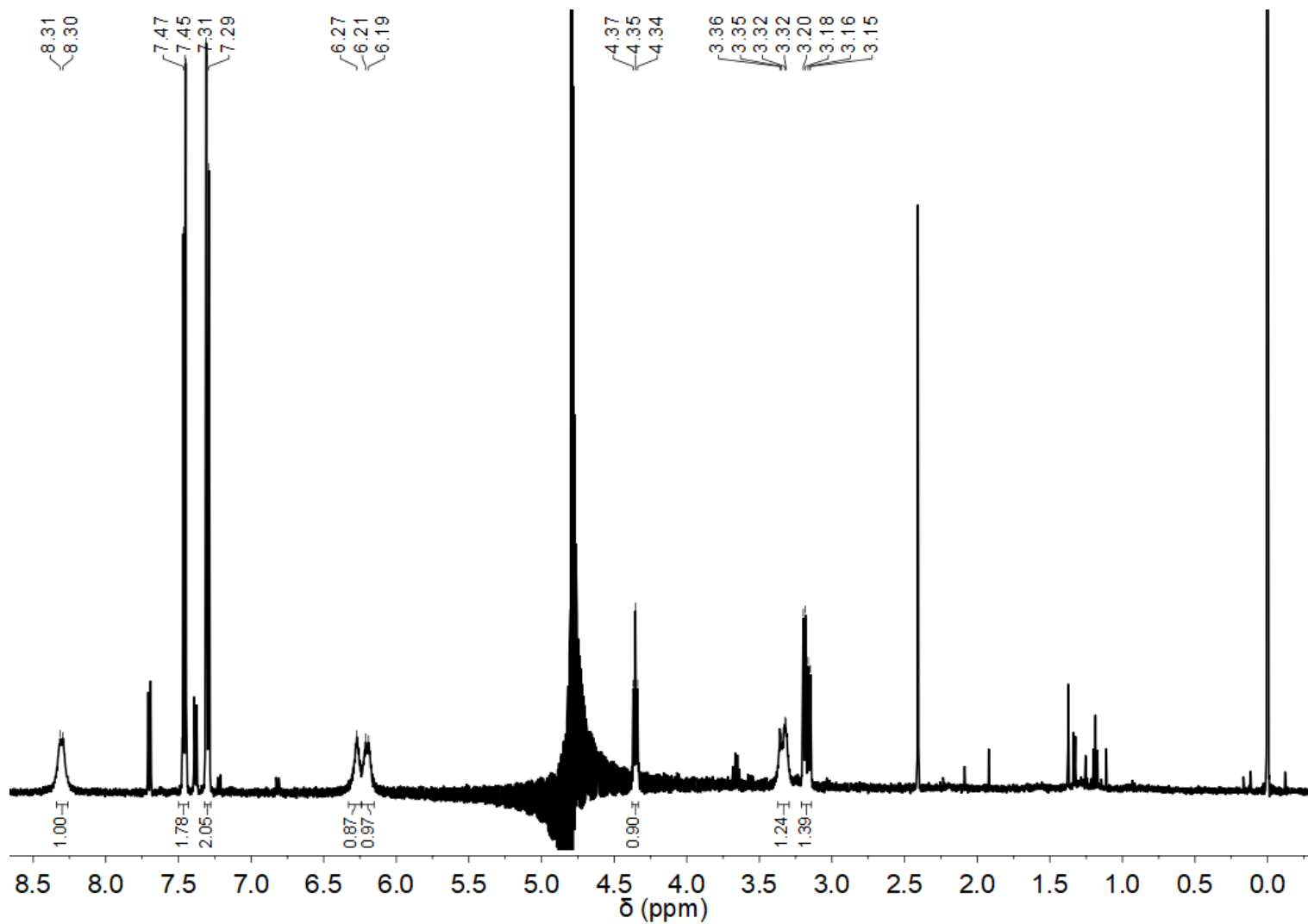


Figura 55: Espectro de 1H RMN da 4-Cl-pBeet (D₂O, 500 MHz).

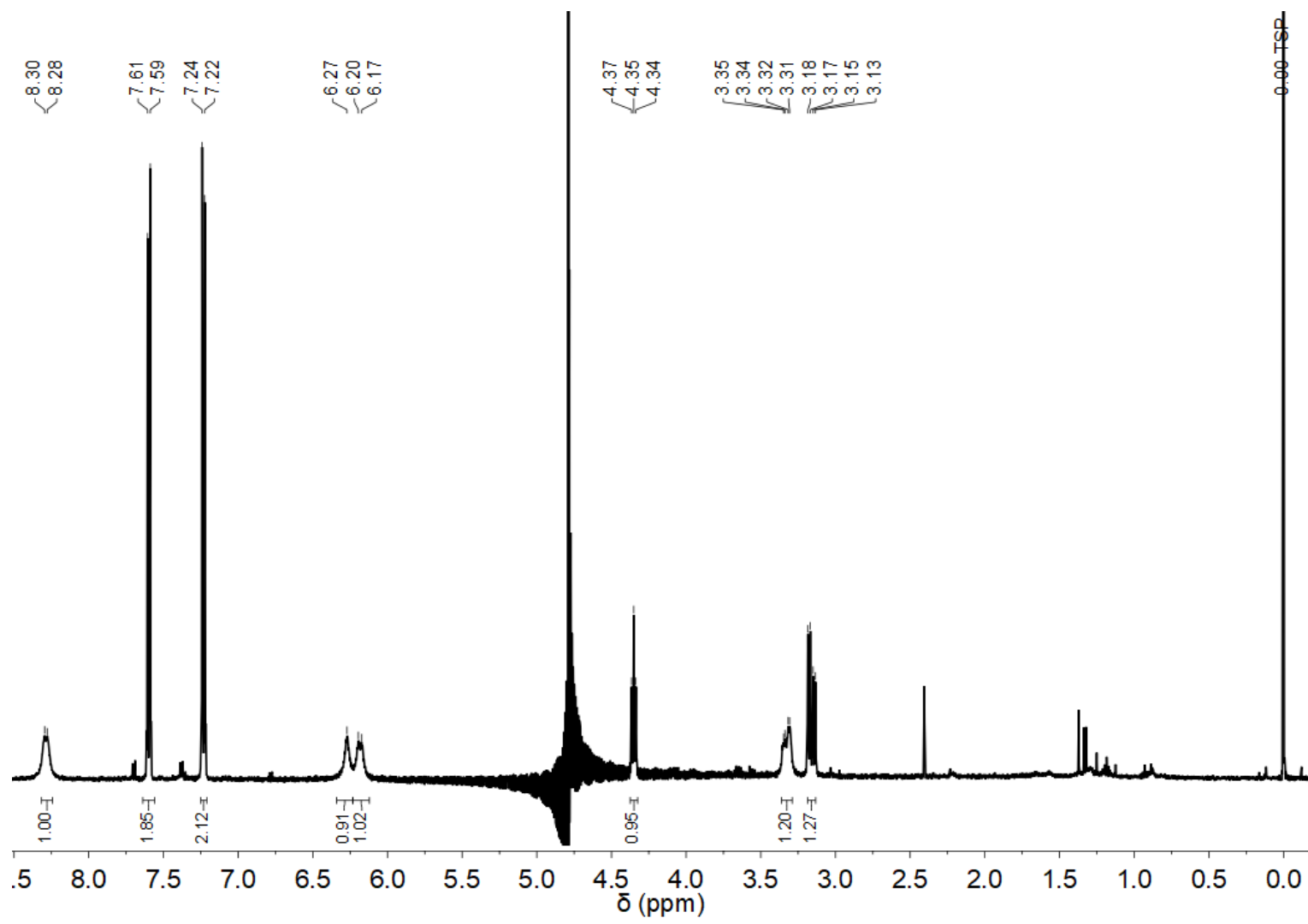


Figura 56: Espectro de 1H RMN da 4-Br-pBeet (D₂O, 500 MHz).

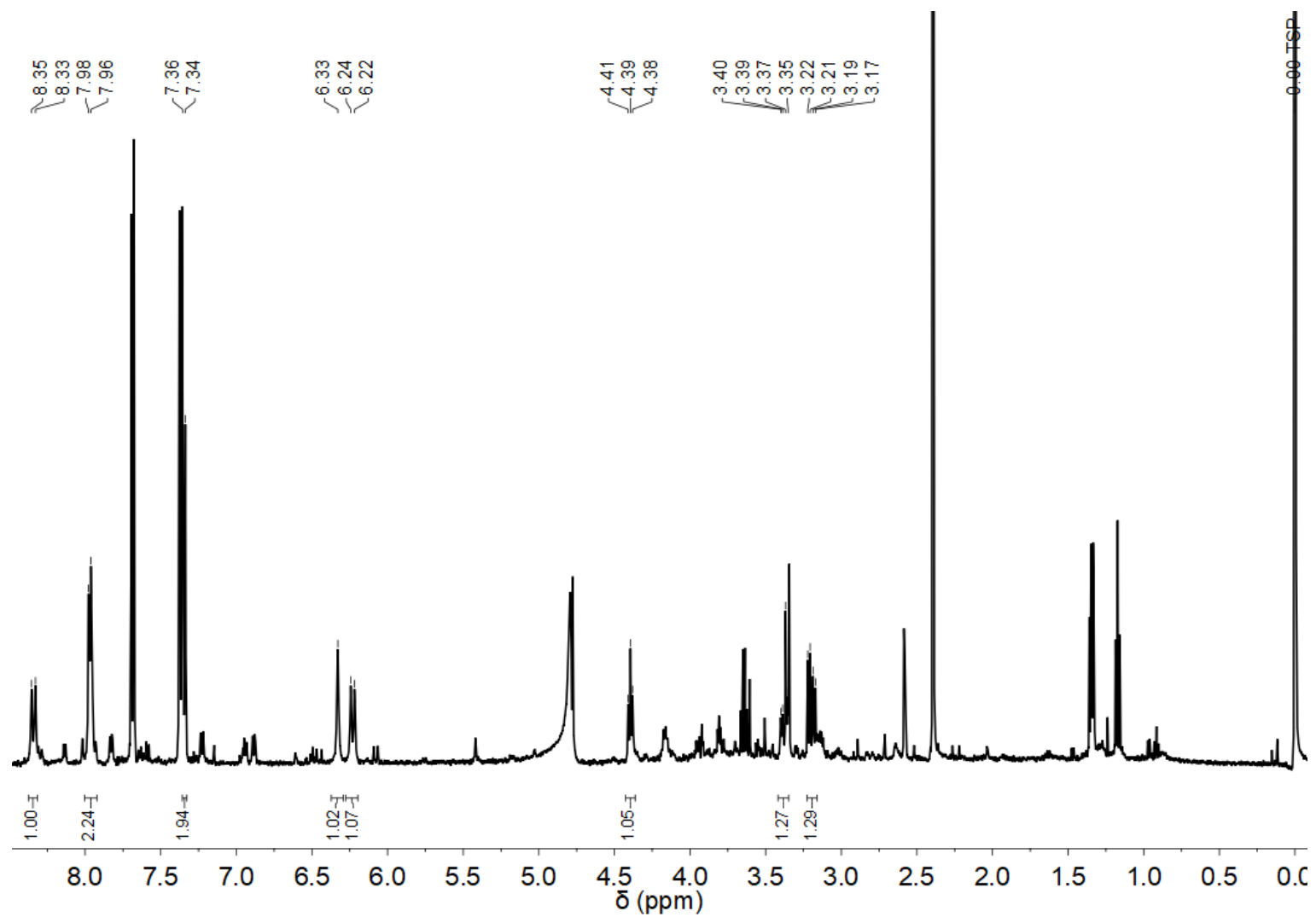


Figura 57: Espectro de ^1H RMN da 4-CO₂H-pBeet (D₂O, 500 MHz).

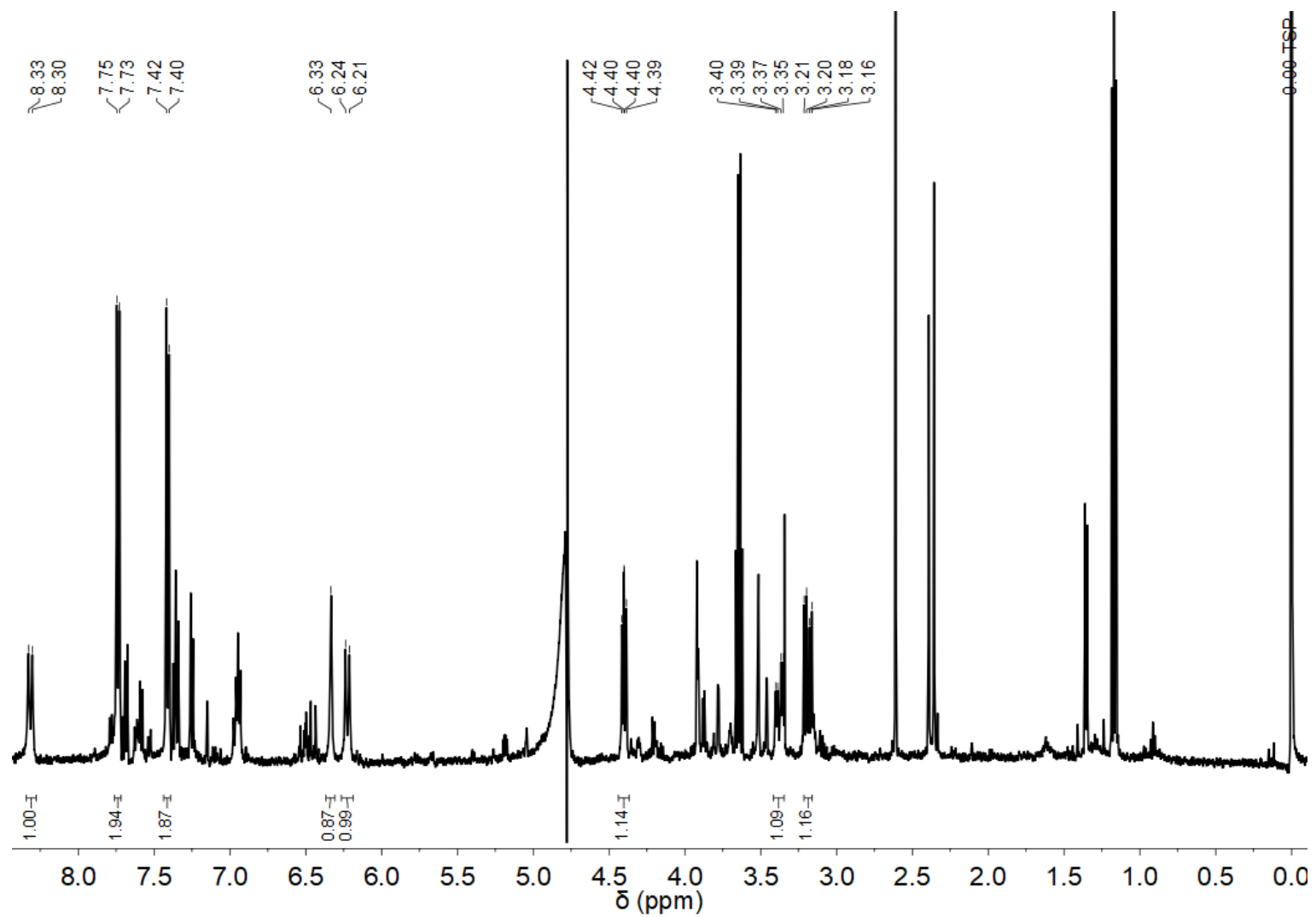


Figura 58: Espectro de 1H RMN da 4-CF₃-pBeet (D₂O, 500 MHz).

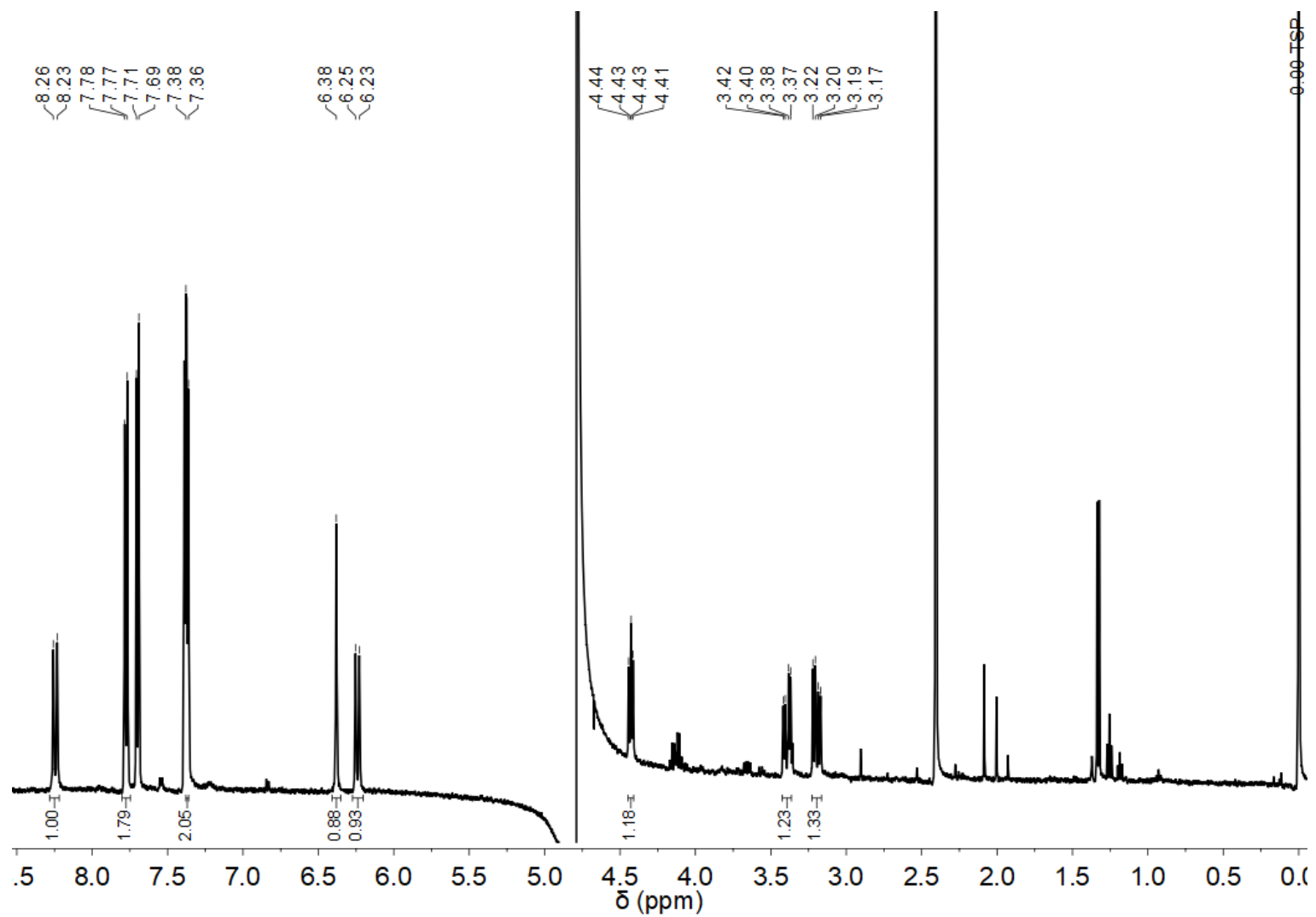


Figura 59: Espectro de ^1H RMN da 4-CN-pBeet (D_2O , 500 MHz).

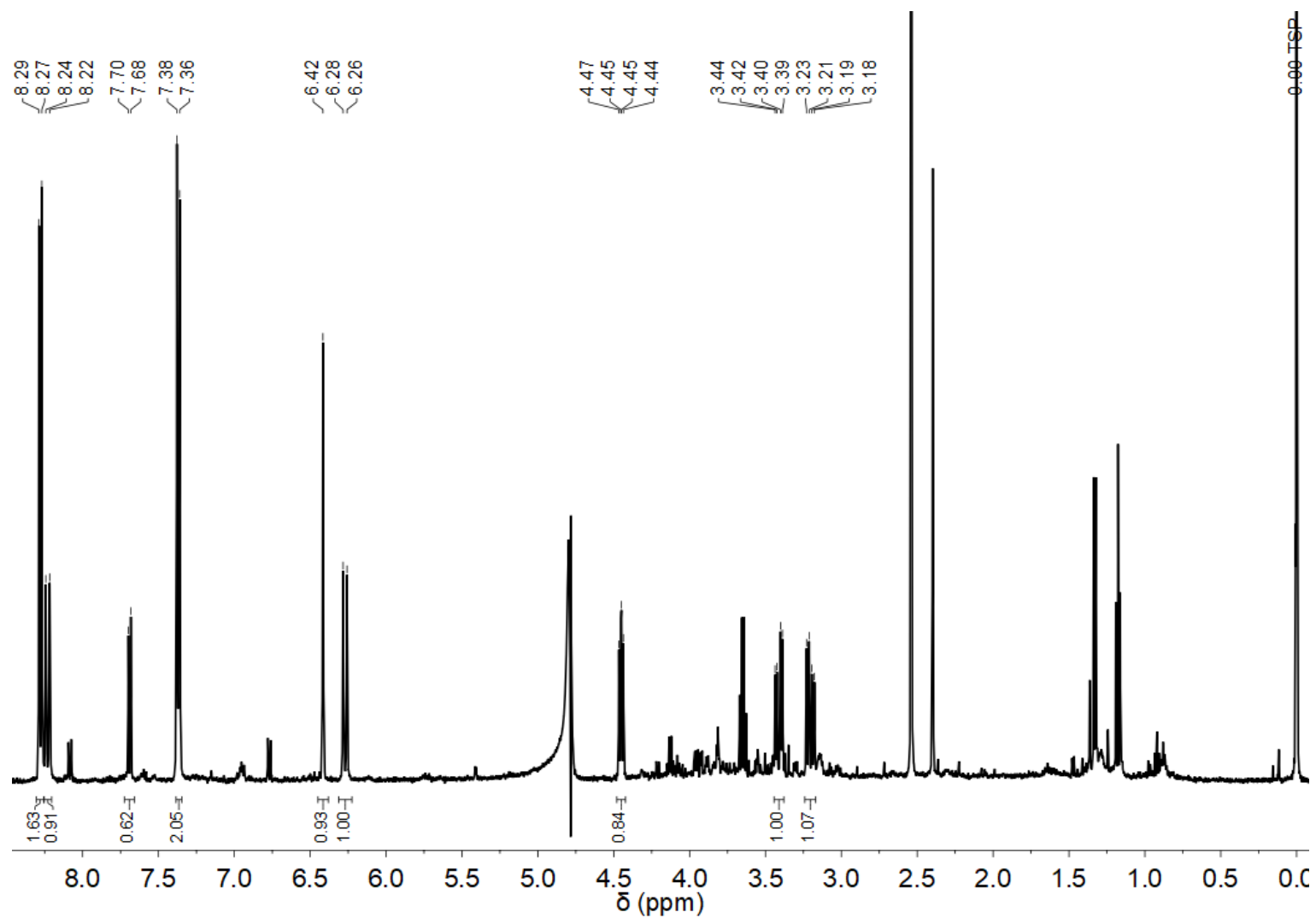


Figura 60: Espectro de ^1H RMN da 4- NO_2 -pBeet (D_2O , 500 MHz).

8.4. Espectros de ^1H RMN das *N*-Me-pBeets

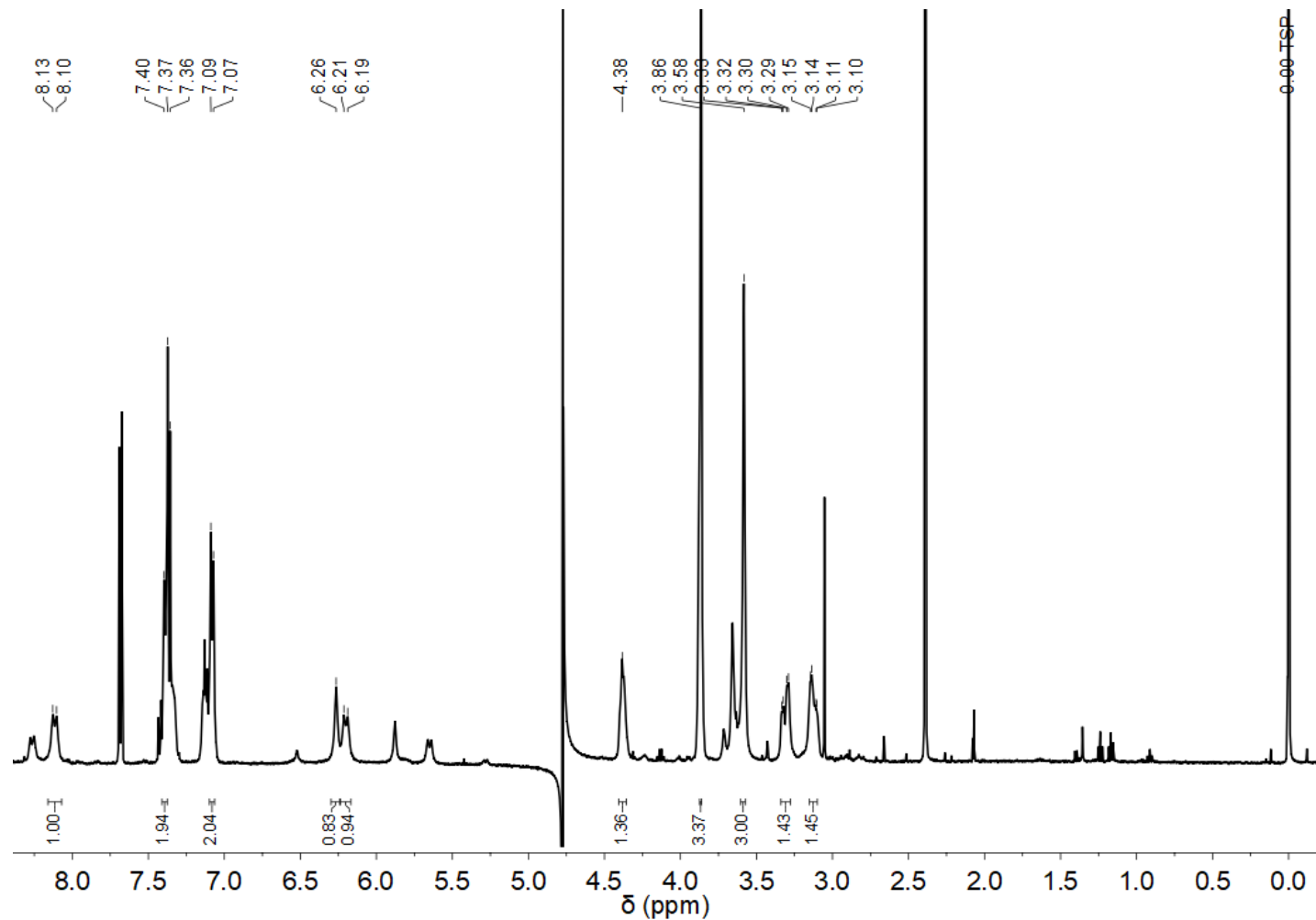


Figura 61: Espectro de ^1H RMN da *N*-Me-4-OMe-pBeet (D_2O , 500 MHz).

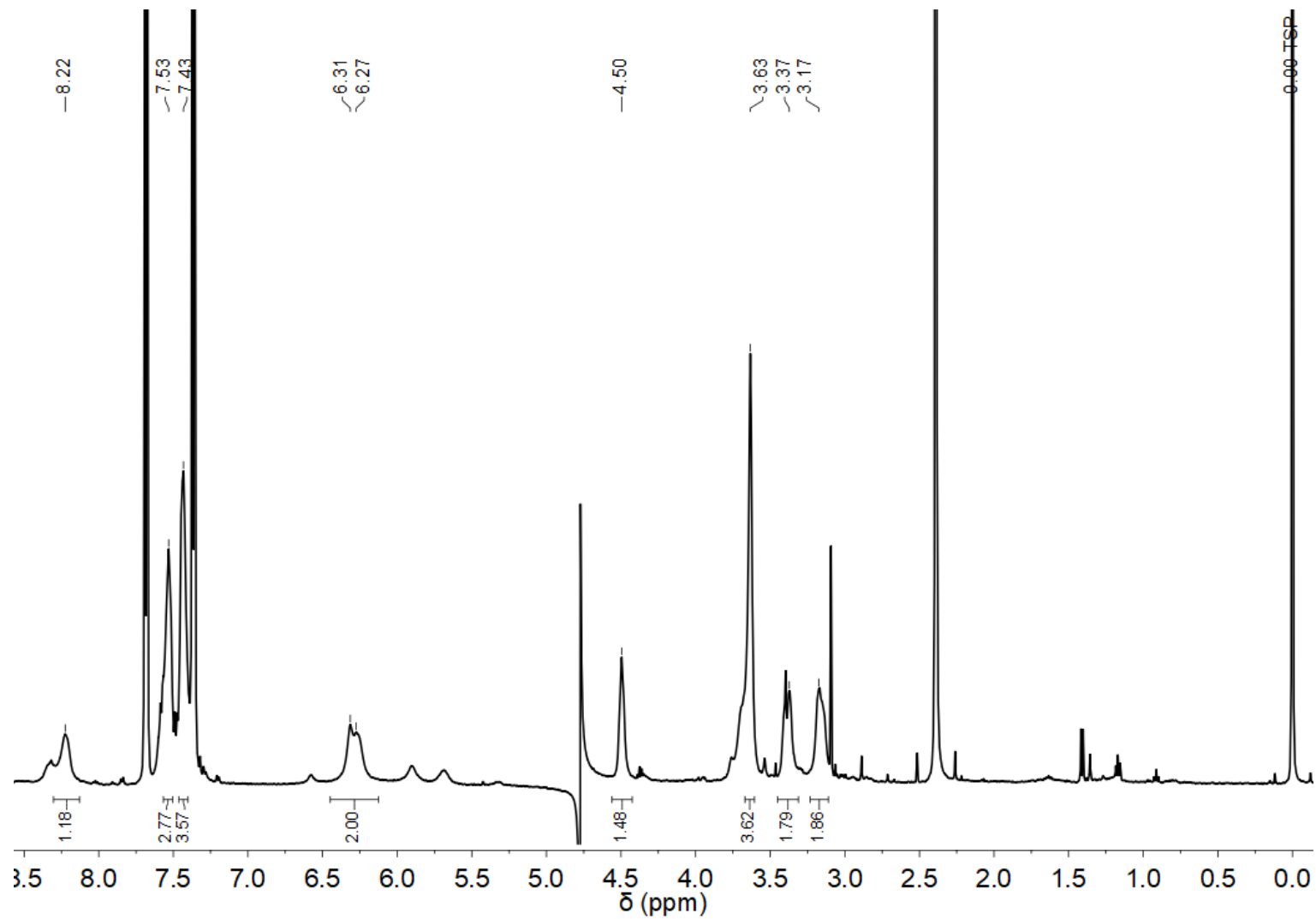


Figura 62: Espectro de ^1H RMN da *N*-Me-pBeet (D_2O , 500 MHz).

