UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

BARBARA COELHO DE FREITAS DÖRR

**BeetBlue: semissíntese e propriedades
espectroscópicas de um corante polimetínico
quiral bioinspirado**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

10/12/2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F 862b	Freitas-Dörr, Barbara Coelho BeetBlue: semissíntese e propriedades espectroscópicas de um corante polimetínico quiral bioinspirado / Barbara Coelho Freitas-Dörr. - São Paulo, 2018. 158 p. Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Bastos, Erick Leite 1. betalaínas. 2. corantes. 3. fluorescência. 4. conjugação. 5. toxicidade. I. T. II. Bastos, Erick Leite, orientador.
-----------	---

BARBARA COELHO DE FREITAS DÖRR

**BeetBlue: semissíntese e propriedades espectroscópicas
de um corante polimetínico quiral bioinspirado**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de doutora em Ciência (Química)*

Orientador Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo

2018

Dedico esta tese aos meus queridos avós
Alcides Coelho (*in memorian*), Dulce Coelho,
Arthemio de Freitas (*in memorian*) e Amália de Freitas (*in memorian*).

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Erick L. Bastos, pela confiança, pelas oportunidades, pelas conversas e discussões e pela paciência durante essa jornada.

À Deus e aos meus guias espirituais por estarem presentes em todos os momentos da minha vida me protegendo, por serem a luz dos meus caminhos e o refúgio nos bons e maus momentos.

Ao meu marido Felipe pelo apoio incondicional, por ser a calma no meu temporal e a razão no meu turbilhão de emoções. Por ser meu companheiro, meu melhor amigo, por me completar e fazer a minha vida muito mais feliz. Você foi essencial para esta conquista.

Aos meus pais, Marcos e Mara, pelo amor incondicional, pela torcida e por sempre me acompanharem de perto e me apoiarem em todas as minhas loucuras. Obrigada por serem minha base e por me ensinarem a valorizar o que realmente importa nessa vida. Amo vocês!

Ao meu irmão Vinicius por tornar minha vida mais doce, pelas maluquices e por ser super companheiro. Tenho muito orgulho de ser sua irmã. Te amo!

À Jaque, irmã que a vida me deu, por todo incentivo, apoio, carinho e, principalmente, pela paciência e compreensão nas minhas ausências.

À toda minha família pelo apoio e pela torcida.

À família Contente Silva. Thá e Di pelos conselhos, por acreditarem e confiarem em mim e por todos os puxões de orelha necessários. E Be e Theo por encherem a minha vida de alegria e amor.

Ao time BastosLab e aos colegas do 461 pela ajuda e pelas discussões que contribuíram muito para a execução deste trabalho.

Aos amigos que o Doutorado me deu: Amanda, Arthur, Ana Clara, Karina e Renan. Muito obrigada por toda ajuda, pelo apoio, pela companhia diária, pelas comilanças e por tornarem tudo mais leve.

Aos técnicos do IQ, principalmente ao Joca e à Helena pela sempre disponibilidade em ajudar e pelas conversas.

À Clélia e ao Walter por me apresentarem o mundo acadêmico, pelos conselhos, pelo carinho e pelo cuidado.

Aos técnicos da Central Analítica, Janaína, Cristiane, Vânia, Giovana, Adriana e Wilton pela ajuda essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Ernani por ter me iniciado na academia e por ter deixado a porta do seu laboratório sempre aberta para mim, seja para experimentos ou para conversas. Obrigada Felipe pelas análises de espectrometria de massas.

Ao Prof. Jacinto por me receber tão bem em seu laboratório e por todos os ensinamentos.

Aos colegas de Uppsala pela acolhida e ao Mohamed e Daniel pela ajuda nos experimentos.

Aos Profs. Willi, Maurício, Frank, Omar, Cassius, Thiago Correra e Thiago Paixão e seus alunos, pelas explicações, ensinamentos e pelo uso dos equipamentos em seus laboratórios.

À FAPESP pela bolsa concedida (2014/10563-5) e CNPq e Capes pelo financiamento dos projetos

*“Experimentei algo que depois, ao longo de minha vida,
se repetiu frequentemente: a alegria do novo”*

Elena Ferrante

em “A amiga genial”

Resumo

FREITAS-DÖRR, B. C. **BeetBlue: semissíntese e propriedades espectroscópicas de um corante polimetínico quiral bioinspirado** 2018. 158f Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Betalainas são pigmentos nitrogenados de cor vermelha-violeta ou amarela encontrados em um número restrito de espécies de plantas e fungos. Esta Tese de Doutorado apresenta o desenvolvimento de um derivado betalaínico com sistema π estendido chamado de **BeetBlue**, a caracterização de suas propriedades estruturais, redox e espectroscópicas e o estudo do seu comportamento na presença de outras espécies químicas. Este corante foi semissintetizado a partir do acoplamento entre 2,4-dimetilpirrol e ácido betalâmico extraído de suco de beterraba hidrolisado. Embora o sistema diazapolimetínico com nove grupos metilênicos da **BeetBlue** seja análogo ao da indocianina verde, um corante fluorescente de grande interesse aplicado, **BeetBlue** é azul-violeta e pouco fluorescente em soluções de solventes moleculares. A diminuição da polaridade ou aumento da viscosidade do meio aumentam o seu rendimento quântico de fluorescência em até três ordens de grandeza e a complexação com lantanídeos em meio aquoso muda a sua cor de azul para laranja. **BeetBlue** é sensível à hidrólise catalisada por base e à oxidação, o que oferece novas oportunidades para o seu uso no desenvolvimento de métodos analíticos. Este corante não é citotóxico para células de epitélio de retina e não afetou o desenvolvimento de embriões e larvas de peixe-zebra. **BeetBlue** é o protótipo de uma nova classe de pigmentos polimetínicos quirais solúveis em água, as *quasibetalainas*, que apresentam grande potencial de aplicação como corantes seguros para o meio ambiente e saúde animal.

Palavras-chave – betalaínas, corantes, fluorescência, conjugação, cor, toxicidade.

Abstract

FREITAS-DÖRR, B. C. **BeetBlue: semi-synthesis and spectroscopic properties of a bioinspired chiral polymethyne dye** 2018. 158f. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Betalains are nitrogen-containing pigments of red-violet or yellow color found in a restricted number of species of plants and fungi. This Doctoral Thesis presents the development of a betalain derivative with an extended π system called **BeetBlue**, the characterization of its structural, redox and spectroscopic properties and the study of its behavior in the presence of other chemical species. This dye was semi-synthesized from the coupling of 2,4-dimethylpyrrole and betalamic acid extracted from hydrolyzed beet juice. Although the diazapolymethyne system with nine methylene groups of **BeetBlue** is analogous to that of indocyanine green, a fluorescent dye of great interest, **BeetBlue** is blue-violet and poorly fluorescent in solutions of molecular solvents. The decrease in polarity or increase in the viscosity of the medium increases its fluorescence quantum yield by up to three orders of magnitude, and the complexation with lanthanides in aqueous medium changes its color from blue to orange. **BeetBlue** is sensitive to base-catalyzed hydrolysis and oxidation, which offers new opportunities for its use in the development of analytical methods. This dye is non-cytotoxic to retinal epithelial cells and did not affect the development of zebrafish embryos and larvae. **BeetBlue** is the prototype of a new class of water-soluble chiral polymethynic pigments, the *quasibetalains*, which present great potential for application as safe dyes for the environment and animal health.

Keywords – betalains, dye, fluorescence, conjugation, color, toxicity.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

μ_E	Momento de dipolo do estado excitado
μ_G	Momento de dipolo do estado fundamental
^{13}C -RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do carbono
^1H -RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do hidrogênio
2,4-dmp	2,4-dimetilpirrol
7AAD	7-aminoactinomicina D
AOT	Dioctilsulfocinato de sódio
Bn	Betanina
BSA	Albumina sérica bovina
BtP	Indicaxantina
CAE	Catálise ácida específica
CBE	Catálise básica específica
CBG	Catálise básica geral
DAD	Diode array detector, detector de arranjo de diodos
DFT	<i>Density functional theory</i> , teoria do funcional de densidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Ácido 2,6-dipicolínico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_s	Energia singlete
ESI(+)	<i>Electrospray ionization positive mode</i> , ionização por eletrospray no modo positivo
$E_T(30)$	Polaridade empírica
ϵ	Coeficiente de absorção molar
ϵ_r	Permissibilidade relativa
f^{em}	Fenda de emissão

f^{ex}	Fenda de excitação
Gli	Glicerol
HBt	Ácido betalâmico
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i> , coerência de ligação heteronuclear múltipla
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i> , coerência quântica heteronuclear múltipla
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i> , orbital molecular de mais alta energia ocupado
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
HRMS	<i>High resolution mass spectrometer</i> , espectrômetro de massas de alta resolução
HSA	Albumina sérica humana
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol
J	Constante de acoplamento
k_{nr}	Constante cinética não radiativa
k_{obs}	Constante cinética observada
k_{r}	Constante cinética radiativa
Ln	Lantanídeos
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i> , orbital molecular de mais baixa energia não ocupado
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
n_{D}	Índice de refração
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampão fosfato-salino
Φ_{Fl}	Rendimento quântico de fluorescência
R_{H}	Raio hidrodinâmico
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
SE	<i>Stimulated emission</i> , emissão estimulada
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TOF	<i>Time of flight</i> , detector por tempo de voo
t_{R}	Tempo de retenção
W_0	Razão entre $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$
δ	Deslocamento químico, em ppm
$\Delta\nu$	Deslocamento de Stokes
η	Viscosidade
λ^{abs}	Máximo de absorção
λ_{f}	Máximo de emissão
τ	Tempo de vida do estado excitado

Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	ix
1 Introdução.....	15
1.1 Cores da natureza.....	15
1.1.1 Cor azul na natureza	15
1.2 Betalaínas, pigmentos naturais nitrogenados	17
1.2.1 Estabilidade de betalaínas.....	21
1.2.2 Obtenção de novas betalaínas.....	24
2 Objetivos.....	27
2.1 Objetivos específicos	27
3 Resultados e Discussões	28
3.1 Semissíntese e caracterização da BeetBlue.....	28
3.1.1 Caracterização estrutural	30
3.2 Propriedades fotofísicas e redox	43
3.2.1 Absorção e fluorescência no estado estacionário e voltametria cíclica....	43
3.2.2 Espectroscopia resolvida no tempo	50
3.3 Estabilidade hidrolítica	59
3.4 Efeitos de interações intermoleculares sobre a fotofísica de BeetBlue	71
3.4.1 Efeitos de solventes moleculares	72

3.4.2	Interação de BeetBlue com lantanídeos.....	74
3.4.3	Efeito da viscosidade do solvente.....	80
3.4.4	BeetBlue em micelas reversas	83
3.4.5	Interação entre BeetBlue e albumina sérica bovina.....	86
3.5	Toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	91
3.5.1	Viabilidade celular.....	91
3.5.2	Toxicidade em modelo peixe-zebra.....	94
4	Conclusões.....	97
5	Parte Experimental	99
5.1	Materiais	99
5.2	Métodos.....	101
5.2.1	Soluções de trabalho	101
5.2.2	Semissíntese e purificação de BeetBlue	106
5.2.3	Caracterização estrutural	108
5.2.4	Propriedades fotofísicas e redox.....	109
5.2.5	Estabilidade hidrolítica	115
5.3	Efeitos de interações intermoleculares sobre a fotofísica de BeetBlue	117
5.3.2	Toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	123
6	Referências	125
7	Anexos.....	144

1 Introdução

1.1 Cores da natureza

As cores influenciam o equilíbrio entre as espécies que habitam este planeta.¹ Pigmentos vegetais desempenham papéis vitais nas plantas, transcendendo a atração de insetos polinizadores. Clorofila, o principal pigmento no processo de fotossíntese, captura a energia da luz do sol para a conversão de dióxido de carbono em glicose. Carotenoides tem a importante função de proteger o aparato fotossintetizante contra processos foto-oxidativos.^{2,3} Na via das pentoses-fosfato, D-glicose é o material de partida para a obtenção de D-eritrose-4-fosfato, composto chave na biossíntese do ácido xiquímico. Aminoácidos aromáticos, como a L-fenilalanina e a L-tirosina, são produtos da via do xiquimato e, em plantas, dão origem às antocianinas e betalainas.⁴ Nesta breve descrição, foi traçado um panorama multicolorido: clorofilas são porfirinas de cor verde, carotenoides são tetraterpenos que abrangem os tons de amarelo a vermelho, antocianinas são flavonoides que se apresentam nas mais diversas cores, incluindo amarelo, laranja, vermelho, violeta e azul e betalainas têm cores magenta, amarela e vermelha.

1.1.1 Cor azul na natureza

Embora a cor azul seja frequente na natureza, podendo ser vista em flores, frutos e penas de pássaros, nem sempre é resultado da presença de um pigmento azul.⁵ A cor azul em animais é tipicamente causada pela reflexão da luz em nanoestruturas (cor física), fenômeno que ocorre nas penas do pavão⁶, nas asas de borboletas do gênero *morpho*^{7,8} e em alguns frutos silvestres, como na *Pollia condensata*⁹ (**Figura 1**). Em flores e frutos pigmentados por antocianinas, a cor azul é o resultado da formação de complexos supramoleculares.⁵

Figura 1 Exemplo de animais e fruto azuis, resultado de cor física: (A) borboleta morpha (*Morpho* sp); (B) pavão (*Pavo cristatus*); (C) fruto da polia (*Polia condensata*); (D) weterm bluebird (*Sialia* sp).

Pigmentos naturais[†] azuis não são tão comuns porque a percepção visual desta cor depende da absorção de luz na região do amarelo-laranja (em torno de 600 nm). A maioria das moléculas absorvem fótons ultravioletas por transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e $\sigma \rightarrow \pi^*$. Algumas moléculas possuem sistemas conjugados que permitem transições de menor energia $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, absorvendo luz no visível e apresentando cor.⁵ Para que um composto consiga absorver na região necessária do espectro para apresentar coloração azul é necessário, além de uma conjugação estendida, anéis aromáticos, heteroátomos e cargas, sendo poucas as moléculas que cumprem esses requisitos. Alguns exemplos de classes que possuem como representantes pigmentos azuis são: flavonoides, quinonas, alcaloides, azulenos e organometálicos.⁵

A indústria de alimentos possui grande interesse em pigmentos naturais, que são utilizados como aditivos de cor para melhorar a aparência e aceitação de uma ampla

[†] Metabólitos secundários coloridos são chamados de pigmentos. Quando usada neste contexto, essa nomenclatura não indica solubilidade, *viz.*, corantes são solúveis e pigmentos são insolúveis.

variedade de alimentos e bebidas. Para ser considerado um aditivo de cor, o composto tem que se mostrar seguro ao consumo, ou seja, não ser tóxico para humanos; um alto coeficiente de atenuação molar (ϵ), permitindo seu uso em baixas concentrações e evitando problemas com toxicidade e agregação de sabor indesejado ao alimento; estável o suficiente para sobreviver ao processamento dos alimentos, como aquecimento, tempo de prateleira, entre outros.⁵ Alguns exemplos de pigmentos naturais já utilizados são a betanina extraída da beterraba, a cochonilha extraída do inseto *Dactylopius coccus* e a clorofila.

Apesar de existirem pigmentos azuis naturais, a maioria não consegue preencher os requisitos para serem considerados aditivos de cor na indústria de alimentos. As antocianinas e as quinonas só mantêm a sua tonalidade azul em meio neutro, em alimentos e bebidas com teor ácidos estas tendem a tomar coloração rosa/roxa, no caso das antocianinas, e alaranjada, no caso das quinonas.^{5,10-13} Os alcaloides indólicos possuem coloração azul em meio ácido, porém tendem a ser bioativos e tóxicos. Já o azuleno e seus derivados costumam ser lipofílicos, possuem um baixo ϵ e baixa estabilidade, o que dificulta seu uso.⁵ Devido à falta de candidatos e alto potencial de aplicabilidade, a busca de novos pigmentos azuis se torna de grande importância.

1.2 Betalaínas, pigmentos naturais nitrogenados

Betalaínas são pigmentos nitrogenados vacuolares que substituem as antocianinas na maioria das famílias de plantas da ordem Caryophyllales, exceto nas famílias Caryophyllaceae e Molluginaceae, e em alguns fungos basideomicetos dos gêneros *Amanita* e *Hygrophorus*.¹⁴ As betalaínas naturais são divididas em duas classes que possuem um cromóforo comum, o ácido betalâmico (**HBt**), um aldeído α , β , γ , δ insaturado (**Esquema 1**). As betaxantinas (*xanthos*, amarelo) são resultado do acoplamento aldimínico do **HBt** com aminoácidos e possuem coloração amarelo-

alaranjada (máximo de absorção (λ_{abs}) $\approx$ 470 nm), enquanto as betacianinas (*kyaneos*, azul) resultam do acoplamento com derivados da ciclo-DOPA com diferentes graus de glicosilação e possuem coloração vermelho-violácea (λ_{abs} $\approx$ 540 nm).¹⁵

Esquema 1 Estrutura básica de betacianinas vermelho-violáceas e betaxantinas amarelo-alaranjadas, do ácido betalâmico, seu precursor comum, e de dois exemplos encontrados na natureza (betanina e indicaxantina).

Esta classe de pigmentos é responsável por pigmentar flores, como a primavera (*Bougainvillea spp.*), e frutos, como a pitaia (*Hylocereus spp.*), e seu papel, neste caso, parece se relacionar com a atração de vetores no processo de polinização e dispersão de sementes.¹⁶ Entretanto, o fato de também estarem presentes em raízes, como a beterraba (*Beta vulgaris*), e em fungos superiores, como o agário das moscas (*Amanita muscaria*) não revela uma função evolutiva evidente (**Figura 2**).^{17–20}

Figura 2 Exemplos de fontes de betalinas. (A) Beterraba vermelha (*Beta vulgaris*); (B) Maravilha (*Mirabilis jalapa*); (C) flor do cacto opuntia (*Opuntia spp.*); (D) Pitaia (*Hylocereus spp.*); (E) Agário das moscas (*Amanita muscaria*); (F) Primavera (*Bougainvillea spp.*).

Apesar das betalainas chamarem atenção pela sua capacidade tintorial, a betanina (E162), pigmento majoritário na beterraba, é a única aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para ser utilizada como corante de alimentos.²¹ A cor dos alimentos está frequentemente ligada à qualidade do alimento e à sua aceitação. Os corantes naturais estão sendo cada vez mais procurados para substituírem os sintéticos, por serem considerados inofensivos e mais saudáveis.²²

Além das suas propriedades tintoriais, as betalainas também são conhecidas pelo seu potencial antioxidante e anti-inflamatório.^{23–27} O potencial antioxidante de betalainas naturais, como a betanina e indicaxantina, vem sido altamente estudado para uso terapêutico em doenças vinculadas ao estresse oxidativo.^{28–32} Quando parte de uma dieta regular, as betalainas tem o potencial para inibir a lipoxidação e a peroxidação.³³ Ainda, betanina e indicaxantina mostraram ser capazes de diminuir o edema e o número de leucócitos recrutados em casos de inflamação, aumentando o seu potencial terapêutico.^{23,24} Estes eventos se tornam mais interessantes, pois além da capacidade terapêutica as betalainas apresentam alta biodisponibilidade.³⁴ O consumo consistente de

figo-do-diabo (500 g, contendo 28 mg de indicaxantina e 16 mg de betanina) gerou uma concentração máxima de $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indicaxantina e betanina, respectivamente, após 3 h de consumo, valores relativamente altos e comparáveis a maioria dos flavonoides.^{33,34}

Um fator ainda mais intrigante que envolve esta classe de pigmentos é o fato de algumas flores pigmentadas com betalaínas apresentarem fluorescência.³⁵ As pétalas das variedades amarelas da maravilha (*Mirabilis jalapa*), onze-horas (*Portulaca grandiflora*) e do cacto-margarida (*Lampranthus productus*) emitem fluorescência verde quando irradiados com luz azul. Sabe-se que essa emissão de fluorescência é decorrente das betaxantinas presentes nestas flores. Embora os motivos para a emissão de fluorescência sejam pouco entendidos, acredita-se que estejam envolvidos na atração de polinizadores.³⁵

Apesar da fluorescência visível apresentada por essas flores, as betalaínas apresentam rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FI}) bem baixos quando isoladas em soluções aquosas (e.g. Φ_{FI} betanina = 0,07%; Φ_{FI} indicaxantina = 0,53%; ambas em água a 25 °C)^{36,37} quando comparadas a outras moléculas fluorescentes, como por exemplo o quinino que está presente na água tônica (Φ_{FI} = 55%, em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} a 25 °C)³⁸. Estudos realizados com quatro betalaínas naturais (betanina, indicaxantina, vulgaxantina I e miraxantina V) demonstraram que a principal via de desativação destes pigmentos é a via não radiativa, não sendo observado em nenhum dos casos a ocorrência de cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$ e nem a formação de fotoprodutos.^{36,37,39,40} Esta eficiente conversão de luz em calor e a não formação do estado excitado triplete sugerem que as betalaínas possuem o papel de fotoprotetoras nas plantas, fato corroborado por outros estudos que mostram um acúmulo destes pigmentos em plantas expostas a luz branca ou UV.⁴¹⁻⁴⁴

Apesar disso, alterações no meio demonstraram ter grande efeito sobre o ϕ_{FI} de betalaínas. A troca do solvente de água para 2,2,2-trifluoretanol (TFE) demonstrou dobrar o ϕ_{FI} da indicaxantina.⁴⁵ Também foi constatado que o aumento da viscosidade do meio aumenta consideravelmente o ϕ_{FI} das betalaínas, como por exemplo o ϕ_{FI} da vulgaxantina I que passa de 0,7% em água (0,89 cP) para 3,9% em etilenoglicol (16,1 cP).³⁷ Tal fato indica que a fluorescência visível das flores pigmentadas por betaxantinas é resultado da compartimentalização destes pigmentos nos vacúolos da planta, onde ocorre um aumento da microviscosidade e consequente aumento do ϕ_{FI} .^{37,39,40}

1.2.1 Estabilidade de betalaínas

Betalaínas são suscetíveis a fatores como pH^{46,47}, luz⁴⁸, atividade de água (a_w)^{49,50} e temperatura^{21,47,51}. Estes fatores comprometem o tempo de vida destes compostos, podendo afetar a sua coloração e limitando a sua aplicação. As principais vias de decomposição das betalaínas são hidrólise, descarboxilação, desidrogenação e epimerização. A temperatura é o fator que possui o efeito mais pronunciado sobre a estabilidade das betalaínas. Com o aquecimento as betalaínas podem se degradar através de todas as vias citadas acima.^{52,53} A velocidade de degradação é diretamente proporcional ao aumento de temperatura e segue cinética de primeira ordem.^{47,54,55} A betanina, por exemplo, apresenta meia vida em pH 7 de 110 min a 25 °C, decaindo para 20 min a 75 °C.⁴⁷ As betacianinas apresentam maior estabilidade térmica frente as betaxantinas^{56,57}, como no caso da meia vida da betanina, que é 11 vezes maior do que a da vulgaxantina I a 55 °C.⁵⁸ Após tratamento térmico prolongado, pode-se observar a descarboxilação dos pigmentos, que resulta em compostos com comprimento de onda máximo de absorção deslocados para o azul, devido à concentração de carga no sistema conjugado 1,7-diazaheptametínico.²¹

Em meio alcalino, a hidrólise da ligação aldimínica (**Esquema 2**) é favorecida conforme o aumento de temperatura, resultando no precursor ácido betalâmico, que torna a solução amarela, e na amina correspondente.⁵⁹ Por se tratar de um equilíbrio, este processo pode ser revertido através da acidificação do meio ou resfriamento⁵⁹, que favorecem a condensação aldimínica. Porém a regeneração dos pigmentos não se dá por completo uma vez que o ácido betalâmico também é decomposto nestas condições.^{55,60} Um estudo recente sobre a hidrólise de betanina na presença de íons fosfato revelou a ocorrência de catálise ácida e básica específica, bem como a catálise ácida e básica geral, sendo a região onde betanina é mais estável entre pH 5 e 7.⁶¹ Também foi apresentado que os produtos formados tanto em pH 2 quanto em pH 9 são os mesmos, modificando-se apenas a taxa na formação, sendo eles ciclo-DOPA, **HBt** e produtos de degradação destes dois últimos (ciclo-DOPA oxidada e desglicosilada e produto da descarboxilação oxidativa de HBt).⁶¹ Ainda neste trabalho, relatou-se que em pH 8,2 o íon hidrogênio fosfato age como uma base geral, mesmo que em baixas concentrações de tampão.⁶¹

Esquema 2 Esquema de hidrólise de betalainas a ácido betalâmico e amina precursora.