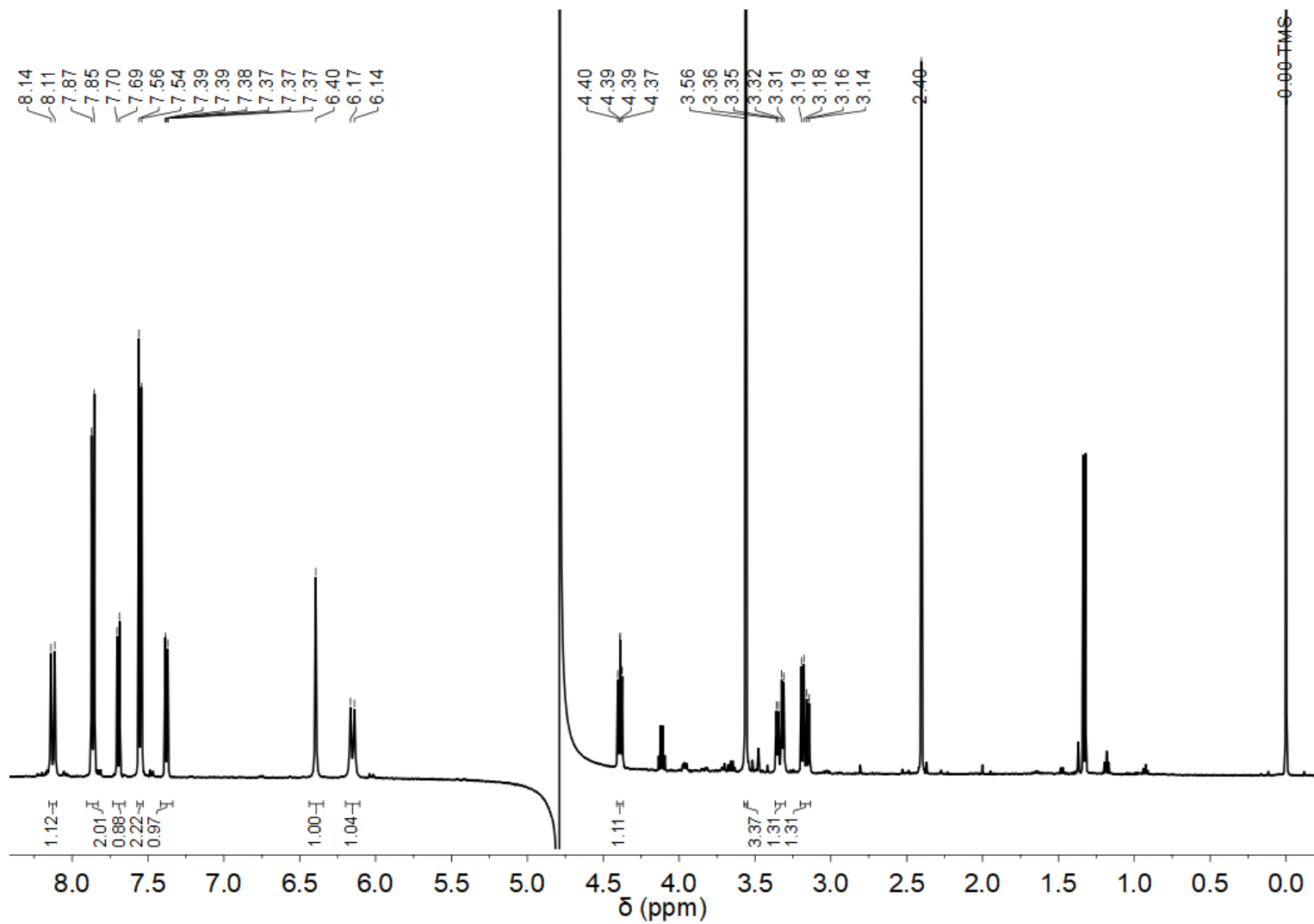


Figura 63: Espectro de ^1H RMN da *N*-Me-4-CN-pBeet (D_2O , 500 MHz).

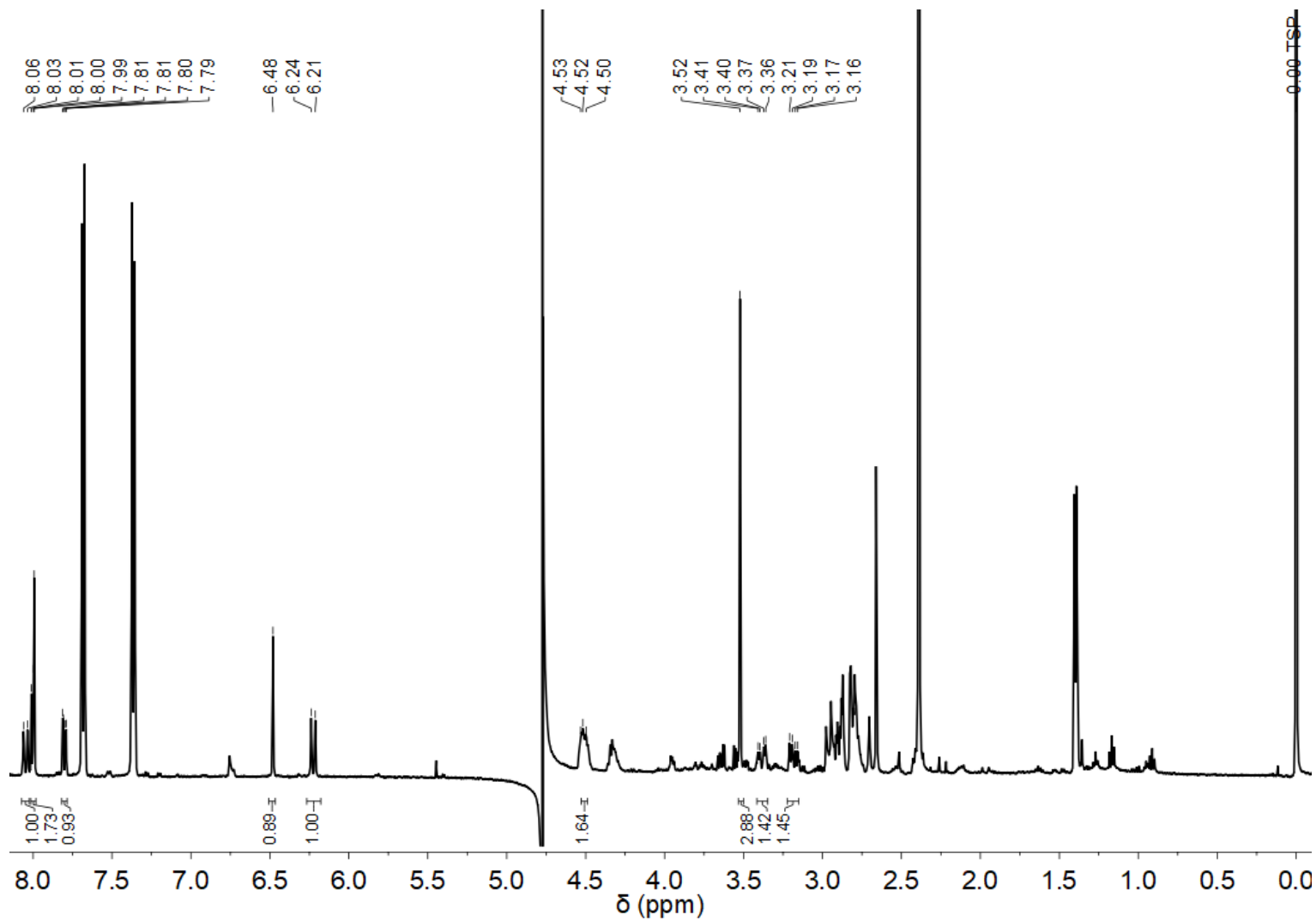


Figura 64: Espectro de 1H RMN da *N*-Me-3,4-CN-pBeet (D₂O, 500 MHz).

8.5. Espectros de ^1H RMN das dipBeets

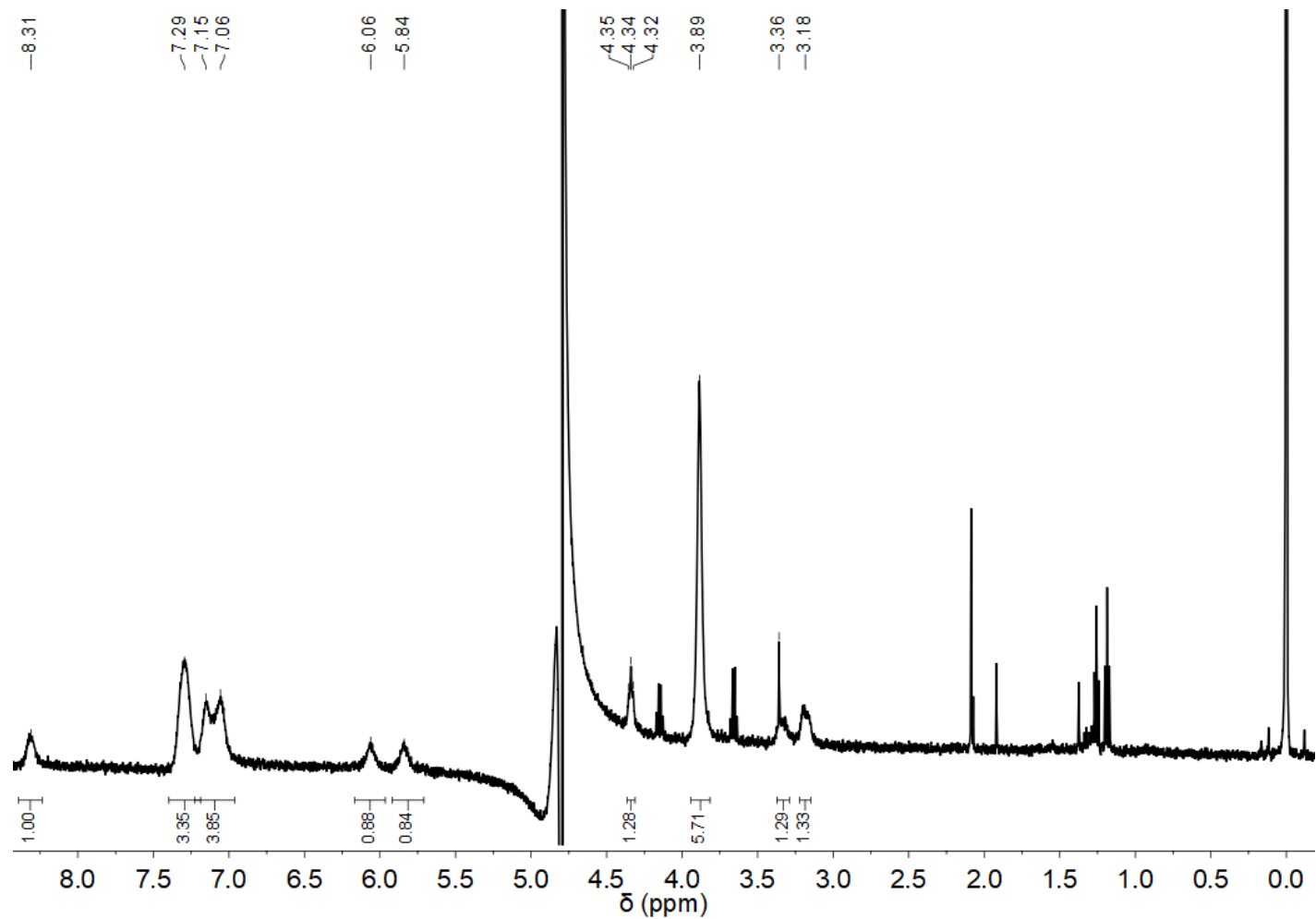


Figura 65: Espectro de ^1H RMN da 4,4'-OMe-dipBeet (D_2O , 500 MHz).

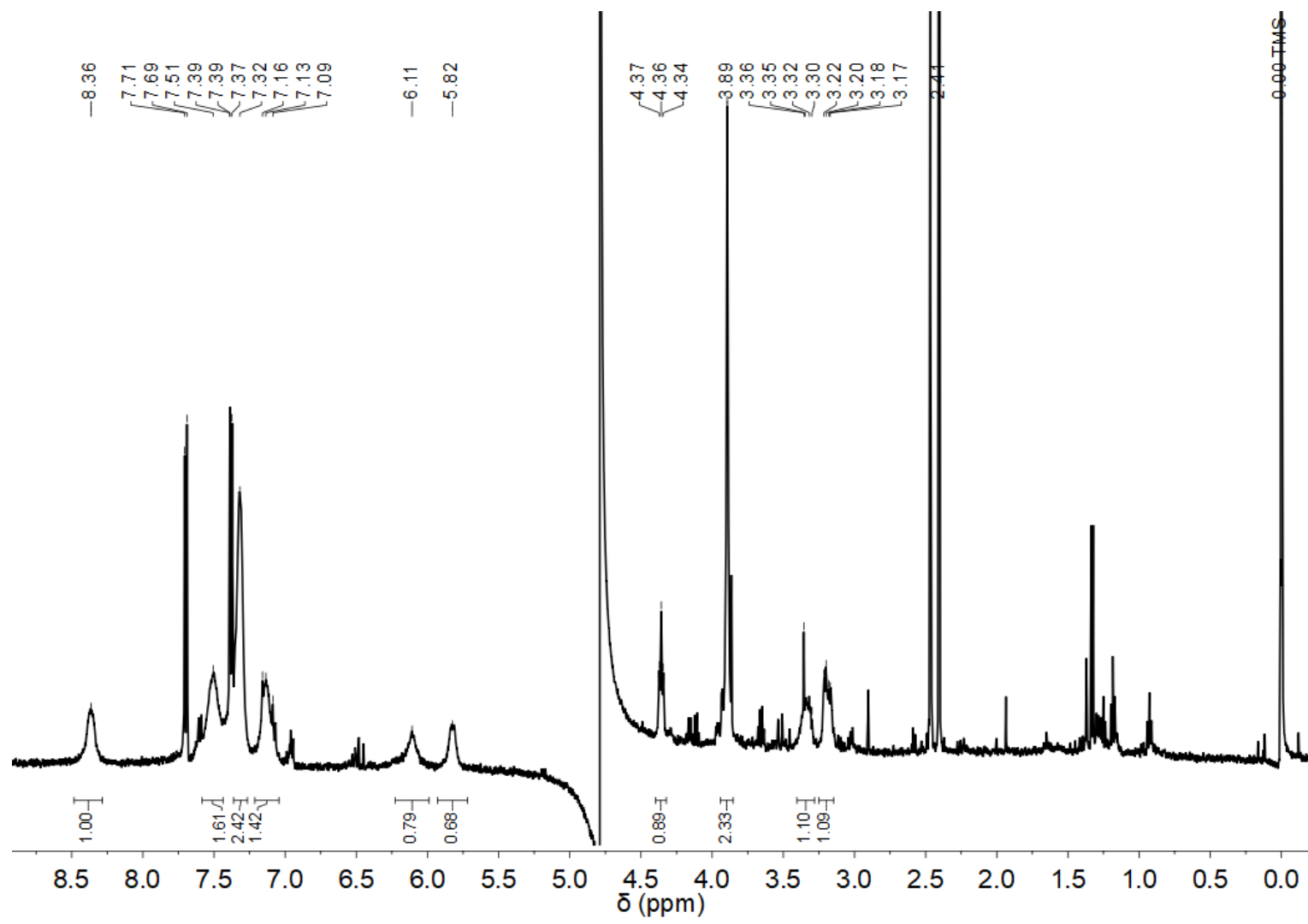


Figura 66: Espectro de ^1H RMN da 4-OMe-dipBeet (D_2O , 500 MHz).

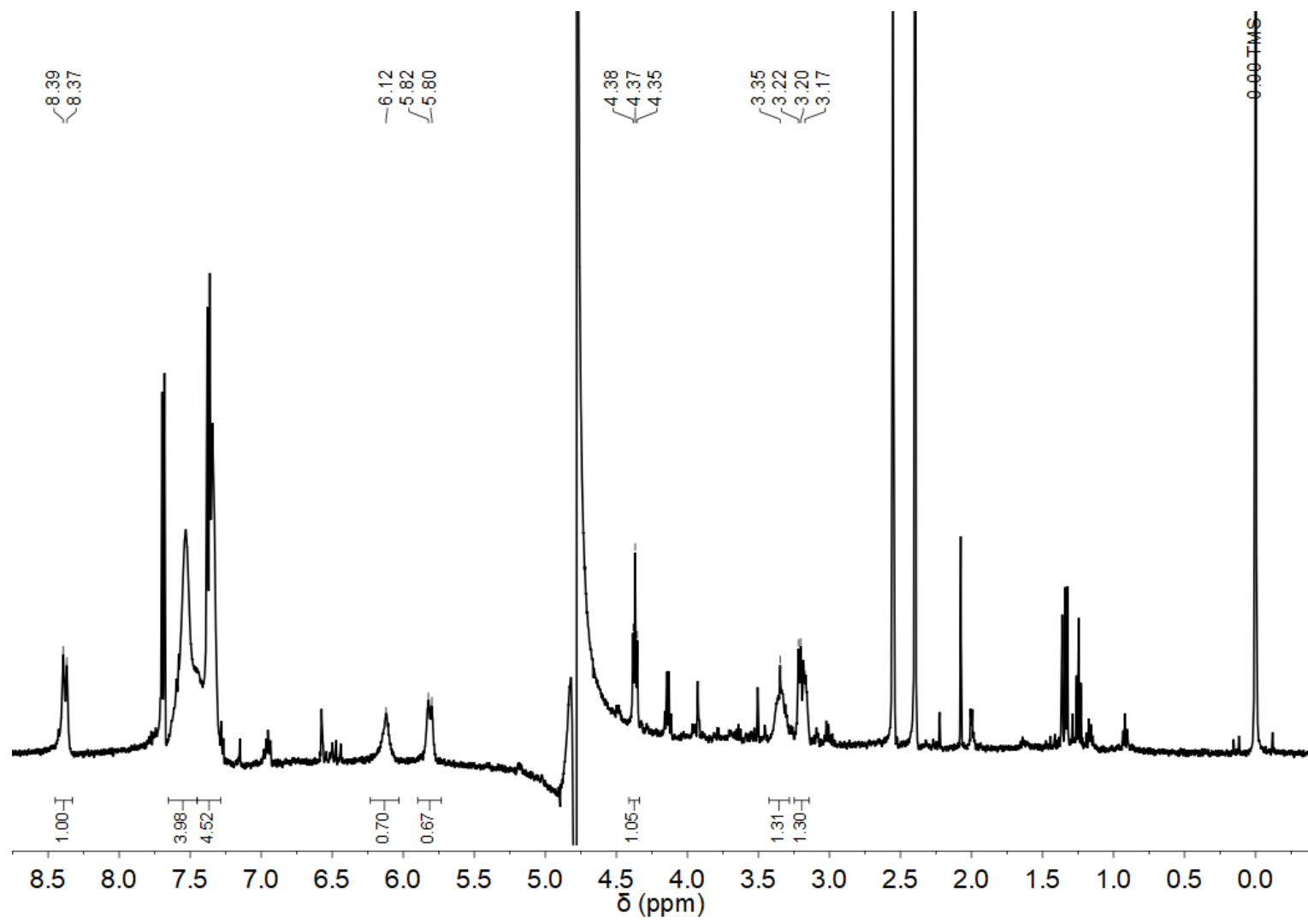


Figura 67: Espectro de ¹H RMN da dipBeet (D₂O, 500 MHz).

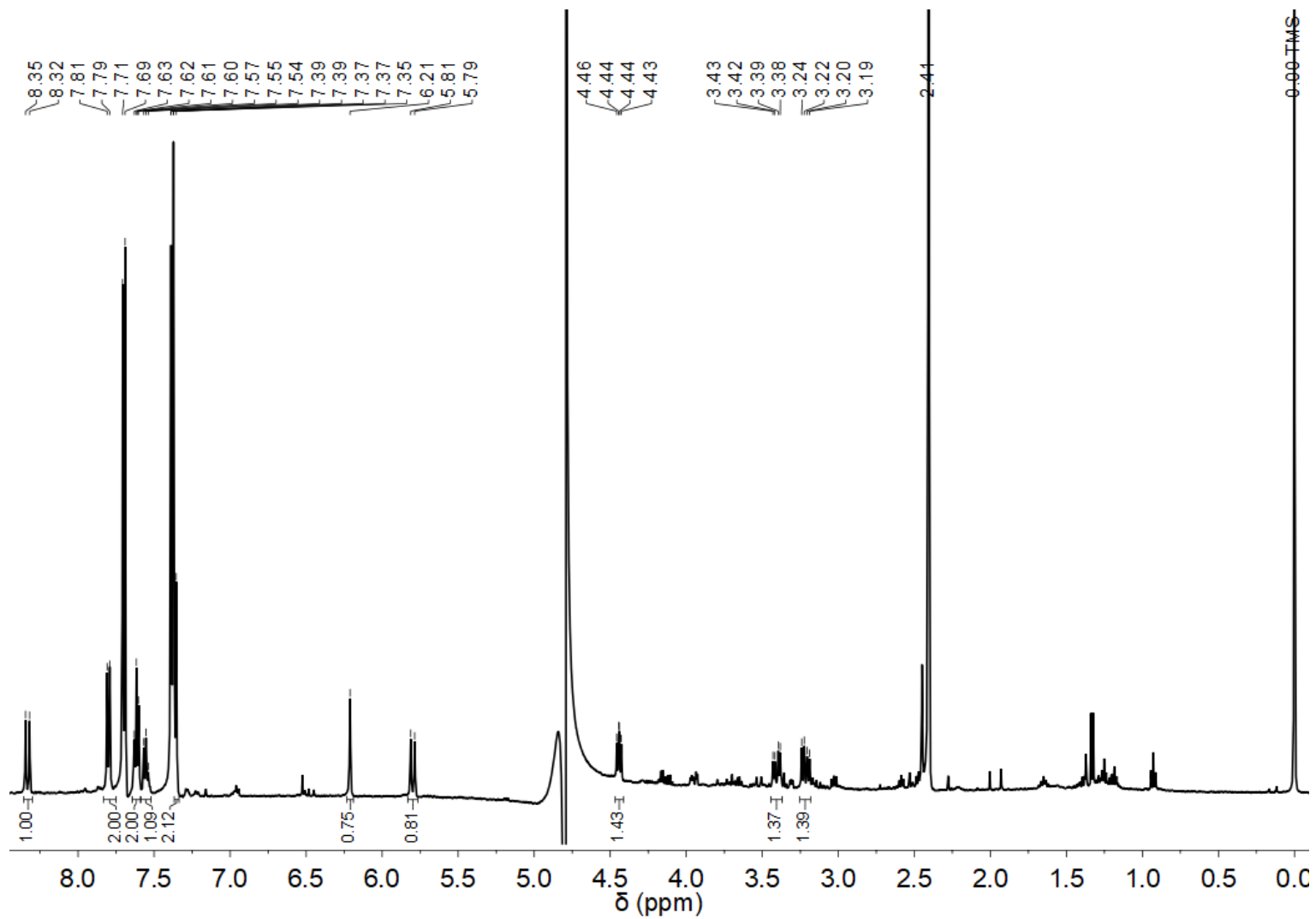


Figura 68: Espectro de ^1H RMN da 4-CN-dipBeet (D_2O , 500 MHz).

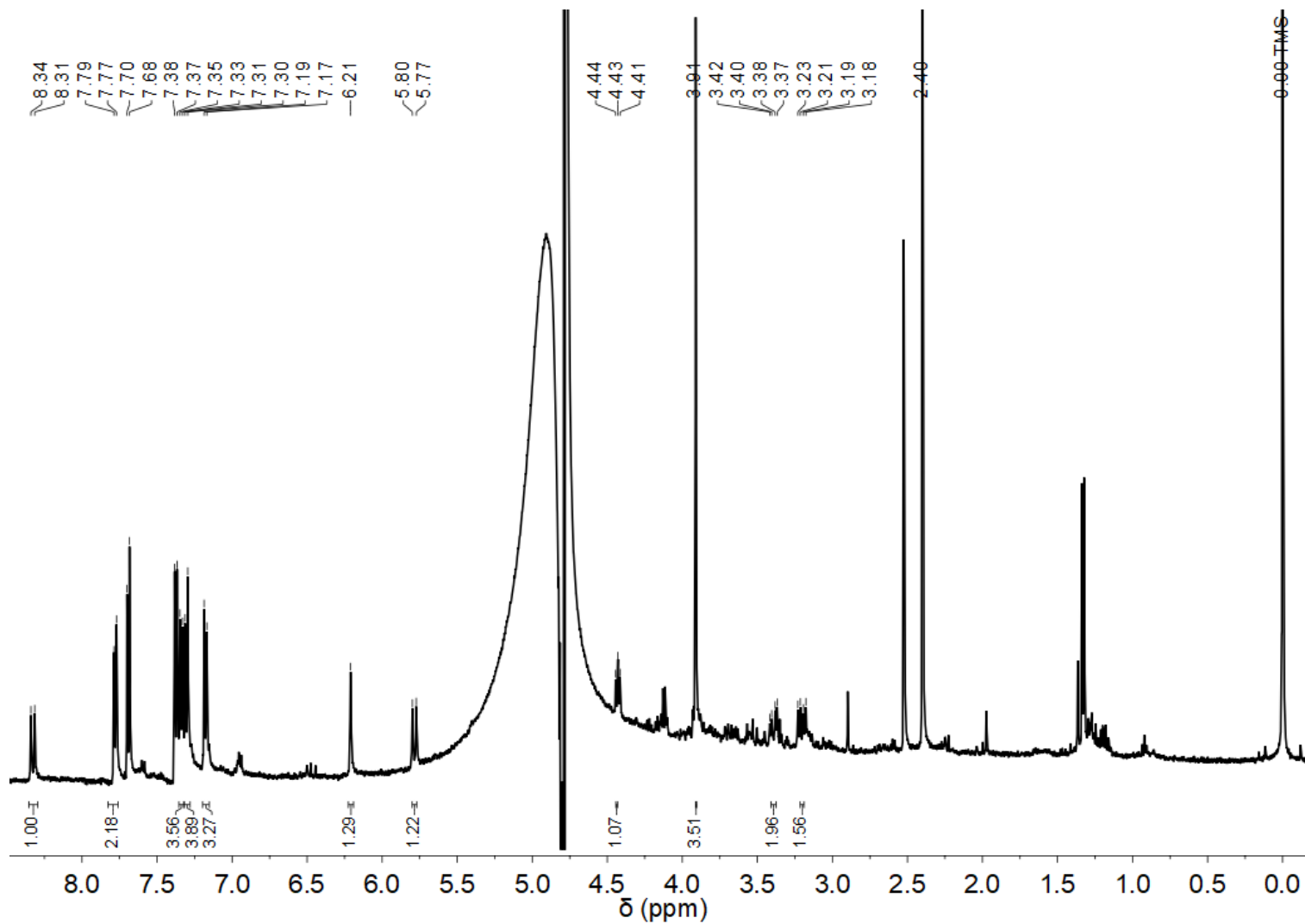


Figura 69: Espectro de ^1H RMN da 4-OMe-4'-CN-dipBeet (D_2O , 500 MHz).

8.6. HPLC-DAD-ESI(+)-TOF das betalaínas

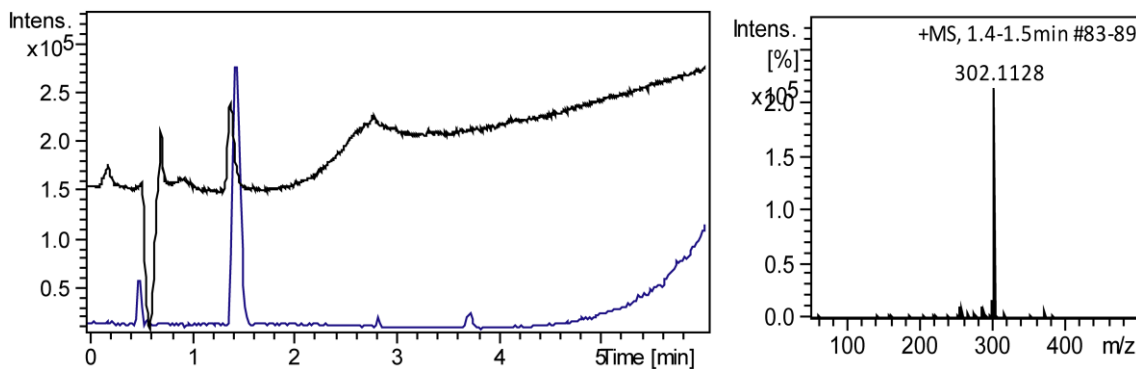


Figura 70: HPLC-ESI(+)-TOF da 4-NH₂-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

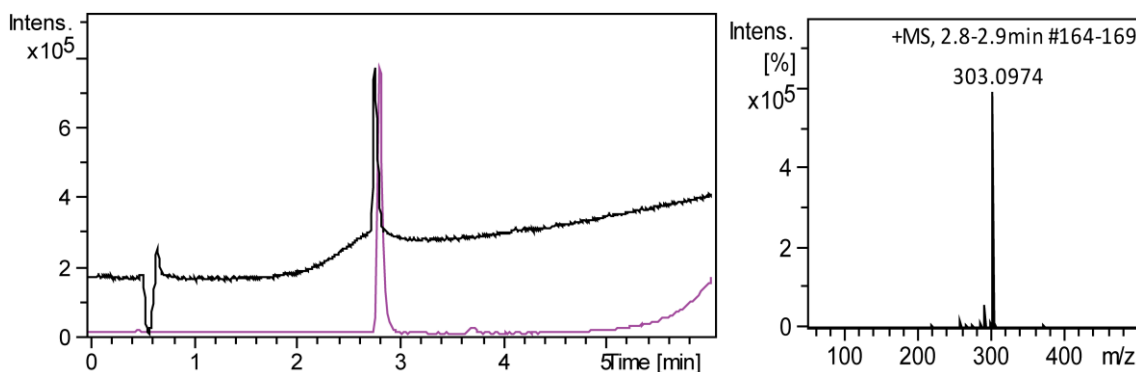


Figura 71: HPLC-ESI(+)-TOF da 4-OH-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

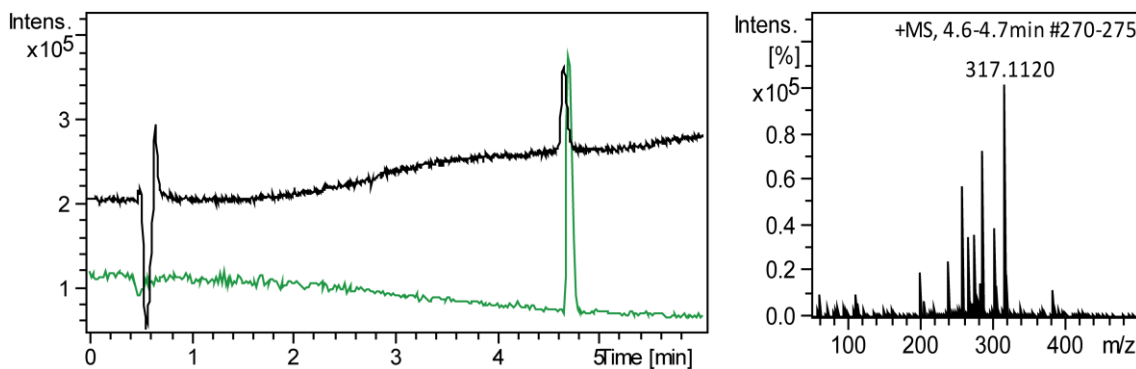


Figura 72: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-OMe-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

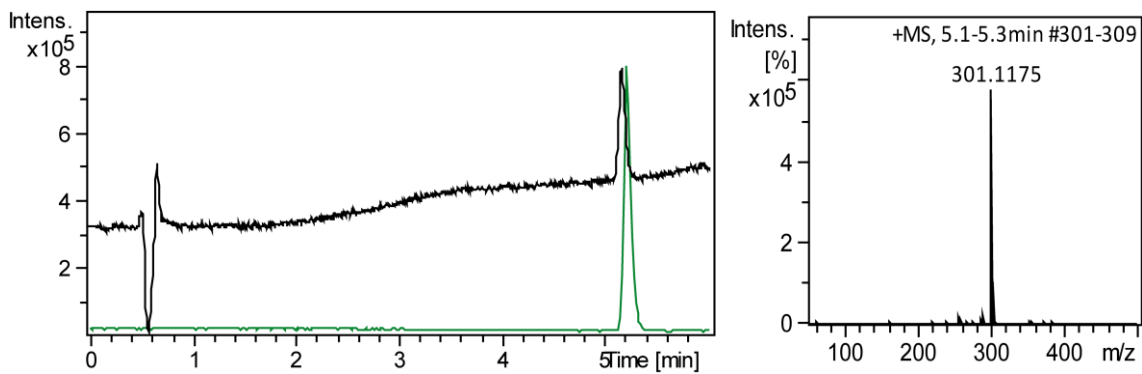


Figura 73: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-Me-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

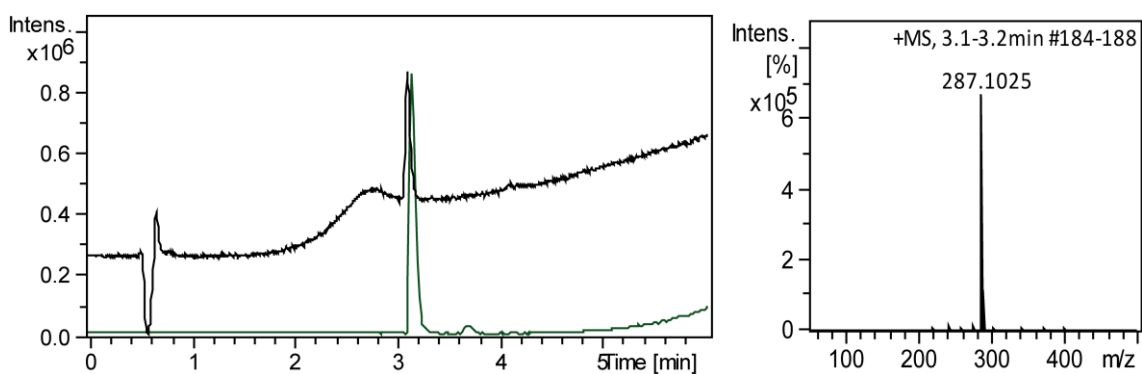


Figura 74: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da pBeet, $\lambda = 254$ nm.

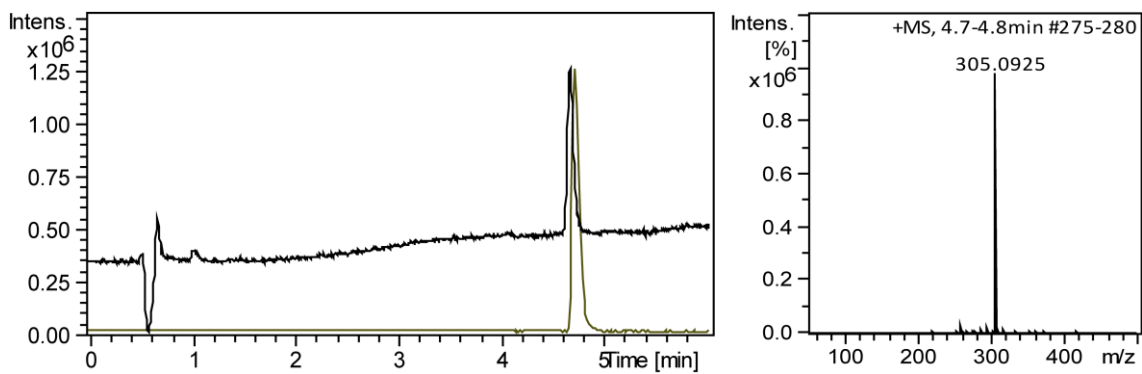


Figura 75: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-F-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

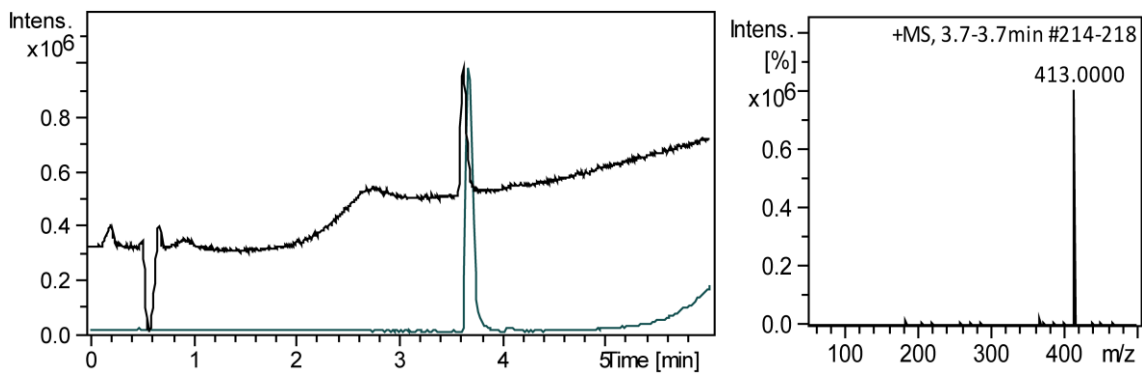


Figura 76: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-I-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

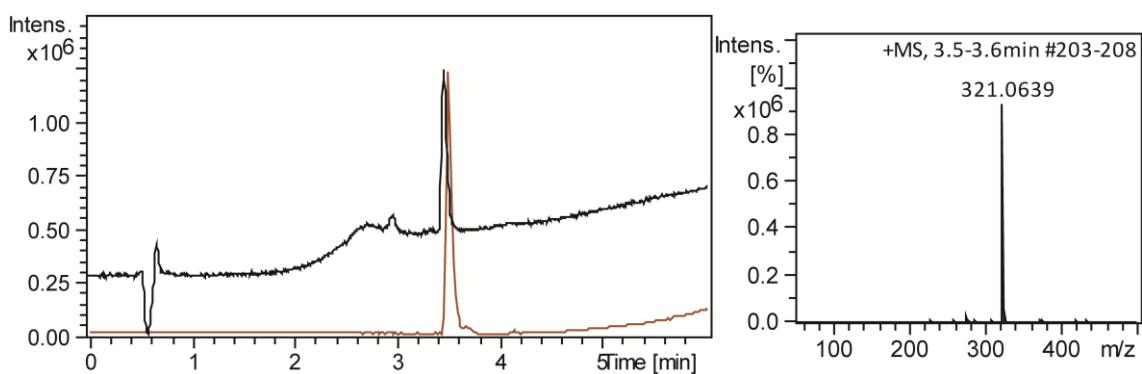


Figura 77: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-Cl-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

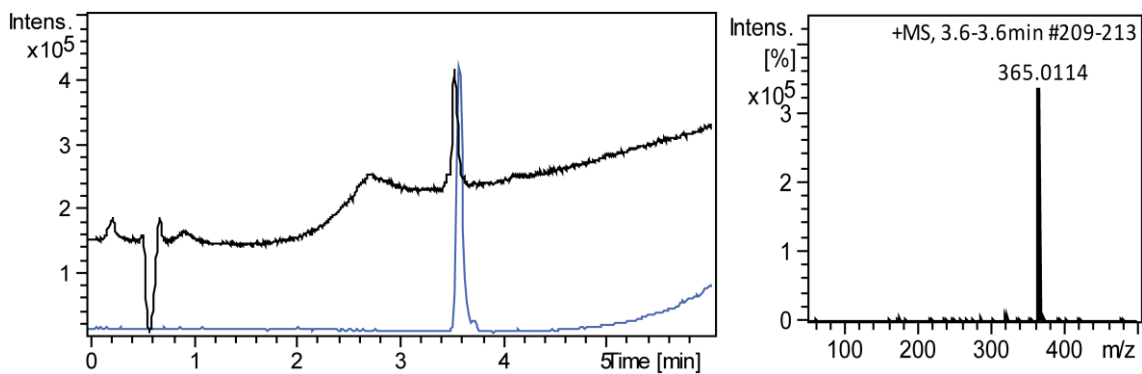


Figura 78: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-Br-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

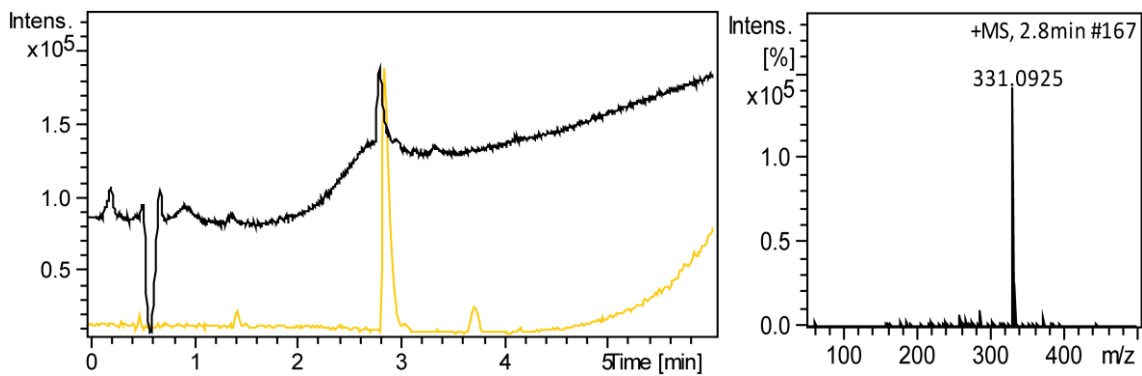


Figura 79: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-CO₂H-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

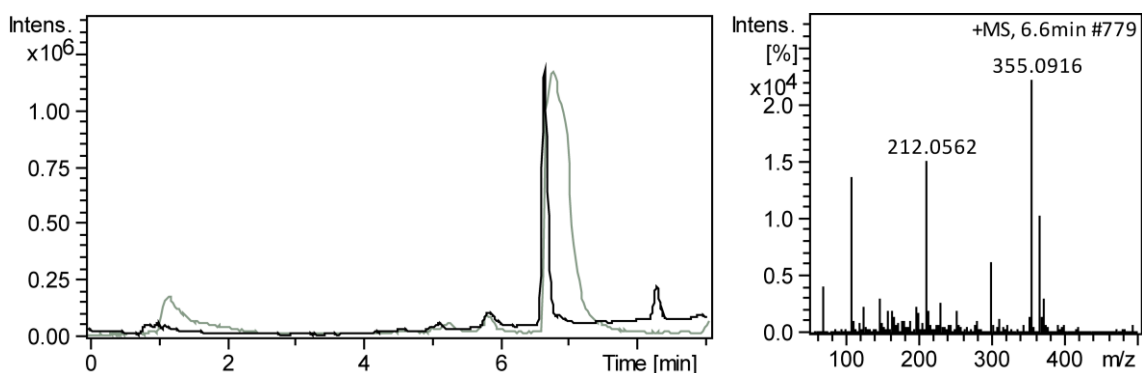


Figura 80: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-CF₃-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

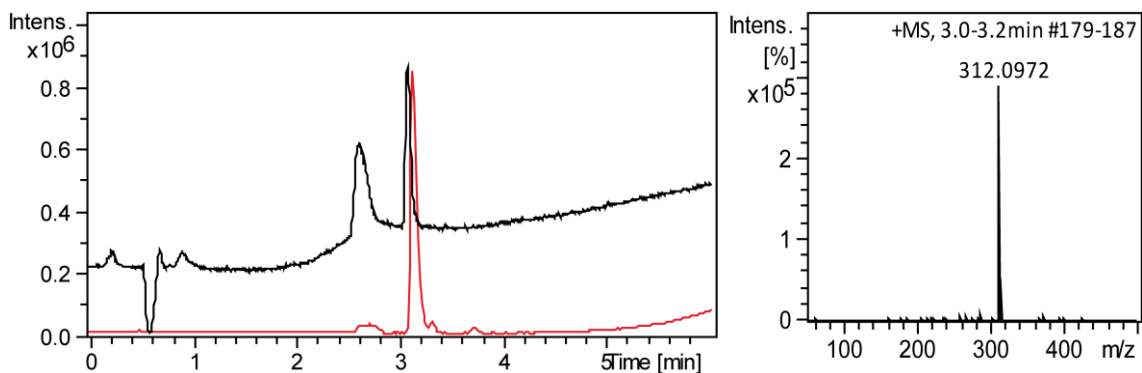


Figura 81: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-CN-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

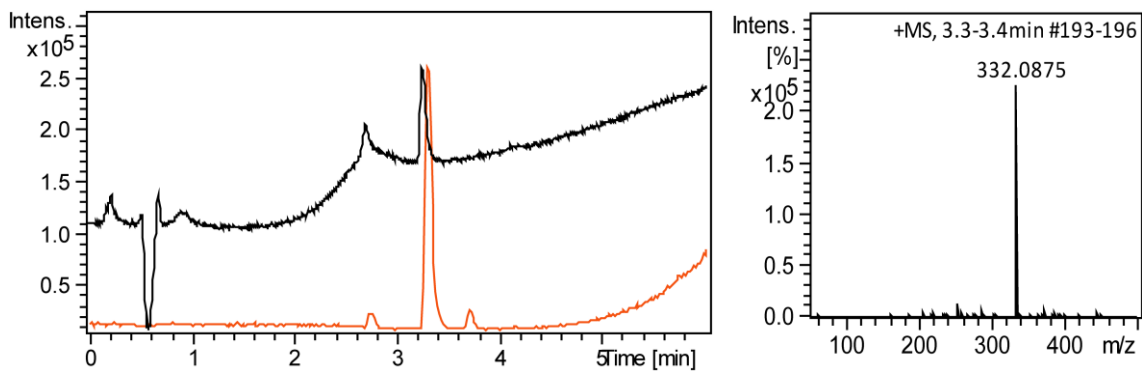


Figura 82: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-NO₂-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

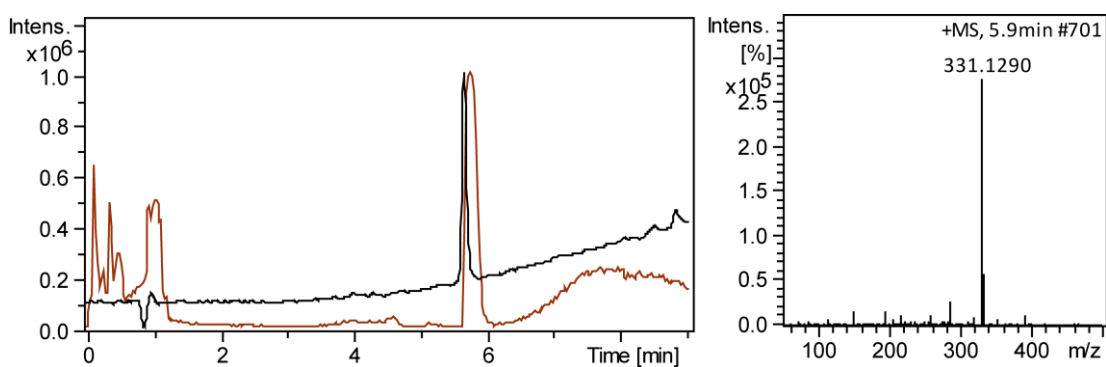


Figura 83: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da *N*-Me-4-OMe-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

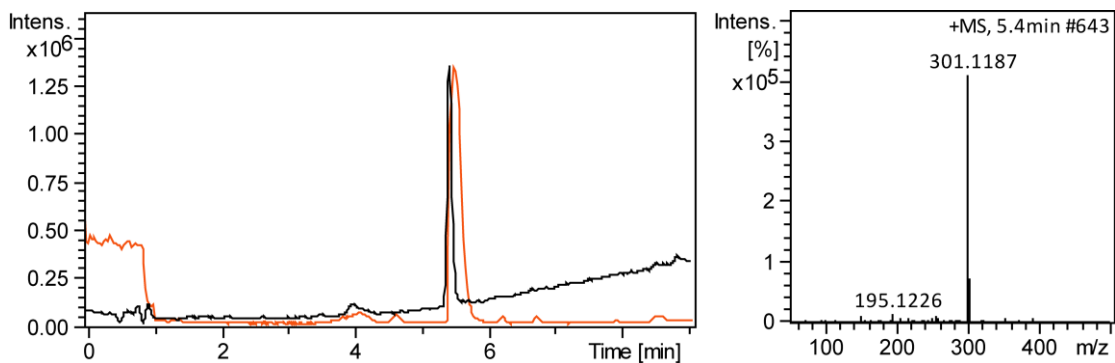


Figura 84: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da *N*-Me-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

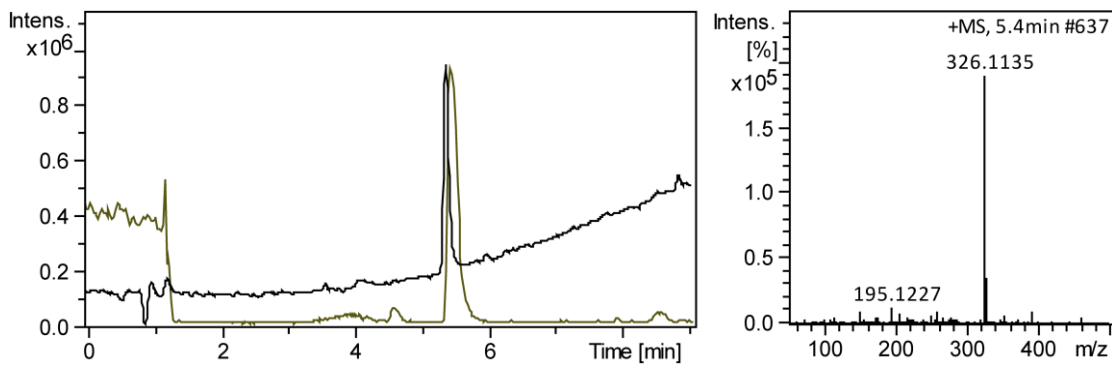


Figura 85: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da *N*-Me-4-CN-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

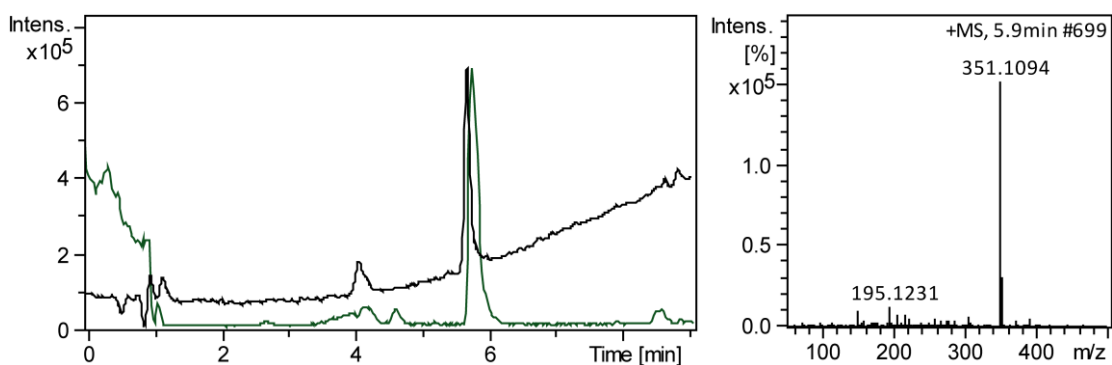


Figura 86: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da *N*-Me-3,4-CN-pBeet, $\lambda = 254$ nm.

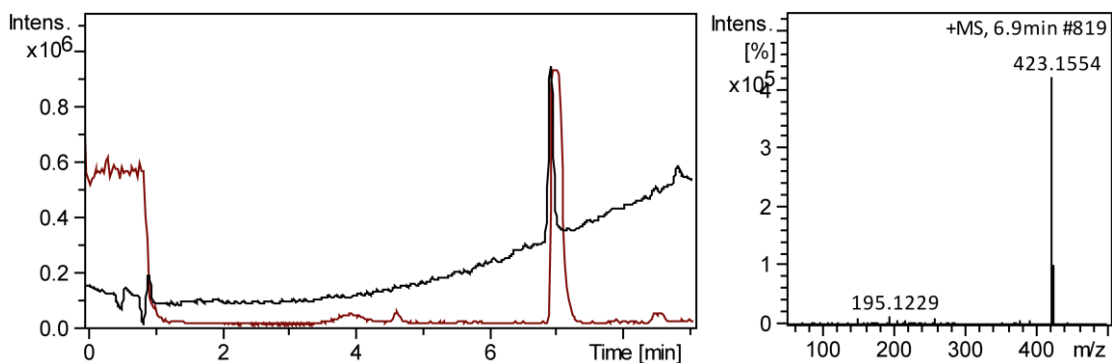


Figura 87: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4,4'-OMe-dipBeet, $\lambda = 254$ nm.

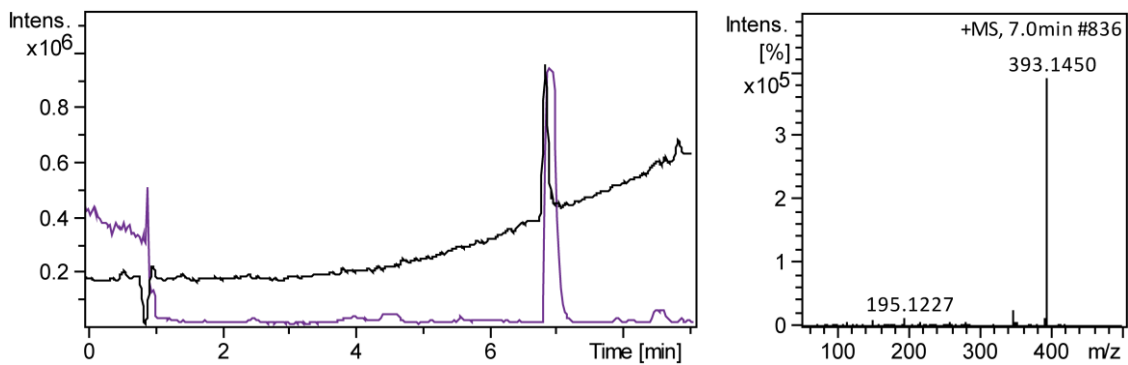


Figura 88: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-OMe-dipBeet, $\lambda = 254$ nm.

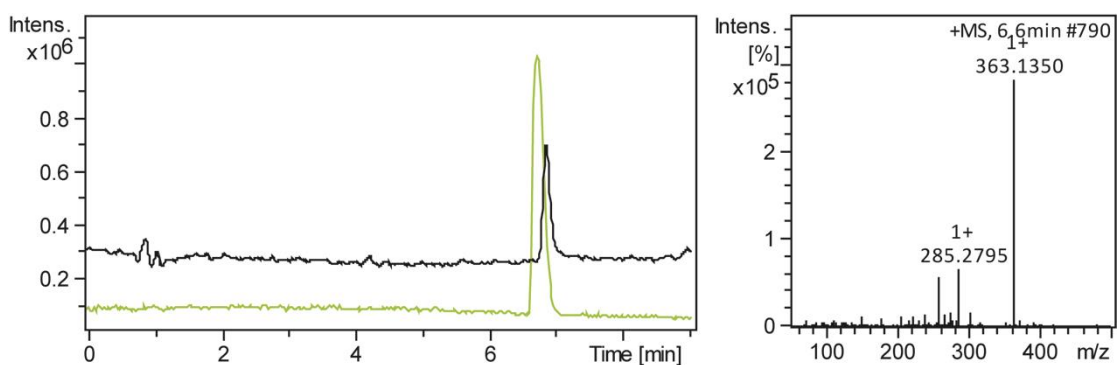


Figura 89: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da dipBeet, $\lambda = 254$ nm.

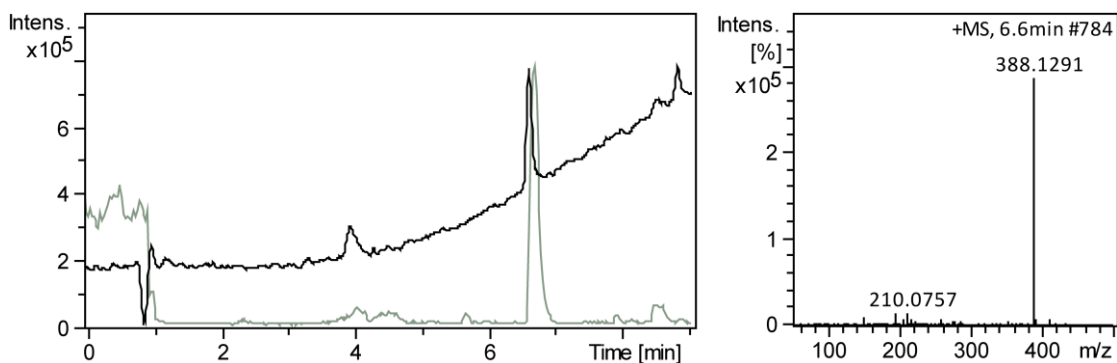


Figura 90: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-CN-dipBeet, $\lambda = 254$ nm.

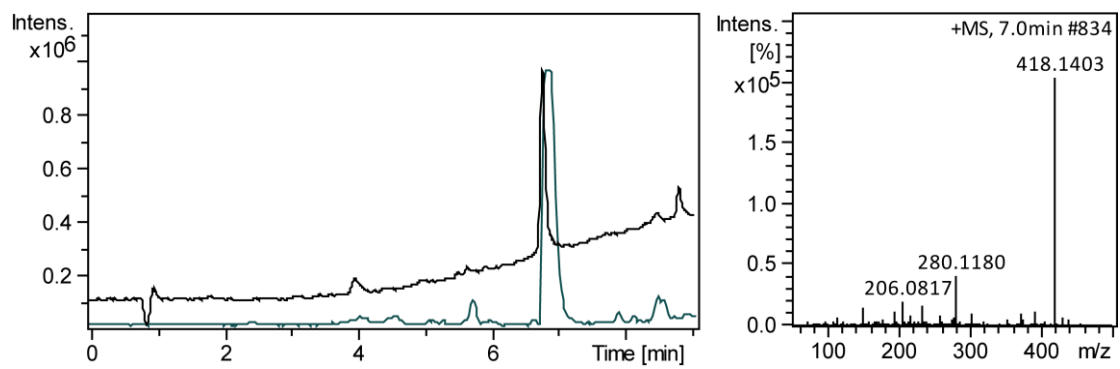


Figura 91: HPLC-DAD-ESI(+)-TOF da 4-OMe-4'-CN-dipBeet, $\lambda = 254$ nm.