Justamente por se tratarem de iminas ou sal de imínio, as betalainas são diretamente afetadas pela atividade de água.⁵⁰ A atividade de água é um parâmetro obtido pela pressão de vapor parcial da água em uma substância em relação a pressão de vapor parcial da água pura na mesma temperatura, e o seu valor varia de 0 a 1. Desta forma, quanto maior o valor de a_w , menos associadas estão as moléculas de água e, portanto,

mais disponíveis para o ataque nucleofílico. Por consequência, métodos que diminuem a a_w , como concentração da solução, aumentam a estabilidade das betalaínas.⁶²

Nas suas matrizes naturais, betaxantinas⁵⁸ e betacianinas^{47,63} são mais estáveis que em solução aquosa. Os constituintes vegetais como açúcares, ácidos e pectinas diminuem a a_w ⁶⁴ e a complexação com metais, aumentando a persistência dos pigmentos em meio aquoso.⁶⁵ Os metais podem agir como ácidos de Lewis, favorecendo a hidrólise ou como pró-oxidantes, favorecendo a oxidação.⁶⁶ A betanina, por exemplo, mostrou ser menos estável na presença dos cátions metálicos Fe^{2+} , Fe^{3+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} e Cu^{2+} .⁶⁶⁻⁶⁸ Na presença de Cu^+ , Cu^{2+} e Hg^{2+} , também foi observado um deslocamento batocrômico da banda de absorção da betanina, indicando a possível formação de complexos.⁶⁷

Processos oxidativos levam a formação de neobetalaínas (amarelas) e este processo é favorecido em altas temperaturas (**Esquema 3**).⁶⁹ A betanina é instável na presença de oxigênio, sendo sua estabilidade inversamente proporcional a concentração de oxigênio. O efeito do oxigênio é pH dependente, sendo mais expressivo na faixa de pH ótimo para betanina em solução aquosa.⁶⁷ A proteção contra oxidação das betalaínas pode ser feita através da utilização de atmosfera de nitrogênio ou argônio ou através do uso de baixas concentrações de redutores, como o ácido ascórbico.^{21,70,71} Devido a sua sensibilidade a presença de oxigênio, betacianinas foram utilizadas como sonda para oxigênio singlete, onde a sua oxidação foi acompanhada pela perda de cor.⁷² Os processos de decomposição oxidativa das betalaínas também podem ser favorecidos pela presença de luz na região UV-Vis, *i.e.*, $E_a = 104,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ no escuro e $80,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ na presença de luz.^{26,47,48,73}

Esquema 3 Oxidação de betaláínas a seus derivados neobetalâmicos.

Na natureza as betaláínas existem como misturas de diastereoisômeros, sendo na forma *S* chamadas pelos seus nomes tradicionais e o isômero *R* recebendo o prefixo *iso*. A betanina e a *isobetanina* possuem propriedades de absorção e fluorescência idênticas, porém podem ser separadas por meio de cromatografia em fase reversa.^{59,74} A epimerização das betacianinas para sua forma *iso* se dá sob aquecimento em meio ácido.²¹ Uma possível via para esta isomerização envolve a tautomerização graças à presença de um hidrogênio alfa carboxílico relativamente ácido (**Esquema 4**).

Esquema 4 Possível via para epimerização de betaláínas.

1.2.2 Obtenção de novas betaláínas

A obtenção de ácido betalâmico pelas plantas se dá através da oxidação da L-tirosina em duas etapas envolvendo enzimas.^{75–78} Apesar disso, a etapa final de acoplamento de **HBt** com ciclo-DOPA ou aminoácidos mostrou ser espontânea⁷⁹, o que permitiu obtenção de novas betaláínas *in vitro*. A metodologia mais comumente utilizada para obtenção de novas betaláínas é a obtenção de ácido betalâmico a partir da hidrólise alcalina da betanina, seguido da adição de excesso de amina e diminuição do pH.⁸⁰ O problema desta abordagem é que se obtém além da betaláína desejada, uma mistura de **HBt** e betanina, dificultando a sua purificação e tornando o rendimento global da reação

baixo (aproximadamente 20%⁸¹). O **HBt** também pode ser obtido em acetato de etila a partir da hidrólise alcalina do suco de beterraba.⁷⁹ Apesar dos baixos rendimentos, esta extração permite a utilização de amins insolúveis em água, ampliando as possibilidades de betalaínas serem obtidas. Além disso, Cabanes e colaboradores propuseram a semissíntese *one-pot* de betaxantinas a partir do suco de beterraba, através da imobilização do **HBt** em uma resina (Lewatit® VP OC 1065) que possui grupamentos amina.⁸² Apesar de ser uma abordagem interessante, a remoção do aduto da resina e consequente obtenção da betalaína só foi otimizada para as amins utilizadas no trabalho.

A semissíntese *in vitro* possibilita a obtenção de uma grande variedade estrutural de betalaínas, que podem ser aplicadas em diversas áreas. Como por exemplo a **cBeet120**, uma betalaína fluorescente semissintética, obtida através do acoplamento do **HBt** com 7-amino-4-metilcumarina, que é capaz de acumular em *Plasmodium falciparum*, marcando seletivamente eritrócitos infectados.⁸¹ Porém, o tempo de meia vida da **cBeet120**, e da maioria das betalaínas semissintéticas^{83,84}, é ainda menor do que o das betalaínas naturais, sendo 110 minutos a 25 °C para o derivado cumarínico^{81,85}. A principal via de degradação no caso é a hidrólise da porção imínica e a descarboxilação. A hidrólise de betalaínas acaba sendo uma das vias mais importantes de degradação, uma vez que betalaínas são solúveis apenas em água ou solventes orgânicos polares próticos, como metanol por exemplo e 2,2,2-trifluoretanol (TFE).

Uma maneira de contornar este problema é a substituição desta porção imínica por uma ligação carbono-carbono, através do uso de um nucleófilo de carbono. Esta substituição tornaria, em teoria, as betalaínas mais resistentes ao calor, à atividade de água e à pH mais elevados. Pirróis são nucleófilos de carbono conhecidos pela sua capacidade de reagir com aldeídos aromáticos formando moléculas do tipo BODIPY.⁸⁶⁻⁸⁹ Uma vantagem extra com a utilização de pirróis como nucleófilo de carbono com **HBt** seria a

provável extensão do sistema diazapolimetínico, podendo chegar betalainas azuis, além de mais estáveis.

2 Objetivos

Semissintetizar um derivado de betalaína biocompatível por meio do acoplamento entre o ácido betalâmico e um nucleófilo de carbono e investigar os efeitos da estrutura e do meio sobre as suas propriedades fotofísicas e hidrolíticas.

2.1 Objetivos específicos

- i. Estender o sistema diazapolimetínico de betalaínas para obter derivados com absorção deslocada para comprimentos de onda mais longos;
- ii. Entender o efeito da porção imínica sobre a persistência de betalaínas em água, bem como sobre as propriedades fotofísicas e redox de derivados do ácido betalâmico;
- iii. Racionalizar os efeitos da polaridade e viscosidade do meio sobre as propriedades fotofísicas destes derivados betalaínicos;
- iv. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a toxicidade *in vivo* destes compostos.

3 Resultados e Discussões

3.1 Semissíntese e caracterização da BeetBlue

A instabilidade hidrolítica das betalaínas limita a sua aplicação.^{21,46,47,49,51} Contudo, a substituição da porção imínica de betalaínas por uma ligação C=C poderia prevenir a ocorrência de hidrólise sem comprometer o sistema π . Pirróis são nucleófilos de carbono que se acoplam a aldeídos em meio de solvente orgânico acidificado.⁹⁰ Um exemplo importante de compostos derivados de pirróis são os fluoróforos boraazaindacênicos da classe BODIPY. Estes corantes fluorescentes se originam do acoplamento de aldeídos, quase sempre aromáticos, com dois equivalentes de pirrol, seguido por oxidação e complexação com BF_3 (**Esquema 5a**).⁸⁶ Não há muitos relatos do acoplamento entre aldeídos α,β -insaturados e dois equivalentes de pirrol. Um exemplo é um BODIPY tioeter vinílico obtido em 2% de rendimento com o uso de um catalisador de Lewis de itérbio (**Esquema 5b**).⁹¹

A reação entre o 2,4-dimetilpirrol (2,4-dmp) e ácido betalâmico (**HBt**) foi realizada em acetato de etila acidificado com ácido trifluoroacético, adaptando-se o método descrito na literatura para a síntese de BODIPYs⁹² (**Esquema 5c**). O ácido betalâmico foi extraído de suco de beterraba hidrolisado conforme metodologia descrita por Schliemann e coautores⁷⁹ e otimizada no nosso grupo⁸³. Esse método baseia-se na concorrência entre a formação de novas betalaínas e o particionamento do ácido betalâmico protonado entre água e acetato de etila sendo, portanto, intrinsicamente pouco eficiente, *i.e.* até 20 mg de **HBt** por litro de suco. Acetato de etila foi usado no lugar de diclorometano, evitando o uso de solvente clorado e a troca do solvente no qual o **HBt** foi extraído do suco de beterraba. A reação foi conduzida a temperatura ambiente e protegido de luz, para evitar a degradação do **HBt**. A reação se torna inicialmente vinho e, após 40 minutos, azul (**Esquema 5c**). O produto foi purificado por cromatografia de permeação em gel com

Sephadex LH-20 e caracterizado por HPLC-DAD-HRMS-ESI(+). A reação apresentou um rendimento de 70% após purificação, valor muito mais alto do que o relatado para a semissíntese de betalaínas, que normalmente fica em torno de 20%^{83,85}. Esse resultado pode ser explicado pela irreversibilidade do acoplamento entre o 2,4-dmp e **HBt** ou, eventualmente, pela maior persistência do produto nas condições de purificação, etapa que reduz o rendimento de obtenção de betalaínas convencionais.

Não era esperada a adição de dois equivalentes do pirrol ao **HBt** dada a diminuição da eletrofilicidade do C8 após a entrada da primeira unidade. O composto obtido, chamado de **BeetBlue** dada a sua coloração azul, não é formalmente uma betalaína. Por isso, classificamos derivados betalaínicos de nucleófilos de carbono como *quasibetalaínas*. **BeetBlue** é obtido na forma do tautômero 2-piperideínico, mas sua tautomerização ao pirrol dihidropiridínico correspondente é esperada dada a aromaticidade do pirrol.

Esquema 5. Acoplamento de pirróis com aldeídos. **(a)** Síntese de corantes tipo BODIPY; **(b)** Síntese do BODIPY tioéter vinílico com catalisador de itérbio e **(c)** Semissíntese de **BeetBlue** e aspecto do material após evaporação do solvente.

3.1.1 Caracterização estrutural

A análise cromatográfica do produto azul purificado revelou um pico majoritário com tempo de retenção (t_R) igual a 6,6 min. Análise por espectrometria de massas de alta resolução mostrou que a espécie majoritária apresenta m/z igual a 289,1181, que corresponde ao valor de m/z esperado para o íon $[M+H]^+$ da **BeetBlue** (m/z teórico 289,1183; erro 0,69 ppm; **Figura 3**). A fragmentação deste íon levou a íons com m/z 245,1250 (perda de fragmento 43,9930 u, possível produto de descarboxilação), e m/z 201,1384 (perda de 43,9866 u com relação a m/z 245,1250, compatível com o produto de dupla descarboxilação). Além disso, também foi encontrado m/z 108,0800, compatível com o produto de dupla descarboxilação com perda da porção pirrólica e um fragmento

com m/z 124,0393, que coincide com o valor esperado para a 2-carboxipiridina protonada (**Figura 3**). Este padrão de fragmentação é muito similar ao encontrado para betalainas em nosso grupo, com exceção do fragmento m/z 108,0800. A presença deste fragmento corrobora a formação de ligação C-C, uma vez que não é esperada uma fragmentação desta forma em uma ligação imínica, sendo mais provável a formação do fragmento referente ao **HBt**.

Figura 3 Análise de HPLC-MS de alta resolução com ionização por eletrospray no modo positivo de **BeetBlue**: (A) cromatograma em 254 nm; (B) espectro de massas de alta resolução do pico com $t_R = 6,6$ min e estrutura do íon $[M+H]^+$; (C) distribuição isotópica do pico com m/z 289,1181; (D) espectro de varredura de íons produto após dissociação induzida por colisão (MS/MS) de **BeetBlue** e possíveis estruturas.

Em seguida, **BeetBlue** foi caracterizada por espectrometria de ressonância magnética nuclear através de experimentos de 1H , ^{13}C (**Figura 4**; anexos 7.1 e 7.2), 1H , 1H NOESY (**Figura 5**; anexo 7.3), 1H , ^{13}C HMQC (**Figura 6**; anexo 7.4) e 1H , ^{13}C HMBC (**Figura 7**; anexo 7.5). É importante ressaltar que devido à baixa persistência⁹³ e solubilidade limitada das betalainas em solventes orgânicos polares e D_2O ⁴⁵, há poucos espectros de RMN destes compostos na literatura. Deslocamentos de ^{13}C RMN são ainda

mais escassos, sendo normalmente medidos através das projeções dos espectros de HSQC e HMQC^{94,95}. O único relato de espectro de ^{13}C RMN registrado diretamente refere-se a neobetanina, um derivado piridínico da betanina muito mais estável⁹⁶. Os experimentos com **BeetBlue** foram conduzidos satisfatoriamente em D_2O . Os espectros de ^1H e ^{13}C e respectivas atribuições se encontram na **Figura 4**.

Figura 4 Espectros de ^1H RMN (800 Hz) e ^{13}C RMN (200 Hz) de **BeetBlue** em D_2O a 15 °C. Foram utilizadas a sequência de pulso *zgpr* para o ^1H que presatura o sinal da $\text{H}_2\text{O}/\text{HOD}$ residuais em 4,79 ppm. Para aquisição do espectro de ^{13}C foi usada a sequência de pulso *zgpgsgr.v1.cga*⁹⁷. O espectro de ^{13}C foi aprimorado por apodização do decaimento livre de indução (FID) e atribuído em conjunto com outros experimentos e predição com o auxílio do algoritmo implementado no sistema online nmrdp.

Os sinais do espectro de hidrogênio foram atribuídos com o auxílio dos espectros de betalaínas já existentes na literatura^{61,94} e no grupo^{83,85}, através de espectro predito com o sistema de redes neurais nmrbd e por meio do ^1H , ^1H -NOESY (**Figura 5**). A ausência do sinal de H9 (**Figura 4**), corrobora a formação da ligação C–C, visto que esse sinal corresponde ao H2 do 2,4-dimetilpirrol (2,4-dmp). Além de contribuir para a atribuição dos hidrogênios, o ^1H , ^1H -NOESY também auxiliou na elucidação da estrutura tridimensional da *quasibetalaína*, uma vez que este experimento permite estabelecer correlação entre núcleos fisicamente próximos, até mesmo quando não há ligação entre eles⁹⁸. A atribuição do H7 e do H8 só foi resolvida através das correlações dos sinais de H3a, H3b e H15 com o sinal então atribuído para H8.

A atribuição do espectro de carbono se deu com o auxílio de experimentos de HMQC (**Figura 6**) e HMBC (**Figura 7**). O HMQC é um experimento de correlação heteronuclear a uma ligação, ou seja, detecta o acoplamento de hidrogênios e carbonos diretamente ligados.⁹⁸ Desta forma, todos os carbonos diretamente ligados a hidrogênios de **BeetBlue** puderam ser atribuídos (**Figura 6**). Já o HMBC é um experimento de correlação heteronuclear a longa distância⁹⁸, o que auxiliou na atribuição dos carbonos quaternários da **BeetBlue** (**Figura 7**). O C16 foi atribuído graças à sua correlação com H2, H3a e H3b. Por sua vez, o C6 foi atribuído através da sua correlação com H5 e o C4 devido a sua correlação com H2, H3a, H3b e H8. Por fim, o C9 pode ser atribuído pela correlação com H7, H8 e H15, o C10 pela correlação com H14 e H15 e o C12 através da correlação com H8, H14 e H15. O único carbono que não apresentou nenhuma correlação com hidrogênios foi o C17, que foi atribuído tentativamente a partir do espectro predito (nmrbd.org).

Figura 5 Espectro de ^1H , ^1H -NOESY da amostra **BeetBlue**, obtido em D_2O a $15\text{ }^\circ\text{C}$ empregando-se a sequência de pulsos *noesyegpph* que suprime o sinal de $\text{H}_2\text{O}/\text{HOD}$ residuais⁹⁹.

Figura 6 Espectro de ^1H , ^{13}C -HMQC (800 Hz para ^1H e 200 Hz para ^{13}C) da amostra **BeetBlue**, obtido em D_2O a 15 $^\circ\text{C}$, empregando-se a sequência de pulsos *hmqcgpqf*.

Figura 7 Espectro de ^1H , ^{13}C -HMBC (800 Hz para ^1H e 200 Hz para ^{13}C) da amostra **BeetBlue**, obtido em D_2O a 15 $^\circ\text{C}$ empregando-se a sequência de pulsos *hmbcgpplndqf*. As correlações são apresentadas esquematicamente indicando em azul os acoplamentos a longa distância observados no experimento de HMBC e em vermelho os acoplamentos ^1J inferidos do espectro de HMQC. O hidrogênio em questão é sublinhado e os deslocamentos dos carbonos inferidos para cada um deles estão coloridos em azul.

A comparação dos deslocamentos químicos (δ) e das constantes de acoplamento (J) de **BeetBlue** com outras betalaínas auxilia a sua caracterização estrutural. Um estudo do nosso grupo relacionou o efeito de grupos retiradores e doadores de elétrons sobre o espectro de ^1H RMN de betalaínas semissintéticas derivadas da anilina *para* substituída, chamadas de fenilbetalaínas, ou pBeets.⁸⁴ Estas betalaínas podem ser representadas por duas estruturas de ressonância principais, com carga formal positiva na imina exocíclica ou na imina presente no anel 2-piperideínico (**Esquema 6**, estruturas pBeet I e II, respectivamente). Quando grupos retiradores de elétrons (*e.g.* CN e NO₂) são inseridos no anel benzênico de fenilbetalaína, infere-se que predomina no híbrido de ressonância a forma canônica com maior densidade positiva no nitrogênio do anel 2-piperideínico.⁸⁴ Os espectros de ^1H RMN destas betalaínas com grupos elétron-retiradores são caracterizados por uma boa resolução espectral e sinal para o H2 com δ de 4,5 ppm na forma de um duplo dubleto. Já na presença de grupos doadores de elétrons (*e.g.* OH e OMe), observa-se um espectro com sinais menos resolvidos, com H2 como um aparente tripleto largo com δ igual a 4,3 ppm. Estes resultados foram racionalizados considerando-se que o híbrido de ressonância pode ser melhor representado considerando-se uma maior contribuição da estrutura de ressonância com densidade positiva mais localizada na imina exocíclica.⁸⁴

BeetBlue também pode ser representada por duas estruturas de ressonância principais (**Esquema 6**). O espectro de ^1H RMN da **BeetBlue** é bem resolvido, com o sinal de H2 sendo apresentado como um duplo dubleto com δ igual a 4,43 ppm. Estes dados sugerem que o híbrido de ressonância da *quasibetalaína* deve apresentar uma maior densidade positiva no nitrogênio do anel 2-piperideínico, mantendo a aromaticidade do pirrol, e que o grupo pirrol não atua como forte doador de densidade eletrônica, uma inferência talvez pouco intuitiva. A constante de acoplamento 3J entre H7 e H8 da

BeetBlue é 15,2 Hz, sendo compatível com valores de acoplamento de hidrogênios insaturados na configuração *trans* (14 – 16 Hz), enquanto para todas as betalainas descritas na literatura o valor de $^3J_{7,8}$ está entre 11 e 12 Hz.⁹⁰

Esquema 6 Estruturas e híbrido de ressonância de (a) fenilbetalainas (pBeets) e (b) **BeetBlue**.