8.7. Caracterização fotofísica

8.7.1. pBeets

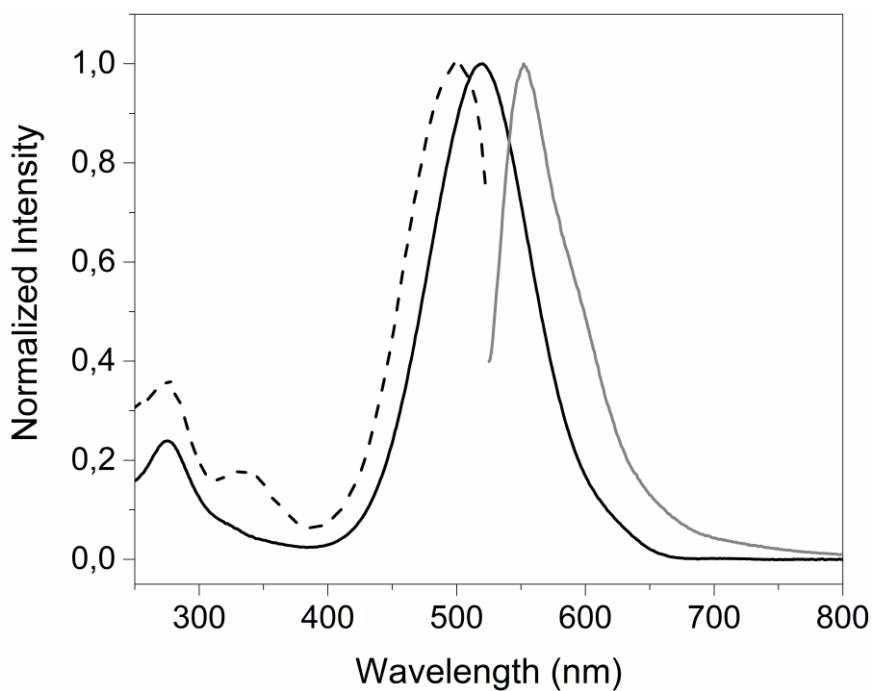


Figura 92: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-NH₂-pBeet

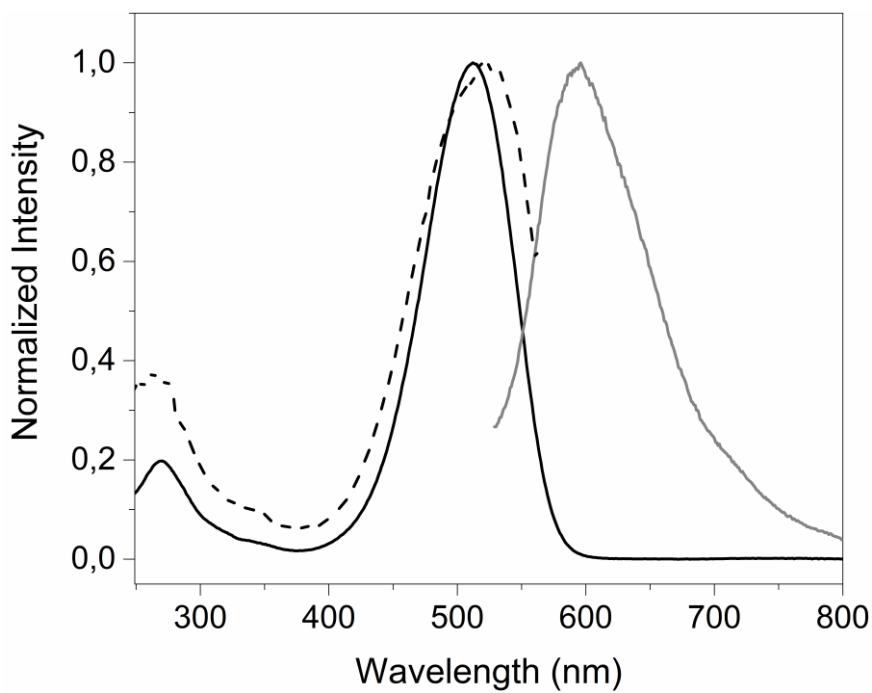


Figura 93: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-OH-pBeet

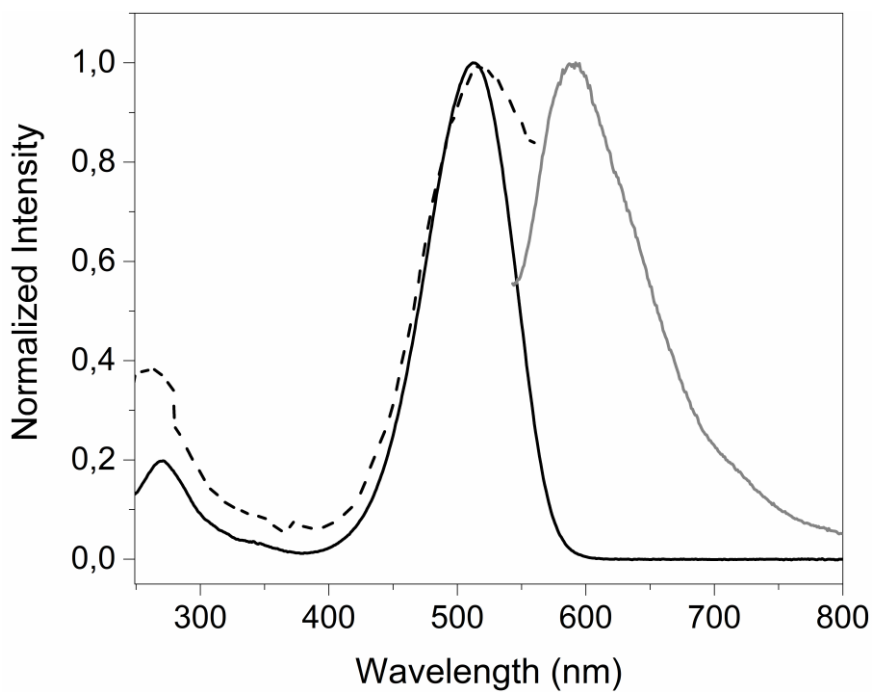


Figura 94: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-OMe-pBeet

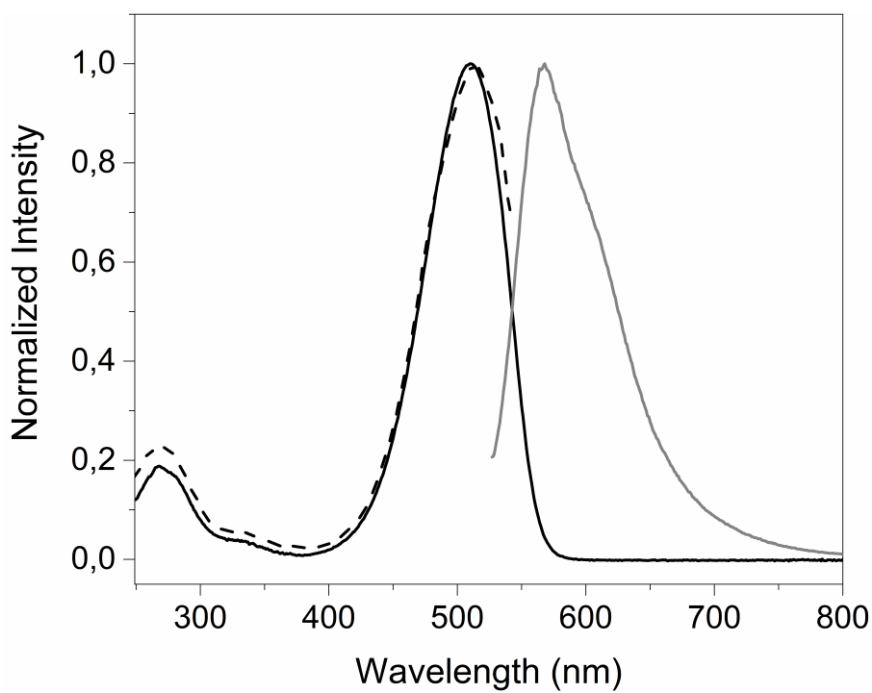


Figura 95: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-Me-pBeet

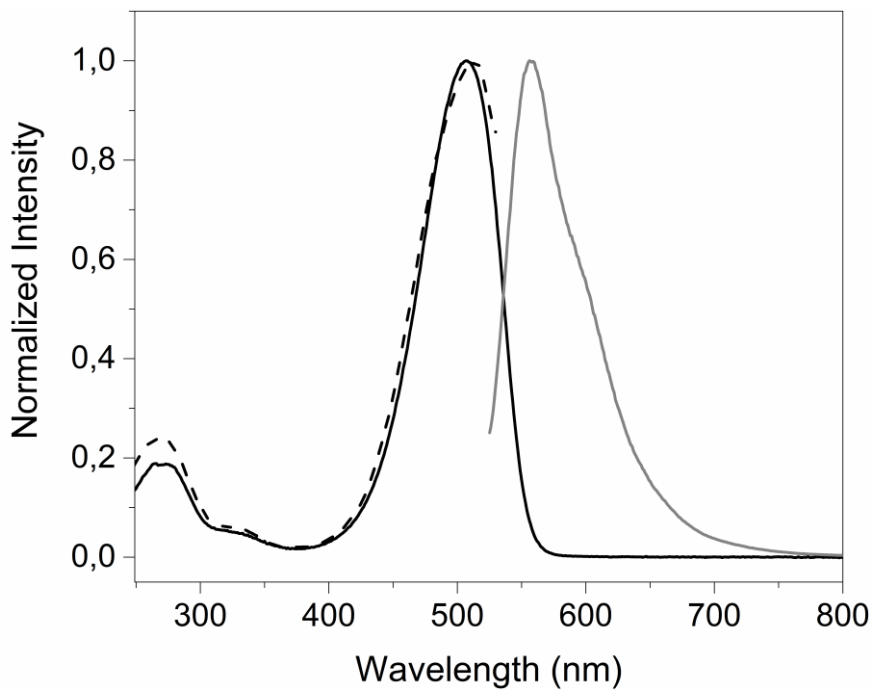


Figura 96: Espectros de absorção, excitação e emissão da pBeet

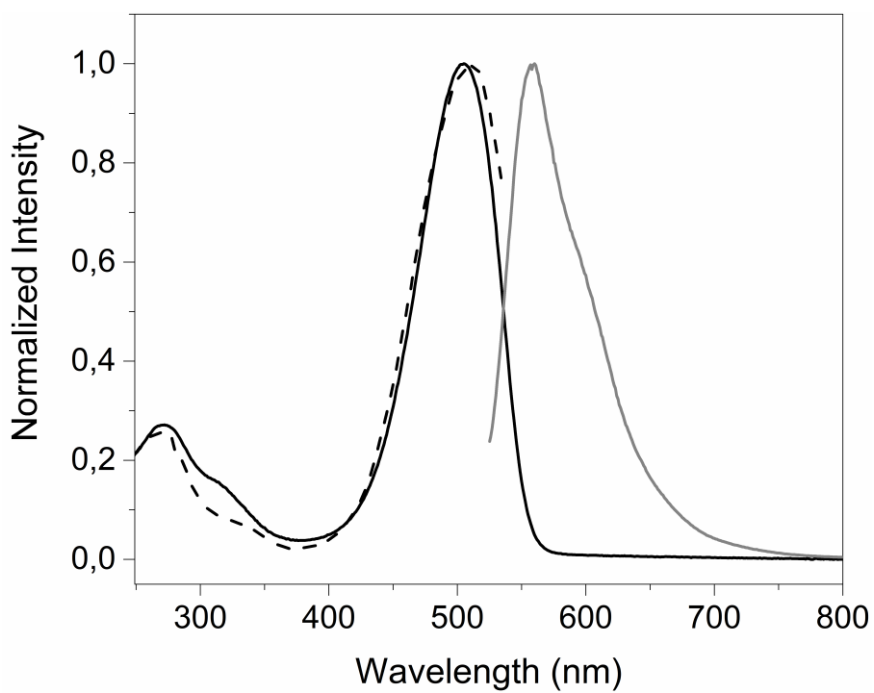


Figura 97: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-F-pBeet

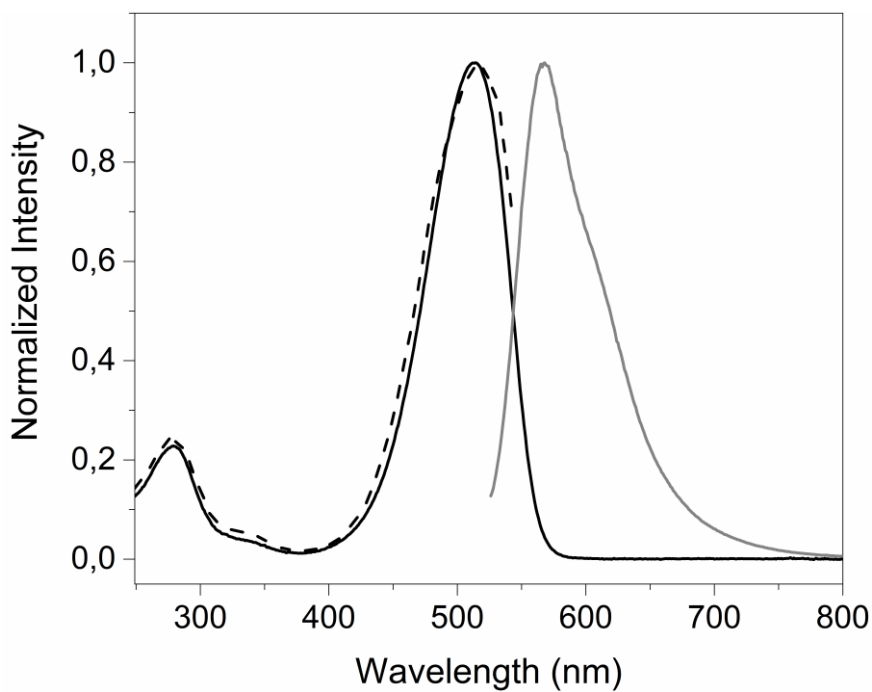


Figura 98: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-I-pBeet

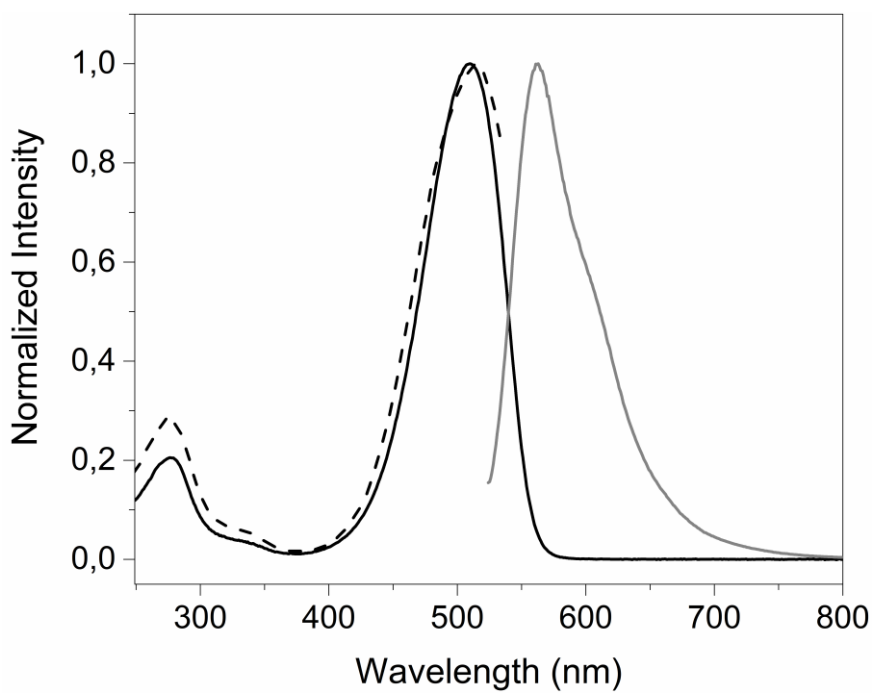


Figura 99: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-Cl-pBeet

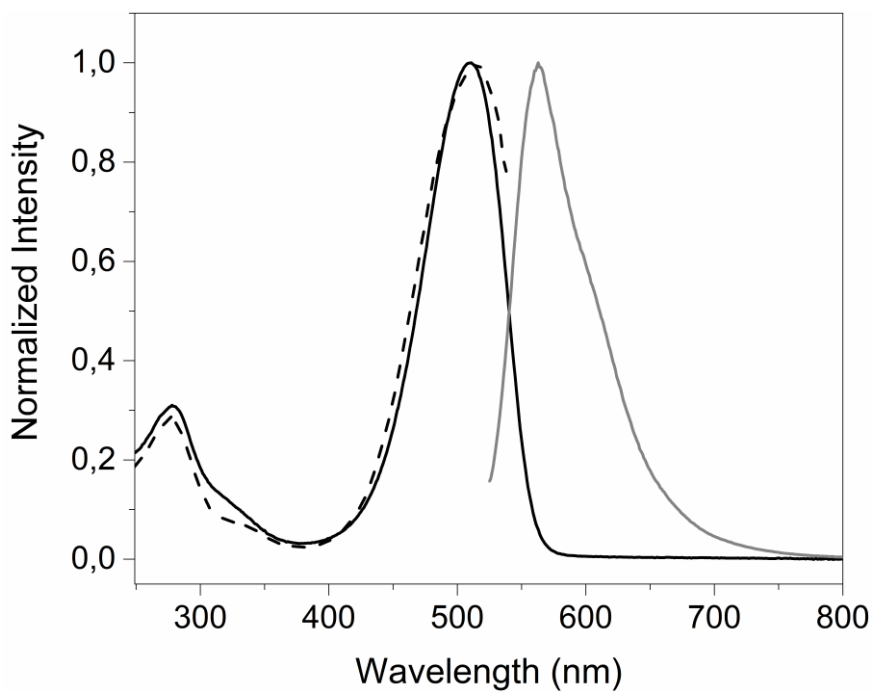


Figura 100: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-Br-pBeet

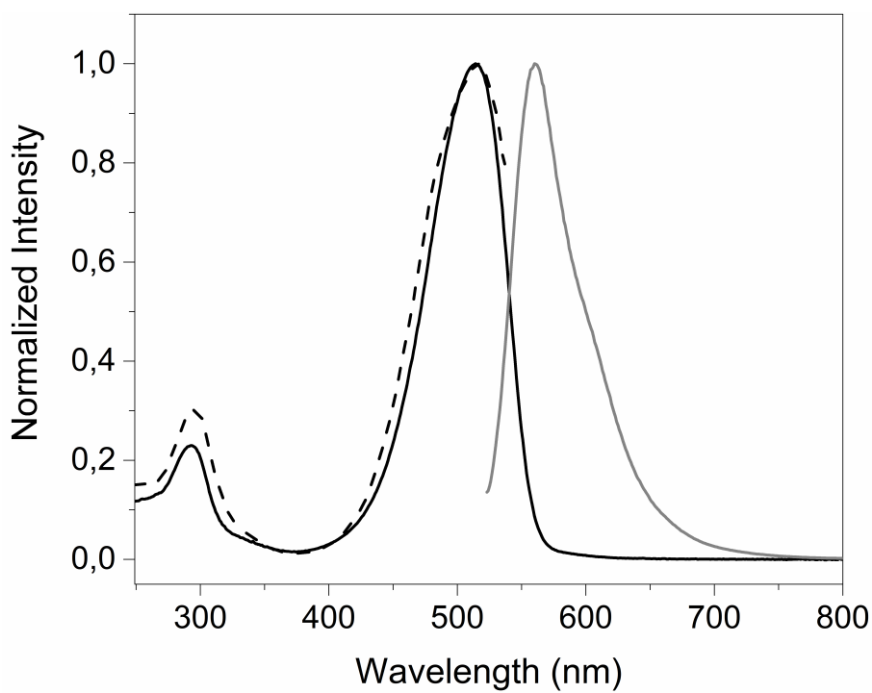


Figura 101: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-CO₂H-pBeet

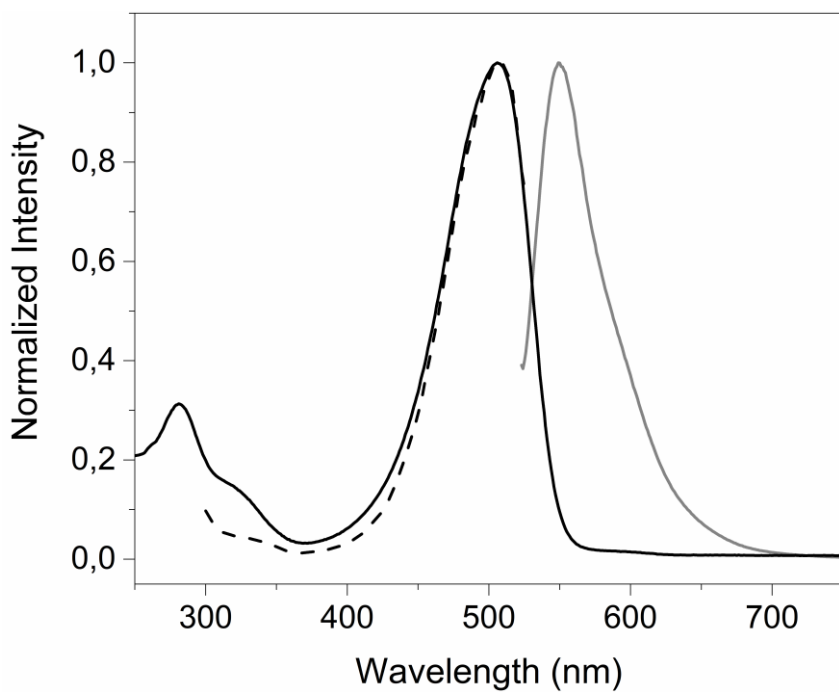


Figura 102: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-CF₃-pBeet

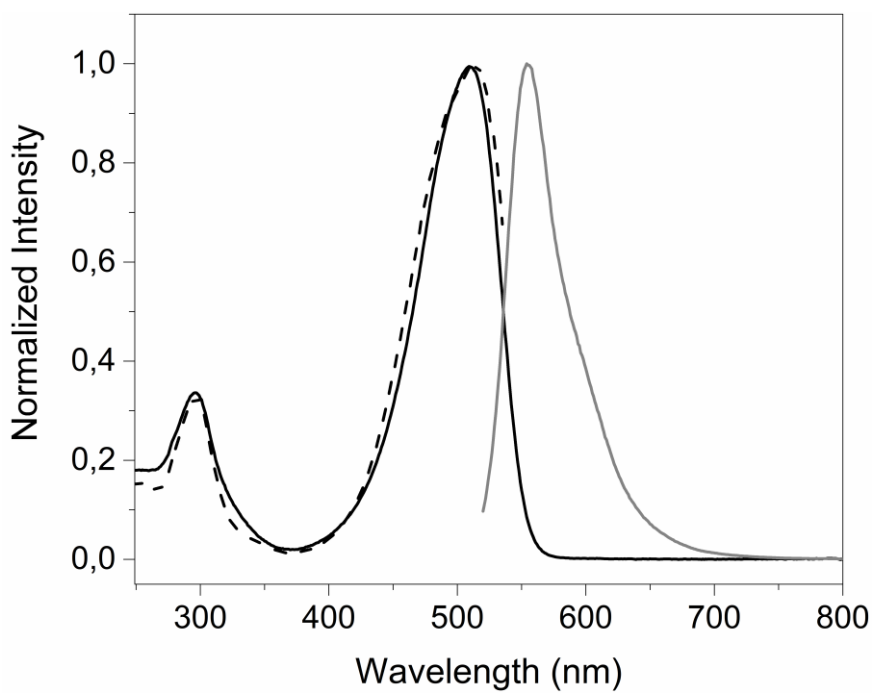


Figura 103: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-CN-pBeet

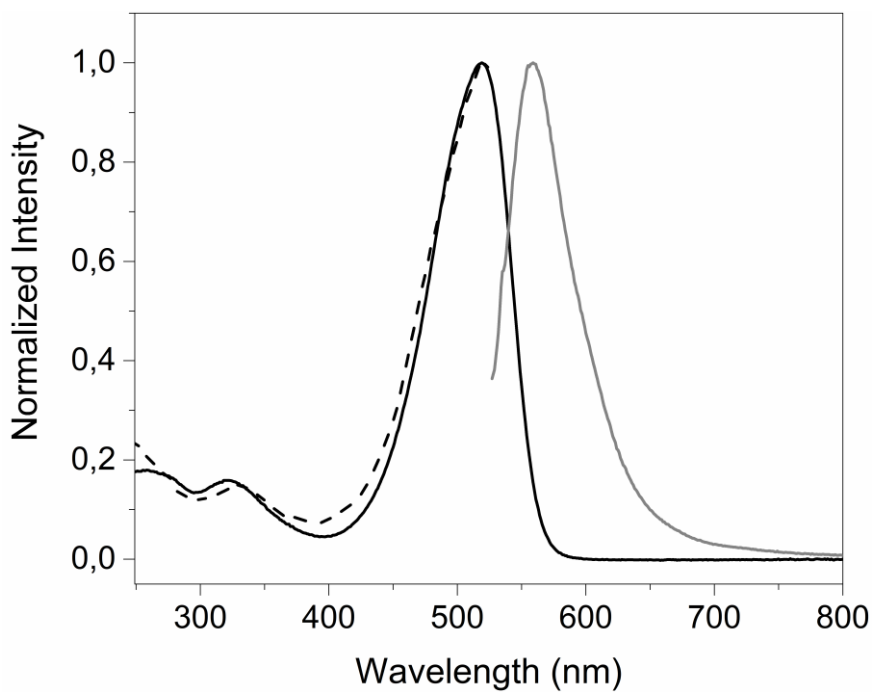


Figura 104: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-NO₂-pBeet

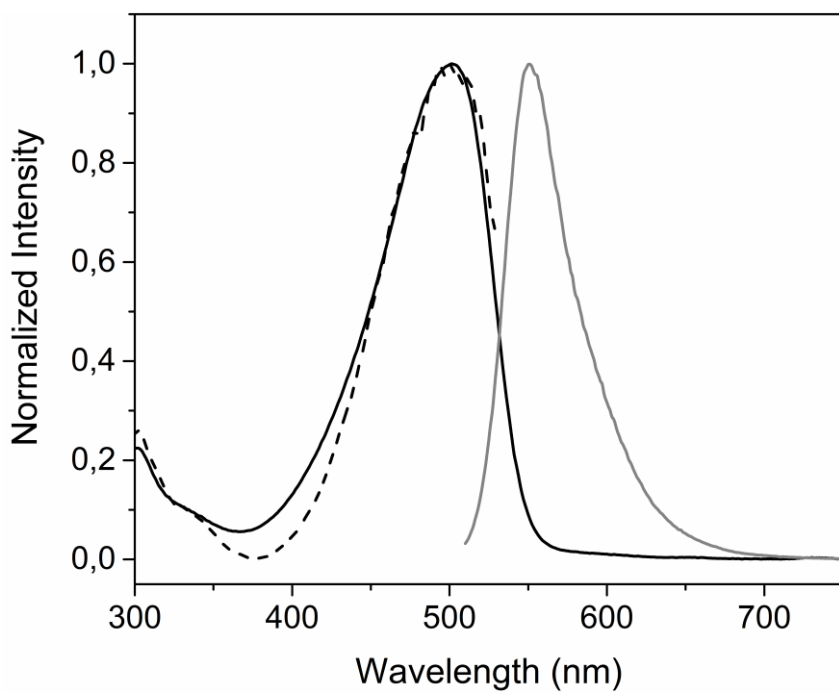


Figura 105: Espectros de absorção, excitação e emissão da 3,4-CN-pBeet

8.7.2. *N*-metil-pBeets

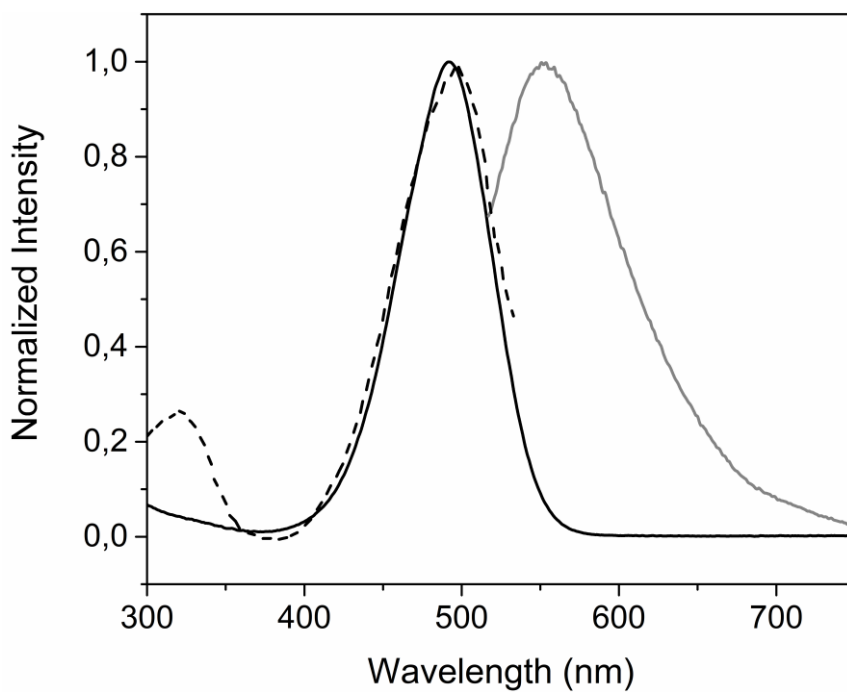


Figura 106: Espectros de absorção, excitação e emissão da *N*-Me-4-OMe-pBeet.

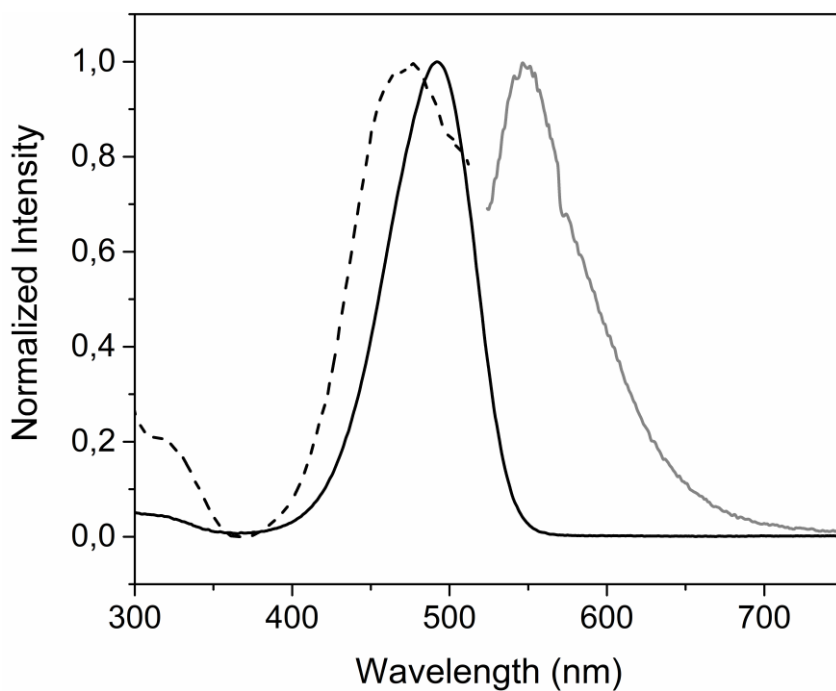


Figura 107: Espectros de absorção, excitação e emissão da *N*-Me-pBeet.

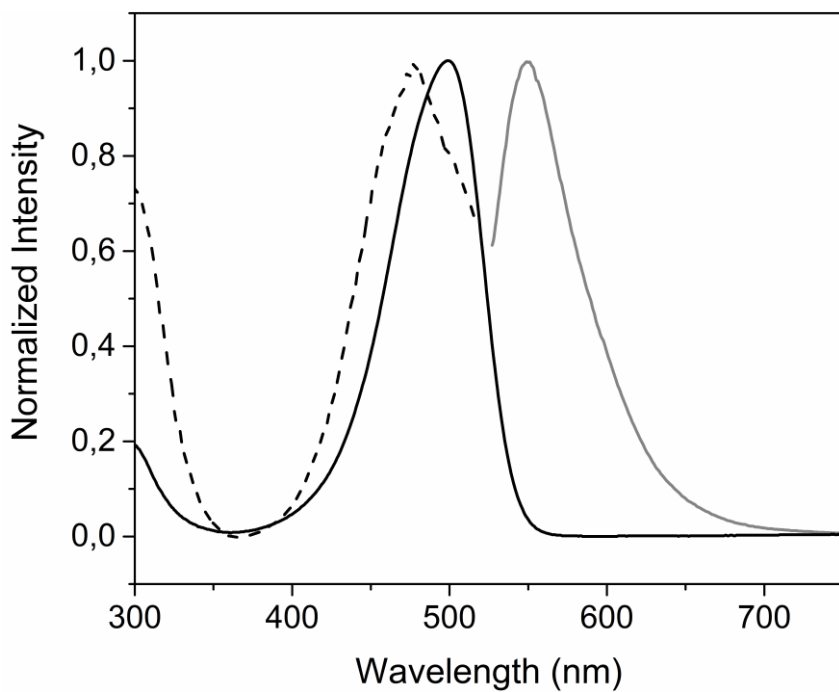


Figura 108: Espectros de absorção, excitação e emissão da *N*-Me-4-CN-pBeet.

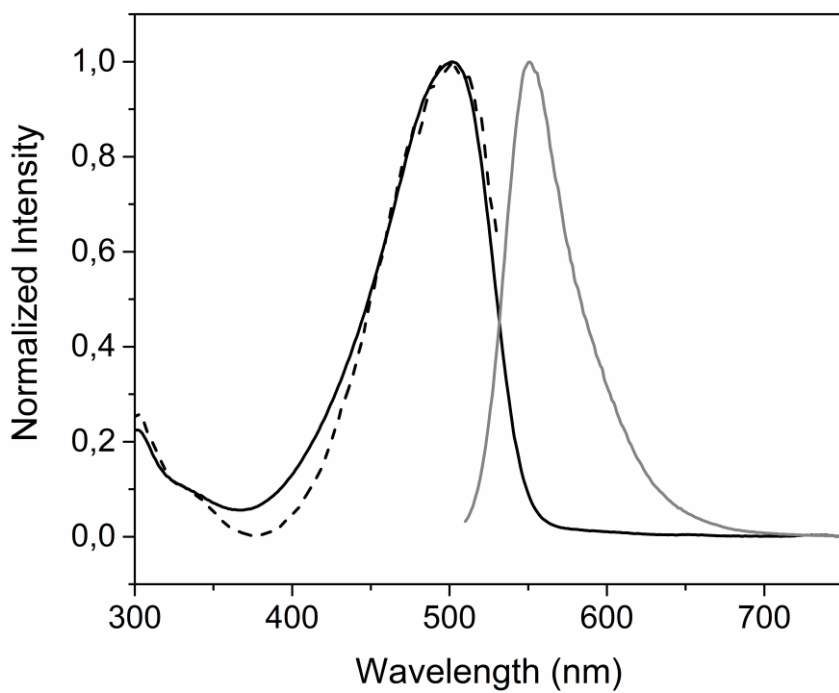


Figura 109: Espectros de absorção, excitação e emissão da *N*-Me-3,4-CN-pBeet.

8.7.3. dipBeets

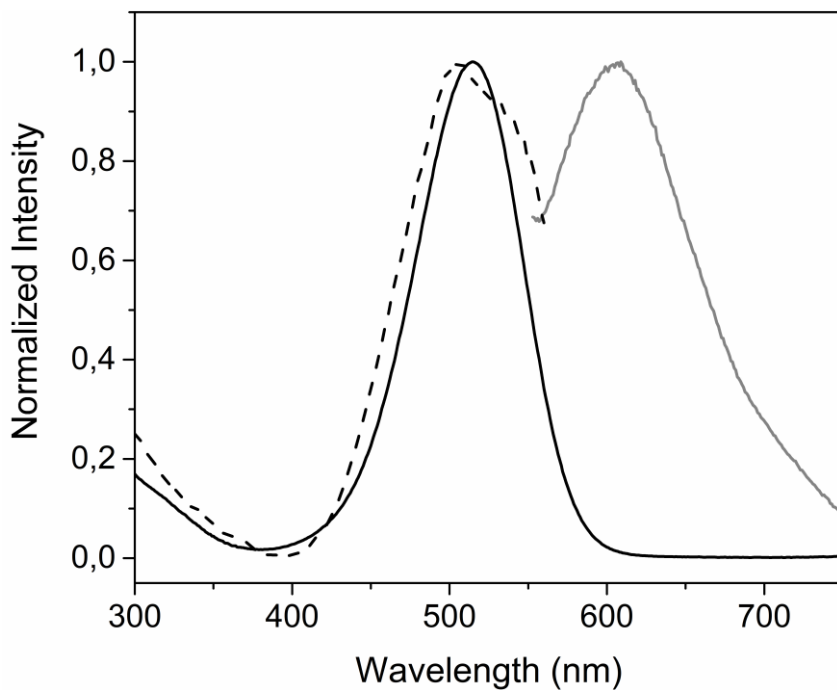


Figura 110: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4,4'-OMe-dipBeet.

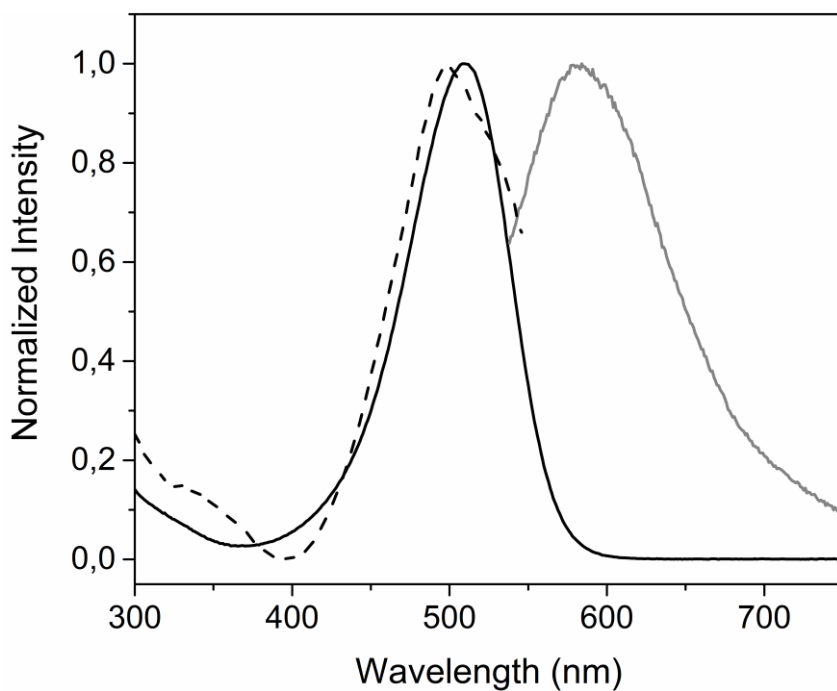


Figura 111: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-OMe-dipBeet.

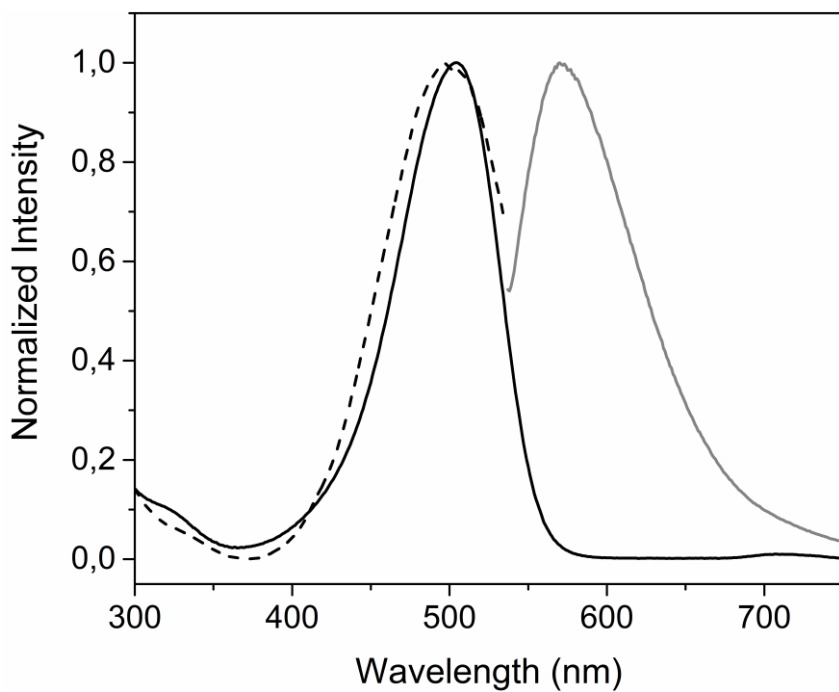


Figura 112: Espectros de absorção, excitação e emissão da dipBeet.

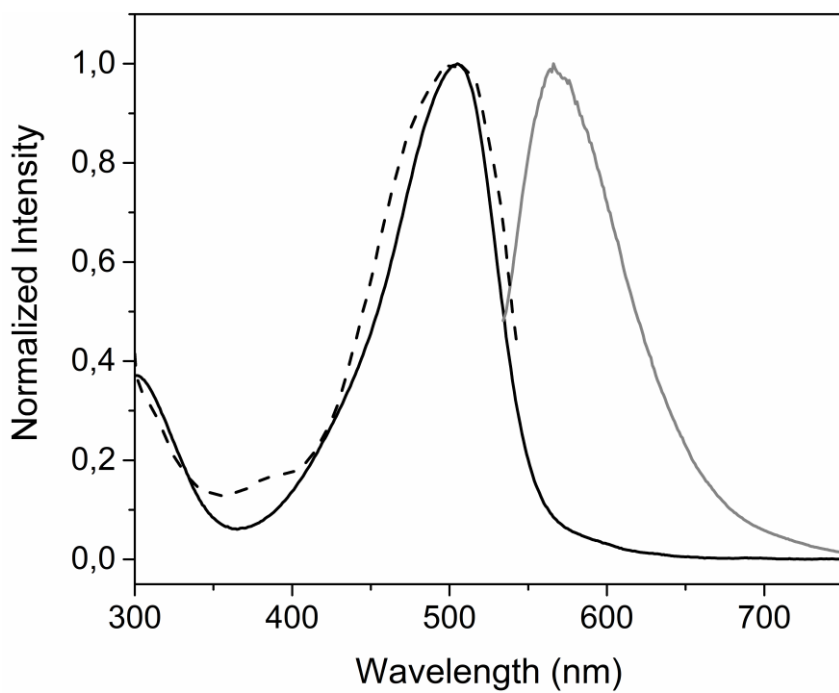


Figura 113: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-CN-dipBeet.

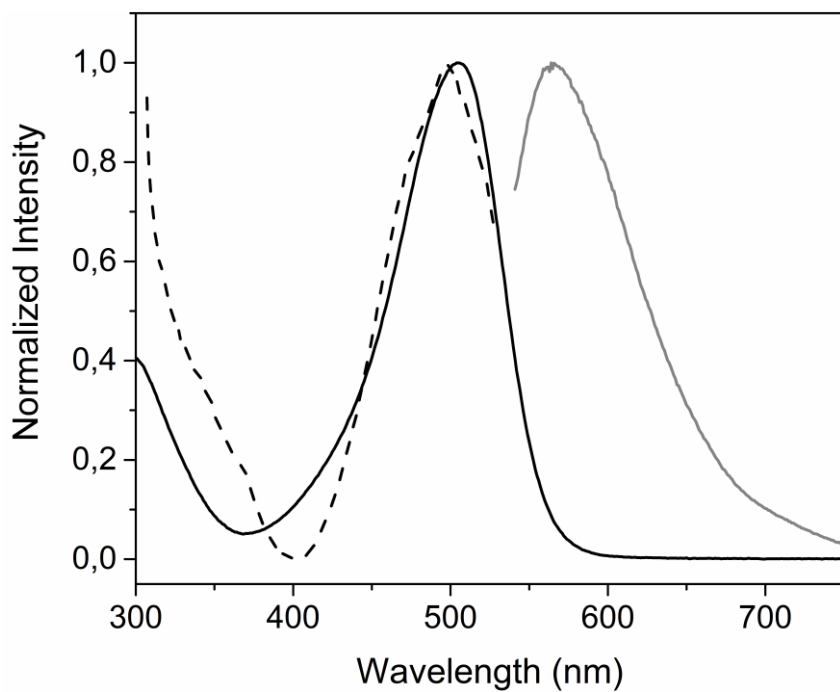


Figura 114: Espectros de absorção, excitação e emissão da 4-OMe-4'-CN-dipBeet.

8.8. Cinéticas de decomposição das betalaínas

8.8.1. pBeets em pH 2

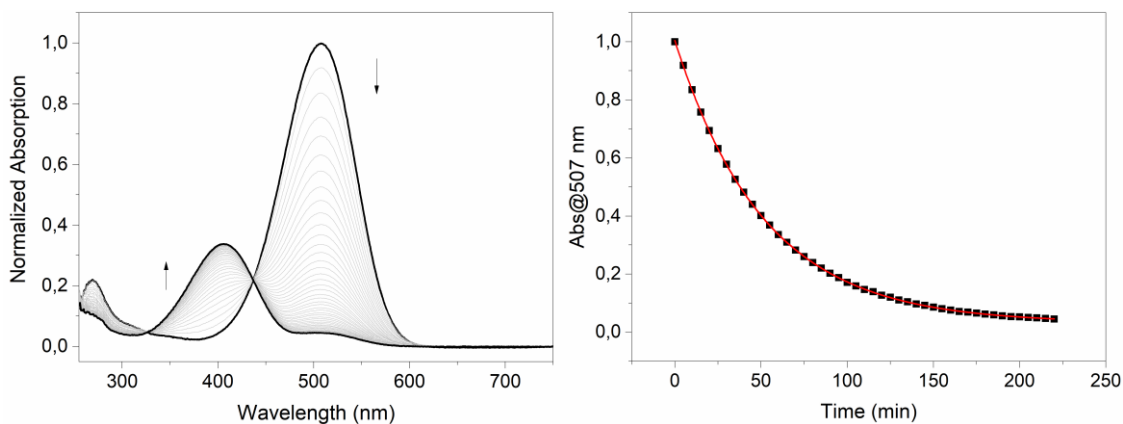


Figura 115: Cinética de degradação da 4-NH₂-pBeet em pH 2 a 25 °C.

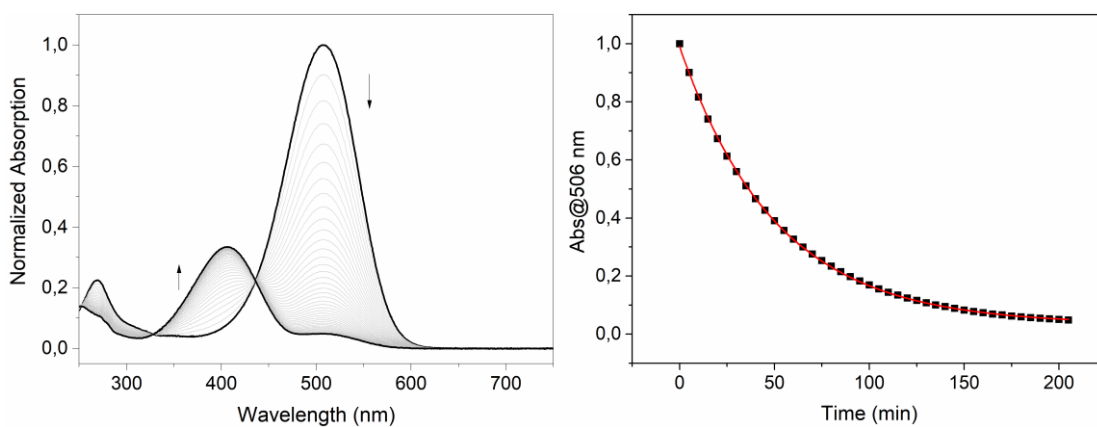


Figura 116: Cinética de degradação da 4-OH-pBeet em pH 2 a 25 °C.

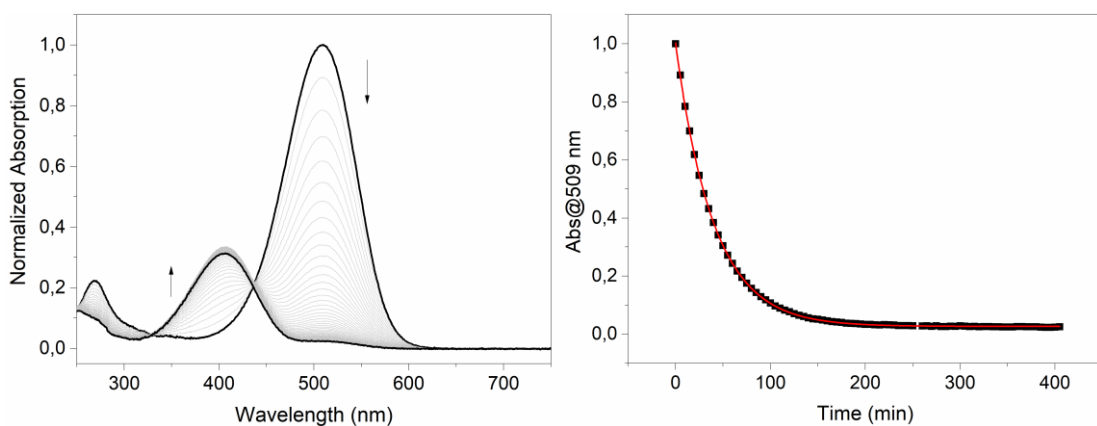


Figura 117: Cinética de degradação da 4-OMe-pBeet em pH 2 a 25 °C.

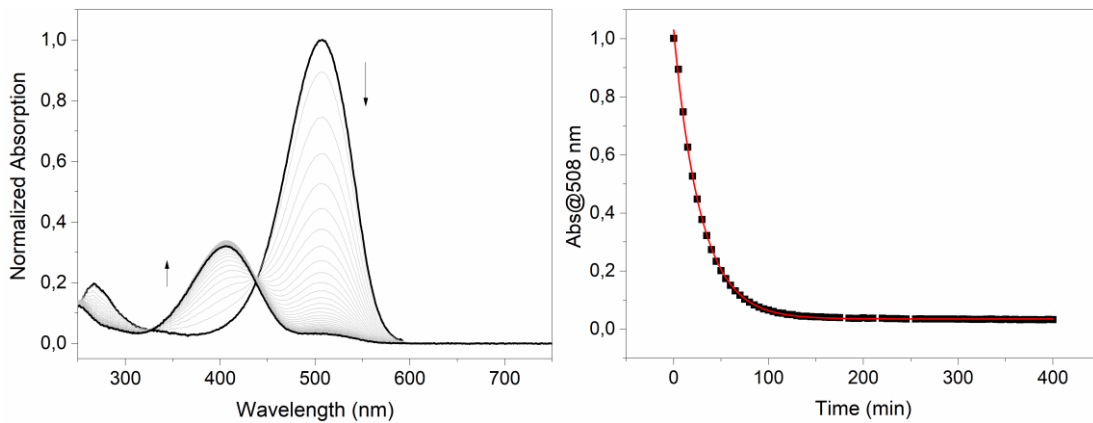


Figura 118: Cinética de degradação da 4-Me-pBeet em pH 2 a 25 °C.

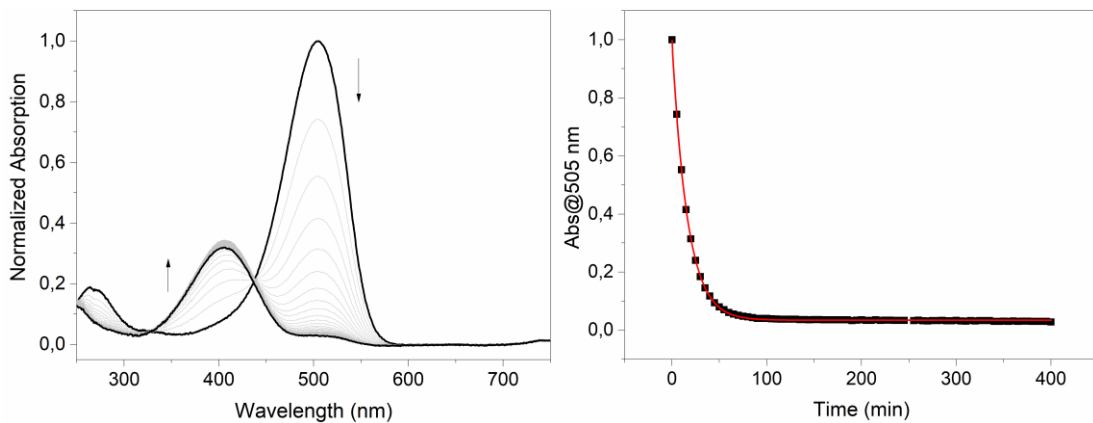


Figura 119: Cinética de degradação da pBeet em pH 2 a 25 °C.

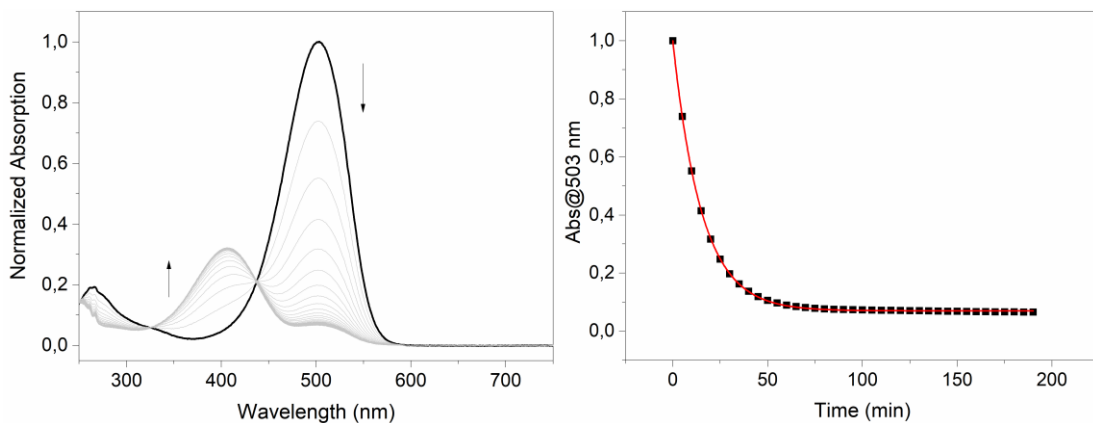


Figura 120: Cinética de degradação da 4-F-pBeet em pH 2 a 25 °C.

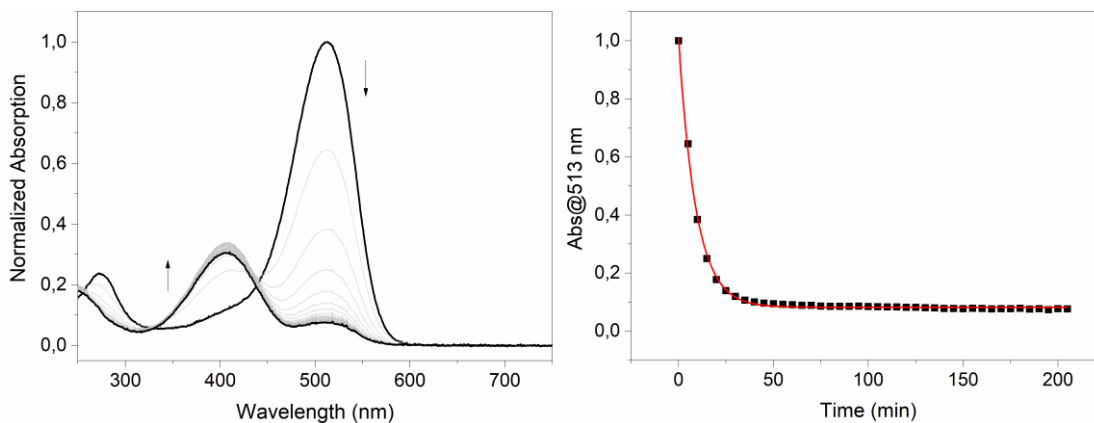


Figura 121: Cinética de degradação da 4-I-pBeet em pH 2 a 25 °C.

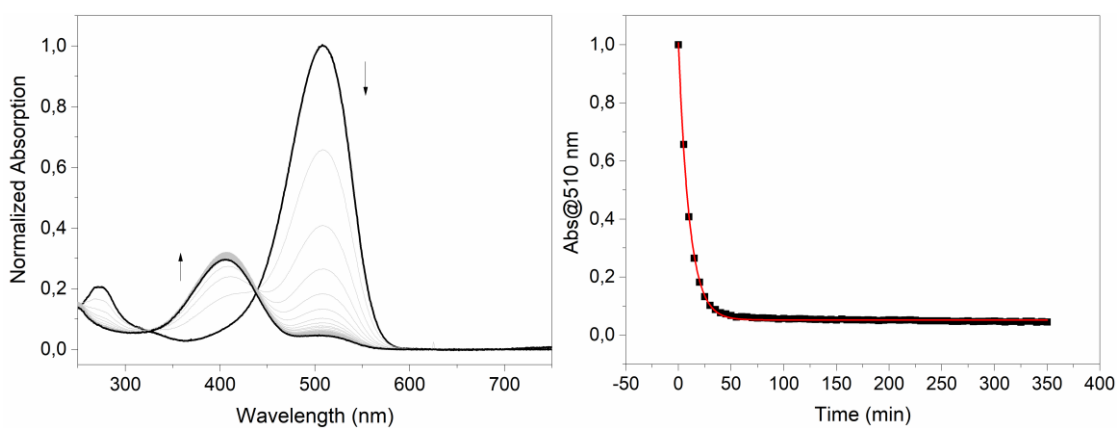


Figura 122: Cinética de degradação da 4-Cl-pBeet em pH 2 a 25 °C.

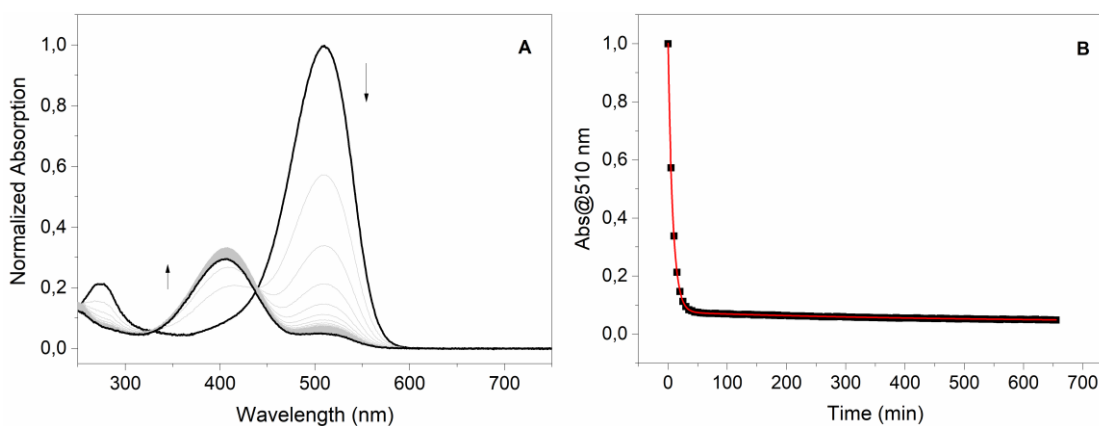


Figura 123: Cinética de degradação da 4-Br-pBeet em pH 2 a 25 °C.

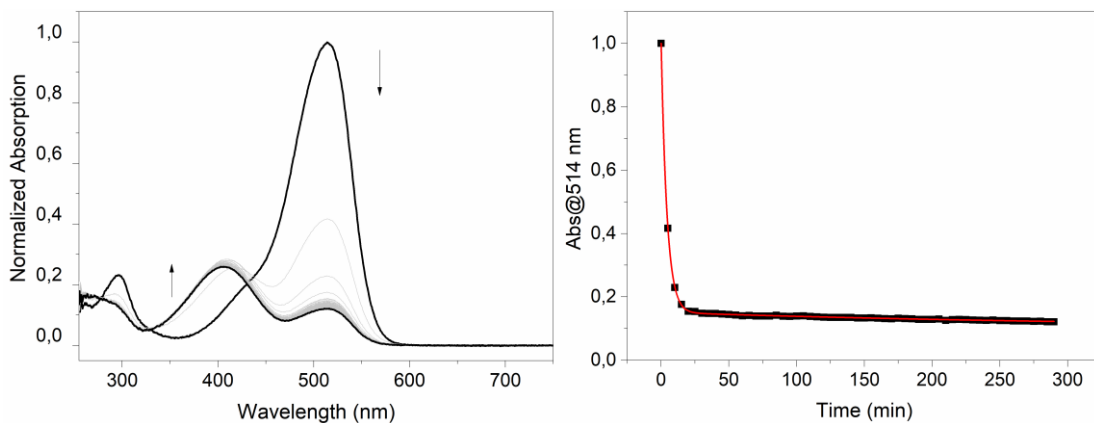


Figura 124: Cinética de degradação da 4-CO₂H-pBeet em pH 2 a 25 °C.