Para aprofundar a análise dos dados de RMN da **BeetBlue**, foram calculadas as energias de Gibbs de quatro confôrmeros possíveis através de cálculos de otimização e frequência empregando-se a Teoria do Funcional de Densidade (DFT). A **Figura 8a** mostra que o confômero sugerido após análise dos dados de RMN, confômero A, tem a mudança conformação da sua porção 2,6-dicarboxi-2-piperideínica de carboxi equatorial para carboxi axial marcada por uma variação de energia muito menor do que a resolução possível com o método teórico empregado (*ca.* 1,0 kcal mol⁻¹; 4,18 kJ mol⁻¹). Contudo, a mudança da conformação das ligações C4–C7 e/ou C8–C9 levam a confôrmeros menos estáveis. Apesar disso, a diferença de energia de *ca.* 12 kJ mol⁻¹ é compatível com as variações de energia determinadas para mudanças conformacionais de alcanos, *e.g.*, da

forma alternada para eclipsada do etano. Este resultado sugere que o sistema diazapolimetínico da **BeetBlue** não é tão conjugado como sugerem as estruturas de ressonância do **Esquema 6**, possivelmente pela disposição dos nitrogênios na estrutura (em contraste com outros sistemas diazapolimetínicos como as indocianinas, por exemplo). A hipótese de comprometimento parcial da conjugação é corroborada pela análise da superfície do orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO, **Figura 8b**). Observa-se um nó no C8 comprometendo a disposição do sistema π que seria representado (salvo limitações no modelo de Lewis) como a estrutura de ressonância I da **BeetBlue** no **Esquema 6**. A análise do orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO), mostra que a **BeetBlue** tem os mesmos três sítios para ataque nucleofílico que as betalaínas, possivelmente dado o efeito da porção sacadora de elétrons (*electron sink*) 2-piperideínica protonada (**Figura 8b**). Finalmente, cálculos de deslocamento químico a partir do confômero A da **BeetBlue** foram realizados e se correlacionam razoavelmente bem ($\text{Adj-R}^2 = 0,992$) com os dados experimentais, corroborando a estrutura proposta (**Figura 8c**).

Figura 8. Efeitos conformacionais sobre as propriedades eletrônicas da BeetBlue. (a) Energia relativa de quatro conformeros da **BeetBlue** e fórmula estrutural numerada para referência. Geometrias otimizadas no nível SMD(H₂O)/B3LYP/6-31+G(d,p). Proporções das espécies calculadas considerando a distribuição de Boltzmann. (b) Orbitais de fronteira do conformero A; são indicados os carbonos mais susceptíveis a ataque nucleofílico. Valor de contorno igual a 0.04. (c) Correlação entre os valores de deslocamento químico de ¹H medidos experimentalmente para o conformero A e os calculados com o método GIAO/SMD(H₂O)/WP04/6-311+G(2d,p)¹⁰⁰ não escalado e com blindagem de referência igual a 31.8821 ppm.

O dados de RMN da **BeetBlue** foram comparados com aqueles relatados para duas betalaínas naturais, **betanina (Bn)**⁹⁴ e **indicaxantina (BtP)**⁹⁵ (Tabela 1). Os hidrogênios de maior relevância no sistema 1,7-diazapolimetínico das betalaínas são os H5, H7 e H8. Observa-se que estes átomos apresentam alterações pronunciadas em seus deslocamentos químicos ao compararmos **BeetBlue** com as duas betalaínas naturais. Enquanto o H7 e o H5 estão mais desblindados em **BeetBlue**, o H8 encontra-se mais blindado. Tanto a **Bn**

quanto a **BtP** são sais de imínio nos quais há uma carga formal positiva localizada no átomo de nitrogênio aldimínico. Independente do grau de deslocalização desta carga, o H8 diretamente ligado ao carbono carbonílico deve estar mais desblindado em betalaínas do que na **BeetBlue**, cuja densidade de carga positiva no carbono alfa (C9) é muito menor e está distante do nitrogênio 2-piperideínico.

Desta forma, foi possível confirmar a formação de uma ligação C–C entre o ácido betalâmico e o 2,4-dmp. O composto resultante, **BeetBlue**, é o primeiro exemplo de uma nova classe de derivados de betalaína, as *quasibetalaínas*. Os dados espectroscópicos e teóricos sugerem que **BeetBlue** tem distribuição de carga diferente de betalaínas naturais modelo. Embora a deslocalização de carga entre os nitrogênios do sistema diazapolimetínico seja provavelmente maior do que a observada em betacianinas (betalaínas vermelhas), a posição relativa dos átomos de nitrogênio compromete a transferência de carga quando comparada a indocianinas análogas com nove carbonos metilênicos, *e.g.*, indocianina verde, que apresentam máximo de absorção em 800 nm (**Esquema 7**)¹⁰¹.

Tabela 1 Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos: ^1H -RMN (800 Hz) e ^{13}C -RMN (200 Hz) de **BeetBlue** em D_2O a 15 °C; ^1H -RMN (600 Hz) e ^{13}C -RMN (150 Hz) de **Betanina (Bn)** em D_2O a 25 °C; ^1H -RMN (500 Hz) e ^{13}C -RMN (125 Hz) de **Indicaxantina (BtP)** em 0,01% TFA $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ 1:4 a 25 °C (s: singleto, d: dubleto, dd: duplo dubleto, t: tripleto; m: multipletto; br: largo; *sinais sobrepostos).

Estrutura	Posição	δ_{H} (ppm)			δ_{C} (ppm)		
		BeetBlue	Bn ⁹⁴	BtP ⁹⁵	BeetBlue	Bn ⁹⁴	BtP ⁹⁵
2	4,43 (dd, $J_{2,3a} = 6,7$ Hz, $J_{2,3b} = 8,4$ Hz)	4,29 (br t; $J = 7,3$ Hz)	4,43 (dd; $J = 6,5$ Hz)	56,95	54,3	52,5
	3	(a) 3,37 (dd, $J_{3a,3b} = 17,7$ Hz, $J_{3a,2} = 6,7$ Hz) (b) 3,16 (dd, $J_{3b,3a} = 17,7$ Hz, $J_{3b,2} = 8,4$ Hz)	(a) 3,26 (br m) (b) 3,16 (br m)	(a) 3,28* (b) 3,04*	29,82	27,5	26,4
	5	6,46 (s)	6,21 (br s)	6,10 (s)	117,25	105,2	103,6
	6	-	-	-	164,87	-	152,9
	7	6,64 (d, $J_{7,8} = 15,1$ Hz)	5,82 (br d, $J = 12,2$ Hz)	5,76 (d, $J = 12,3$ Hz)	119,96	106,2	107,4
	8	7,51 (d, $J_{8,7} = 15,1$ Hz)	8,19 (br d, $J = 11,4$ Hz)	8,29 (d; $J = 12,3$ Hz)	135,25	144,0	156,2

Esquema 7. Estrutura da indocianina verde (ICG) e da **BeetBlue**. É apresentado o isômero da ICG mais parecido com a estrutura da **BeetBlue** proposta após análise dos experimentos de RMN, não o mais estável. Observa-se que os carbonos dos grupos imínio e enamina estão "protegidos" da hidrólise pela presença de duas metilas ligadas a cada carbono α . Além disso, equilíbrios de protonação são pouco relevantes para a ICG seja no estado fundamental ou excitado.

3.2 Propriedades fotofísicas e redox

3.2.1 Absorção e fluorescência no estado estacionário e voltametria cíclica

Foram realizadas medidas espectroscópicas em estado estacionário para caracterizar o comportamento fotofísico geral da **BeetBlue** em solução. Inicialmente, foram adquiridos espectros de absorção na região UV-Vis, de excitação e de emissão de fluorescência da **BeetBlue** em meio aquoso (**Figura 9**). Com estes espectros, foram calculados o deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$, diferença entre o máximo de emissão (λ_f) e o máximo de absorção (λ^{abs}), em cm^{-1}) e a energia singlete (E_S ; comprimento de onda no qual ocorre a intersecção entre os espectros de absorção e fluorescência e que, portanto, representa a energia da transição 0,0 entre o S_0 e o S_1)¹⁰². O coeficiente de absorção molar (ϵ) e o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) de **BeetBlue** também foram calculados a partir de, respectivamente, experimentos de ponto final e medidas com padrão secundário, conforme discutido mais adiante neste tópico (**Figura 10**). Foi registrado também o perfil de voltametria cíclica da **BeetBlue** em água para determinar seu potencial anódico, valor relevante para o estudo da sua oxidação em solução. A **Tabela 2** compila os resultados obtidos para **BeetBlue** e os relatados na literatura para as betalainas naturais **Bn** e **BtP** para comparação. Detalhamentos são apresentados a seguir.

Figura 9 Espectros de absorção, emissão ($\lambda_{Ex} = 570$ nm) e excitação ($\lambda_{Em} = 620$ nm) não corrigidos de **BeetBlue** em H_2O , a 25 °C.

Figura 10. Caracterização das propriedades fotofísicas e redox de **BeetBlue**. **(a)** Estrutura dos compostos. **(b)** Espectros de absorção e emissão de **BeetBlue**, **Betanina (Bn)** e **Indicaxantina (BtP)** em H₂O, a 25 °C. **(c)** Monitoramento do decaimento de **HbT** e surgimento da banda de **BeetBlue** em 582 nm em água. **(d)** Gráfico da correlação entre a área sob a curva de emissão de fluorescência e a absorção de **BeetBlue** em água em relação ao padrão de violeta de cresila em etanol. **(e)** Voltametria cíclica em KCl 0,1 mol L⁻¹ na ausência (linha pontilhada) e na presença (linhas preta e cinza) de **BeetBlue** ($8,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referência: Ag/AgCl; contra-eletrodo: platina; intervalo de varredura: 0,3 a 0,85 V vs. Ag/AgCl; velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

Tabela 2 Valores de máximo de absorção (λ^{abs}), coeficiente de atenuação molar (ϵ), máximo de emissão (λ_f), rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{FI}), deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$), energia singlete (E_s) e potencial de pico anódico (E_{pa} , em mV, contra eletrodo de referência Ag|AgCl₁) para a *quasi*betalaina (azul) **BeetBlue** e as duas betalainas naturais (vermelho) **Betanina (Bn)** e **Indicaxantina (BtP)**

	λ^{abs} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_f (nm)	$\phi_{FI} (\pm\sigma) \times 10^{-2}$	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	E_s (kJ mol ⁻¹)	E_{pa} (mV)	Ref
BeetBlue	582	54.000	623	0,06 ± 0,01	1101	197	632, 762	<i>este trabalho</i>
Bn	536	65.000	620	< 0,01	1990	211	404, 616, 998	25,45,103
BtP	486	48.000	520	0,46 ± 0,02	1388	238	611, 895	25,45,103

Determinar a concentração de **BeetBlue** é importante para a realização de todos os experimentos descritos nesta Tese. Entretanto, assim como as betalaínas, a **BeetBlue** é higroscópica e foi obtida em quantidades mínimas (escala de 1-10 mg), o que torna a sua pesagem precisa muito difícil. Além disso, **BeetBlue** é, em praticamente toda a faixa de pH em condições aquosas, um sal cujos contra íons são difíceis de serem identificados com precisão. Portanto, o ϵ da *quasibetalaína* não pôde ser calculado através de medidas de absorção de soluções com concentrações conhecidas. O cálculo do ϵ das betalaínas semissintetizadas é feito empregando-se uma metodologia de ponto final (*endpoint*)¹⁰⁴, que se baseia na hidrólise completa da betalaína em meio alcalino com a formação estequiométrica de **HBt** (cujo ϵ em água é conhecido, $\epsilon_{424\text{nm}} = 26.270 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁰⁵. Esta metodologia também não pode ser aplicada com a **BeetBlue** uma vez que esta *quasibetalaína* não se hidrolisa produzindo **HBt**. Desta forma, acompanhou-se a formação de **BeetBlue** a partir do acoplamento de **HBt** com 2,4-dmp em meio aquoso acidificado com TFA. A presença do ponto isobéstico no perfil cinético e o fato das constantes de formação (**BeetBlue**) e de decaimento (**HBt**) encontradas serem praticamente iguais (*ca.* $5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, **anexo 7.6** e **Figura 10c**), corrobora a hipótese de que o acoplamento entre **HBt** e 2,4-dmp gera apenas **BeetBlue** (estequiometria 1:1), permitindo relacionar o ϵ do ácido betalâmico, que é conhecido, como o da **BeetBlue** que se pretende determinar. O ϵ encontrado para **BeetBlue** foi de $54.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor compatível com os relatados para **Bn** e **BtP**, $65.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $48.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente (**Tabela 2**).

Em seguida, as propriedades de absorção e emissão de betalaínas e *quasibetalaína* foram comparadas. O λ^{abs} e o λ_{f} da *quasibetalaína* em água são deslocados para o vermelho (menor energia) e o valor de E_s obtido é menor quando comparados aos valores relatados para betalaínas dada a extensão da conjugação (**Figura 10b** e **Tabela 2**). O deslocamento de Stokes da **BeetBlue** é menor comparado aos valores relatados para **BtP**

e **Bn** representando uma diferença de $3,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $10,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente. Este resultado sugere que as ligações químicas do sistema π da **BeetBlue** diferem daqueles de betalaínas, podendo conferir maior rigidez estrutural ao estado eletronicamente excitado da **BeetBlue** em comparação a betalaínas naturais.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) da **BeetBlue** foi calculado empregando-se como padrão secundário violeta de cresila em etanol ($\Phi_{\text{Fl}} = 0,56$)³⁸ dada a similaridade dos perfis de absorção e emissão do padrão e da amostra. Utilizou-se uma metodologia na qual o rendimento quântico da amostra é calculado a partir da razão entre os índices de refração do solvente do padrão secundário e da amostra e a razão entre os coeficientes angulares calculados a partir das retas obtidas entre a área sob as curvas de emissão e as absorções das soluções do padrão e da amostra (**Figura 10d**, vide *item 5.2.4.3*). A absorção das amostras foi mantida abaixo de 0,1 para evitar efeitos de reabsorção.¹⁰⁶ O Φ_{Fl} da **BeetBlue** é $(6,24 \pm 0,1) \times 10^{-4}$, que está de acordo com os valores encontrados para betalaínas tanto naturais quanto semissintéticas que desativam seus estados excitados principalmente por vias não-radiativas⁴⁵.

A medida dos potenciais redox da **BeetBlue** é necessária para o estudo de processos de transferência de elétron no estado fundamental, bem como no estado eletronicamente excitado. A voltametria cíclica de **BeetBlue** em $\text{KCl}_{(\text{aq})} 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi realizada sobre eletrodo de carbono vítreo.^{83,85} Todos os processos observados são irreversíveis e os potenciais são relatados em mV vs. Ag/AgCl. Considerando o primeiro ciclo voltamétrico (linha preta), observam-se dois valores de potencial de pico anódico ($E_{\text{p,a}}$): 632 mV e 762 mV, sendo o primeiro um pico bem definido e o segundo menos definido (**Figura 10e**). Ensaaios, em condições semelhantes às empregadas, descritos na literatura revelam valores de potencial de pico de duas betalaínas naturais (**Tabela 2**): betanina (404 mV, 616 mV e 998 mV) e indicaxantina (611 mV e 895 mV).²⁵ Os valores

de $E_{p,a}$ encontrados para **BeetBlue** estão próximos da faixa para as betalainas naturais descritas, podendo-se inferir que o potencial encontrado está relacionado à porção betalâmica do composto. O baixo $E_{p,a}$ encontrado para as três moléculas (*ca.* 600 mV *vs.* Ag/AgCl) indica que estas são bastante susceptíveis a oxidação. Para referência, fenóis tem potencial de pico anódico nas mesmas condições ao redor de 800 mV *vs.* Ag/AgCl. Durante o experimento, pôde-se notar que o produto de oxidação de **BeetBlue** adsorvia no eletrodo, efeito visto através da diminuição da corrente dos voltamogramas após o primeiro ciclo (**Figura 10**). Este efeito acontece comumente com betalainas^{83,85,105} e, por isso, todas as medidas são seguidas de limpeza exaustiva do eletrodo de trabalho e medida controle do perfil voltamétrico de uma solução de ferricianeto de potássio.

Em resumo, a banda de absorção de **BeetBlue** é deslocada para comprimentos de onda mais longos quando comparada a betalainas modelo, conferindo a este composto uma coloração violeta-azul. **BeetBlue** é menos fluorescente do que **BtP**, sendo o rendimento quântico e o máximo de emissão indistinguíveis daqueles medidos para **Bn**. Curiosamente, o deslocamento de Stokes da **BeetBlue** é menor do que aquele medido para as betalainas naturais. O potencial de pico anódico, relacionado com a oxidação da **BeetBlue** no estado fundamental é baixo o suficiente para sugerir que este composto seja um bom redutor e que sua oxidação no estado excitado seja ainda mais favorecida. Assim, os motivos para a baixa eficiência de fluorescência da **BeetBlue** podem estar relacionados a desativação vibracional rápida, como sugerido pela ampla liberdade conformacional inferida dos resultados de RMN, pela localização de carga nos estados fundamental e excitado, comprometendo a magnitude do vetor de transição dado o comprometimento da mudança do momento de dipolo, ou por processos redox fotoinduzidos que podem levar a radicais íons e desativação não-radiativa preferencial. O estudo destas questões requer medidas resolvidas no tempo, que são apresentadas a seguir.

3.2.2 Espectroscopia resolvida no tempo

As propriedades fotofísicas da **BeetBlue** também foram investigadas empregando-se absorção e emissão resolvidas no tempo, em colaboração com o grupo do Prof. Jacinto Sá, na Universidade de Uppsala, Suécia. Os experimentos foram realizados durante um estágio de curta duração e completados com alguns resultados obtidos em Uppsala pela doutoranda Caroline de Oliveira Machado.

Espectros de absorção e de emissão transientes resolvidos no tempo foram adquiridos em dois sistemas *pump-probe* independentes, ambos com streak-camera e com largura de pulso a meia altura de ca. 6 ps. Dados de absorção em escala de tempo entre ns – μ s foram obtidos em um sistema de fotólise relâmpago. As superfícies de contorno de absorção e emissão transientes obtidos com a streak-camera são apresentadas na **Figura 11**. Sete espectros de absorção transiente em função do tempo na escala ns – μ s na forma de superfície de contorno e os espectros de estado estacionário com correção para sensibilidade da fotomultiplicadora na excitação e emissão são apresentados para efeito de comparação (**Figura 11**).

Figura 11 Espectroscopia de absorção e emissão de **BeetBlue** em soluções aquosas aeradas. **(a)** Espectros de excitação e emissão corrigidos e de absorção. O espectro de emissão estimulada foi calculado a partir da seção de choque de emissão, $F(\lambda) \times \lambda^4$, conforme descrito na literatura.¹⁰⁷ Os comprimentos de onda de excitação e emissão são 570 nm e 613 nm, respectivamente. **(b)** Superfície de contorno de absorção transiente da **BeetBlue** em água (pH = 5), obtido em sistema *pump-probe* com bombeamento em 540 nm. **(c)** Superfície de contorno da emissão resolvida no tempo com excitação em 545 nm. **(d)** Superfície de contorno de experimento de fotólise relâmpago com excitação em 580 nm. Os espectros de absorção e emissão transientes foram submetidos a tratamento matemático para remoção de artefatos ligados à configuração do sistema ótico.

O experimento de absorção transiente com **BeetBlue** foi realizado em água com bombeamento (*pump*) em 540 nm. As bandas positivas e negativas características da variação da absorção (ΔA) das espécies em solução podem ser observadas (**Figura 12**). A banda positiva, com máximo em 463 nm foi atribuída a absorção da **BeetBlue** em seu primeiro estado singlete, *i.e.*, $S_1 \rightarrow S_n$. Embora a largura do pulso a meia altura seja de *ca.* 6 ps, observa-se no intervalo < 1 ps a mudança do máximo desta transição, bem como da emissão estimulada (SE, banda negativa próxima a 620 nm), para comprimentos de onda mais longos, fato que pode estar relacionado a solvatação da espécie localmente excitada. As duas bandas negativas, uma com máximo em 578 nm e outra em 634 nm, referem-se à recomposição do estado fundamental (branqueamento, *bleaching*) e à emissão

estimulada (SE), respectivamente. Este perfil observado é similar aos dados da literatura para as betalaínas **Bn**, **BtP**, **vulgaxantina-I** e **miraxantina-V**.^{36,37,39,40}

Todos os processos observados tem tempo de vida próximo a 14 ps, valor calculado através do ajuste não linear da variação da absorção em função do tempo com função monoexponencial (**anexo 7.7**). Não há formação de novas bandas de absorção, o que indica que não há processos fotoquímicos ocorrendo nessa escala de tempo (**Figura 12**). O tempo de vida do estado excitado da *quasibetalaína* foi calculado pelo ajuste monoexponencial da emissão em 613 nm em função do tempo (τ igual a 13,7 ps, **Figura 12**), que é próximo com os valores de τ reportados para betalaínas naturais em meio aquoso (**Tabela 3**).^{36,37,39,40,85} O τ de **BeetBlue** só é superior ao reportado para **Bn** (6,8 ps) e **neoBn** (2,3 ps), que também apresentam Φ_{FI} da ordem de 10^{-4} .^{36,108} O maior valor de τ descrito para uma betalaína é o da betalaína semissintética **cBeet151** (110 ps)⁸⁵, sendo este 8 vezes maior do que o de **BeetBlue**.

Os decaimentos encontrados na literatura para betaxantinas em água são descritos por funções biexponenciais, com τ_1 variando de 3,7 a 4,8 ps e τ_2 variando de 22,7 a 37 ps, sendo atribuídos à emissão de isômeros excitados presentes em solução.^{37,39,40} O arranjo experimental usado em Uppsala tem largura de pulso a meia altura de *ca.* de 6 ps, não sendo possível observar com precisão fenômenos mais rápidos. Assim, ou a **BeetBlue** não tem os isômeros análogos ou o decaimento rápido é mais rápido do que o observado nesse experimento. Cabe ressaltar que o deslocamento da banda de absorção da **BeetBlue** excitada poderia estar relacionado à interconversão ultrarrápida de um isômero em outro.

Figura 12 Espectros de absorção e emissão transientes resolvida no tempo de **BeetBlue** em solução aquosa pH = 5. Para referência são apresentados os espectros de absorção no estado estacionário (SS-Abs), emissão no estado estacionário (SS-EM) e o espectro de emissão estimulada¹⁰⁷ (σ-EM). [BeetBlue] = 1×10^{-5} .