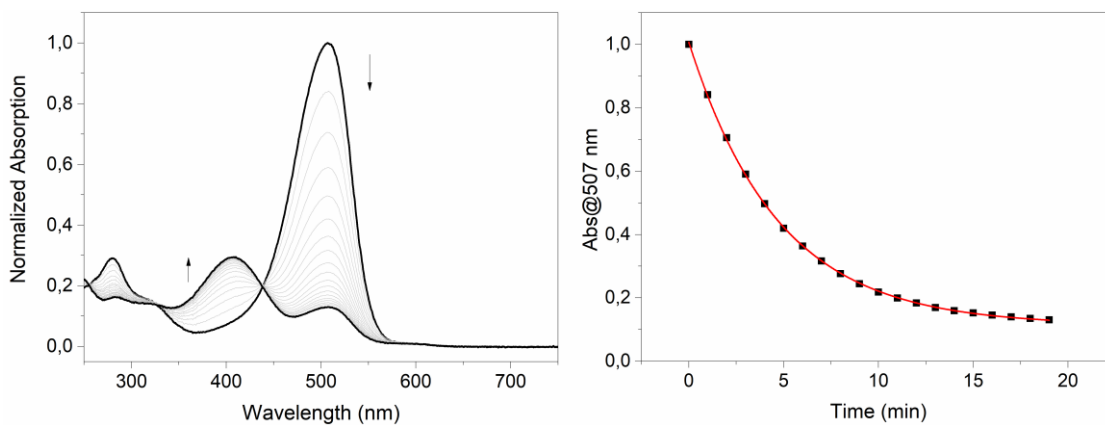


Figura 125: Cinética de degradação da 4-CF₃-pBeet em pH 2 a 25 °C.

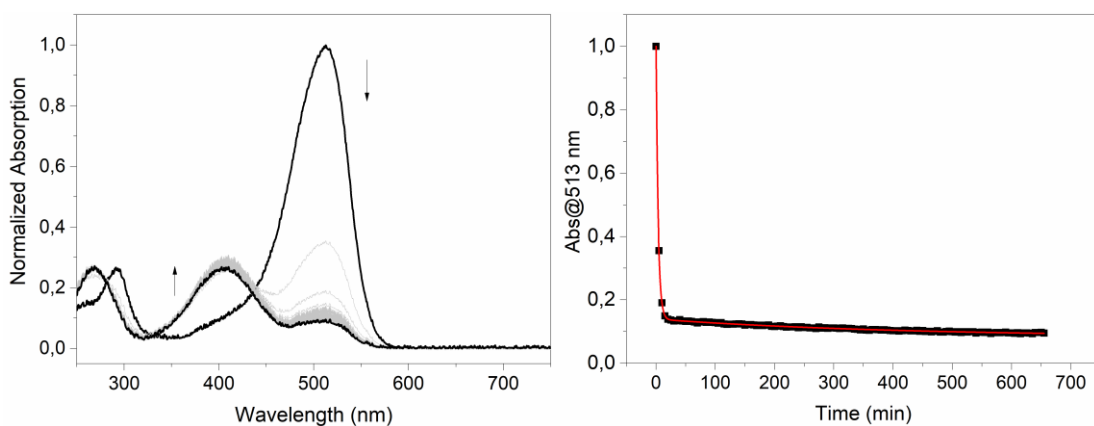


Figura 126: Cinética de degradação da 4-CN-pBeet em pH 2 a 25 °C.

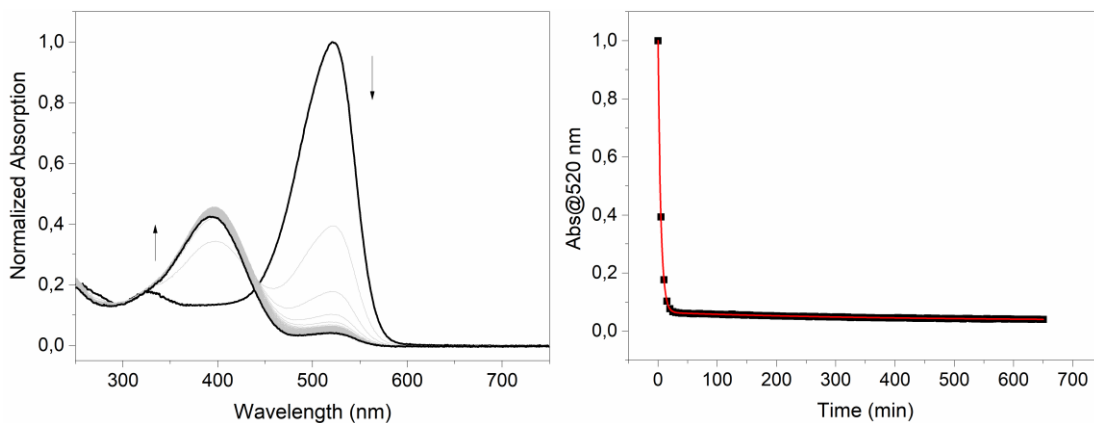


Figura 127: Cinética de degradação da 4-NO₂-pBeet em pH 2 a 25 °C.

8.8.2. pBeets em pH 5

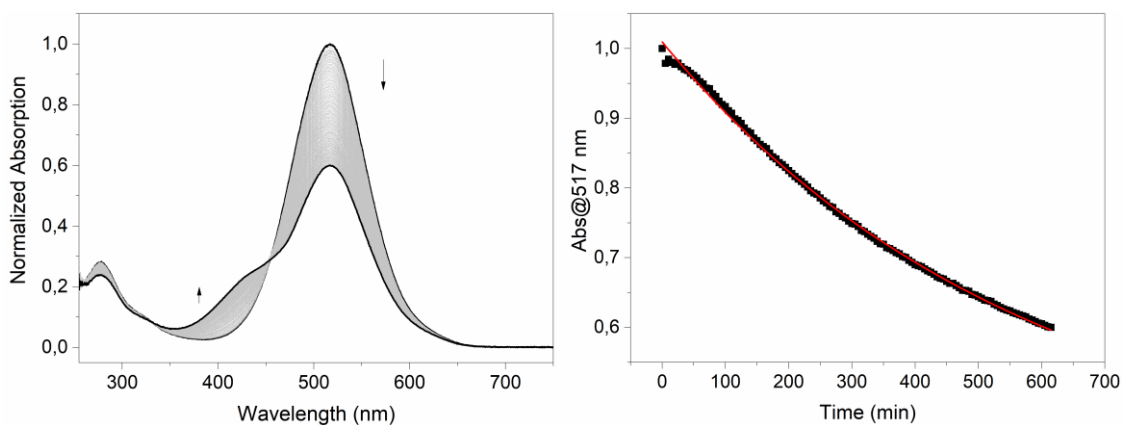


Figura 128: Cinética de degradação da 4-NH₂-pBeet em pH 5 a 25 °C.

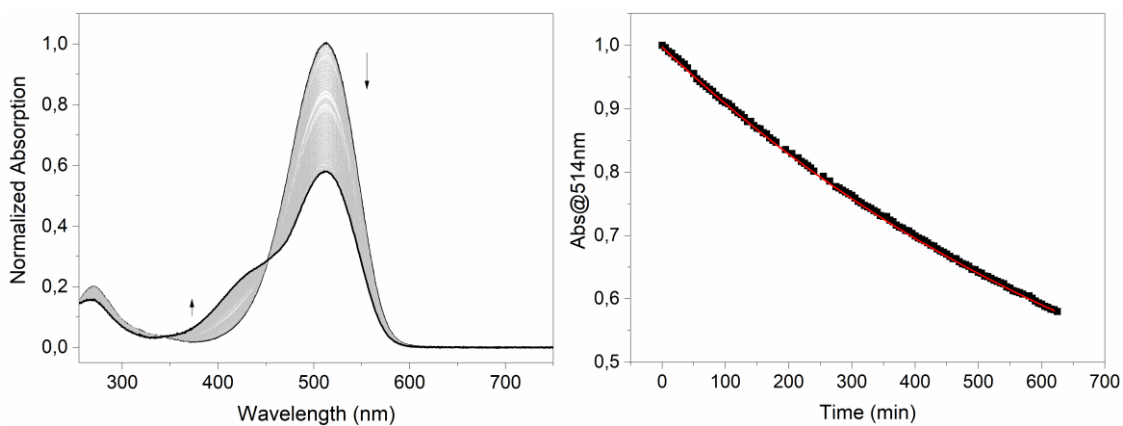


Figura 129: Cinética de degradação da 4-OH-pBeet em pH 5 a 25 °C.

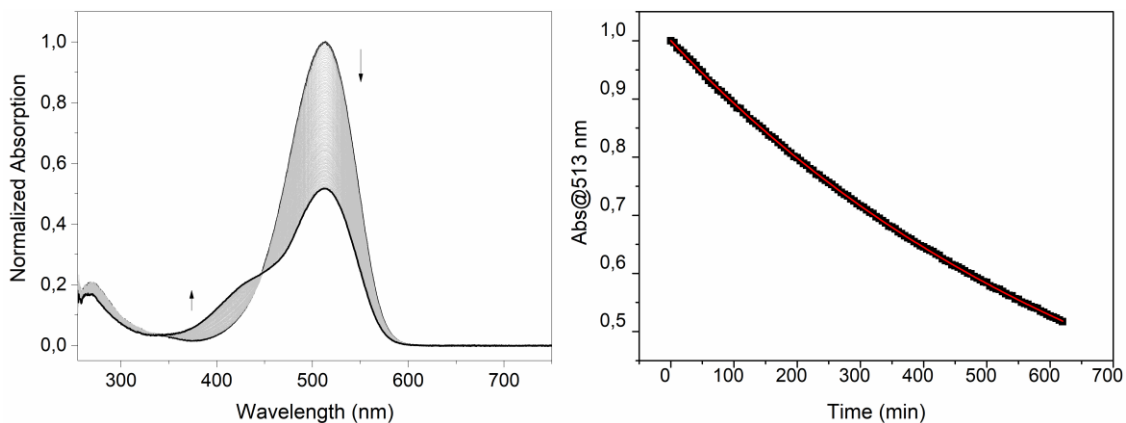


Figura 130: Cinética de degradação da 4-OMe-pBeet em pH 5 a 25 °C.

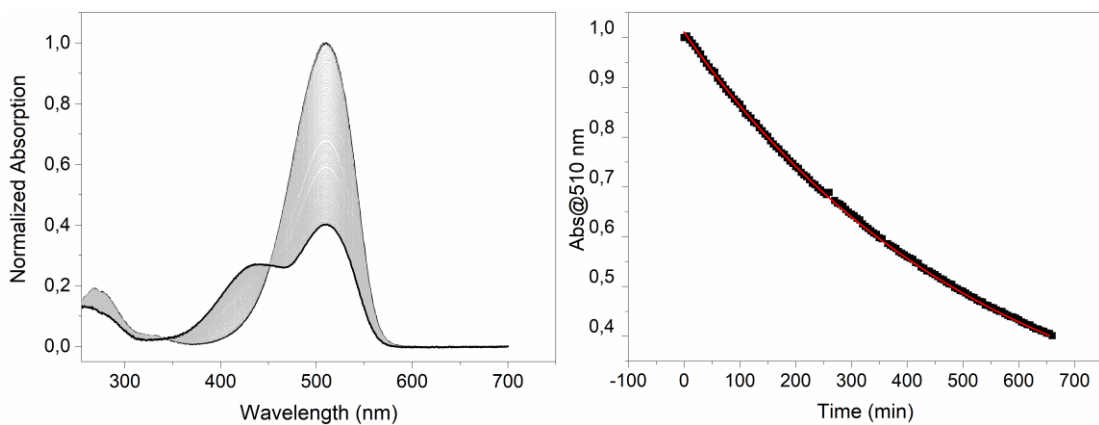


Figura 131: Cinética de degradação da 4-Me-pBeet em pH 5 a 25 °C.

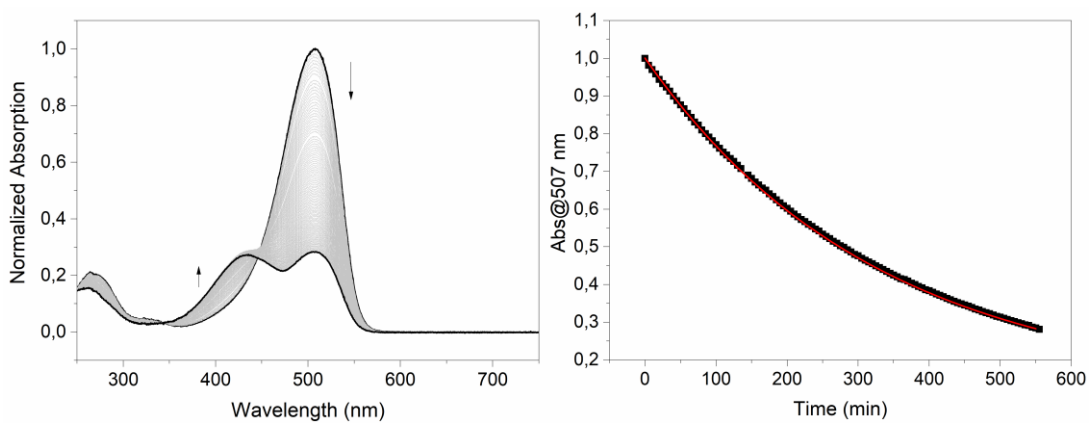


Figura 132: Cinética de degradação da pBeet em pH 5 a 25 °C.

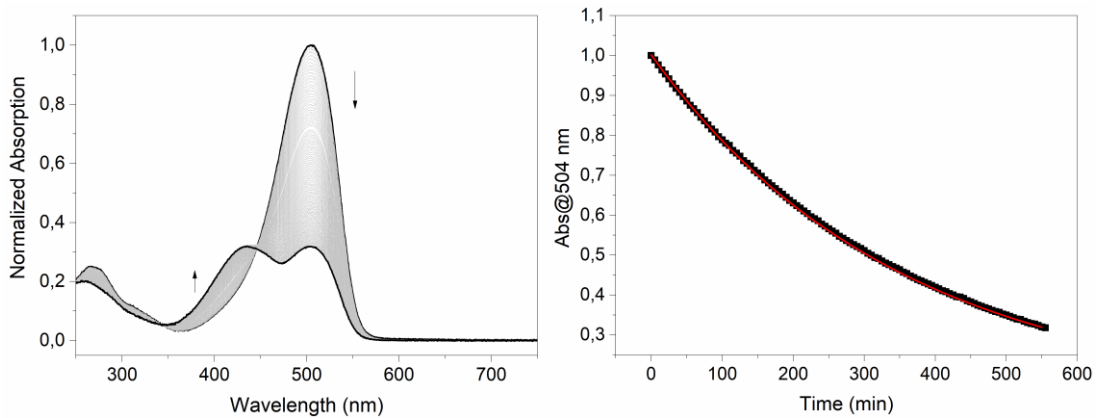


Figura 133: Cinética de degradação da 4-F-pBeet em pH 5 a 25 °C.

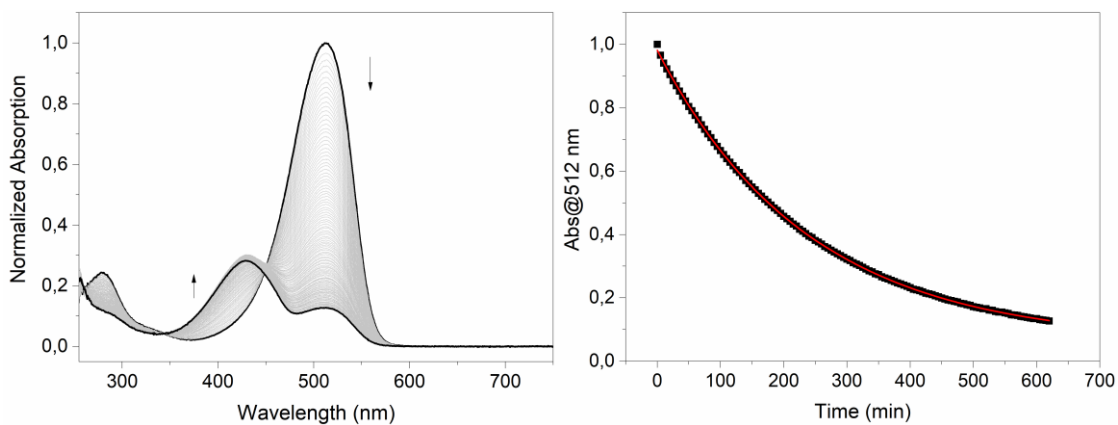


Figura 134: Cinética de degradação da 4-I-pBeet em pH 5 a 25 °C.

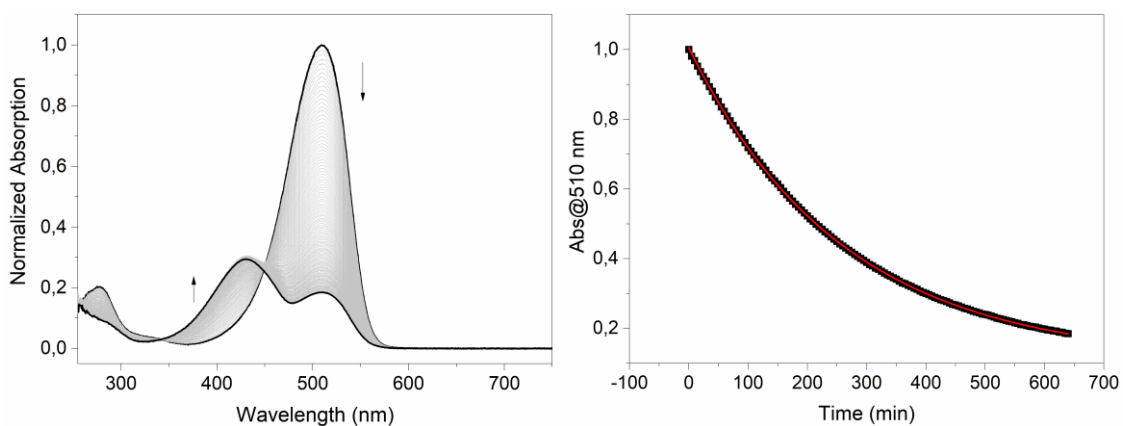


Figura 135: Cinética de degradação da 4-Cl-pBeet em pH 5 a 25 °C.

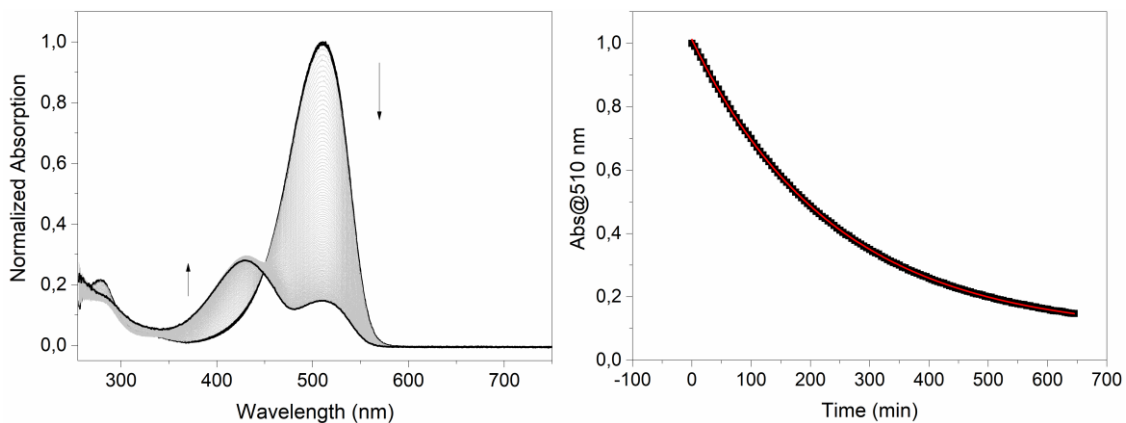


Figura 136: Cinética de degradação da 4-Br-pBeet em pH 5 a 25 °C.

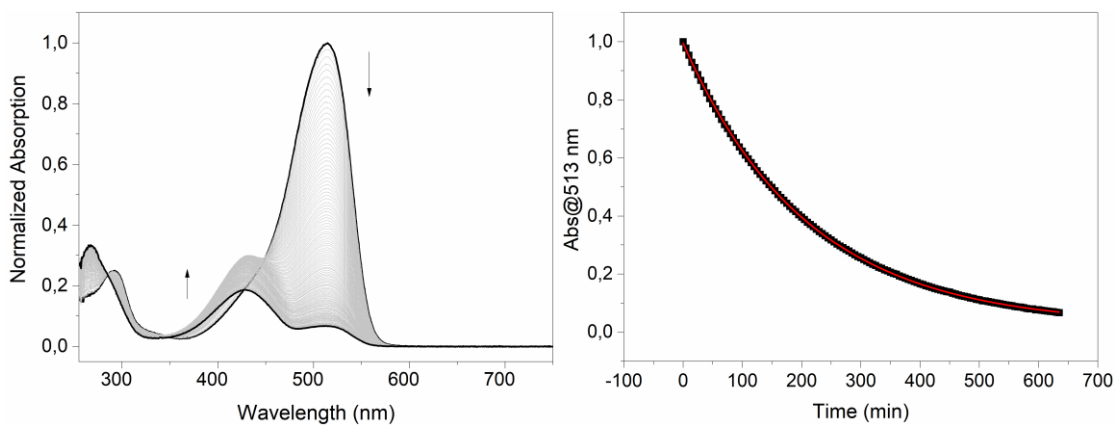


Figura 137: Cinética de degradação da 4-CO₂H-pBeet em pH 5 a 25 °C.

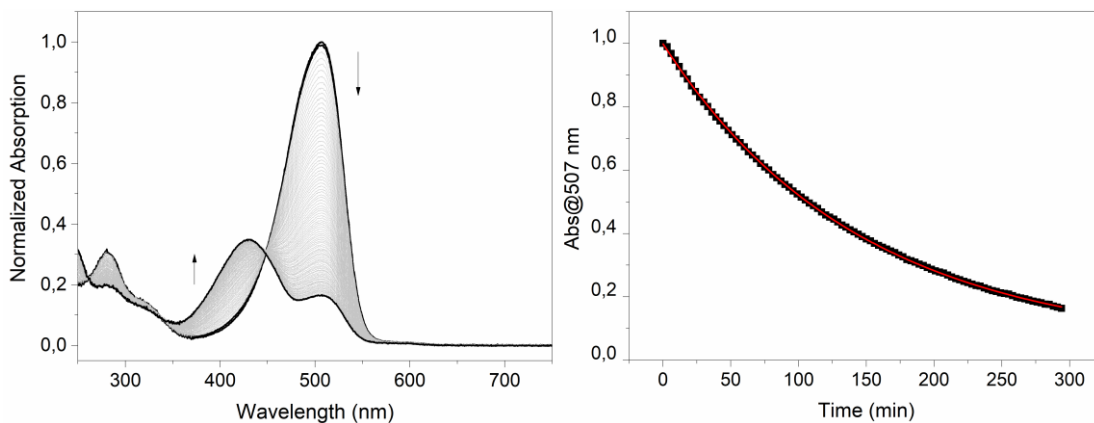


Figura 138: Cinética de degradação da 4-CF₃-pBeet em pH 5 a 25 °C.

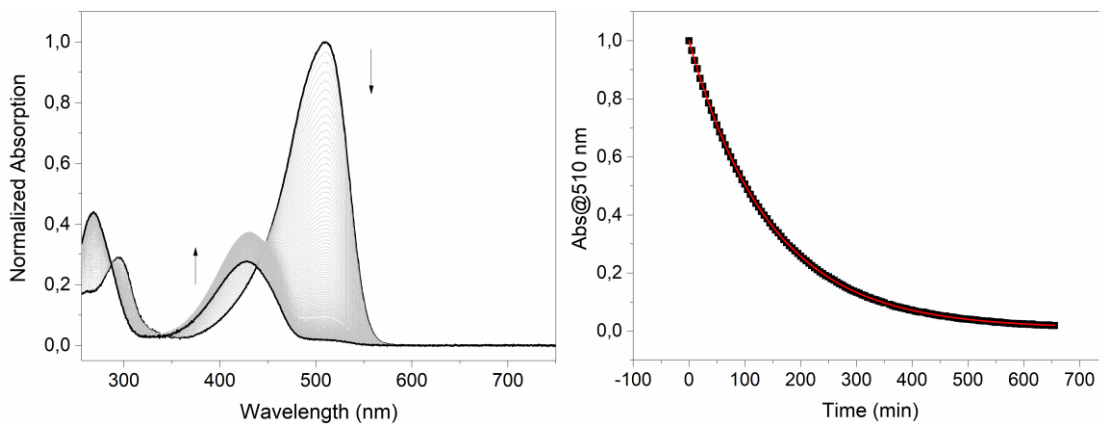


Figura 139: Cinética de degradação da 4-CN-pBeet em pH 5 a 25 °C.

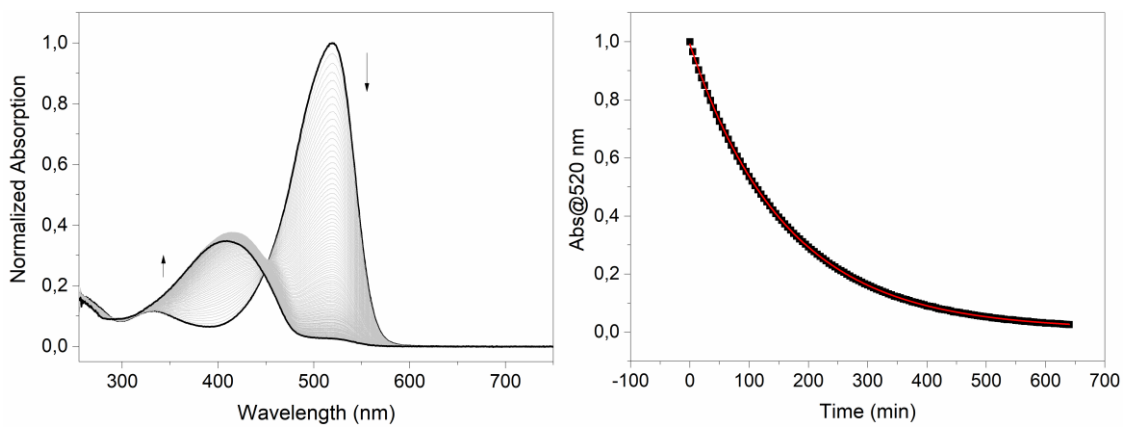


Figura 140: Cinética de degradação da 4-NO₂-pBeet em pH 5 a 25 °C.

8.8.3. pBeets em pH 8,5

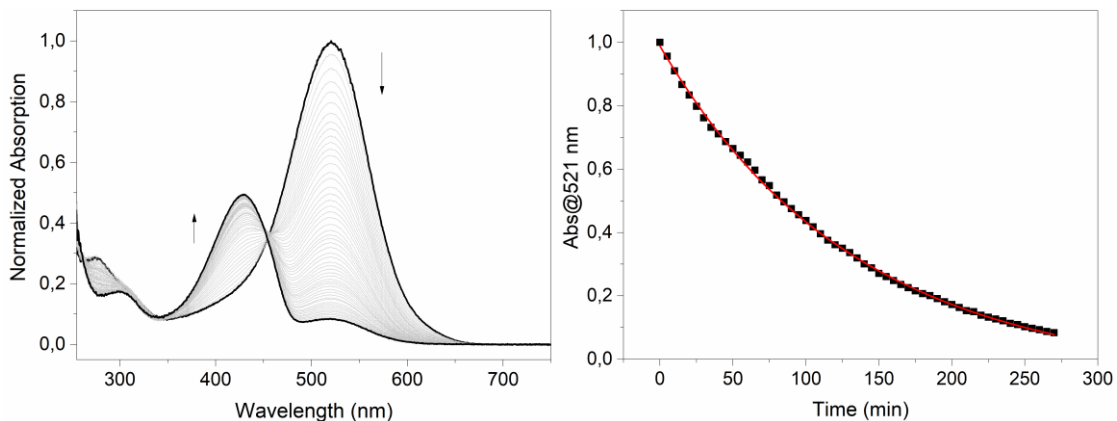


Figura 141: Cinética de degradação da 4-NH₂-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

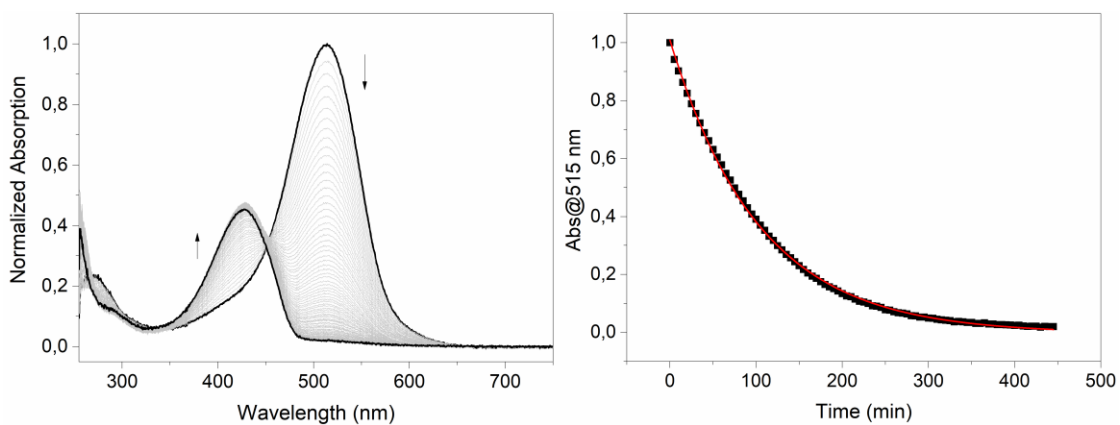


Figura 142: Cinética de degradação da 4-OH-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

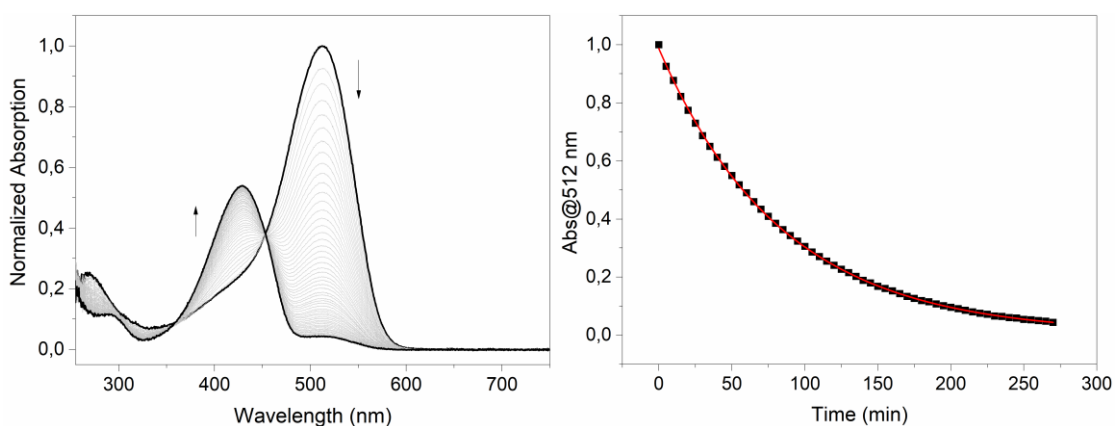


Figura 143: Cinética de degradação da 4-OMe-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

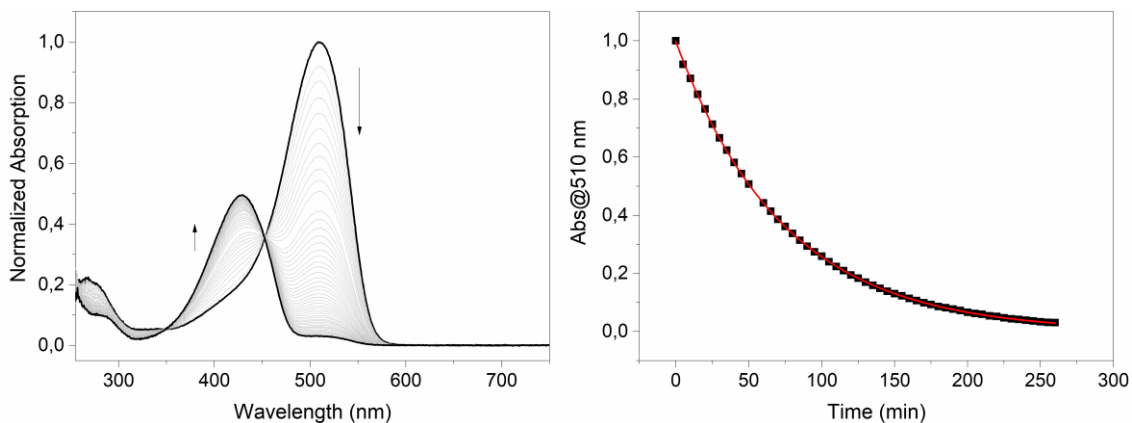


Figura 144: Cinética de degradação da 4-Me-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

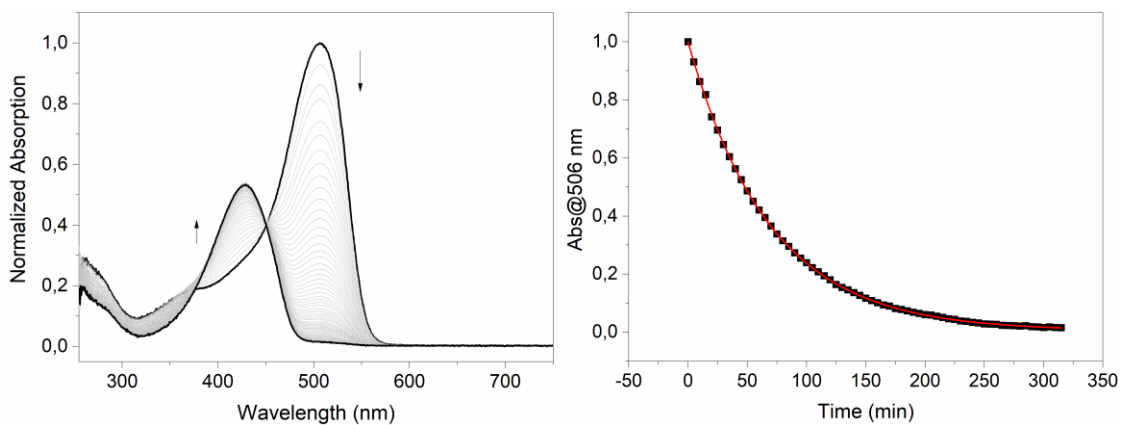


Figura 145: Cinética de degradação da pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

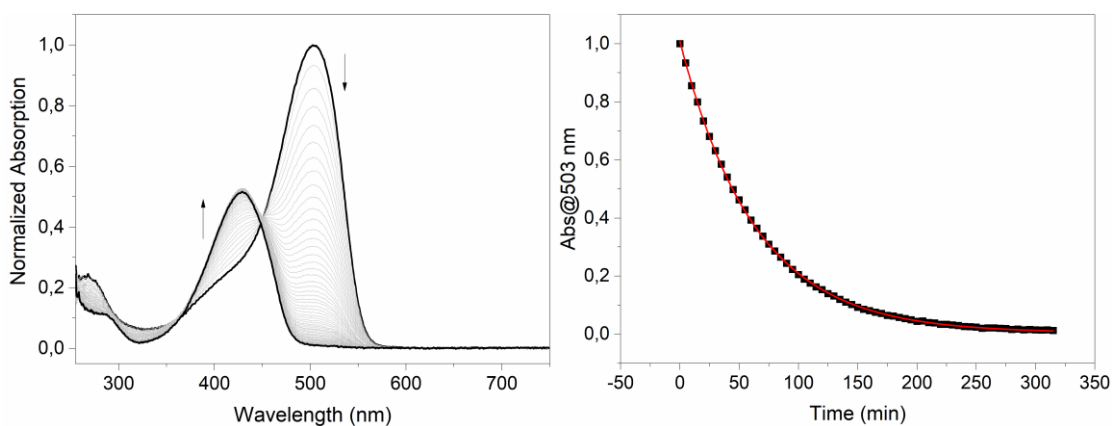


Figura 146: Cinética de degradação da 4-F-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

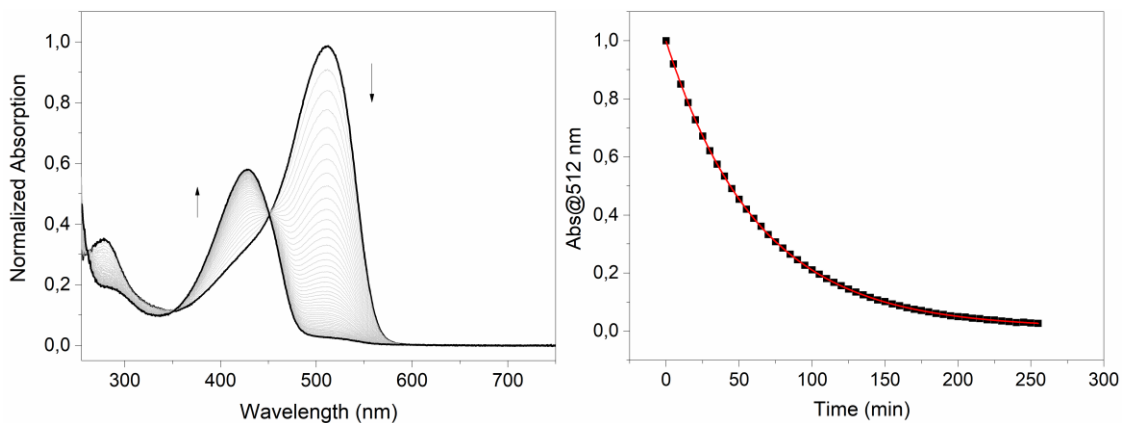


Figura 147: Cinética de degradação da 4-I-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

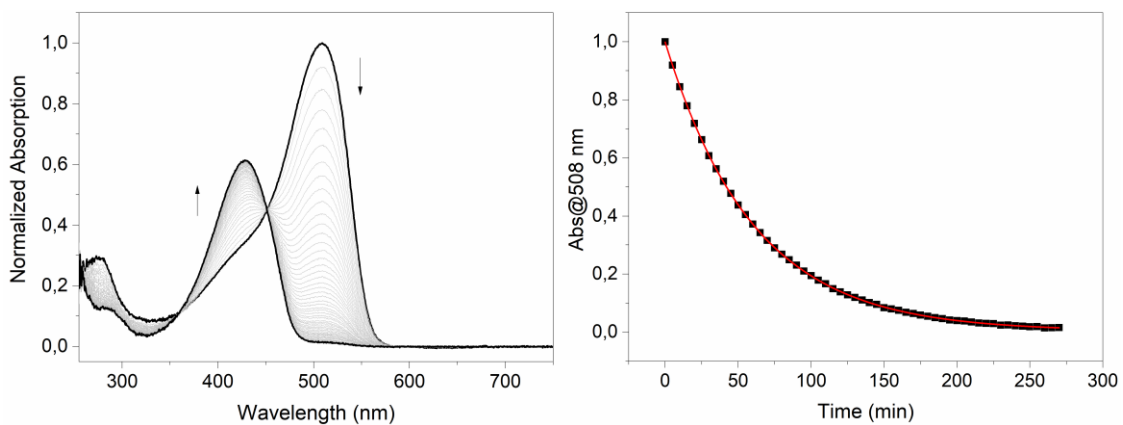


Figura 148: Cinética de degradação da 4-Cl-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

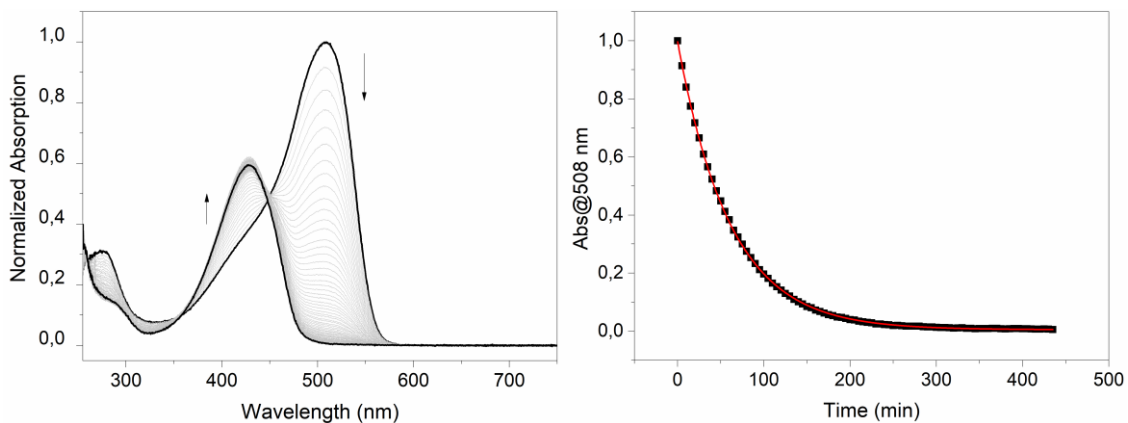


Figura 149: Cinética de degradação da 4-Br-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

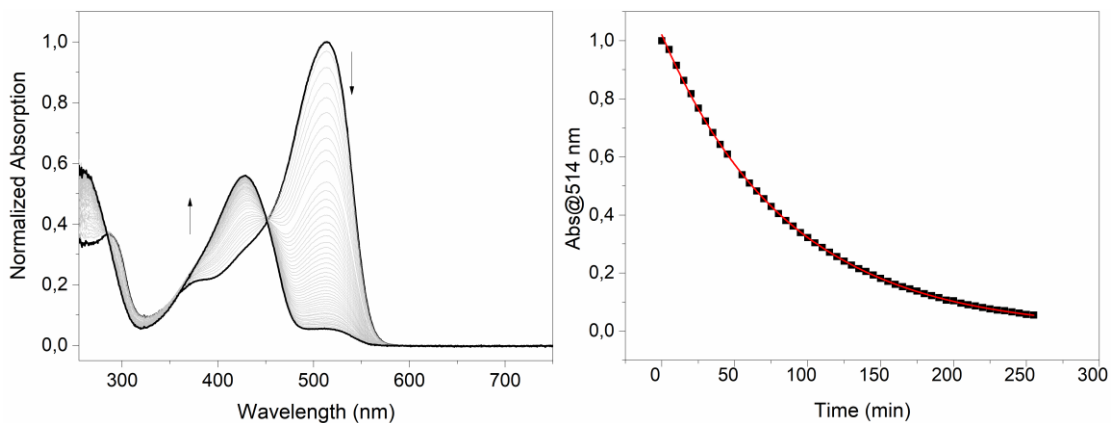


Figura 150: Cinética de degradação da 4-CO₂H-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

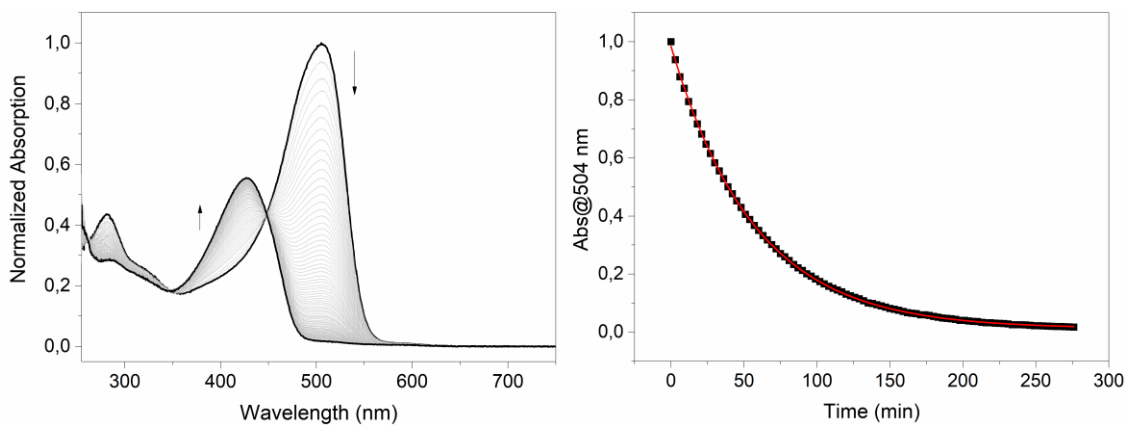


Figura 151: Cinética de degradação da 4-CF₃-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

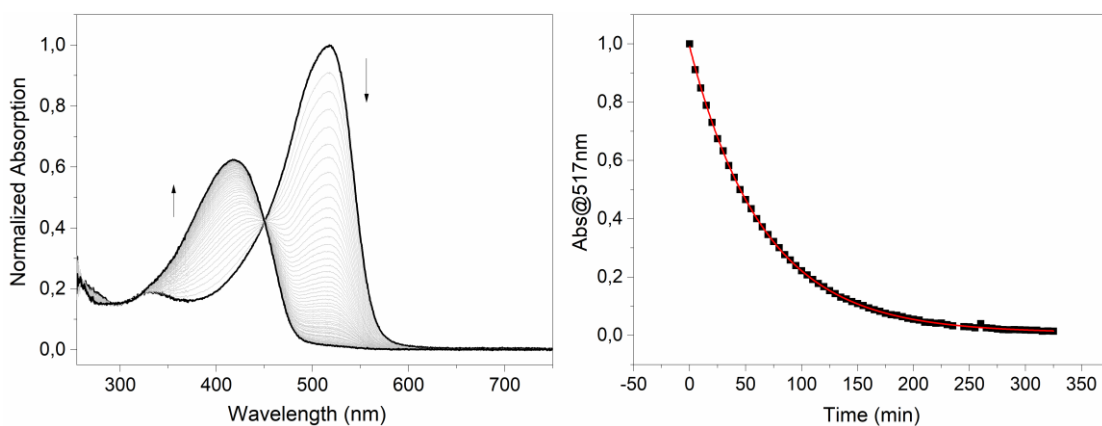


Figura 152: Cinética de degradação da 4-CN-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

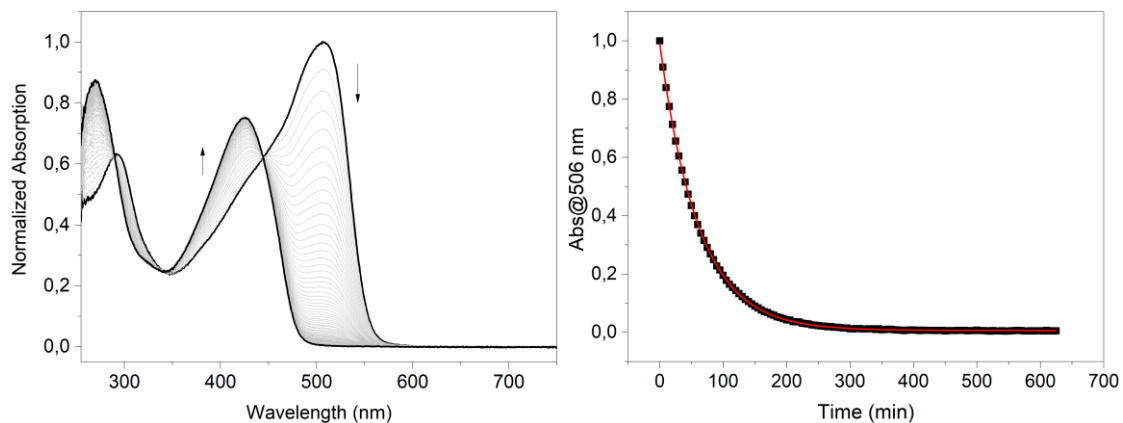


Figura 153: Cinética de degradação da 4-NO₂-pBeet em pH 8.5 a 25 °C.

8.8.4. pBeets em pH 5, 60 °C

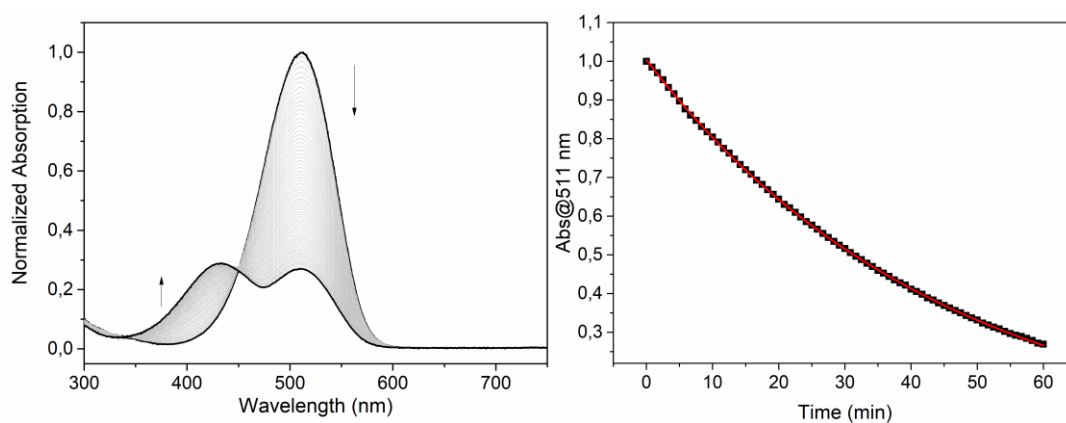


Figura 154: Cinética de degradação da 4-OMe-pBeet em pH 5 a 60°C.

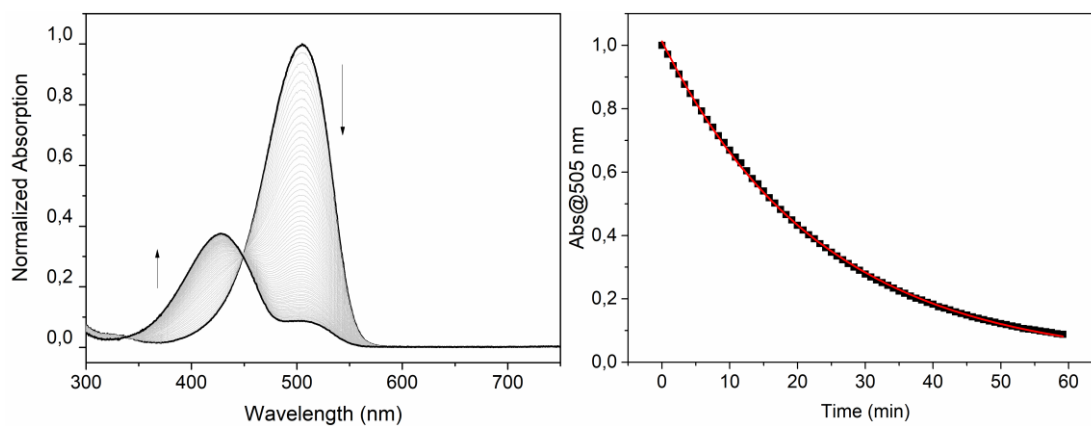


Figura 155: Cinética de degradação da pBeet em pH 5 a 60°C.

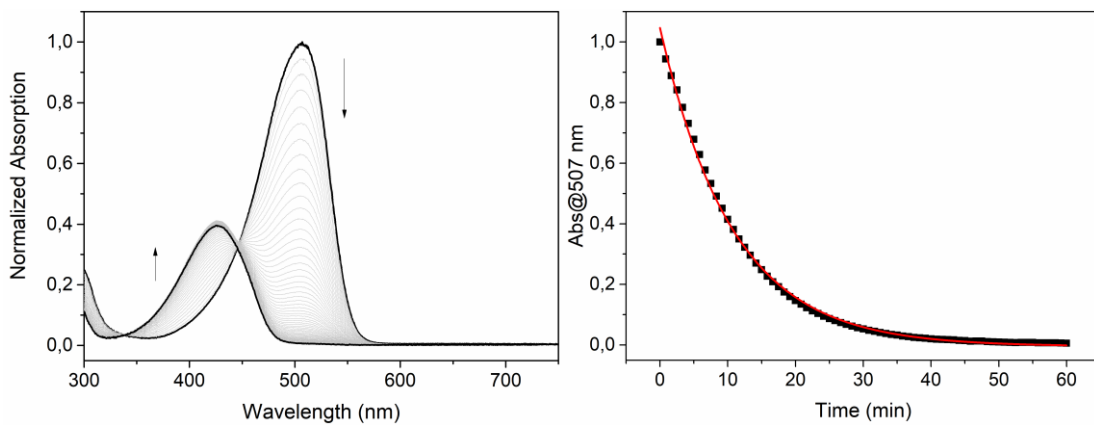


Figura 156: Cinética de degradação da 4-CN-pBeet em pH 5 a 60°C.

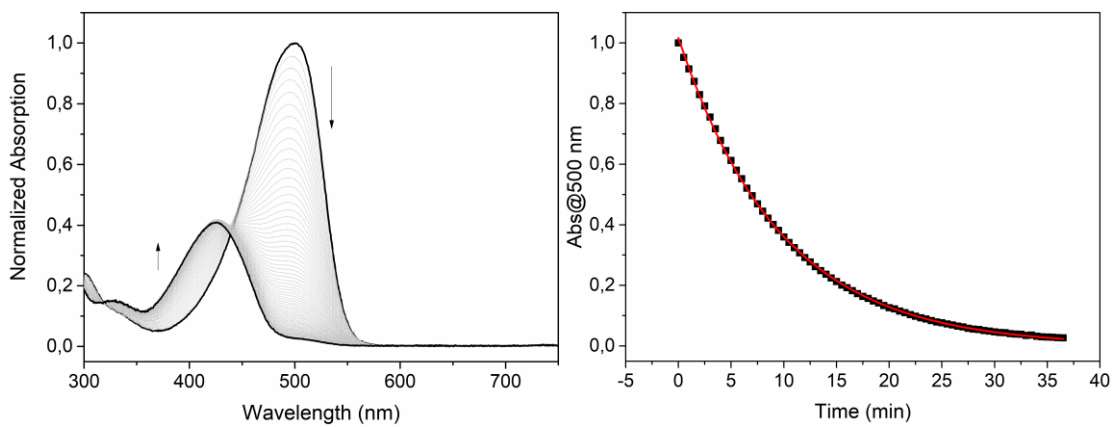


Figura 157: Cinética de degradação da 3,4-CN-pBeet em pH 5 a 60°C.

8.8.5. *N*-metil-pBeets em pH 5, 60°C

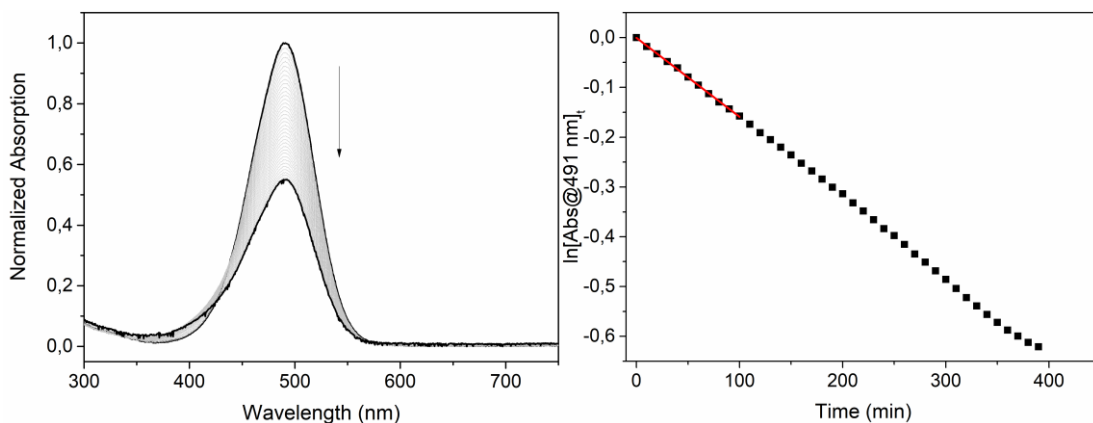


Figura 158: Cinética de degradação da *N*-Me-4-OMe-pBeet em pH 5 a 60 °C.

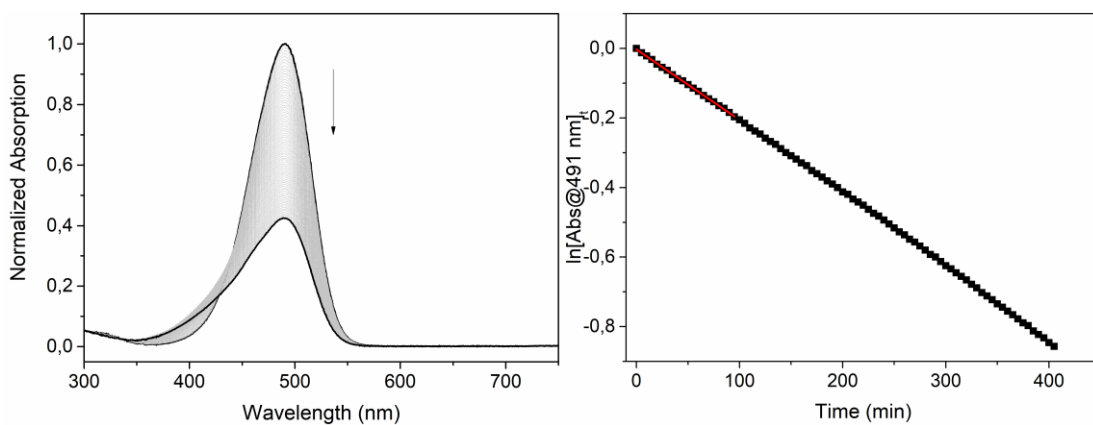


Figura 159: Cinética de degradação da *N*-Me-pBeet em pH 5 a 60 °C.

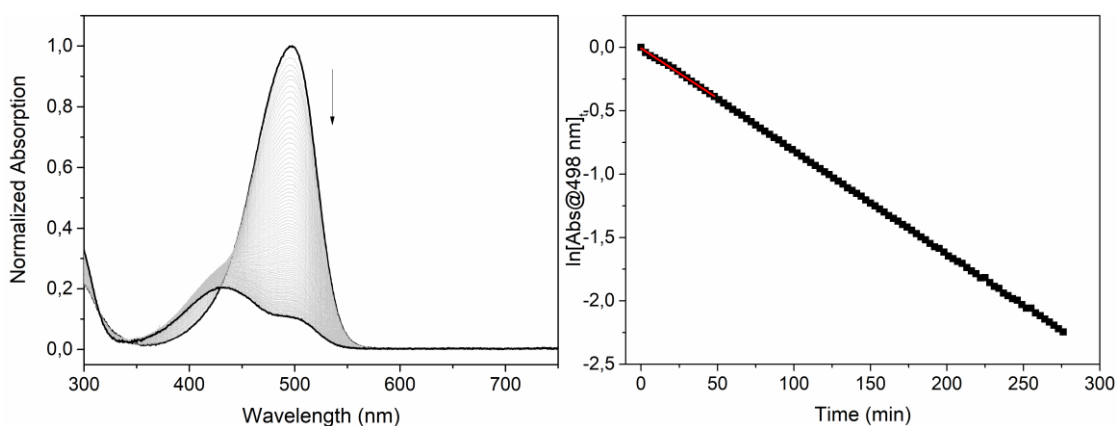


Figura 160: Cinética de degradação da *N*-Me-4-CN-pBeet em pH 5 a 60 °C.

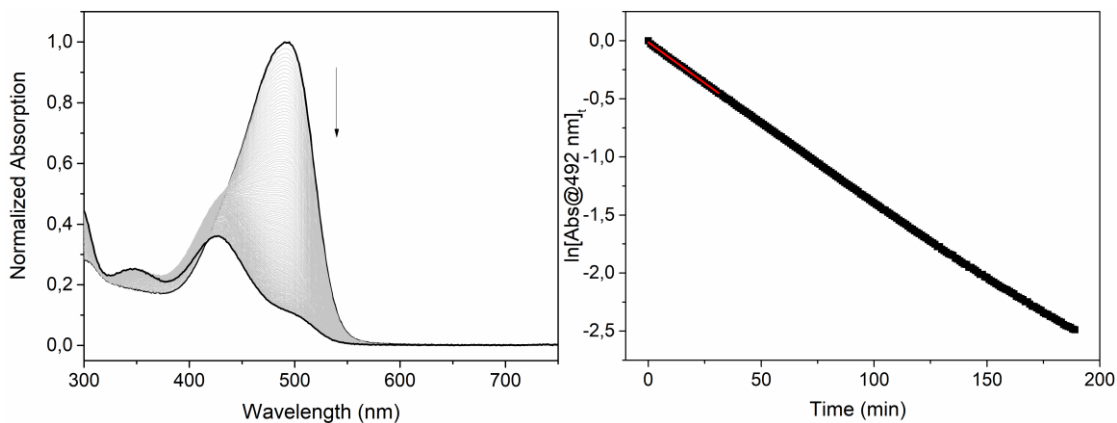


Figura 161: Cinética de degradação da *N*-Me-3,4-CN-pBeet em pH 5 a 60 °C.