As constantes cinéticas radiativas (k_r) e não radiativas (k_{nr}) para a desativação do estado eletronicamente excitado singlete de **BeetBlue** foram calculados a partir dos valores de Φ_{FI} e do tempo de vida do estado excitado (τ) (**Tabela 3**). A k_{nr} de **BeetBlue** é cerca de três ordens de grandeza maior do que a sua k_r , o que significa que a energia proveniente do processo de excitação é dissipada principalmente por processos não radiativos. O valor de k_{nr} de **BeetBlue** é um pouco maior do que o relatado para **miraxantina-V** ($k_{nr} = 6,6 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$)⁴⁰ e menor do que o relatado para **Bn** ($k_{nr} = 1,5 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$)³⁶ e **neoBn** ($k_{nr} = 4,3 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$)¹⁰⁸. Por outro lado, seu valor de k_r é menor do que todos os valores relatados na literatura para betalainas, sendo uma ordem de grandeza menor do que das betaxantinas naturais **miraxantina-V** ($k_r = 2,0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$), **BtP** ($k_r = 2,0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) e **vulgaxantina-I** ($k_r = 2,0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$).^{36,37,39,40,85,108}

Tabela 3 Correlação entre Φ_{FI} , τ_{FI} e as constantes radiativa (k_r) e não radiativa (k_{nr}) de **BeetBlue**.

Entrada	Φ_{FI}	τ (ps)	k_r (s ⁻¹)	k_{nr} (s ⁻¹)	Ref
<p>BeetBlue</p>	$6,0 \times 10^{-4}$	13,7	$4,4 \times 10^7$	$7,3 \times 10^{10}$	<i>este trabalho</i>
<p>Miraxantina-V</p>	$3,0 \times 10^{-3}$	$\tau_1 = 3,7; \tau_2 = 22,7$	$2,0 \times 10^8$	$6,6 \times 10^{10}$	40
<p>Indicaxantina</p>	$5,3 \times 10^{-3}$	$\tau_1 = 4,8; \tau_2 = 27$	$1,9 \times 10^8$	$3,7 \times 10^{10}$	37

<p>Vulgaxantina I</p>	$7,3 \times 10^{-3}$	$\tau_1 = 2,9; \tau_2 = 37$	$2,0 \times 10^8$	$2,5 \times 10^9$	39
<p>Betanina</p>	$7,0 \times 10^{-4}$	$\tau_1 = 0,86; \tau_2 = 6,8$	$1,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^{11}$	36
<p>Neobetanina</p>	$2,0 \times 10^{-4}$	2,3	$8,7 \times 10^7$	$4,3 \times 10^{11}$	108

<p>cBeet120</p>	$6,3 \times 10^{-3}$	38	$1,7 \times 10^8$	$2,6 \times 10^{10}$	85
<p>cBeet151</p>	$2,14 \times 10^{-2}$	110	$1,9 \times 10^8$	$8,9 \times 10^9$	85

$$\tau = 1/k_r + k_{nr}; \Phi_{Fl} = k_r \tau.$$

Sabe-se que betalaínas naturais apresentam uma eficiência quântica extremamente baixa do cruzamento intersistema $S_1 \rightarrow T_1$, sendo observado a formação do estado triplete apenas na presença de fotossensibilizadores triplete, como o $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.^{37,39} Apesar dos da recuperação da **BeetBlue** ocorrer em 14 ps, sugerindo que a desativação do estado S_1 não leva a população de um estado triplete por cruzamento intersistemas, foram realizadas análises de absorção transiente em escala de ns - μs (fotólise relâmpago). Para isto, a *quasi*betalaína foi dissolvida em água aerada e saturada com gás argônio por 1 h (com o objetivo de reduzir a concentração de oxigênio dissolvido) e irradiadas em 580 nm (**Figura 13**). Supreendentemente, em ambos os espectros obtidos, foi possível observar uma banda negativa em 550 nm, referente à recomposição do estado fundamental da **BeetBlue**, e uma banda positiva em 620 nm. Este resultado não pode ser explicado com facilidade, visto que nenhuma espécie com tempo de vida longo foi observada no experimento de absorção transiente com resolução de ps. Uma possível explicação pode estar relacionada a potência do pulso de cada sistema, informação que não estava disponível na ocasião do término desta Tese. O tempo de vida da espécie absorvendo em *ca.* 620 nm foi calculado através do ajuste não linear do decaimento em função do tempo empregando-se uma função monoexponencial (**Figura 13**). Tanto na solução aerada quanto na saturada com argônio os tempos de vida medidos são iguais a 2,6 μs (**anexo 7.8**). Praticamente o mesmo resultado foi obtido com excitação em 540 nm, com tempo de vida de 3 μs (*dados não mostrados*), que poderia ser explicado com a absorção de elétrons solvatados oriundos da ionização da água com dois fótons em regimes de alta potência do laser.^{109,110} De qualquer forma, este tempo de vida é uma ordem de grandeza menor do que aquele medido para a **vulgaxantina-I** (36 μs), seja via KI ou fotossensibilização com $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ³⁹ e o decaimento não foi observado em experimentos com outras betalaínas nas mesmas condições experimentais.

Figura 13 Espectros de absorção transiente resolvidos no tempo de **BeetBlue** em solução aerada e saturada com nitrogênio. [BeetBlue] = $1 \cdot 10^{-5}$; pH = 5.

Em água 25 °C, a constante de difusão de oxigênio é $6,5 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e a concentração de oxigênio em uma solução em contato com ar é $1,27 \text{ mmol L}^{-1}$.¹¹¹ Assim, o limiar de tempo para observação de sequestro do estado excitado por oxigênio molecular é $1,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}$, valor cerca de uma ordem de grandeza menor do o tempo de vida da espécie absorvendo ao redor de 620 nm, *i.e.* $2 \mu\text{s}$. Isso significa que o sequestro de uma espécie triplete poderia, *a priori*, ser observado, visto que requer menos tempo para ocorrer do que o tempo de vida da espécie. Apesar disso, não foi realizado um experimento saturando a solução com oxigênio nem o estudo com fotossensibilizadores triplete, *e.g.*, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, ou em solução de iodeto de potássio para favorecer o cruzamento intersistemas pelo efeito de átomo pesado do iodo³⁹, portanto, a formação de uma espécie triplete que absorva ao redor de 620 nm não pode ser descartada. Como referência, **miraxantina-V** não popula o estado triplete e não forma fotoprodutos quando excitada em 480 nm.⁴⁰ Da mesma forma, considerando o potencial de pico anódico de

600 mV vs. Ag/AgCl e sabendo que este potencial é menor para **BeetBlue** no estado excitado pode-se postular a formação de uma espécie fotooxidada, *e.g.*, um radical cátion, cuja absorção no estado eletronicamente excitado ocorre em *ca.* 620 nm. Experimentos preliminares em colaboração com o Prof. Maurício Baptista sugerem que **BeetBlue** não atua como fotossensibilizador para gerar oxigênio singleto. Contudo, esse resultado pode ser difícil de explicar considerando-se que betanina sequestra oxigênio singleto¹¹² e não se sabe o comportamento da **BeetBlue** na presença de $^1\text{O}_2$.

BeetBlue tem um comportamento fotofísico que apresenta alguma similaridade com betalaínas, sendo pouco fluorescente o que se reflete em um tempo de vida do estado excitado de 14 ps e uma constante cinética para desativação não radiativa na ordem de $7 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$. Este resultado poderia estar relacionado a desativação do estado π , π^* via uma troca para o estado n , π^* associado ao par de elétrons do nitrogênio 2-piperideínico desprotonado ou do nitrogênio seguida por uma intersecção cônica com o estado fundamental.^{40,110} Os dados de absorção transiente na escala de ns a μs não podem inequivocamente diferenciar a formação de um fotoproduto da população do estado tripleto, tampouco está descartado algum artefato experimental, sendo necessário explorar mais profundamente o problema nesta escala de tempo.

3.3 Estabilidade hidrolítica

A persistência de corantes em água é um fator determinante para a sua aplicação em alimentos, cosméticos e outros produtos destinados à utilização animal. Considerando-se a ausência da ligação aldimínica na **BeetBlue**, esperar-se-ia que esta *quasi*betalaína fosse mais estável em meio aquoso comparada às betalaínas. A persistência da **BeetBlue** em água foi monitorada por espectroscopia de absorção UV-Vis a 60 °C por 10 h. A **Figura 14** mostra a diminuição da banda de absorção em 582 nm em função do tempo e, simultaneamente, o surgimento de uma pequena banda próxima a

400 nm. Este decaimento foi ajustado com uma função monoexponencial e permitiu a obtenção do valor de k_{obs} de $1,47 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e, consequentemente, da $t_{1/2}$ de 682 min (11 h).

Figura 14 (a) Cinética de decomposição de **BeetBlue** em água, a 60 °C e (b) monitoramento de decaimento da mesma em 582 nm.

Surpreendentemente, quando comparada a **Bn** e **BtP**, que possuem valores de $t_{1/2}$ de 2 h e 10 h¹¹³, respectivamente, **BeetBlue** não teve maior persistência em água do que a betalaína de maior $t_{1/2}$ (**BtP**). Estes resultados demonstram que a substituição da ligação imínica pela ligação carbono-carbono em **BeetBlue** não lhe confere estabilidade superior a betalaínas. Este resultado pode ser explicado considerando que na sua forma imino-protonada, **BeetBlue** possui três carbonos eletrofilicos (C4, C6 e C8, **Figura 8b**). O ataque da água ao C6 no anel 2-piperideínico sugere abertura do anel, de forma análoga ao que acontece com betalaínas, sendo este equilíbrio uma etapa crítica da biossíntese desses pigmentos naturais. A ocorrência do ataque é favorecida com a protonação do nitrogênio 2-piperideínico que ativa o C6 para o ataque. Desta forma, optou-se por determinar os pK_{as} da **BeetBlue** e investigar o efeito do pH do meio sobre a sua hidrólise.

Apesar de parecer uma medida simples, determinar o pK_{a} da **BeetBlue** espectrofotometricamente (dada a sua solubilidade inferior a $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em água) envolve contornar a concorrência entre os equilíbrios ácido-base e reações de degradação que se iniciam na escala de tempo de minutos em condições fortemente ácidas ou

alcalinas ($\text{pH} < 2$ ou $\text{pH} > 10$). Os espectros de absorção e emissão de soluções de **BeetBlue** foram adquiridos em tampão Britton-Robinson (universal, borato/fosfato/acetato, $0,4 \text{ mol L}^{-1}$) na faixa de pH entre 2 e 12. As soluções eram preparadas imediatamente antes da medida, mantendo-se a concentração de **BeetBlue** constante, para evitar que a ocorrência de decomposição comprometesse a medida.

Os resultados obtidos por absorção e fluorescência tem perfil similar (**Figura 15**). Os seguintes valores de pK_a foram calculados através de ajuste não linear dos dados empregando-se uma função sigmoide absorção: absorção, $\text{pK}_{a1} = 2,9$ e $\text{pK}_{\text{decomp}} = 9,5$; fluorescência: $\text{pK}_{a1} = 2,4$ e $\text{pK}_{\text{decomp}} = 9,8$. O valor em torno de 2,4 pode ser atribuído aos ácidos carboxílicos, que apesar de serem diferentes eles possuem valores de pK_a muito próximos, sendo difícil diferenciá-los.^{114,115} O valor em torno de 9,8 pode ser atribuído ao pK_a de decomposição da **BeetBlue**, uma vez que o último ponto (pH 12) apresenta absorção e emissão igual a zero nas bandas referentes a *quasibetalaina*. Apesar do experimento não possuir resolução suficiente para se inferir o pK_a da imina presente no anel 2-piperideínico, nota-se uma inflexão sistemática entre o pH 6 e 7 (circulada de azul) tanto no experimento por absorção quanto no experimento por emissão, sugerindo que este valor pode se encontrar nesta faixa.

Figura 15 Titulação de **BeetBlue** com Tampão Britton-Robinson (pH 2 a 12), a 25 °C: **(a)** espectro de absorção de **BeetBlue** em diferentes pHs; **(b)** gráfico de máximo de absorção em 580 nm versus pH; **(c)** espectro de **BeetBlue** em diferentes pHs; **(d)** gráfico de máximo de emissão em 620 nm versus pH.

Após a determinação dos pK_a s, seguiu-se com a investigação a estabilidade de **BeetBlue** em diferentes pHs (pH 2 – 10), através de cinéticas realizadas a 60 °C. Este experimento foi realizado em dois meios diferentes: tampão Britton-Robinson e tampão fosfato. Ambos apresentaram resultados estatisticamente iguais e, portanto, será apresentado apenas os resultados obtidos com tampão fosfato, uma vez os dados reportados na literatura para **Bn** e **BtP** foram realizados neste meio^{61,113}. Apesar do fosfato não ser capaz de tamponar em toda a faixa de pH estudada ($pK_{a1} = 2,1$, $pK_{a2} = 7,2$ e $pK_{a3} = 12,1$), este sistema já foi usado neste tipo de estudo e o pH¹¹⁶, medido a 25 °C antes e após cada experimento, não se alterou. Após a obtenção do perfil cinético, os valores de λ^{abs} de **BeetBlue** em cada pH foram medidos e colocados em função do tempo (**anexos 7.9 e 7.10**). Os valores obtidos de k_{obs} e da $t_{1/2}$ podem ser encontrados na **Figura 16**.

Figura 16 Dependência do valor de $\log k_{obs}$ com o pH do meio para **BeetBlue** e **Bn** à 60 °C em tampão Fosfato e valor de $\log k_{obs}$ para **BeetBlue** em água representado pela linha tracejada. Tempo de vida ($t_{1/2}$) e constante de decaimento observada (k_{obs}) de **BeetBlue** em função do pH, com tampão fosfato 10 mM, a 60 °C.

Observou-se que, independente do pH, a decomposição de **BeetBlue** se deu mais rapidamente em tampão fosfato do que em água deionizada, sugerindo a interferência do componente do tampão na degradação da *quasibetalaina*. De maneira geral, pode-se observar que em pHs entre 4 e 7, a $t_{1/2}$ tende a ser maior do que em meios mais ácidos ou mais básicos. Este perfil pode ser melhor observado na **Figura 16**, onde nota-se uma concavidade para cima, com o mínimo em pH 4. Este perfil já foi observado e estudado no nosso grupo de pesquisa com **BtP** e **Bn** ^{61,113}, onde se relata a ocorrência de catálise ácida na região de pH entre 2 e 4 e catálise básica na região de pH entre 8 e 11 separadas por uma faixa de pH independente entre 5 e 7 (**Figura 16**). No caso da **Bn**, os produtos de degradação formados em tampão fosfato pH 2 e 9 são os mesmos, apesar da diferença em suas constantes de formação, sendo eles ácido betalâmico, ciclo-DOPA e seus respectivos produtos de oxidação e descarboxilação. A comparação entre as curvas (**Figura 16**) sugere que **BeetBlue** é mais estável do que **Bn** em pH 2 a pH 5. As curvas se cruzam em pH 6 e em pHs alcalinos a **BeetBlue** é mais instável. Quando comparada a **BtP**, a *quasibetalaina* é mais estável somente entre pH 2 e 3.

O perfil encontrado para a curva de pH *versus* $\log k_{\text{obs}}$ indica que **BeetBlue** está sofrendo catálise ácida e básica. Desta forma, para avaliar uma possível catálise mediada pelos sais na reação de hidrólise, as concentrações de tampão fosfato (pH = 6,2) e acetato (pH = 5,8) foram alteradas e as cinéticas de degradação monitoradas. O gráfico de k_{obs} *versus* a concentração do tampão em pH constante é capaz de indicar a ocorrência ou não de catálise geral ou nucleofílica: obtenção de uma reta crescente ou decrescente indica a ocorrência de catálise geral ou nucleofílica, enquanto a obtenção de uma reta horizontal indica a não ocorrência de catálise.¹¹⁷ Os espectros de absorção em função do tempo e os decaimentos no λ^{abs} de **BeetBlue** nestas condições podem ser encontrados nos **anexos 7.11 a 7.14**. Observa-se nos dois casos que quanto maior a concentração do sal, maior é a constante k_{obs} e, conseqüentemente, menor é o tempo de meia vida ($t_{1/2}$). Tal fato fica ainda mais evidente quando construímos um gráfico das constantes k_{obs} *versus* a concentração do tampão (**Figura 17**), onde observa-se uma correlação linear crescente entre esses dois parâmetros, evidenciando a ocorrência de catálise básica geral ou catálise nucleofílica como a via de decomposição da **BeetBlue**. O efeito do tampão fosfato sobre a hidrólise de **BeetBlue** se mostrou maior do que o do tampão acetato, sendo a constante k_{obs} do primeiro aproximadamente 2,5 vezes maior do que a do segundo em quase todas as concentrações.

Figura 17 Correlação entre os valores de k_{obs} obtidos através do monitoramento do decaimento de **BeetBlue** em tampão fosfato e acetato e a concentração do tampão.

Posteriormente, com o intuito de investigar a ocorrência de catálise básica geral ou catálise nucleofílica pelos tampões estudados, cinéticas em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ e tampão acetato 100 mmol L⁻¹ foram acompanhadas por HPLC-DAD-HRMS-ESI(+). Em ambos os ensaios, nota-se inicialmente a presença de apenas um pico cromatográfico com tempo de retenção 9,2 min e m/z 289, correspondente à **BeetBlue** protonada. Com o decorrer do tempo, observa-se a diminuição de sua intensidade e o surgimento de dois produtos: um aos 9,7 min com m/z 287 e 243 e outro aos 10,3 min com m/z 275 e 259 (**Figura 18** e **Figura 19**). Uma vez que os produtos observados são semelhantes para os dois tampões utilizados, confirma-se a ocorrência de catálise básica geral. As m/z 287 e 243 podem ser atribuídas à **neoBeetBlue** e ao seu produto de descarboxilação (-44 u), respectivamente. O fato de estas m/z encontrarem-se em um mesmo pico cromatográfico indica que a descarboxilação da **neoBeetBlue** é um artefato analítico, ocorrido no interior do espectrômetro de massas. Caso a descarboxilação ocorra no meio reacional, a polaridade do composto formado é suficientemente alterada para que ocorra separação cromatográfica, de maneira que um pico com tempo de retenção diferente seria observado. Já para as m/z 275 e 259 encontradas no tempo de retenção 10,3 min, não foi

possível propor estruturas. As diferenças de m/z entre a **BeetBlue** e os possíveis produtos revelam perdas inespecíficas de 14 e 28 u, que são de difícil atribuição.

Figura 18 Análise de HPLC-MS de alta resolução com ionização por eletrospray no modo positivo de **BeetBlue** em Tampão Fosfato 100 mmol L⁻¹ com a amostra sendo aquecida a 60 °C: **(a)** cromatogramas obtidos a cada 30 minutos durante 210 min; **(b)** monitoramento do decaimento da área dos picos correspondentes às massas encontradas; **(c)** espectro de massas de alta resolução do pico com $t_R = 9,2$ min; **(d)** espectro de massas de alta resolução do pico com $t_R = 9,7$ min; **(e)** espectro de massas de alta resolução do pico com $t_R = 10,3$ min.

Figura 19 Análise de HPLC-MS de alta resolução com ionização por eletrospray no modo positivo de **BeetBlue** em Tampão Acetato 100 mmol L⁻¹ com a amostra sendo aquecida a 60 °C: **(a)** cromatogramas obtidos a cada 30 minutos durante 480 min; **(b)** monitoramento do decaimento da área dos picos correspondentes às massas encontradas; **(c)** espectro de massas de alta resolução do pico com t_R = 9,2 min; **(d)** espectro de massas de alta resolução do pico com t_R = 9,7 min; **(e)** espectro de massas de alta resolução do pico com t_R = 10,3 min.

Com este conjunto de dados, iniciou-se a interpretação dos resultados. Mesmo com a troca da ligação aldimínica pela ligação C–C ainda há ocorrência de catálise ácida específica e catálise básica geral como via de decomposição. Isto é explicado pelo fato do anel 2-piperideínico também ser suscetível a hidrólise. Esta via de decomposição levaria à abertura deste anel, que já foi reportada como via alternativa para hidrólise de

Bn⁶¹ e para o próprio **HBt**^{20,118}. A **Figura 20** mostra as curvas de especiação aproximadas de **BeetBlue**, **Bn** e **BtP**, obtidas através do programa CurTiPot e dos pK_a s destas moléculas, sem considerar a força iônica do meio, sendo, portanto, aproximadas. Os pK_a s de **Bn** e **BtP** foram retirados da literatura.^{114,115}

Em pH 2 é possível observar que a forma majoritária da *quasibetalaína* é a positivamente carregada (azul), enquanto no tampão fostato teria-se uma mistura das formas H_3PO_4 e $H_2PO_4^-$. Pode-se inferir que nesta faixa ocorra catálise ácida específica (CAE), uma vez que o C6 da **BeetBlue** se encontra com uma alta densidade de carga positiva, estando suscetível ao ataque da água. Conforme há o aumento do pH, aumenta-se também a fração de moléculas de **BeetBlue** com as duas porções carboxílicas desprotonadas (vermelho) o que diminui a densidade negativa de C6, diminuindo, portanto, a suscetibilidade ao ataque da água e justificando o aumento gradativo da estabilidade até pH 4. **Bn** e **BtP** se encontram totalmente protonadas em pH 2 e também é reportado ocorrência de CAE, com a hidrólise tanto na imina exocíclica, quanto a abertura do ciclo.^{61,113} O fato de existirem dois sítios ativados pode justificar a menor estabilidade de ambas quando comparadas com **BeetBlue** nesta faixa.

A partir de pH 5 observa-se o aumento da forma totalmente desprotonada da **BeetBlue** (preto). Nesta forma o C6 encontra-se desativado e era previsto uma maior persistência da *quasibetalaína*, porém o que se observa é o comportamento oposto. Em pH igual a 6, observa-se a presença majoritária do espécime $H_2PO_4^-$ e o início do aparecimento de HPO_4^{2-} , ambos capazes de ativarem a água para o ataque ao C6. Neste caso então infere-se a ocorrência de catálise básica geral (CBG) com participação dos componentes do tampão. Conforme há o aumento do pH, aumenta a fração do espécime HPO_4^{2-} , que é uma base mais forte e, conseqüentemente, também se observa o aumento o k_{obs} da degradação de **BeetBlue**. A partir de pH 9 espera-se o início ocorrência de

catálise básica específica (CBE), com a participação direta do hidróxido na abertura do anel 2-piperideínico.

Em pH 4 e pH 6 ocorre o cruzamento com as curvas de **BtP** e **Bn**, respectivamente, indicando uma maior estabilidade das betalaínas a partir deste ponto. Nesta faixa as betalaínas se encontram negativamente carregadas e é reportada também a ocorrência de CBG.^{61,113} Com a alta densidade de carga negativa presente no anel 2-piperideínico, infere-se que a hidrólise esteja acontecendo na imina exocíclica.^{61,113} Estes dados nos mostram que ao obter uma ligação C–C em busca de evitar a hidrólise da imina exocíclica, acabou-se ativando mais o C6 e provocando a hidrólise via abertura de anel na porção betalâmica do composto, reação esta que se mostrou mais sensível à CBG e à CBE e menos sensível a CAE.

Figura 20 Curva de especiação de H_3PO_4 , **BeetBlue**, **Betanina** e **Indicaxantina**, obtidos através do programa CurTiPot e dos pK_{as} dos compostos.

O produto de hidrólise com abertura do anel 2-piperideínico não foi observado na análise de HPLC-DAD-HRMS-ESI(+), o que pode ser explicado pelo fato de se tratar de um equilíbrio entre a forma cíclica e a forma aberta. Possivelmente, este equilíbrio está deslocado para a forma fechada nas condições analíticas empregadas. Este experimento, porém, mostrou a presença da **neoBeetBlue**, que pode ser formada em meio básico através da oxidação do anel 2-piperideínico (**Esquema 8**).

Esquema 8 Proposta para a oxidação do anel 2-piperideínico de **BeetBlue** e formação de **neoBeetBlue**.

O **Esquema 9** mostra um resumo dos possíveis produtos da decomposição de **BeetBlue**. Assim como as betalainas, **BeetBlue** possui três carbonos eletrofílicos, sendo eles C4, C6 e C8. A hidrólise no C6 leva à abertura do anel 2-piperideínico resultando na **4,5-seco-BeetBlue**, sendo esta podendo ser mediada por catálise ácida específica e catálise básica geral e específica. Ainda pode-se pensar no ataque da água ao C4 e C8, que levaria à hidroxilação destas posições resultando na **4-hidro-BeetBlue** e na **8-hidro-BeetBlue**, respectivamente. Em meio básico também pode ocorrer a oxidação do anel 2-piperideínico, que resulta na formação da **neoBeetBlue**.

Esquema 9. Estrutura da **BeetBlue** e dos produtos de hidrólise, hidratação e oxidação.

3.4 Efeitos de interações intermoleculares sobre a fotofísica de **BeetBlue**

Sabe-se que o meio exerce grande influência sobre as propriedades fotofísicas das betalainas.^{45,85} A caracterização fotofísica e estrutural de **BeetBlue** indica que este composto possui a coloração azul devido ao aumento do sistema conjugado em comparação com betalainas. As constantes k_r e k_{nr} da *quasibetalaina* sugerem que o seu baixo ϕ_{FI} deve ocorrer principalmente pela perda de energia vibracional. Sendo assim, este item apresentará os efeitos de mudança de solvente, polaridade, viscosidade e

diminuição da camada de solvatação de água nas propriedades fotofísicas da *quasibetalaina*, na tentativa de compreender melhor as suas propriedades.

3.4.1 Efeitos de solventes moleculares

A interação de fluoróforos com solventes pode ser descrita em termos dos momentos de dipolo do estado fundamental e excitado, μ_G e μ_E , respectivamente e os campos reativos ao redor destes dipolos.¹¹⁹ Estes campos podem ser divididos naqueles resultantes de alterações na distribuição de carga na molécula e aqueles derivados da reorganização do solvente. Há várias formas de racionalizar estes parâmetros em função das diferenças nas frequências de absorção e de emissão e de alguns parâmetros físico-químicos. Uma aproximação muito utilizada é a equação de Lippert, também conhecida como Lippert-Mataga (**Eq. 1**):

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_E = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon_r - 1}{2\epsilon_r + 1} - \frac{n_D^2 - 1}{2n_D^2 + 1} \right) \frac{(\mu_G - \mu_E)^2}{\alpha^3} + const. \quad \text{Eq. 1}$$

onde, h ($6,6256 \times 10^{-34}$ J s) é a constante de Plank, c ($2,9979 \times 10^{10}$ cm s⁻¹) é a velocidade da luz no vácuo, $\bar{\nu}_A$ e $\bar{\nu}_E$ são os números de onda (cm⁻¹) da absorção e emissão, respectivamente.

No estudo de betalaínas nunca foi possível o uso da equação de Lippert-Mataga visto que estes compostos não são solúveis ou estáveis o suficiente em um número representativo de solventes moleculares. Contudo, **BeetBlue** é solúvel em álcoois leves, 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) e 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP). Observou-se que no caso de metanol (MeOH) e dimetilsulfóxido (DMSO) a solução de **BeetBlue** era amarela, mas se tornava parcialmente rosa com a adição de ácido *para*-toluenossulfônico (**Figura 21**). Com os máximos de absorção e emissão e com o valor de momento de dipolo obtido através de cálculo teórico em nível DFT SMD(H₂O)/B3LYP/6-31+G(d,p)), $\mu_G = 11$ D, tentou-se aplicar a equação de Lippert-Mataga para cálculo do valor de μ_E . Embora

não tenha sido observada uma relação linear (*dados não apresentados*, $\text{Adj-R}^2 = -0,24$), é possível estimar se o efeito do solvente se relaciona com uma mudança no momento de dipolo ou não. O aumento da polaridade do meio resulta em deslocamento batocrômico no espectro de absorção pode sugerir um estado excitado mais polar que o fundamental. O efeito observado não é sistemático e não foi possível relacionar efeitos de solvente com variações na polaridade resultantes da excitação. Como exercício, o uso do coeficiente angular obtido empregando-se a equação de Lippert-Mataga, mesmo não descrevendo um comportamento sistemático, resulta em um valor de μ_E igual a 12 D. Curiosamente, a fluorescência em isopropanol seco é uma ordem de grandeza maior que em água. Fato que pode ser explicado pela eventual presença de água residual nos outros solventes, apesar dos nossos esforços na secagem ou aquisição de solventes secos em frascos *sure-seal*.

Figura 21. Espectros de absorção e emissão corrigidos de **BeetBlue** em solventes moleculares. Os números nos espectros de emissão indicam a escala de intensidade em unidades arbitrárias.

Finalmente, as amostras foram submetidas a medidas de cor com iluminador CIE D75 com ângulo de observador de 2°. Cor é uma questão que associa as propriedades

físicas de um material, como a sua reflectância, com a percepção do observador. Assim, existem diversas formas de relatar cor e de medi-la. Empregando o espaço de cor CIELu'v' foram sistematizados os resultados obtidos com o estudo das soluções de **BeetBlue** em diferentes solventes (**Figura 21**). Em água, a solução se torna mais violeta, sendo que o aumento da acidez do solvente, *e.g.*, TFE, HFIP, ou a adição de ácido deslocam a cor mais para o azul. Em todos os casos, as soluções parecem visualmente violeta-azulado ou diversas tonalidades de azul, fato que pode ser distorcido pela cor do gráfico na **Figura 22**. O aumento da concentração de **BeetBlue** em TFE não resultou na mudança dos comprimentos de onda de absorção, mas levaram a uma mudança na percepção da cor conforme a concentração, *i.e.*, a solução parece mais azul visualmente quando diluída e mais violeta quando concentrada. Estes resultados ajudam a caracterizar adequadamente a cor da **BeetBlue** em solução e fornecem indícios da importância da protonação do nitrogênio 2-piperideínico para a cor azul desta *quasibetalaína*.

Figura 22 Cor da **BeetBlue** em solução com solventes moleculares diversos **(a)** e ampliação da região de interesse **(b)**. Os valores de u' e v' foram adquiridos em um espectrofotômetro Cary 50 Bio com o programa Color com parâmetro de iluminador CIE D75 e ângulo de observador 2° . A concentração de **BeetBlue** foi mantida constante em todos os experimentos e é igual a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.4.2 Interação de BeetBlue com lantanídeos

O resultado obtido com solventes mais básicos poderia ser explicado considerando que a desprotonação da **BeetBlue** compromete a conjugação do sistema diazapolimetínico e desloca a banda de absorção para comprimentos de onda mais curtos,

tornando-a amarela. Contudo, o dado de pH assumindo que o pK_{aH} do anel 2-piperideínico esteja ao redor de 7 sugere que se esta hipótese estiver correta a água deve desempenhar um papel fundamental para manter a deslocalização ou algum outro fenômeno que preserve a cor azul. Desta forma, considerando-se que o complexo betanina- Eu^{3+} , previamente utilizado para quantificação de esporos de *Bacillus anthracis*¹²⁰, é amarelo decidiu-se investigar como lantanídeos afetariam a absorção da **BeetBlue**, visto que Eu^{3+} se ligou ao sistema 2,6-dicarboxi-2-piperideínico da betanina estabelecendo uma ligação coordenada com o nitrogênio do anel, que está desprotonado.¹²⁰

A interação de **BeetBlue** com Dy^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+} , Ho^{3+} , Pr^{3+} e Yb^{3+} foi investigada empregando-se o método das variações contínuas, ou método de Job, que permite o estudo da variação da absorção e a determinação da estequiometria dos complexos formados. Embora tenha limitações^{121,122}, o método é simples e consiste na construção de um gráfico da medida da concentração do complexo (*e.g.* absorção) *versus* a fração molar de um dos reagentes, enquanto a soma das concentrações dos reagentes é mantida constante.^{122,123}

Os espectros de absorbância obtidos mostram que com o aumento da fração molar dos lantanídeos ocorre a diminuição da absorbância da solução, provocada tanto pela formação do complexo quanto pela diminuição da concentração de **BeetBlue** (**Figura 23**). Portanto, para a construção do gráfico de Job, foi necessário corrigir a absorbância (vide *item 5.3.1.2*), considerando apenas a influência dos lantanídeos sobre a absorção da **BeetBlue** (absorbância do complexo). O máximo da parábola (**Figura 24**) da maioria dos complexos estudados ficou mais próxima a 0,5, indicando que a estequiometria dos complexos é 1:1. O único caso em que isto não foi observado foi com Nd^{3+} , onde o máximo da parábola ficou mais próximo de 0,33, indicando uma estequiometria 2:1.

Figura 23 Espectro de absorção dos complexos de **BeetBlue** com Dy^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+} , Ho^{3+} , Pr^{3+} e Yb^{3+} , variando a razão entre as concentrações dos compostos. $[\text{BeetBlue}] = 15 - 1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. $[\text{Lantanídeos}] = 1,5 - 15 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 24 Gráfico de Job para os complexos de **BeetBlue** com Dy^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+} , Ho^{3+} , Pr^{3+} e Yb^{3+} .

O gráfico de Job só permite inferir a estequiometria média do complexo, não dando nenhuma informação sobre a natureza dos sítios ligantes. O ácido 2,6-dipicolínico (DPA) forma complexos estáveis com lantanídeos^{124,125}. Como representado na **Figura 25**, observa-se que o complexo envolve a participação do nitrogênio (comprimento da ligação Ln–N, 267 pm).¹²⁶ Uma vez que o anel presente em **BeetBlue** possui grande semelhança estrutural com o DPA, espera-se que o complexo de lantanídeos com a *quasibetalaína* também possua uma estrutura semelhante. No caso de **BeetBlue**, para ocorrer a participação do nitrogênio do anel 2-piperideínico da *quasibetalaína* na formação do complexo seria necessário a perda do próton. A ligação Ln–N é mais longa do que no complexo com DPA, devido à não aromaticidade do anel de **BeetBlue**, resultando em uma densidade positiva baixa neste nitrogênio. Cálculos teóricos com um complexo de Ln^{3+} indicam uma distância similar, de 270 pm. O deslocamento hipsocrômico do complexo **BeetBlue**-lantanídeo comparado à *quasibetalaína* livre, de 582 nm para aproximadamente 450 nm, não pode ser explicado pela desprotonação e diminuição da transferência de carga entre os átomos de nitrogênio da **BeetBlue**. Contudo, os átomos mais eletronegativos da **BeetBlue** estão no anel 2,6-dicarboxi-2-piperideínico; portanto, o vetor momento de dipolo se orienta com a seta indicando densidade negativa na direção do anel. No complexo com Ln^{3+} , a densidade positiva se localiza na porção 2-piperideínica ligada ao lantanídeo e o vetor tem sua direção invertida. A protonação da porção carboxilato causa uma grande redução do momento de dipolo, de 38 D para 11 D, mantendo a direção do vetor (**Figura 25**). A deslocalização da carga positiva em betalaínas e **BeetBlue** aumenta a densidade de carga positiva na porção pirrol da **BeetBlue** ou aldimínica nas betalaínas. Contudo, os ácidos carboxílicos na porção piperideínica destes compostos favorecem que o vetor momento de dipolo aponte na direção do anel dado o efeito indutivo. Estes dois efeitos combinados, aliados ao efeito

de substituintes sobre as cargas formais, definem a direção e magnitude do vetor momento de dipolo, que influenciam a energia os orbitais envolvidos nas transições eletrônicas e, consequentemente, na absorção/cor das substâncias. A relação entre os resultados obtidos com lantanídeos e com solventes moleculares é complexa e pode envolver efeitos como agregação e solvatação preferencial. Embora esta Tese não apresente uma explicação clara para a mudança de cor ela está, de alguma forma, relacionada com o efeito da complexação sobre a distribuição de carga na **BeetBlue**.

Figura 25 Complexo lantanídeo (La) – ácido 2,6-dipicolínico com estequiometria 1:1 destacado no quadro pontilhado e formação do complexo de **BeetBlue** com lantanídeos (Ln) com provável estrutura do complexo com estequiometria 1:1. Estruturas e setas de vetor momento de dipolo ($\delta^+ \rightarrow \delta^-$) e sua magnitude calculados em nível SMD(H₂O)/B3LYP/LANL2DZ com **BeetBlue** totalmente protonada, com as porções carboxílicas desprotonadas e com um átomo de Ln ligado ao sistema 2,6-dicarboxi-2-piperideínico desprotonado sem ligantes adicionais, perfazendo um cátion com carga +1.

3.4.3 Efeito da viscosidade do solvente

A polaridade e a viscosidade do solvente influenciam o rendimento quântico, pois afetam a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado dada a estabilização diferencial do estado fundamental e excitado da espécie.¹¹⁹ Contudo, é difícil separar esses efeitos. O aumento da viscosidade do meio restringe o grau de liberdade vibracional e rotacional do estado excitado e, conseqüentemente, aumenta o ϕ_{FI} . Como nossos dados fotofísicos sugerem que em **BeetBlue** seu baixo ϕ_{FI} é devido à grande perda de energia vibracional no estado excitado, decidiu-se realizar um estudo a fim de avaliar o aumento da viscosidade do meio no ϕ_{FI} da *quasibetalaina*. Porém, quando há uma mudança na viscosidade do meio, normalmente há também uma mudança paralela da polaridade, sendo difícil avaliar qual parâmetro está ocasionando o possível efeito no ϕ_{FI} . Desta forma, optou-se por trabalhar com misturas binárias de glicerol/água (Gli/H₂O), 2,2,2-trifluoretanol/água (TFE/H₂O) e glicerol/2,2,2-trifluoretanol (Gli/TFE), empregando-se uma metodologia descrita no grupo⁸⁵, para avaliar o efeito da polaridade e da viscosidade do meio sobre as propriedades fotofísicas de **BeetBlue**. A mistura binária Gli/H₂O permite variar a viscosidade do meio em mais de 100 x e, no caso da mistura TFE/H₂O, apesar da viscosidade apenas dobrar, a polaridade diminui muito mais do que para a mistura de Gli/H₂O (**Tabela 4**).⁸⁵ O TFE foi o solvente de escolha devido a maior solubilidade e estabilidade das betalaínas neste solvente⁴⁵.

Tabela 4 Viscosidade (η), permissibilidade relativa (ϵ_r) e índice de refração (n_D) de água, glicerol e 2,2,2-trifluoretanol.¹²⁷

	η^a (cP)	ϵ_r^b	n_D^b
Água (H ₂ O)	0,893	80,1	1,333
Glicerol (Gli)	945	46,5	1,474
2,2,2-Trifluoretanol (TFE)	1,73	27,7	1,291

^a 25 °C; ^b 20 °C

O espectro de excitação e emissão de **BeetBlue** em diferentes proporções das misturas citadas acima pode ser observado na **Figura 26**. Nota-se o aumento da intensidade de fluorescência conforme o aumento de Gli ou TFE nas três misturas estudadas, sendo este menos intenso na mistura TFE/H₂O. Também foram calculados os ϕ_{FI} , onde observou-se um efeito muito maior da viscosidade do meio quando comparado a polaridade (**Figura 27**). Enquanto na mistura 90 %^{m/m} TFE/H₂O apresentou um aumento no ϕ_{FI} de aproximadamente 3 vezes quando comparado ao valor em água, a mistura de 90 %^{m/m} Gli/H₂O apresentou um aumento de 100 vezes e a mistura 90 %^{m/m} Gli/TFE apresentou um aumento de aproximadamente 130 vezes neste mesmo parâmetro.

Figura 26 Espectros de excitação ($\lambda_{Em} = 620$ nm) e emissão ($\lambda_{Ex} = 570$ nm) de **BeetBlue** a 25 °C em diferentes frações molares das misturas: **(a)** 2,2,2-trifluoretol/água, **(b)** glicerol/água e **(c)** glicerol/2,2,2-trifluoretol.

Figura 27 Relação entre os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{FI}) de **BeetBlue** e a fração mola (χ) das misturas 2,2,2-trifluoranol/ H_2O , glicerol/ H_2O e glicerol/2,2,2-trifluoranol. Valores de viscosidades relatados em preto e de polaridade empírica em vermelho.

A Dr^a. Ana Clara Beltran Rodrigues mediu previamente a polaridade empírica, $E_T(30)$, utilizando a ϵ e a viscosidades das misturas estudadas. Alguns destes valores são relatados na **Figura 27**. O efeito do TFE sobre o ϕ_{FI} já foi estudado para **BtP** e **cBeet120**⁴⁵ e o resultado obtivo foi compatível para o encontrado para **BeetBlue** (2 e 4 vezes maior em TFE do que em água, respectivamente)⁴⁵. Este resultado pode ser explicado pelo envolvimento de ligações de hidrogênio intermoleculares na desativação não-radiativa da *quasibetalaina* e das *betalaínas* no estado excitado.⁴⁵

Na fração molar 0,6 observa-se um aumento pronunciado de ϕ_{FI} quando comparamos as misturas TFE/Gli e H_2O /Gli, sendo a primeira o maior valor. Neste ponto há uma variação relativamente baixa de $E_T(30)$, aproximadamente 1 kcal mol⁻¹, porém a viscosidade aumenta de 9,846 cP na mistura H_2O /Gli para 133,1 cP na mistura TFE/Gli. O mesmo efeito ocorre quando comparamos outros pontos deste gráfico, como, por exemplo, a fração molar 0 e 0,6 da mistura TFE/Gli. Desta forma, infere-se que o efeito da viscosidade se mostrou mais importante do que a polaridade. Os dados também

confirmam os resultados obtidos na caracterização fotofísica, indicando que tanto a retirada de água do sistema, quanto a restrição do grau de liberdade vibracional aumentam o ϕ_{FI} , sendo o último um aumento mais pronunciado.

3.4.4 BeetBlue em micelas reversas

Os experimentos com misturas binárias apontaram que a presença de água afeta o ϕ_{FI} . Uma maneira de controlar a quantidade de água presente na camada solvatação de um composto é o confinamento dos mesmo em uma micela reversa^{128,129,130}, permitindo avaliar o efeito da água no ϕ_{FI} de maneira mais efetiva. O tensoativo dioctilsulfocinato de sódio (AOT) é conhecido por ser capaz de formar micelas reversas quando dissolvido em solventes orgânicos não polares, no caso heptano, e também ser capaz de compartimentalizar relativamente grandes quantidades de água. O número de moléculas de água presente em soluções micelares do tensoativo AOT é descrita pelo parâmetro W_0 , definido como (**Eq. 2**):

$$W_0 = \frac{[H_2O]}{[AOT]} \quad \text{Eq. 2}$$

O raio hidrodinâmico (R_H) da micela desse compartimento aquoso é diretamente proporcional ao W_0 (**Eq. 3**):¹³¹

$$R_H = 1,5 + 0,175W_0 \quad \text{Eq. 3}$$

Figura 28 Espectros de absorção de **BeetBlue** em meio aquoso e em micelas reversas de AOT/heptano. [**BeetBlue**] = $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; [AOT] = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em heptano; $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$.

O confinamento da **BeetBlue** na cavidade de micelas reversas de AOT ocasionou um deslocamento hipsocrômico de 10 nm no λ^{abs} com relação ao espectro em água (**Figura 28**). Além disto, também ocorre uma diminuição da absorção conforme aumenta-se o valor de W_0 (Abs = 0,082 em água e Abs = 0,016 em $W_0 = 20$). Ao avaliarmos os espectros de emissão e excitação obtidos nas soluções micelares, com relação ao em água, observa-se um aumento na intensidade de ambos conforme diminui-se o W_0 , que também pode ser observado ao analisar os espectros sincronizados (**Figura 29**). Ao contrário do que ocorre nos espectros de absorção, nenhum deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ foi observado nos espectros de emissão e excitação.

Figura 29 (a) Espectros de emissão e excitação ($\lambda_{\text{Ex}} = 570 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 620 \text{ nm}$) e (b) espectros sincronizados ($\Delta = 20 \text{ nm}$) de **BeetBlue** em meio aquoso e em micelas reversas de AOT/heptano, a 25°C . $[\text{BeetBlue}] = 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{AOT}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em heptano; $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$.