8.8.6. dipBeets em pH 5, a 60°C

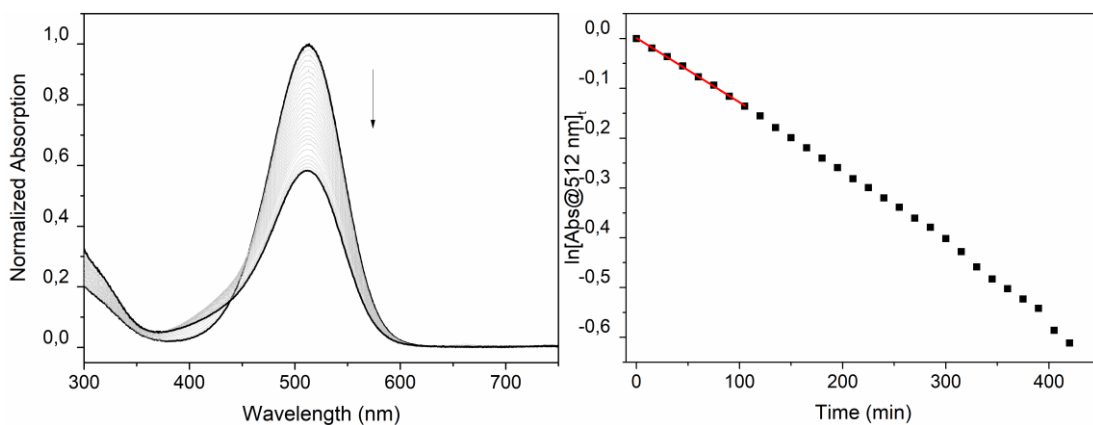


Figura 162: Cinética de degradação da 4,4-OMe-dipBeet em pH 5 a 60 °C.

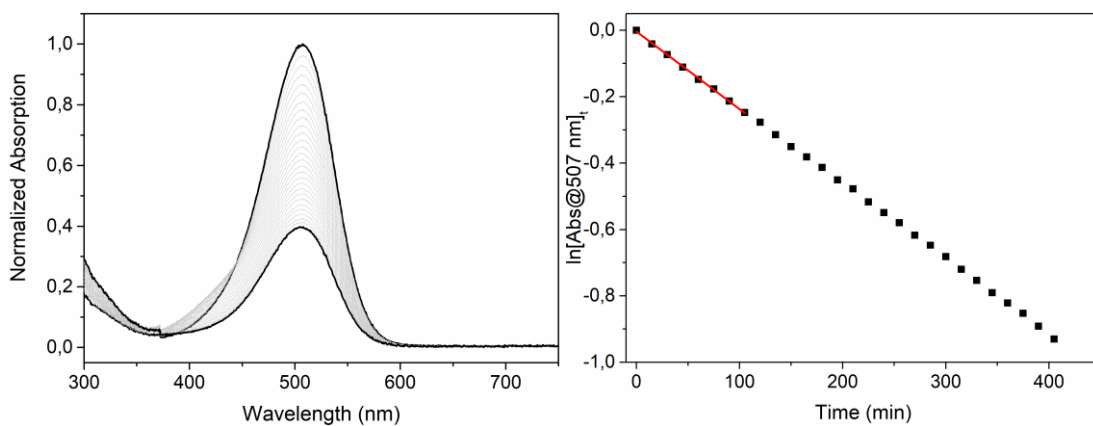


Figura 163: Cinética de degradação da 4-OMe-dipBeet em pH 5 a 60 °C.

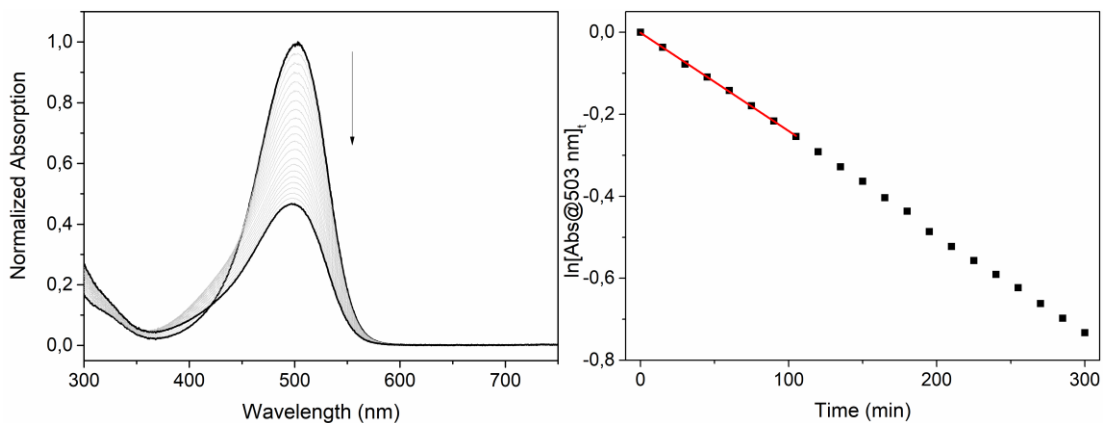


Figura 164: Cinética de degradação da dipBeet em pH 5 a 60 °C.

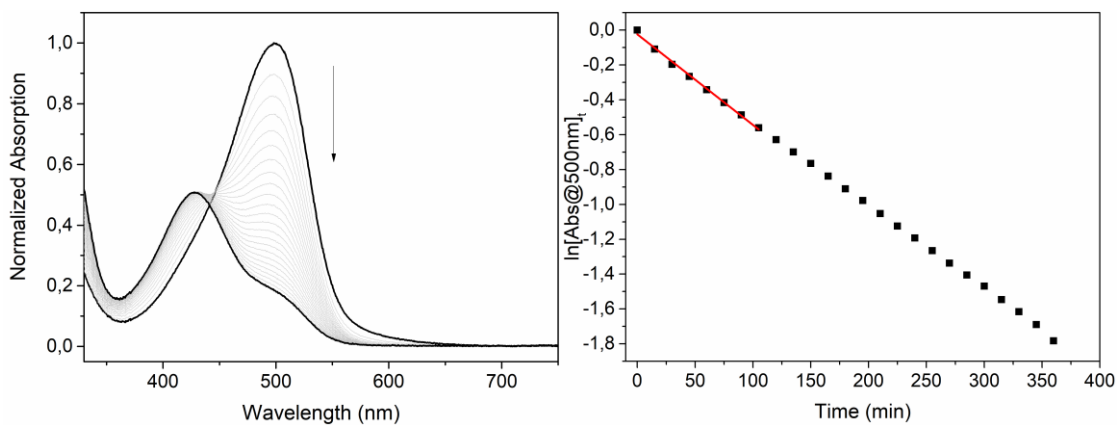


Figura 165: Cinética de degradação da 4-CN-dipBeet em pH 5 a 60 °C.

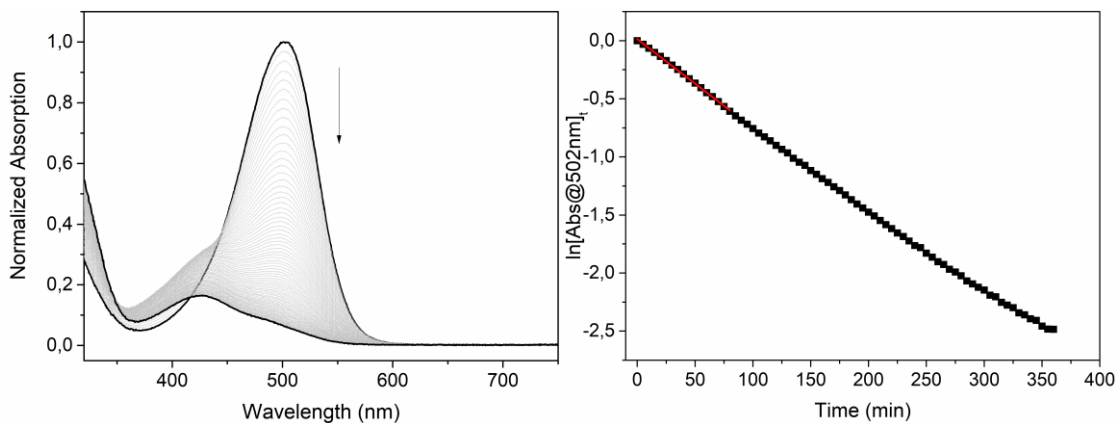


Figura 166: Cinética de degradação da 4-OMe-4-CN-dipBeet em pH 5 a 60 °C.

8.9. Voltamogramas

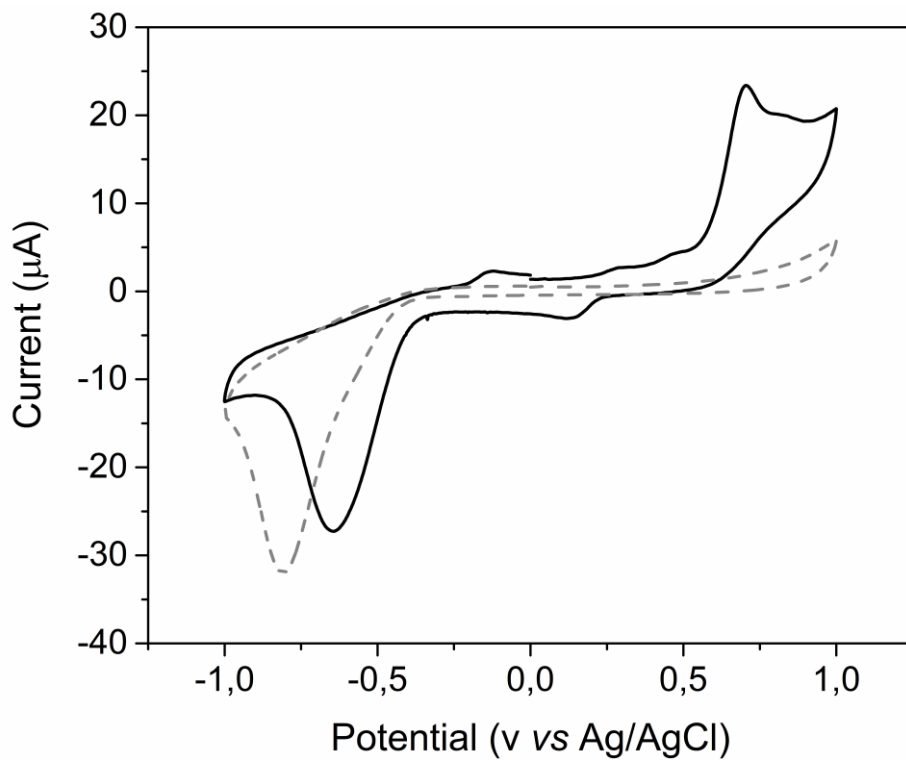


Figura 167: Voltamograma cíclico da *N*-Me-4-OMe-pBeet.

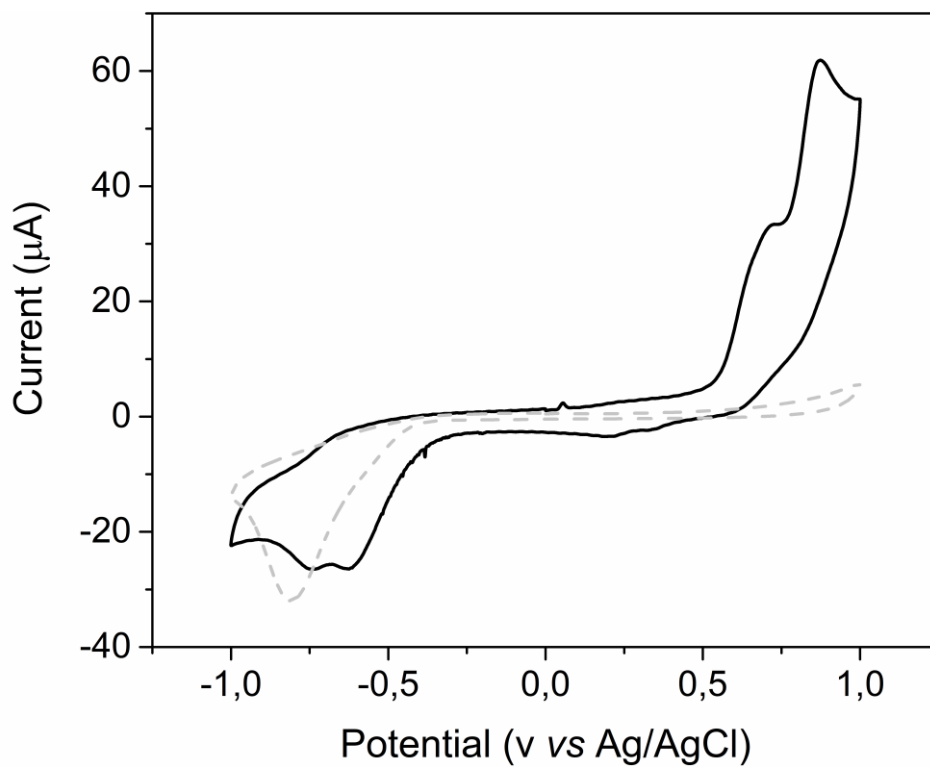


Figura 168: Voltamograma cíclico da *N*-Me-pBeet.

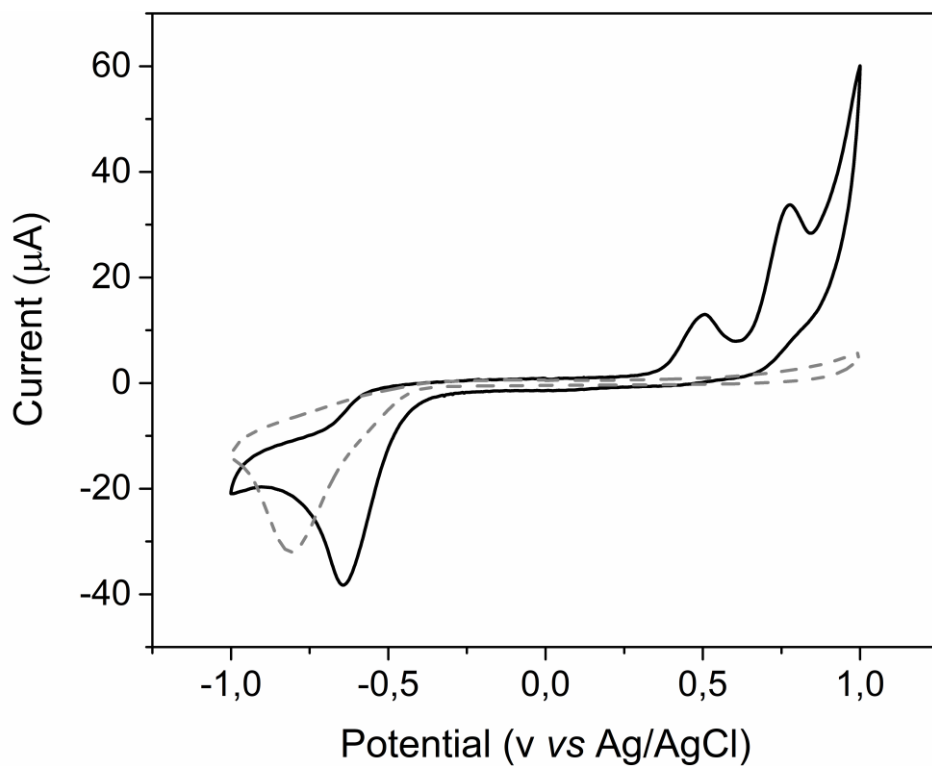


Figura 169: Voltamograma cíclico da *N*-Me-4-CN-pBeet.

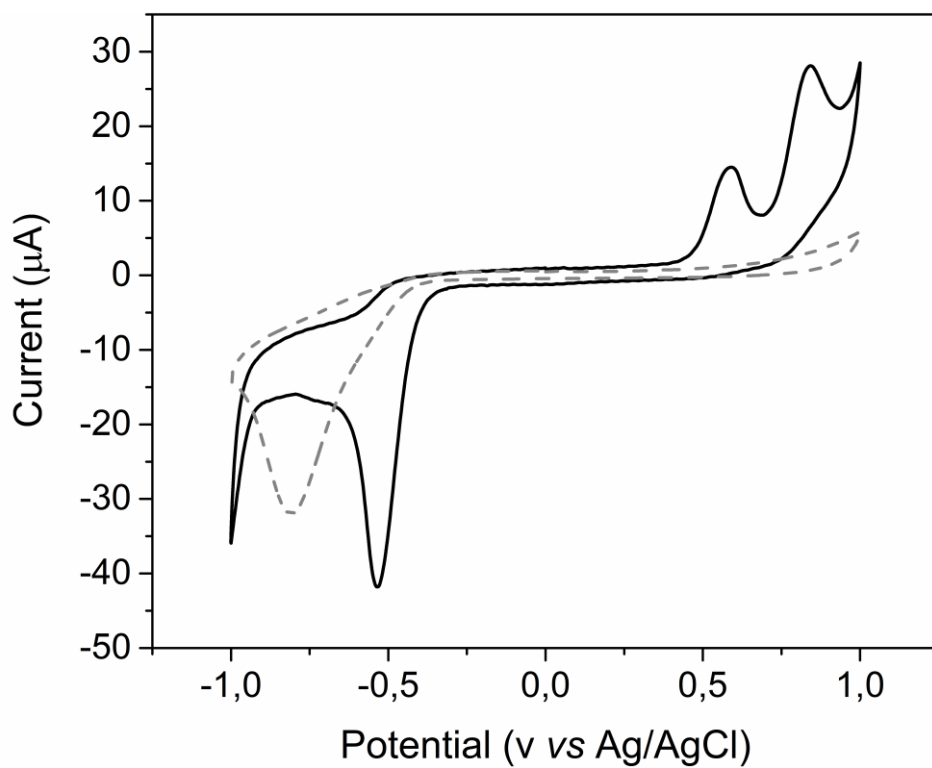


Figura 170: Voltamograma cíclico da *N*-Me-3,4-CN-pBeet.

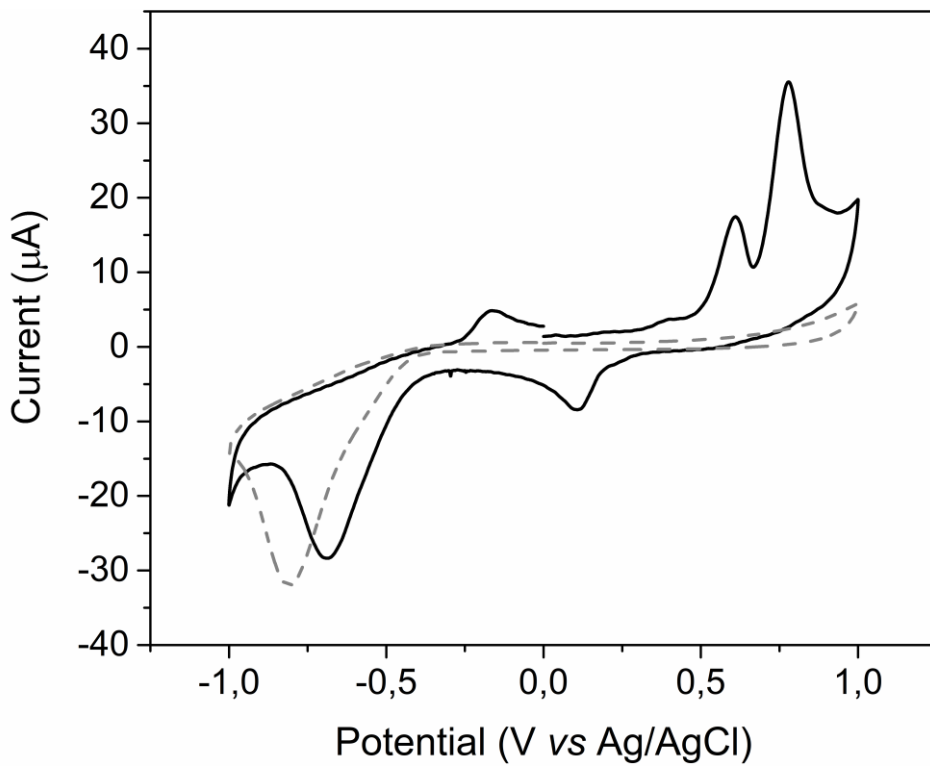


Figura 171: Voltamograma cíclico da 4,4'-OMe-dipBeet.

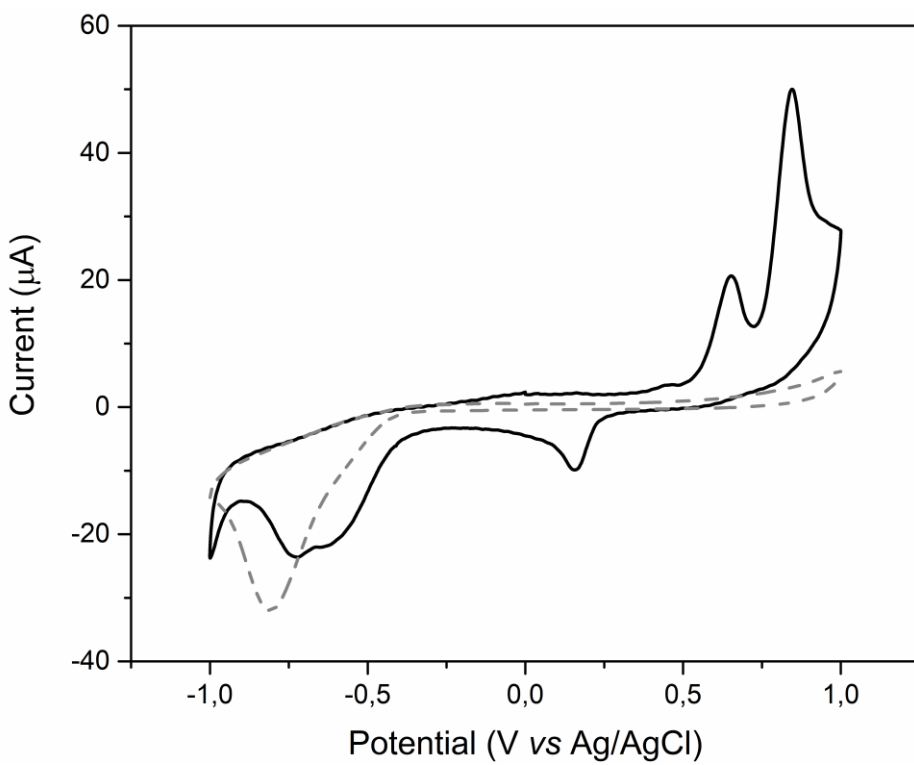


Figura 172: Voltamograma cíclico da 4-OMe-dipBeet.

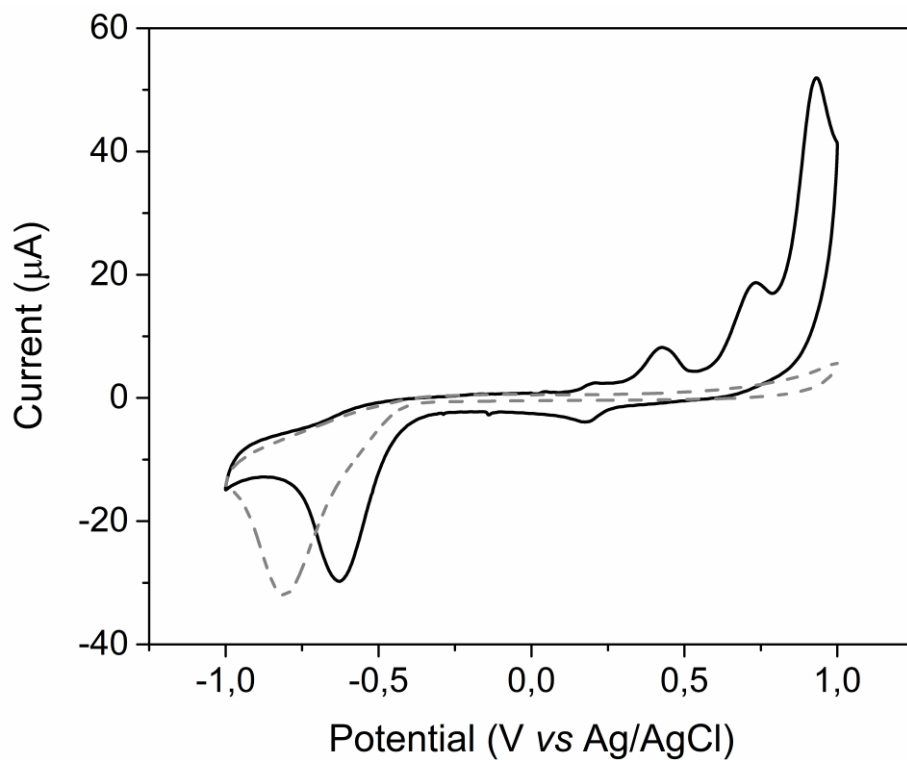


Figura 173: Voltamograma cíclico da dipBeet.

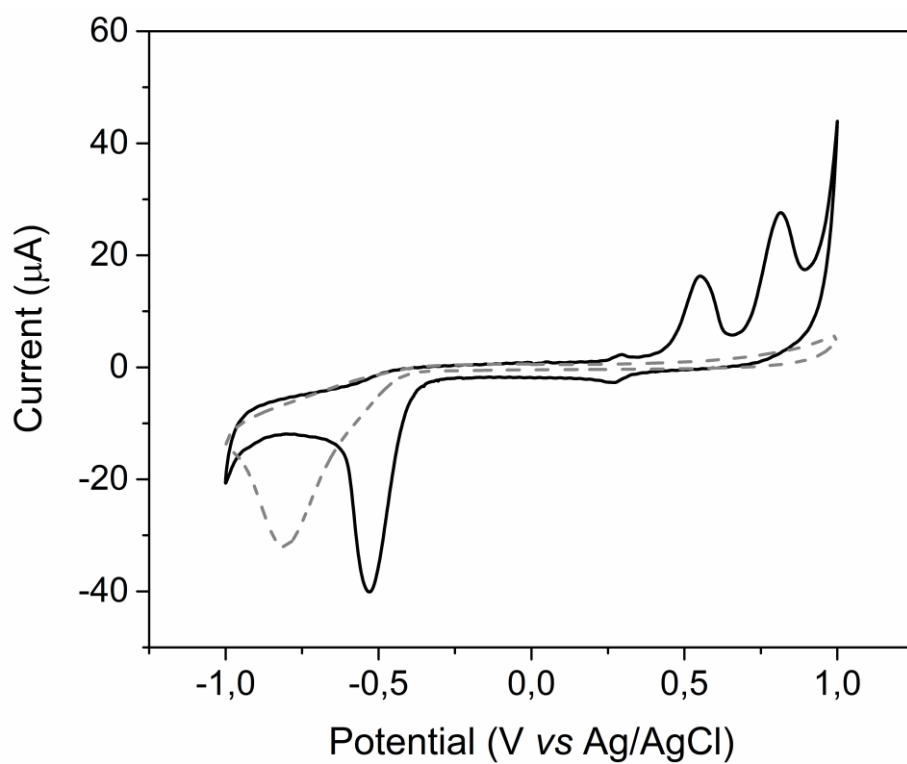


Figura 174: Voltamograma cíclico da 4-CN-dipBeet.

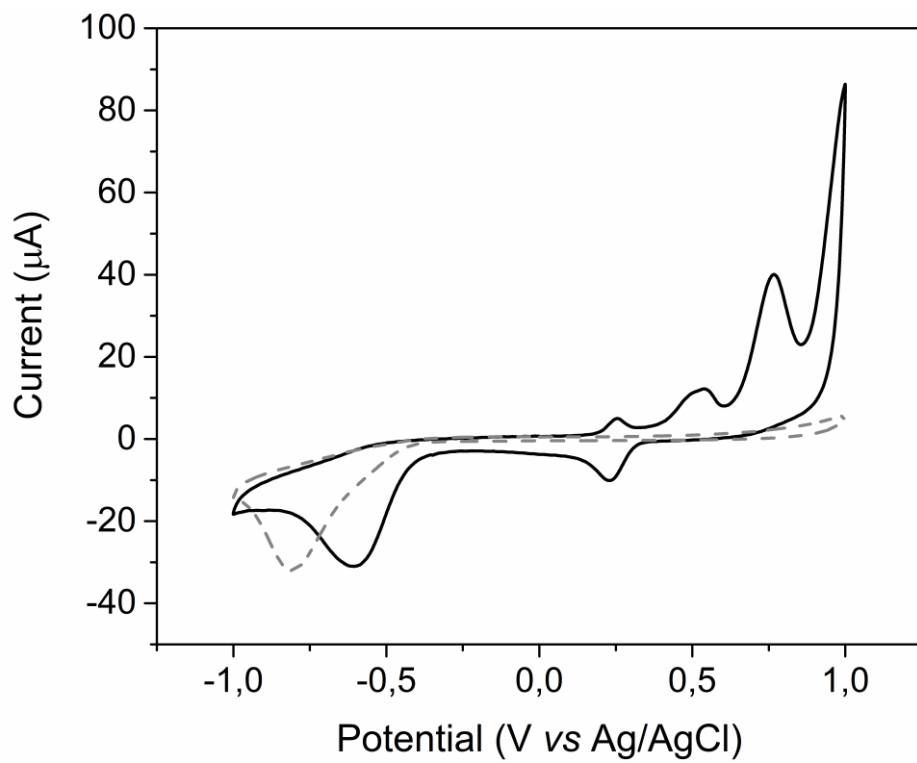


Figura 175: Voltamograma cíclico da 4-OMe-4'-CN-dipBeet.