Devido ao grande aumento da intensidade nos espectros de emissão, optou-se por calcular o rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}) nas soluções micelares estudadas e, como o esperado, o Φ_{FL} aumenta conforme o volume da cavidade aquosa da micela diminui (**Figura 30**). Já em $W_0 = 20$ o Φ_{FL} aumenta 40 vezes quando comparado com o valor em água ($\Phi_{\text{FL}} = 2,45 \%$ em $W_0 = 20$). Em $W_0 = 2$ o aumento do Φ_{FL} é ainda mais significativo, sendo 190 vezes maior do que o valor reportado em água ($\Phi_{\text{FL}} = 11,37 \%$ em $W_0 = 2$). Tal resultado pode ser atribuído a dois fatores, a diminuição da quantidade de moléculas de água presentes na cavidade em valores menores de W_0 e/ou o confinamento da **BeetBlue** dentro da cavidade. A presença de água tem mostrado constantemente afetar o Φ_{FL} da *quasibetalaina*. Uma das hipóteses que justificaria este efeito seria que a energia do estado excitado de **BeetBlue** pode ser próxima da energia de vibração da água, desta forma ocorre a transferência de energia para a água, que a perde vibracionalmente. Com a diminuição de W_0 , há uma consequente diminuição do raio hidrodinâmico e da quantidade de moléculas de água presentes no poço, desta forma há uma diminuição da solvatação do estado excitado de **BeetBlue** dentro da cavidade, levando ao aumento do Φ_{FL} . Já o segundo fator pode ser explicado, pois o confinamento da **BeetBlue** dentro da cavidade da micela reversa resultaria em uma restrição dos graus

rotacionais (assim como ocorre em meios viscosos) e, conseqüentemente, em uma menor perda de energia por processos não radiativos.

Figura 30 Correlação entre o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{FL}) de **BeetBlue** e o valor de W_0 ($[H_2O]/[AOT]$) das micelas reversas de AOT/heptano.

3.4.5 Interação entre BeetBlue e albumina sérica bovina

Proteínas são umas das mais importantes moléculas bioativas, sendo responsáveis por uma série de funções no organismo. A albumina sérica, por exemplo, é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo e é responsável pelo transporte de uma grande gama de compostos endógenos e exógenos.¹³² O estudo da interação de fluoróforos com esta classe de proteínas é uma importante ferramenta no estudo da sensibilidade das propriedades fotofísicas destes compostos à modificações nas propriedades do meio.^{133–136} A albumina sérica bovina (BSA) tem sido vastamente utilizada como modelo, principalmente pela sua homologia estrutural com a albumina sérica humana (HSA).¹³⁵ Neste contexto, o efeito da adição de BSA na emissão de fluorescência de **BeetBlue** foi avaliado em diferentes pHs, visando investigar a possível interação da *quasibetalaína* com proteínas. Este estudo foi baseado em protocolo já estabelecido pelo grupo⁸⁵, onde foram testadas concentrações de 0,5 a 100 equivalentes da proteína em relação a **BeetBlue**. Os experimentos foram feitos em meio tamponado (pH 3, pH 5 e pH 7) a fim de variar o

estado de protonação da *quasibetalaina* e também a carga da proteína (ponto isoelétrico BSA = 4,7)¹³⁷. A faixa de concentração de BSA escolhida baseia-se na concentração em que as albuminas séricas estão presentes no citoplasma de mamíferos (estimada em $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)¹³⁸ e na solubilidade da proteína em meio aquoso (40 g L^{-1}). Já a concentração de **BeetBlue** foi mantida baixa ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) para possibilitar a variação da concentração de BSA em uma ampla faixa, mantendo a densidade óptica da solução da *quasibetalaina* inferior a 0,1 no máximo de excitação, evitando processos de reabsorção¹⁰⁶ que poderiam interferir na determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{FI}).

Foi observado uma diminuição da intensidade da banda de absorção correspondente a **BeetBlue** conforme foi adicionado BSA, sendo o efeito mais pronunciado na presença de 50 e 100 equivalentes. Essa diminuição é mais intensa em meio tamponado pH 3 e menos intensa em pH7 (**Figura 31**). Tal efeito pode ser explicado pelo fato de que ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas podem gerar uma diminuição na deslocalização dos elétrons na molécula e, conseqüentemente, resultar em um deslocamento hipocrômico, indicando a interação de **BeetBlue** com a BSA. O efeito observado na emissão de fluorescência é mais pronunciado (**Figura 31**), podendo-se observar um aumento na intensidade de emissão proporcional ao aumento da quantidade de equivalentes de BSA adicionado, reforçando a ocorrência de interação entre a *quasibetalaina* e a proteína.

Figura 31 Espectros de absorção, emissão ($\lambda_{Ex} = 570 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{Em} = 620 \text{ nm}$) em concentração de 0,5 a 100 equivalentes de BSA em relação a **BeetBlue** em diferentes meios tamponados (tampão fosfato 100 mmol L^{-1} pH 3; tampão acetato 100 mmol L^{-1} pH 5; tampão fosfato 100 mmol L^{-1} pH 7), a 25°C .

O mesmo efeito também pode ser observado na **Figura 32**, onde observa-se o aumento do ϕ_{Fl} conforme o aumento da quantidade de equivalentes de BSA. Ocorre este aumento em todos os pHs estudados, porém é mais pronunciado em pH 3, onde há uma elevação de aproximadamente 7 vezes no ϕ_{FL} quando comparado ao mesmo valor em água. O estudo realizado anteriormente com a betalaína semissintética **cBeet120**⁸⁵

apresentou alteração relevante apenas em pH 3, onde o aumento foi de 5 vezes na presença de 100 equivalentes de BSA quando comparado ao mesmo valor em água. Esta diferença pode estar relacionada ao pK_a dos compostos envolvidos e será discutida adiante.

Figura 32 Efeito da concentração de BSA e do pH no rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) de **BeetBlue**. [**BeetBlue**] = $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; [BSA] = $7,5 \times 10^{-7}$ (0,5 equivalentes de BSA) a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (100 equivalentes de BSA).

Ao contrário da HSA, a estrutura cristalina da BSA não é conhecida.¹³³ A estrutura modelo de BSA, que foi obtida a partir da sequência de aminoácidos e pela estrutura cristalina da proteína homóloga HSA (**Figura 33**), indica que ela é composta por três domínios homólogos (I, II e III), sendo cada domínio dividido em dois subdomínios (A e B).^{133,139} Os principais sítios de interação são localizados nos subdomínios IIA (mais hidrofóbico) e IIIA.¹³³ A BSA possui ponto isoelétrico igual a 4,7, ou seja, está positivamente carregada em pH 3, neutra em pH 5 e aniônica em pH 7. Já a **BeetBlue**, como visto no *item 3.3*, possui pK_a médio das porções carboxílicas por volta de 2,4 e pK_a da imina do anel 2-piperideínico próximo de 6 (**Esquema 10**). Sendo assim, a *quasibetalaina* se encontra negativamente carregada nos três pHs estudados. Nos três pHs estudados foi observado interação da BSA com **BeetBlue**, que pode ser observado através

do aumento do rendimento quântico de fluorescência. Apesar de não ser possível inferir qual sítio e por meio de quais interações está ocorrendo esta interação, os resultados apontam que há contribuição de interações iônicas, uma vez que em pH 3 o aumento de ϕ_{FI} foi mais pronunciado e, neste pH, a BSA encontra-se positivamente carregada e **BeetBlue** negativamente carregada. O mesmo pode ser inferido observando o pH 7, onde o efeito no ϕ_{FI} foi menos pronunciado e ambas se encontram negativamente carregadas. Estes resultados também estão de acordo com os dados obtidos com micelas reversas, a *quasibetalaína* tende a fluorescer mais em ambientes mais hidrofóbicos e com volume livre reduzido.

Figura 33 Representação pictórica da estrutura da BSA obtida da estrutura cristalina da proteína homóloga, HSA, seus domínios e principais sítios de ligação.¹³³

Esquema 10 Diferentes estados de protonação de **BeetBlue**.

3.5 Toxicidade *in vitro* e *in vivo*

A cor azul na natureza é proveniente normalmente da difração da luz em nanoestruturas⁵. Desta forma, pigmentos azuis semissintéticos biocompatíveis são de grande interesse para a aplicação industrial.⁵ Um dos requisitos para aplicação de pigmentos na indústria de alimentos é justamente ser seguro para o consumo humano. Ensaio toxicológicos *in vitro*, como cultivo celular, são vastamente utilizados devido a sua rapidez, eficiência e rentabilidade. Porém, quando se trata de riscos à saúde humana, este tipo de estudo dificulta a prospecção de possíveis riscos. Nestes casos, há a preferência por estudos *in vivo*, onde se possui uma resposta biológica direta. Desta forma, a possibilidade da aplicação de **BeetBlue** na indústria alimentícia foi avaliada através da realização de experimentos de viabilidade celular por citometria de fluxo e de toxicidade em embriões de peixe-zebra (*zebrafish*).

3.5.1 Viabilidade celular

Inicialmente, foram realizados, com a ajuda da estudante de doutorado Caroline de Oliveira Machado, experimentos de viabilidade celular, visando investigar a citotoxicidade de **BeetBlue** *in vitro*. Para isso, linhagens de célula ARPE-19 foram incubadas com 10^{-5} mol L⁻¹ de **BeetBlue** por 5 e 24 horas, em tampão PBS 10 mM (pH 7,4). ARPE-19 são células da retina e foram selecionadas para este experimento por terem uma alta resistência a luz, no caso da necessidade de irradiação. Após os períodos de incubação, foi adicionado o corante 7AAD, composto conhecido por apresentar fluorescência ($\lambda_f = 647$ nm) apenas quando intercalado com o DNA.¹⁴⁰ Tal composto não possui a capacidade de permear a membrana celular de células vivas e, portanto, só é possível observar a sua fluorescência quando a célula não se encontra mais viável.^{140,141}

Também foram realizados experimentos controle, onde células que não passaram por tratamento algum (controle negativo), células que foram tratadas com 50 mmol L⁻¹

de peróxido de hidrogênio (controle positivo) e células que foram incubadas apenas com PBS 10 mM (pH 7,4) por 24 horas foram incubadas com 7AAD. A banda obtida com o controle negativo representa a população de células viáveis e possui menor intensidade de fluorescência, que é referente a autofluorescência da célula estudada. Já no controle positivo o tratamento com peróxido de hidrogênio gera um estresse oxidativo e, conseqüentemente, morte celular. Neste caso, nota-se o aparecimento de uma segunda banda à direita que representa a população de células não viáveis e que possui maior intensidade de fluorescência, referente à fluorescência do complexo 7AAD/DNA.

Através da **Figura 34** pode-se observar que, para um período de até 24 horas de incubação nas condições testadas não foram observados danos às células causados por **BeetBlue**, podendo indicar portando que, nestas condições, a *quasibetalaína* não é tóxica para a linhagem testada. Este resultado, apesar de parcial, é positivo e nos dá uma boa perspectiva para prosseguir os testes em modelos mais complexos.

Figura 34 Gráficos DOT e histogramas dos ensaios de viabilidade celular por citometria de fluxo, com células ARPE-19, sendo: **(a)** controle positivo com peróxido de hidrogênio 50 mmol L^{-1} por 5 horas de incubação; **(b)** controle com PBS 10 mM (pH 7,4), com 24 horas de incubação; **(c)** células incubadas com $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de BeetBlue, com 5 horas de incubação; e **(d)** células incubadas com $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de BeetBlue, com 24 horas de incubação.

3.5.2 Toxicidade em modelo peixe-zebra

Uma vez que **BeetBlue** não se mostrou citotóxica nas condições testadas, prosseguiu-se para os estudos *in vivo*, que são os de escolha no tocante a segurança para consumo humano. O modelo normalmente utilizado é o de roedores, porém envolve a necessidade de uma grande infraestrutura, cuidados complexos com os animais e análises mais demoradas que, conseqüentemente, tornam a análise cara e menos acessível.¹⁴² Uma alternativa aos problemas expostos é a utilização de embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*), modelo já bem estabelecido para o estudo de processos biológicos básicos de desenvolvimento¹⁴³ e para avaliações toxicológicas^{144,145}. Além do menor custo de manutenção, o modelo de *Zebrafish* apresenta vantagens como: rápido desenvolvimento dos embriões, que eclodem dentro de aproximadamente 2 – 3 dias após a fertilização¹⁴⁶; os embriões são transparentes desde a fertilização até o estágio de larva, o que permite a observação clara de alterações morfológicas durante o período de experimentação¹⁴⁴; e o seu genoma já foi totalmente sequenciado, apresentando 70% de genes ortólogos ao genoma humano¹⁴⁷, sendo então considerado um bom modelo de estudo *in vivo*.

Desta forma, estudos com *Zebrafish* foram realizados em colaboração com a Pesquisadora Científica Dra. Mônica Lopes-Ferreira do Instituto Butantã. Os embriões de *Zebrafish* foram incubados com 10^{-5} mol L⁻¹ de **BeetBlue** e monitorados por 4 dias. Simultaneamente, foi realizado o experimento controle com embriões apenas na presença do meio E2. A cada 24 horas após a exposição a **BeetBlue** foram realizadas observações referentes a quatro indicadores de letalidade: coagulação de embriões fertilizados, não formação de somito (estruturas epiteliais transitórias relacionadas com a formação da coluna vertebral), não descolamento da cauda do vitelo e ausência de batimento cardíaco¹⁴⁸. Qualquer observação positiva relacionada aos parâmetros citados considera-se morto o embrião de *Zebrafish*¹⁴⁸. A eclosão dos embriões se dá entre o segundo e o

terceiro dia e a partir deste momento também são observados parâmetros de má formação da larva, como, por exemplo, dano vascular, tamanho da larva, cauda, tamanho de bexiga natatória e vitelo.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre tratamento com **BeetBlue** e controle na taxa de sobrevivência (**Figura 35**). Em ambos os grupos foram observados embriões mortos apenas no primeiro dia e todos os casos se deram por coagulação. A perda de alguns embriões é esperada, sendo o experimento considerado válido quando a taxa de sobrevivência é $\geq 70\%$ no controle. Como esperado, todos os embriões eclodiram entre o segundo e o terceiro dia de experimento. Na **Figura 36** é possível observar que o tratamento com a *quasibetaláína* também não gerou nenhuma má formação na larva.

Figura 35 Taxa de sobrevivência no controle com Meio E2 e no tratamento com 10^{-5} mM de **BeetBlue** dos embriões de Zebrafish incubados a 28 °C durante os 4 dias de tratamento.

Figura 36 Imagem das larvas de Zebrafish após os 5 dias de incubação a 28 °C do controle (apenas meio E2) e com 10^{-5} mol L⁻¹ de **BeetBlue**.

Apesar da ausência de sinais de toxicidade é prematuro concluir que **BeetBlue** não é tóxica ao *Zebrafish*. O córion, estrutura anatômica que envolve o ovo do peixe, do *Zebrafish* é espesso, acelular e composto principalmente por proteínas e glicoproteínas. Uma vez que a *quasibetalaina* já se mostrou capaz de interagir com proteína (*item 3.4.5*), não é possível afirmar se esta atravessou o córion ou ficou retida em sua superfície, não tendo contato com o embrião. Desta forma, a única informação inequívoca que podemos extrair deste experimento é que **BeetBlue** não se mostrou tóxica à larva já formada do *Zebrafish* nos dias e condições estudadas. Apesar de se tratar de um experimento preliminar, estes resultados somados aos obtidos no experimento de citotoxicidade são promissores no tocante a aplicação de **BeetBlue** na indústria de alimentos.

4 Conclusões

A semissíntese do derivado de betalaína resultante do acoplamento de **HBt** com o nucleófilo de carbono 2,4-dmp em meio acidificado com TFA, pôde realizada com sucesso. O resultado deste acoplamento deu origem a um composto azul, **BeetBlue**, que foi classificado como uma *quasibetalaína* devido a substituição da ligação imínica pela ligação carbono-carbono. Esta abordagem foi realizada com o objetivo de gerar compostos mais estáveis a hidrólise, porém acarretou em um aumento na ativação do C6, tornando a hidrólise por abertura do anel 2-piperideínico uma via mais importante. Devido a este fato, a **BeetBlue** não se mostrou mais estável do que a betalaína com maior $t_{1/2}$ (**BtP**, $t_{1/2}$: 10 horas). Mesmo assim, a $t_{1/2}$ de **BeetBlue** é mais alta do que a maioria das betalaínas semissintéticas, o que permitiu a sua caracterização estrutural completa por HPLC-DAD-HMRS-ESI(+) e por ressonância magnética nuclear (^1H , ^{13}C , NOESY, HMQC e HMBC), onde foi observado uma distribuição de carga diferente de betalaínas naturais modelo, com densidade de carga positiva maior no nitrogênio do anel 2-piperideínico.

O Φ_{FI} de **BeetBlue** é baixo, compatível com os valores relatados para **Bn**, o que pode ser explicado pela sua alta constante não radiativa (três ordens de grandeza maior do que a sua constante radiativa) e pelo seu baixo potencial de oxidação, que sugere possível oxidação no estado excitado. O aumento da viscosidade do meio e a diminuição da quantidade de água na solvatação de **BeetBlue** tem efeito intenso sobre a sua emissão. A interação com BSA também aumenta a fluorescência da *quasibetalaína*, provavelmente devido a sua interação com porções menos polares da proteína. Sendo assim, é possível modular a intensidade de fluorescência de **BeetBlue** através de mudanças no meio, tornando-a uma possível sonda *on – off*.

Por fim, **BeetBlue** não apresentou ser citotóxica para a linhagem ARPE-19 nas condições testadas e nem ser tóxica para a larva de *Zebrafish* já formada. Apesar de não ser possível concluir nada sobre a embriogênese do *Zebrafish* e de se tratarem de experimentos preliminares, os resultados foram promissores para a continuação do estudo da aplicação de **BeetBlue**.

5 Parte Experimental

5.1 Materiais

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho e suas características estão listadas na **Tabela 5**.

Tabela 5 Reagentes e solventes utilizados no trabalho, sua origem e grau de pureza.

Reagente/Solvente	Fórmula/ Abreviatura	Fornecedor	Grau de pureza
1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol	HFIP	S.A.	≥ 99%
2,2,2-trifluoretanol*	TFE	S.A.	≥ 99%
2,4-dimetilpirrol	2,4dmp	S.A.	97%
2-propanol*		Merck	P.A.
7-aminoactinomicina D	7AAD	ThermoFisher	-
Acetato de etila	AcOEt	Merck	P.A.
Acetato de sódio	CH ₃ COO ⁻ Na ⁺	S.A.	> 99%
Acetona		Merck	P.A.
Acetonitrila	ACN	Tedia	HPLC
Acetonitrila*	ACN	S.A.	P.A.
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	S.A.	≥ 99%
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	S.A.	≥ 98,5%
Ácido clorídrico	HCl	Merck	37%
Ácido fórmico	HCO ₂ H	Merck	98-100%
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	S.A.	85%
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	S.A.	95-98%
Ácido trifluoroacético	TFA	S.A.	99%
Água deuterada	D ₂ O	S.A.	99,9%

Albumina sérica bovina	BSA	S.A.	≥ 96%
Cloreto de ferro (III)	FeCl ₃	Synth	97%
Cloreto de itérbio	YbCl ₃	S.A.	99,9%
Cloreto de potássio	KCl	S.A.	≥ 99%
Cloreto de sódio	NaCl	S.A.	≥ 99,5%
Clorofórmio*	CHCl ₃	Merck	P.A.
Diclorometano	DCM	S.A.	≥ 98,9%
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	S.A.	≥ 99%
Dihidrogenofosfato de sódio	NaH ₂ PO ₄	S.A.	≥ 99%
Dimetilsulfóxido*	DMSO	Synth	P.A.
Diocilsulfocinato de sódio	AOT	Across	≥ 97%
Etanol*	EtOH	Merck	P.A.
Glicerol	Gli	S.A.	≥ 99,5%
Heptano		Synth	P.A.
Hidrogenofosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	S.A.	≥ 99%
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH	Merck	28-30%
Hidróxido de sódio	NaOH	S.A.	≥ 98%
Metanol	MeOH	Tedia	HPLC
N,N-dimetilformamida*	DMF	Synth	P.A.
Nitrato de disprósio	Dy(NO ₃) ₃	S.A.	99,9%
Nitrato de érbio	Er(NO ₃) ₃	S.A.	99,9%
Cloreto de európio	EuCl ₃	S.A.	99,9%
Nitrato de gadolínio	Gd(NO ₃) ₃	S.A.	99,9%
Nitrato de hólmio	Ho(NO ₃) ₃	S.A.	99,9%

Nitrato de neodímio	$\text{Nd}(\text{NO}_3)_3$	S.A.	99,9%
Nitrato de praseodímio	$\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$	S.A.	99,9%
Sephadex LH20		G.E.	-
Tetrahidrofurano	THF	S.A.	$\geq 99,9\%$

S.A.: Sigma-Aldrich; P.A.: para análise; *reagentes foram tratados sempre antes do uso.¹⁴⁹

5.2 Métodos

5.2.1 Soluções de trabalho

Todas as soluções foram preparadas com água desmineralizada com resistividade em temperatura ambiente $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (milli-Q, Millipore).

5.2.1.1 Gerais

-Solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹: 4 g de NaOH foram adicionados em balão volumétrico (100 mL) e o volume foi completado com água.

-Solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹: 8,28 mL de HCl 37% ($d = 1,2 \text{ g mL}^{-1}$) foram adicionados em balão volumétrico (100 mL) e o volume foi completado com água.

-Solução aquosa de NaOH 0,2 mol L⁻¹: 4 g de NaOH foram adicionados em balão volumétrico (500 mL) e o volume foi completado com água.

-Solução aquosa de HCl 0,2 mol L⁻¹: 1,12 mL de HCl 37% ($d = 1,2 \text{ g mL}^{-1}$) foram adicionados em balão volumétrico (500 mL) e o volume foi completado com água.

-Solução de NaCl 0,01 mol L⁻¹: 0,0029 g de NaCl foram adicionados em balão volumétrico (5 mL) e o volume completado com água.

-Solução de HCl 0,01 mol L⁻¹: 4 μL de HCl 37% ($d = 1,2 \text{ g mL}^{-1}$) foram adicionados em balão volumétrico (5 mL) e o volume completado com água.

-Solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹: 0,0020 g de NaOH foram adicionados em balão volumétrico (5 mL) e o volume completado com água.

5.2.1.2 Análise cromatográfica

As soluções foram preparadas imediatamente antes das análises cromatográficas:

-Solvente A (0,05% ácido fórmico/ H_2O): 125 μ L de ácido fórmico foram diluídos em 250 mL de água.

-Solvente B (0,05% ácido fórmico/ACN): 125 μ L de ácido fórmico foram diluídos em 250 mL de acetonitrila.

5.2.1.3 Tampões

As soluções tampões foram preparadas e armazenadas a 8 °C por até um mês. O valor de pH da solução foi conferido e, caso necessário, aferido, em temperatura ambiente antes de cada ensaio.

-Solução tampão fosfato 10 mmol L^{-1} : foram preparadas soluções tampão 10 mmol L^{-1} de fosfato dibásico (0,3549 g de Na_2HPO_4 adicionados a balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água) e 200 mmol L^{-1} de cloreto de sódio (2,922 g de NaCl adicionados a balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água), utilizando-se de HCl ou NaOH 1,0 mol L^{-1} para se atingir o pH desejado, no intervalo entre pH 2 – 10.

-Solução tampão Britton-Robinson (acetato-fosfato-borato, 40 mmol L^{-1} , pH 2 – 12): 2,5 g de H_3BO_3 ($pK_a = 9,24$), 2,3 mL de CH_3COOH ($pK_a = 4,76$, $d = 1,049$ g mL^{-1}) e 1,9 mL H_3PO_4 ($pK_{a1} = 2,14$; $pK_{a2} = 7,21$; $pK_{a3} = 12,36$; $d = 1,685$ g mL^{-1}) 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.

-Solução tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,050 mol L^{-1} , pH 6,21: 0,455 mmol de $H_2PO_4^-$ (0,0546 g de NaH_2PO_4) e 0,0456 mmol de HPO_4^{2-} (0,0063 g de Na_2HPO_4) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,10 mol L^{-1} , pH 6,21: 0,911 mmol de $H_2PO_4^-$ (0,1093 g de NaH_2PO_4) e 0,0892 mmol de HPO_4^{2-} (0,0127 g de Na_2HPO_4) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,15 mol L^{-1} , pH 6,21: 1,37 mmol de $H_2PO_4^-$ (0,1638 g de NaH_2PO_4) e 0,134 mmol de HPO_4^{2-} (0,0190 g de Na_2HPO_4) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,20 mol L^{-1} , pH 6,21: 1,82 mmol de $H_2PO_4^-$ (0,2185 g de NaH_2PO_4) e 0,178 mmol de HPO_4^{2-} (0,0253 g de Na_2HPO_4) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,25 mol L^{-1} , pH 6,21: 2,28 mmol de $H_2PO_4^-$ (0,2732 g de NaH_2PO_4) e 0,223 mmol de HPO_4^{2-} (0,0317 g de Na_2HPO_4) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,30 mol L^{-1} , pH 6,21: 2,73 mmol de $H_2PO_4^-$ (0,3278 g de NaH_2PO_4) e 0,268 mmol de HPO_4^{2-} (0,0380 g de Na_2HPO_4) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,40 mol L^{-1} , pH 6,21: 3,64 mmol de $H_2PO_4^-$ (0,4371 g de NaH_2PO_4) e 0,357 mmol de HPO_4^{2-} (0,0507 g de Na_2HPO_4) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,50 mol L^{-1} , pH 6,21: 4,55 mmol de $H_2PO_4^-$ (0,5464 g de NaH_2PO_4) e 0,456 mmol de HPO_4^{2-} (0,0634 g de Na_2HPO_4) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão CH_3COOH/CH_3COO^- 0,050 mol L^{-1} , pH 5,76: 0,0454 mmol de CH_3COOH (2,6 μL de CH_3COOH) e 0,454 mmol de CH_3COO^- (0,0618 g de $NaCH_3COO$) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0,10 mol L^{-1} , pH 5,76: 0,0909 mmol de CH_3COOH (5,2 μL de CH_3COOH) e 0,909 mmol de CH_3COO^- (0,1237 g de NaCH_3COO) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0,15 mol L^{-1} , pH 5,76: 0,136 mmol de CH_3COOH (7,8 μL de CH_3COOH) e 1,36 mmol de CH_3COO^- (0,1856 g de NaCH_3COO) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0,20 mol L^{-1} , pH 5,76: 0,182 mmol de CH_3COOH (10,4 μL de CH_3COOH) e 1,82 mmol de CH_3COO^- (0,2474 g de NaCH_3COO) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0,25 mol L^{-1} , pH 5,76: 0,227 mmol de CH_3COOH (13 μL de CH_3COOH) e 2,27 mmol de CH_3COO^- (0,3093 g de NaCH_3COO) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0,30 mol L^{-1} , pH 5,76: 0,273 mmol de CH_3COOH (15,6 μL de CH_3COOH) e 2,73 mmol de CH_3COO^- (0,3711 g de NaCH_3COO) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0,40 mol L^{-1} , pH 5,76: 0,364 mmol de CH_3COOH (20,8 μL de CH_3COOH) e 3,64 mmol de CH_3COO^- (0,4948 g de NaCH_3COO) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0,50 mol L^{-1} , pH 5,76: 0,454 mmol de CH_3COOH (26 μL de CH_3COOH) e 4,54 mmol de CH_3COO^- (0,6185 g de NaCH_3COO) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução tampão PBS 10 mM, pH 7,4: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ e 0,24 g de KH₂PO₄ foram adicionados em balão volumétrico (1 L) e o volume foi completado com água. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl e a solução foi esterilizada em autoclave (20 minutos, 121 °C).

5.2.1.4 Voltametria cíclica

-Solução aquosa de KCl 0,1 mol L⁻¹: 1,864 g de KCl foram adicionados em balão volumétrico (250 mL) e o volume completado com água; a solução foi mantida a temperatura ambiente.

-Solução aquosa de ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆] 0,1 mol L⁻¹: 0,329 g de K₃[Fe(CN)₆] foram adicionados em balão volumétrico (100 mL) e o volume completado com água; a solução foi mantida a temperatura ambiente, sob abrigo de luz.

5.2.1.5 Interação com BSA

-Solução aquosa de BSA 5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹: 0,3325 g de albumina sérica bovina (massa molar ≈ 66,5 kDa) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água; a solução foi preparada imediatamente antes dos ensaios.

5.2.1.6 Micela reversa

-Solução de AOT (dioctilsulfocinato de sódio) 0,1 mol L⁻¹: 1,11 g de dioctilsulfocinato de sódio foram adicionados em balão volumétrico (25 mL) e o volume completado com heptano.

5.2.1.7 Lantanídeos

-Solução de Nd(NO₃)₃ 0,3 mmol L⁻³: 0,0013 g de nitrato de neodímio (III) hexahidratado (massa molar = 438,35 g mol⁻¹) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução de $Dy(NO_3)_3$ 0,3 mmol L^{-3} : 0,0010 g de nitrato de disprósio (III) (massa molar = 348,51 g mol^{-1}) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução de $EuCl_3$ 0,3 mmol L^{-3} : 0,0011 g de cloreto de európio (III) hexahidratado (massa molar = 366,41 g mol^{-1}) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução de $Gd(NO_3)_3$ 0,3 mmol L^{-3} : 0,0014 g de nitrato de gadolínio (III) hexahidratado (massa molar = 451,36 g mol^{-1}) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução de $Er(NO_3)_3$ 0,3 mmol L^{-3} : 0,0013 g de nitrato de érbio (III) pentahidratado (massa molar = 443,35 g mol^{-1}) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução de $Ho(NO_3)_3$ 0,3 mmol L^{-3} : 0,0013 g de nitrato de hólmio (III) pentahidratado (massa molar = 441,02 g mol^{-1}) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução de $Pr(NO_3)_3$ 0,3 mmol L^{-3} : 0,0013 g de nitrato de praseodímio (III) pentahidratado (massa molar = 435,01 g mol^{-1}) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

-Solução de $YbCl_3$ 0,3 mmol L^{-3} : 0,0012 g de nitrato de itérbio (III) hexahidratado (massa molar = 387,49 g mol^{-1}) foram adicionados em balão volumétrico (10 mL) e o volume completado com água.

5.2.2 Semissíntese e purificação de BeetBlue

5.2.2.1 Obtenção de ácido betalâmico (HBt) em acetato de etila

O HBt foi obtido por meio da hidrólise alcalina das betalaínas presentes no suco de beterraba. Beterrabas frescas foram lavadas e processadas em centrífuga tipo *Juicer*

(Philips-Walita, modelo RI1855). O suco (ca. 500 mL) foi filtrado em filtro de pano e refrigerado a aproximadamente 10 °C e o pH do meio foi elevado a 11,4 com a adição de NH₄OH concentrado. A solução foi mantida sob agitação mecânica (ca. 400 rpm) até que a solução passasse da coloração roxa para a amarelo-esverdeada (ca. 30 min). A solução foi então resfriada a 1 °C (banho de CO_{2(s)}/etanol) e em seguida o pH foi levado a 1,5 - 2 com HCl concentrado. Em seguida, o eletrodo de pH foi retirado e foi adicionado acetato de etila (10% do volume inicial do suco) sob a solução avermelhada e a emulsão resultante foi centrifugada (7000 g, 1 minuto, 5 °C). A fase orgânica amarela foi separada, e repetiu-se o processo de extração, adicionando-se novamente acetato de etila (10% do volume inicial do suco) sob a fase aquosa e centrifugando-se (7000 g, 1 minuto, 5 °C) a emulsão formada. A fase orgânica foi novamente separada, reunida com a fração anterior e resfriada a -20 °C. Ocorre a formação de uma suspensão que foi filtrada rapidamente a vácuo com o auxílio de um funil de Büchner para eliminar a água e o sal em suspensão. A concentração de **HBt** na solução em acetato de etila foi estimada considerando-se um $\epsilon^{380\text{nm}} = 30.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor determinado para a água.¹⁰⁵

5.2.2.2 *Semissíntese e purificação de BeetBlue*

Em um balão de fundo redondo, foi adicionado o HBt em acetato de etila (10 mL, 0,6 mmol L⁻¹, 6 µmol, 1,3 mg), o 2,4-dimetilpirrol (5 equivalentes, 30 µmol, 2,9 mg) e o ácido trifluoroacético (10 equivalentes, 60 µmol, 6,8 mg), sob atmosfera inerte e protegido de luz. A reação foi mantida por 30 minutos sob agitação mecânica, observando-se a mudança de coloração de amarela para azul, indicando a formação do produto desejado (**Esquema 11**). Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida (70 mmHg, 25 °C) e mantido a - 20 °C protegido de luz. O produto resultante da síntese foi ressuspenso em água e purificado por cromatografia de filtração em gel com Sephadex LH-20 como fase estacionária e água como eluente, fluxo 4 mL min⁻¹. A fração roxa,

correspondente a **BeetBlue**, foi coletada, congelada, liofilizada e armazenada a - 20 °C protegida de luz. A coluna de Sephadex LH-20 foi regenerada através da limpeza com aproximadamente 5 volumes de coluna de metanol seguidos de cerca de 10 volumes de coluna de água, podendo ser reutilizada na sequência.

Esquema 11 Semissíntese de BeetBlue a partir se ácido betalâmico e 2,4-dimetilpirrol.

5.2.2.3 Análise cromatográfica

As amostras purificadas foram analisadas por HPLC Shimadzu Prominence, equipado com uma coluna de fase reversa (Ascentis C18, 5 µm, 250 × 4.6 mm, Supelco) mantida a 30 °C, acoplado ao detector PDA SPD-M20A. As análises foram realizadas com gradiente de 5% a 95% de B em 20 minutos, sendo solvente A 0,05% v/v ácido fórmico/água e o solvente B 0,05% v/v ácido fórmico/acetonitrila, com fluxo de 1 mL min⁻¹.

5.2.3 Caracterização estrutural

5.2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)

As análises de HPLC-MS foram realizadas no laboratório do Prof. Ernani Pinto (FCF-USP) em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução micrOTOF-QII (Bruker Daltonics). Para separação foi utilizada uma coluna de fase reversa (Luna C18(2), 150 x 2,0 mm; 3 µm; Phenomenex®) e sistema cromatográfico: 5 – 95 % de B em 15 minutos, sendo o solvente

A 0,05% ácido fórmico/água e o solvente B 0,05% ácido fórmico/ACN com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹.

5.2.3.2 *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)*

As análises de RMN foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP, em um espectrômetro Bruker AIII800 acoplado a criosonda (TCI) com 4 canais. Foram adquiridos espectros de ¹H, ¹³C, NOESY, HSQC e HMBC, com o equipamento operando a 800 MHz, para a frequência do hidrogênio e 200 MHz para o carbono. Para a análise, aproximadamente 3 mg da betalaína purificada e seca foram dissolvidos em 700 µL de D₂O. Os deslocamentos químicos (δ) estão representados em unidades de partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do ácido trimetilsililpropanóico (TSP; δ 0,00). As multiplicidades dos sinais foram dadas como: s (singleto), d (dubleto) e dd (duplo dubleto).

5.2.4 **Propriedades fotofísicas e redox**

5.2.4.1 *Espectroscopia de absorção, emissão e excitação*

Os espectros de absorção foram adquiridos em espectrofotômetro Varian Cary 50Bio e os espectros de emissão e excitação em espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, ambos em meio aquoso mantido a 25 °C por meio de banho termostático acoplado aos equipamentos. As análises foram realizadas em cubeta de quartzo de volume final 1,5 mL e caminho óptico de 10 mm e com as seguintes configurações: absorção - faixa de varredura de 800 – 250 nm; emissão - λ_{Ex} = 570 nm, λ_{Em} = 600–800 nm, f^{ex} = 20 nm, f^{em} = 20 nm, tensão = 600 V; excitação - λ_{Em} = 620 nm, λ_{Ex} = 300 – 600 nm, f^{ex} = 20 nm, f^{em} = 20 nm, tensão = 600 V.

5.2.4.2 *Coeficiente de atenuação molar*

O coeficiente de atenuação molar (ε) de **BeetBlue** foi calculado através da sua cinética de formação a partir de HBt e 2,4-dimetilpirrol. A concentração final da

quasibetalaína foi inferida a partir da total conversão de HBt, cujo ϵ é conhecido e sua concentração inicial pode ser determinada.

Uma solução de HBt em água foi obtida através de uma extração líquido-líquido partindo-se da solução do mesmo em acetato de etila. Esta solução foi diluída de maneira a obter uma concentração de HBt próxima a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na cubeta e, em seguida, foram adicionados 5 equivalentes de 2,4 – dimetilpirrol e 100 equivalentes de TFA. A cinética de formação da **BeetBlue** foi monitorada no espectrofotômetro Varian Cary 50Bio, a 25 °C, por 500 min, com aquisição de espectros de absorção a cada 5 minutos e em cubetas de quartzo (volume final 3 mL e caminho óptico 10 mm). Ao término da cinética de formação, o ϵ foi determinado correlacionando a concentração inicial de HBt com a concentração final da *quasibetalaína* (Eq. 4):

$$c_{HBt}^{inicial} = c_{BeetBlue}^{final} \quad \text{Eq. 4}$$

Pela lei de Lambert-Beer, temos a relação (Eq. 5):

$$A^{\lambda} = \epsilon^{\lambda} bc \quad \text{Eq. 5}$$

onde A^{λ} é a absorção em determinado comprimento de onda, ϵ^{λ} é o coeficiente de atenuação molar nesse mesmo comprimento de onda, b é o caminho óptico e c é a concentração.

Dessa forma, temos que (Eq. 6):

$$\frac{A^{BeetBlue}}{\epsilon^{BeetBlue}} = \frac{A^{HBt}}{\epsilon^{HBt}} \quad \text{Eq. 6}$$

O coeficiente de atenuação molar das betalaínas foi então determinado pela seguinte relação (Eq. 7):

$$\varepsilon^{BeetBlue} = \frac{A^{BeetBlue}}{A^{HBt}} \varepsilon^{HBt} \quad \text{Eq. 7}$$

Sendo que os valores de ε e A foram obtidos no $\lambda^{\text{máx}}$ de **BeetBlue** (582 nm) e que o ε padrão utilizado para o cálculo foi de $\varepsilon^{424 \text{ nm}} = 26.270 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o **HBt**.¹⁰⁵

5.2.4.3 *Rendimento quântico de fluorescência*

Os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{Fl}) foram determinados por método indireto por comparação com padrões secundários. Foi utilizado violeta de cresila em etanol ($\phi_{\text{Fl}} = 0,56$)³⁸ como padrão secundário para a **BeetBlue** devido a compatibilidade das bandas de absorção e emissão do padrão com a *quasibetalaína*.

Foram adquiridos, nas mesmas condições experimentais (fendas e tensão da fotomultiplicadora), espectros de absorção e emissão em diferentes concentrações da amostra e do padrão, mantendo sempre a densidade ótica da amostra inferior a 0,1 para evitar efeitos de reabsorção.¹⁰⁶ Um gráfico que correlaciona a área de emissão com a absorção do composto foi construído, e o coeficiente angular da reta traçada com intercepto igual a zero foi correlacionado com o padrão de acordo com a **Eq. 8**.¹⁰⁶

$$\phi_{\text{Fl}}^x = \phi_{\text{Fl}}^p \frac{\alpha^x}{\alpha^p} \left(\frac{n^x}{n^p} \right)^2 \quad \text{Eq. 8}$$

onde, ϕ_{Fl}^x é o rendimento quântico de fluorescência da amostra, ϕ_{Fl}^p é o rendimento quântico de fluorescência do padrão, α^x é o coeficiente angular do gráfico área sob a curva de emissão de fluorescência vs. absorção da amostra, α^p é o coeficiente angular do gráfico área sob a curva de emissão de fluorescência vs. absorção do padrão, n^x é índice de refração do solvente da amostra e n^p é índice de refração do solvente do padrão.

5.2.4.4 *Voltametria cíclica*

O experimento de voltametria cíclica foi conduzido empregando-se um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT101 (Metrohm), utilizando o software

NOVA. As medidas foram realizadas em cela eletroquímica adquirida do prof. Cecílio Sadao Fugivara (Unesp-Araraquara), 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 mV s^{-1} e o potencial foi varrido de -1 V a $+1 \text{ V}$, em janela aberta, em seguida de varredura em janela fechada, entre $0,3$ a $0,85 \text{ V}$, com 4 ciclos de varredura. A solução aquosa da **BeetBlue** foi preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, também utilizado como solução controle nos ensaios, numa concentração fixa de $8,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A varredura de **BeetBlue** foi realizada segundo 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 $0,05 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro, respectivamente; (ii) enxágue do eletrodo com água e banho ultrassônico por 1 min; (iii) voltamograma de solução "padrão" de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , janela de potencial de 0 a $+0,5 \text{ V}$); (iv) registro do branco do próximo voltamograma, na janela de potencial desejada, com solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. 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 há adsorção das betalainas na superfície do eletrodo de carbono vítreo.⁸³

5.2.4.5 Absorção transiente resolvida no tempo na escala de ps

Os experimentos de absorção transiente foram adquiridos no Ångström Laboratoriet, na Universidade de Uppsala, Suécia. Os experimentos foram realizados com potências de laser igual a menos de uma absorção de fóton por partícula. O laser utilizado foi o coerente de Ti:Safira (800 nm , comprimento de pulso de 100 fs , taxa de repetição de 1 kHz), onde os pulsos de excitação no comprimento de onda de aproximadamente

540 nm foram adquiridos utilizando um amplificador paramétrico óptico (Topas C, Light Conversion). O pulso de sonda e o pulso de referência foram dispersos em um espectrógrafo e detectados por um arranjo de diodos e a polarização da bomba foi ajustada em ângulo de 54,7° em relação ao feixe de sonda. O tempo de resposta instrumental é de aproximadamente 100 fs.

5.2.4.6 *Tempo de vida de fluorescência*

O decaimento do tempo de vida de emissão da **BeetBlue** também foi adquirido no Ångström Laboratoriet, na Universidade de Uppsala, Suécia. O decaimento foi obtido através da detecção do sinal de fluorescência das amostras, as quais foram excitadas em $\lambda_{\text{Ex}} = 535$ nm. Para a excitação em 535 nm, o comprimento de onda do laser foi ajustado utilizando um sistema ótico composto por um amplificador paramétrico de onda (OPA, Coherent) excitado por um sistema de lasers ultra-rápido Ti:safira (Coherent Mira 900: gerador de pulsos de largura de 160 fs; Coherent RegA 900: amplificador do laser e Coherent Verdi-V18: pump laser). A frequência é de 200 kHz. Uma cubeta de caminho ótico de 1 cm foi utilizada e a linha do laser foi direcionada à parede da cubeta, posicionada em frente ao detector, reduzindo a passagem do laser por cerca de 1-2 mm do caminho ótico da cubeta. A fluorescência da amostra foi detectada pelo espectrômetro Streak Camera (Hamamatsu), em uma janela de observação de cerca de 200 nm (Bruker SPEC 250IS). O dispositivo de carga acoplada da câmera (Hamamatsu Orca-ER C4742-95) foi utilizado no modo de armazenamento de 2 x 2 pixel, originando uma matriz de 512 x 512 pixel. Um filtro C3C23 foi posicionado antes da *streak camera* a fim de remover o pulso do laser

Para a detecção dos eventos rápidos do laser, assume-se que a resposta do instrumento, pulso do laser, é um perfil gaussiano¹⁵⁰ em função do tempo, com uma largura σ em t_0 , cuja equação pode ser descrita por (Eq. 9 e Eq. 10)¹⁵¹:

$$F_{Gauss}(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{\left(\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}\right)} \quad \text{Eq. 9}$$

$$FWHM = 2\sqrt{2\ln 2} \quad \text{Eq. 10}$$

Para combinar as Eqs. 2 e 3, um processo de reconvolução foi feito pela multiplicação de duas funções e introduzindo a função complementar de erro para reconvoluir tanto as funções exponenciais, quanto a gaussiana. Dessa forma, a função do ajuste monoexponencial é descrita pela **Eq. 11**:

$$I_{fit}(t) = \frac{1}{2} I_0 e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right)} x e^{\left(\frac{\sigma^2}{2\tau^2}\right)} \left(1 + \operatorname{erf}\left(\left(\frac{\sigma}{\tau} - \frac{t-t_0}{\sigma}\right) \cdot \frac{1}{\sqrt{2}}\right)\right) \quad \text{Eq. 11}$$

onde a função *erf* calcula o erro do ajuste.

As imagens dos decaimentos da *streak camera* e seus ajustes dos decaimentos, obtidos com as equações 2 a 4 combinadas, foram obtidos com funções matemáticas descritas no *Mathlab*, já previamente programadas para o tratamento dos dados.

5.2.4.7 Absorção transiente resolvida no tempo na escala de μs e ns

Para os experimentos de identificação do estado tripleto de betalaínas e seus respectivos tempos de vida as amostras foram solubilizadas em água e saturadas com argônio. Um laser Nd:YAG em modo Q-switched ou frequência dupla (Quanta-Ray ProSeries, Spectra-Physics) foi utilizado para obtenção de 580 nm com potência de 10 mJ pulso⁻¹ e com pulso instrumental apresentando largura à meia altura de 10 ns. O espectrômetro (Edinburgh Instruments) foi acoplado a uma luz de sonda a partir de uma lâmpada de xenônio pulsada num ângulo de 90° para a excitação do laser, enquanto a amostra foi colocada a 45° em relação a ambos os feixes em uma cubeta de 1 cm. Traços de absorção transitória foram adquiridos com um osciloscópio Tektronix TDS 3052 500 MHz (5GS s⁻¹) em conexão com o software L900 (Edinburgh Instruments).

5.2.5 Estabilidade hidrolítica

5.2.5.1 Estudo cinético de decomposição em água

As cinéticas de decomposição foram realizadas em meio aquoso, através da aquisição do espectro de absorção (Varian Cary 50Bio) em função do tempo. As análises foram realizadas em um suporte de celas termostatizado por efeito Peltier (60 °C) e em cubeta de quartzo com volume final 3 mL e caminho ótico de 10 mm. As cinéticas foram acompanhadas por 10 horas, na faixa de 800 – 250 nm e com medidas a cada 5 minutos. O tempo de meia-vida de decomposição ($t_{1/2}$) e a constante de hidrólise (k_{obs}) foram determinados no λ^{max} da **BeetBlue** (582 nm).

5.2.5.2 Determinação do pKa

Para a determinação do pKa de **BeetBlue**, foram obtidos espectros de absorção, emissão e excitação da *quasibetalaína* em soluções de Tampão Britton-Robinson pH 2 – 12. O volume pipetado da *quasibetalaína* deve ser no mínimo 100 μ L para diminuir o erro de pipetagem no experimento. Então, adicionou-se 100 μ L de uma solução de **BeetBlue** (solução estoque = 1×10^{-6} mol L⁻¹, aproximadamente Abs_{cubeta} = 0,6) à 900 μ L de tampão Britton-Robinson em cubeta de quartzo de volume final 1,5 mL e caminho óptico de 10 mm. A temperatura durante o ensaio foi mantida a 25 °C por meio de banho termostático acoplado aos equipamentos. As medidas de absorção foram adquiridas em espectrofotômetro Varian Cary 50Bio, na faixa de varredura de 800 – 200 nm. Já as medidas de emissão e excitação foram obtidas em espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse com as seguintes configurações: emissão - λ_{Ex} = 570 nm, λ_{Em} = 600–800 nm, f^{ex} = 20 nm, f^{em} = 20 nm, tensão = 600 V; excitação - λ_{Em} = 620 nm, λ_{Ex} = 300 – 600 nm, f^{ex} = 20 nm, f^{em} = 20 nm, tensão = 600 V.

5.2.5.3 *Estudo cinético em diferentes pHs*

Estudos cinéticos de decomposição foram realizados na presença de tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em pH 2 a 10. As cinéticas foram acompanhadas com o auxílio de espectrofotômetro Varian Cary 50Bio por 635 minutos, na faixa de 800 – 250 nm e com medidas a cada 5 minutos. As análises foram realizadas em um suporte de celas termostatizado por efeito Peltier a 60 °C e em cubeta de quartzo de 3 mL, caminho ótico de 10 mm e com um volume final de solução de 1 mL. O tempo de meia-vida de decomposição ($t_{1/2}$) e a constante de hidrólise (k_{obs}) foram determinados no $\lambda_{m\acute{a}x}$ de **BeetBlue** (582 nm).

5.2.5.4 *Estudos cinéticos em Tampão Fosfato pH 6,21 e Tampão Acetato pH 5,76*

Estudos cinéticos de decomposição foram realizados na presença de Tampão Fosfato pH 6,21 e Tampão Acetato pH 5,76 em diferentes concentrações (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM). As cinéticas foram acompanhadas com o auxílio de espectrofotômetro Varian Cary 50Bio por 240 minutos (Tampão Fosfato) ou 580 minutos (Tampão Acetato), na faixa de 800 – 300 nm a cada 5 minutos. As análises foram realizadas em um suporte de celas termostatizado por efeito Peltier a 60 °C e em cubeta de plástico de 1,5 mL, caminho ótico de 10 mm e com um volume final de solução de 1 mL. O tempo de meia-vida de decomposição ($t_{1/2}$) e a constante de hidrólise (k_{obs}) foram determinados no $\lambda_{m\acute{a}x}$ de **BeetBlue** (582 nm).

A cinética de decomposição também foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS). As análises foram realizadas no laboratório do Prof. Ernani Pinto (FCF-USP) em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução micrOTOF-QII (Bruker Daltonics). A amostra foi mantida em banho Thermomixer Comfort da Eppendorf termostatizado a 60 °C e injeções foram realizadas a cada 30

minutos. Para separação foi utilizada uma coluna de fase reversa (Eclipse Plus C18; 2,1 x 50 mm; 1,8 μm ; Agilent) e sistema cromatográfico: 5 – 10 % de B em 5 minutos e 10 – 90 % de B em 10 minutos, sendo o solvente A 0,05% ácido fórmico/água e o solvente B 0,05% ácido fórmico/ACN com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹.

5.3 Efeitos de interações intermoleculares sobre a fotofísica de BeetBlue

5.3.1.1 Efeitos de solventes moleculares

Uma solução estoque concentrada de **BeetBlue** foi preparada em 2,2,2-trifluoretanol (TFE). Um volume definido desta solução foi pipetado para uma cubeta de quartzo (volume final 1,5 mL e caminho óptico de 10 mm), seco em fluxo de nitrogênio e ressuspenso em 500 μL do solvente a ser estudado. Para cada amostra foi realizada análise de cor, espectro de absorção e espectros de emissão e excitação corrigidos. A análise de cor e o espectro de absorção foram realizados no espectrofotômetro Varian Cary 50Bio (programa Color) nas seguintes condições: faixa de varredura 830 – 360 nm; cromaticidade D75, 2 graus. Os espectros de emissão e excitação foram adquiridos em fluorímetro Hitachi F4500 e obtidos nas seguintes condições: emissão - $\lambda_{\text{Ex}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 590 - 800 \text{ nm}$; excitação - $\lambda_{\text{Em}} = 613 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 300 - 600 \text{ nm}$; todos com $f^{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$, $f^{\text{em}} = 10 \text{ nm}$, *scan speed* 240 nm min⁻¹ e tensão = 700 V.

5.3.1.2 Interação de **BeetBlue** com lantanídeos

-Job Plot

O método de Job, ou método da variação contínua, foi escolhido para o estudo da interação de **BeetBlue** com os lantanídeos Dy³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺, Nd³⁺, Er³⁺, Ho³⁺, Pr³⁺ e Yb³⁺. Para isto, foram preparadas soluções estoque 3 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em água de **BeetBlue**, nitrato de disprósio (Dy(NO₃)₃), cloreto de európio (EuCl₃), nitrato de gadolínio (Gd(NO₃)₃), nitrato de neodímio (Nd(NO₃)₃), nitrato de érbio (Er(NO₃)₃), nitrato de hólmio (Ho(NO₃)₃), nitrato de praseodímio (Pr(NO₃)₃) e cloreto de itérbio (YbCl₃). O

número de mols total em todas as frações molares foi mantido constante em 60 nmol, variando-se a razão entre a concentração da *quasi*betalaína e do sal de lantanídeo. A **Tabela 6** foi utilizada para adição dos volumes de água, da solução estoque de **BeetBlue** e da solução estoque do lantanídeo, nas diferentes frações molares de **BeetBlue**. As misturas foram preparadas em cubeta de plástico de caminho óptico de 10 mm e volume final de 4 mL, imediatamente antes da aquisição dos espectros de absorção. A faixa de varredura de absorção foi de 800 – 300 nm em espectrofotômetro Varian Cary 50Bio, termostatizado a 25 °C com banho Peltier. Após a aquisição dos espectros foi construído um gráfico da fração molar da *quasi*betalaína *versus* a absorção corrigida da mesma (gráfico de Job). A absorção corrigida foi obtida através da **Eq. 12**:

$$Abs_{corrigida} = Abs_{medida} * \chi_{BeetBlue} - Abs_{medida} \quad \text{Eq. 12}$$

Tabela 6 Volumes das soluções estoque 3×10^{-4} mol L⁻¹ em água de **BeetBlue** e dos lantanídeos (Dy³⁺, Eu³⁺ e Gd³⁺) e correspondente fração molar de **BeetBlue** (V_{final} = 4 mL).

$\chi_{BeetBlue}$	V _{BeetBlue} (μL)	V _{lantanídeo} (μL)	V _{água} (μL)
1	200	0	3800
0,9	180	20	3800
0,8	160	40	3800
0,7	140	60	3800
0,6	120	80	3800
0,5	100	100	3800
0,4	80	120	3800
0,3	60	140	3800
0,2	40	160	3800
0,1	20	180	3800
0	0	200	3800

5.3.1.3 Efeito da viscosidade do solvente

Foram preparadas 6 mL de misturas binárias de glicerol/água (Gli/H₂O), 2,2,2-trifluoretanol/água (TFE/W) e glicerol/2,2,2-trifluoretanol (Gli/TFE) nas proporções 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90%^{m/m} pela pesagem dos componentes, como descrito na **Tabela 7**. O TFE utilizado foi previamente tratado com K₂CO₃ anidro seguido por destilação simples, como descrito na literatura.¹⁵²

Tabela 7 Proporção em massa da mistura correspondente, massa pesada do respectivo componente (g) e fração molar do componente referência.

g ₀ ^{m/m}	Gli/W ^a			TFE/W ^b			Gli/TFE		
	χ^{Gli}	m ^{Gli}	m ^W	χ^{TFE}	m ^{TFE}	m ^W	χ^{Gli}	m ^{Gli}	m ^{TFE}
0	0	-	6,00	0	-	6,00	0	-	8,238
15	0,03	0,925	5,26	0,03	0,9336	5,32	0,16	1,2	6,92
30	0,08	1,925	4,46	0,07	1,949	4,58	0,32	2,4	5,602
45	0,14	2,95	3,64	0,12	3,1	3,742	0,47	3,56	4,327
60	0,23	4,1	2,72	0,21	4,284	2,88	0,62	4,65	3,13
75	0,37	5,3	1,76	0,35	5,6568	1,88	0,77	5,775	1,895
90	0,63	6,575	0,74	0,63	7,1946	0,76	0,91	6,75	0,824

^a d_{glicerol} = 1,25 g mL⁻¹, pH_w = 7,6. ^b d_{2,2,2-trifluoretanol} = 1,373 g mL⁻¹, pH_w = 7,2.

As viscosidades e índices de refração das misturas a 25 °C foram previamente medidas pela Dra. Ana Clara Beltran Rodrigues.⁸⁵ O valor de absorção de **BeetBlue** foi mantido de forma que a densidade óptica fosse inferior a 0,05 em todas as misturas (**Tabela 7**). Os espectros de absorção, emissão, excitação e sincronizado foram adquiridos em triplicata em cubetas de quartzo de caminho óptico 10 mm e volume final de 1,5 mL. A faixa de varredura de absorção foi de 800 – 250 nm em espectrofotômetro Varian Cary 50Bio, termostatizado a 25 °C com banho Peltier. Os espectros de emissão, excitação e sincronizado foram adquiridos em fluorímetro Varian Cary Eclipse e obtidos nas

seguintes condições: emissão - $\lambda_{\text{Ex}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 600 - 800 \text{ nm}$; excitação - $\lambda_{\text{Em}} = 620 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 300 - 600 \text{ nm}$; sincronizado - $\Delta = 20 \text{ nm}$, $\lambda = 300-800 \text{ nm}$; todos com $f^{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$, $f^{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ e tensão = 600 V.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) de **BeetBlue** nas diferentes misturas foi obtido em triplicata, pelo método de Williams¹⁵³, utilizando violeta de cresila em etanol ($\Phi_{\text{Fl}} = 0,56$)³⁸ como padrão secundário.

5.3.1.4 **BeetBlue** em micelas reversas

Uma solução estoque de **BeetBlue** $4,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em água foi preparada de forma que a adição de 7 μL da solução estoque em água (volume final de 2 mL) correspondesse a concentração na cubeta, mantida fixa nas diferentes proporções $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$, de $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A **Tabela 8** foi utilizada para adição dos volumes de água, de solução de AOT $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em heptano, mantendo fixos os 7 μL adicionados de solução estoque de **BeetBlue** nos diferentes valores de W_0 ($[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$)¹²⁹ estudados. As soluções de diferentes W_0 e do controle foram preparadas na cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm e volume final 3,5 mL, imediatamente antes da aquisição dos espectros absorção, emissão, excitação e sincronizado. A faixa de varredura de absorção foi de 800 – 300 nm em espectrofotômetro Varian Cary 50Bio, termostatizado a 25 °C com banho peltier. Os espectros de emissão, excitação e sincronizado foram adquiridos em fluorímetro Varian Cary Eclipse e obtidos nas seguintes condições: emissão - $\lambda_{\text{Ex}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 600 - 800 \text{ nm}$; excitação - $\lambda_{\text{Em}} = 620 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 300 - 600 \text{ nm}$; sincronizado - $\Delta = 20 \text{ nm}$, $\lambda = 350-800 \text{ nm}$; todos com $f^{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$, $f^{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ e tensão = 600 V.

Tabela 8 Volumes de solução de AOT $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em heptano e água adicionados a $7 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de **BeetBlue** $4,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($V_{\text{final}} = 2 \text{ mL}$)

	$V^{\text{AOT}} (\mu\text{L})$	$V^{\text{H}_2\text{O}} (\mu\text{L})$
Controle	-	1993
$W_0 = 2$	1993	-
$W_0 = 3$	1990	3
$W_0 = 4$	1986	7
$W_0 = 5$	1982	11
$W_0 = 7$	1975	18
$W_0 = 10$	1965	28
$W_0 = 20$	1930	63

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) de **BeetBlue** nos diferentes W_0 foi obtido em triplicata, pelo método de Williams¹⁵³, utilizando violeta de cresila em etanol ($\Phi_{\text{Fl}} = 0,56$)³⁸ como padrão secundário, utilizando o $\eta_D = 1,394$ para as frações com heptano, conforme determinado anteriormente no grupo.⁸⁵

5.3.1.5 Interação de **BeetBlue** e albumina sérica bovina

O efeito da adição de albumina sérica bovina (BSA) nos espectros de absorção e emissão de **BeetBlue** foi avaliado numa ampla faixa de concentração de BSA (de $7,5 \times 10^{-7}$ a $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), obtidas a partir da diluição da solução estoque de BSA ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), como descrito na **Tabela 9**. A concentração de **BeetBlue** na cubeta ($V_f = 2 \text{ mL}$) foi mantida fixa em $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e determinada espectrofotometricamente pelo coeficiente de atenuação molar da *quasi*betalaína ($\epsilon^{582 \text{ nm}} = 54000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), de forma que o valor de absorção em $\lambda = 582 \text{ nm}$ fosse menor que 0,1. Dessa forma, a variação de concentração de BSA em relação a **BeetBlue** foi de 0,5 a 100 equivalentes. Os ensaios foram realizados em meio tamponado em pH 3 (tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH

5 (tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e pH 7 (tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) de forma a avaliar o efeito do pH do meio e da adição de BSA nos espectros de absorção, emissão e também do rendimento quântico de fluorescência.

Tabela 9 Preparo de 5,0 mL das soluções estoque de BSA, nas diferentes concentrações estudadas.

Número de equivalentes	Concentração na cubeta (mol L^{-1})	Concentração da solução estoque (mol L^{-1})	V BSA ^a (mL)	V H ₂ O (mL)
0,5	$7,5 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$	0,025	4,975
1,0	$1,5 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	0,05	4,95
2,5	$3,75 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-5}$	0,125	4,875
5,0	$7,5 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-5}$	0,25	4,75
10	$1,5 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	0,5	4,5
25	$3,75 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-4}$	1,25	3,75
50	$7,5 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-4}$	2,5	2,5
100	$1,5 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	5,0	-

^a da solução estoque de BSA $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A adição das soluções à cubeta foi sempre realizada na seguinte ordem: $x \mu\text{L}$ de solução tampão; $600 \mu\text{L}$ de solução aquosa de BSA, na concentração estudada; $y \mu\text{L}$ de **BeetBlue** em água, de forma que o volume de $x + y = 1,4 \text{ mL}$. O pH do meio foi conferido após os ensaios, assegurando que o efeito avaliado em cada pH poderia ser apenas a concentração de BSA em solução. Nos ensaios controle, sem BSA, os $600 \mu\text{L}$ de solução aquosa de BSA foram substituídos por solução tampão no pH estudado. Os ensaios foram realizados em cubeta de quartzo (volume final $1,5 \text{ mL}$ e caminho óptico 10 mm) e foram avaliadas as mudanças nos espectros de absorção, emissão, excitação e sincronizado. A faixa de varredura de absorção foi de $800 - 250 \text{ nm}$ em espectrofotômetro Varian Cary

50Bio, termostatzado a 25 °C com banho Peltier. Os espectros de emissão, excitação e sincronizado foram adquiridos em fluorímetro Varian Cary Eclipse e obtidos nas seguintes condições: emissão - $\lambda_{\text{Ex}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 600 - 800 \text{ nm}$; excitação - $\lambda_{\text{Em}} = 620 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 300 - 600 \text{ nm}$; sincronizado - $\Delta = 20 \text{ nm}$, $\lambda = 300-800 \text{ nm}$; todos com $f^{\text{ex}} = 10 \text{ nm}$, $f^{\text{em}} = 10 \text{ nm}$ e tensão = 600 V.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) de **BeetBlue** frente as diferentes concentrações de BSA em diferentes pH foi obtido em triplicata, pelo método de Williams¹⁵³, utilizando violeta de cresila em etanol ($\Phi_{\text{Fl}} = 0,56$)³⁸ como padrão secundário.

5.3.2 Toxicidade *in vitro* e *in vivo*

5.3.2.1 Viabilidade celular

As análises de citometria de fluxo foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP, utilizando um citômetro de fluxo BC FACS Verse. Para o estudo de viabilidade celular, linhagens de ARPE-19 foram replicadas e incubadas com concentrações de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de **BeetBlue** em PBS 10 mM (pH 7,4) por 5 e 24 horas. Após o tempo de incubação foi efetuada uma lavagem com PBS 10 mM (pH 7,4), seguiu-se a incubação com o corante 7AAD ($0,25 \mu\text{g}/10^{-6}$ células, solução estoque de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 15 minutos e leitura da fluorescência do 7AAD através do filtro 665LP (700/54 nm). Foram feitos controles com apenas PBS 10 mM (pH 7,4) após 24 horas de incubação e também o controle positivo, que foi realizado para a validação da metodologia, com peróxido de hidrogênio 50 mmol L^{-1} por 5 horas de incubação. Cada experimento foi realizado com 1×10^{-6} células com passagens entre 5 – 35.

5.3.2.2 Estudo de toxicidade em modelo peixe-zebra

As análises de toxicidade em embriões de *Zebrafish* foram realizadas no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), no Instituto Butantan (IB), com o auxílio da

Pesquisadora Científica Dra. Mônica Lopes-Ferreira e da aluna de doutorado Maria Alice Pimentel Falcão. Lá o *Zebrafish* foi tratado de acordo com os regulamentos locais de bem-estar animal e mantido de acordo com protocolos padrão (zfin.org). A criação dos peixes adultos foi aprovada pelo comitê local de bem-estar animal (DEC) do IB.

Machos e fêmeas adultos (< 18 meses de idade) da linhagem selvagem AB (*Zebrafish* International Resource Center, Eugene, OR) foram mantidos em condições laboratoriais padrão, com ciclo de 14 horas luz/ 10 horas escuro, a 28 °C. Pares adultos foram utilizados para gerar embriões após 0 – 5 dias da fertilização. Óvulos não fertilizados ou irregulares foram separados e os embriões fertilizados foram transferidos para placas de 24 poços não mais do que 2 horas após a fertilização. O estudo de toxicidade em embriões de *Zebrafish* foi realizado de acordo com as diretrizes da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development; nº 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test). Os ensaios foram conduzidos em placas de 24 poços, onde cinco embriões de *Zebrafish* (estágio de 4 a 32 células) foram incubados com uma solução de concentração 10^{-5} mol L⁻¹ de **BeetBlue** em meio de cultura E2¹⁵⁴, em estufa a 28 °C. Após o tratamento, embriões e larvas foram monitorados com auxílio de um microscópio Leica M205C (24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização) onde cada embrião foi avaliado quanto à mortalidade (coagulação do embrião, não formação de somito, não descolamento da cauda do vitelo e ausência de batimento cardíaco) e más formações (edema do saco vitelino, dobramento do eixo do corpo, olho, focinho, mandíbula, otólito, edema pericárdico, cérebro, somito, nadadeira caudal, nadadeira peitoral, circulação, pigmentação, comprimento do tronco e bexiga natatória). Após os experimentos os *Zebrafish* foram eutanasiados por uma overdose de Tricaína tamponada (3-aminobenzoato de etila) diluído em meio E2¹⁵⁴ por 10 – 20 minutos. Após esse período, os peixes foram checados para garantir que eles não estavam se movendo ou respirando, antes de serem colocados em alvejante 10%.

6 Referências

1. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. & Francis, F. J. *Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**, (2000).
2. Bartley, G. E. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *Plant Cell Online* **7**, 1027–1038 (1995).
3. Grotewold, E. The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 761–780 (2006).
4. Harris, N. N. *et al.* Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *BMC Plant Biol.* **12**, 12–34 (2012).
5. Newsome, A. G., Culver, C. A. & Van Breemen, R. B. Nature's palette: The search for natural blue colorants. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 6498–6511 (2014).
6. Yoshioka, S. & Kinoshita, S. Effect of Macroscopic Structure in Iridescent Color of the Peacock Feathers. *Forma-Tokyo* **17.2**, 169–181 (2002).
7. Watanabe, K., Hoshino, T., Kanda, K., Haruyama, Y. & Matsui, S. Brilliant blue observation from a Morpho-butterfly-scale quasi-structure. *Japanese J. Appl. Physics, Part 2 Lett.* **44**, (2005).
8. Gralak, B., Tayeb, G. & Enoch, S. Morpho butterflies wings color modeled with lamellar grating theory. *Opt. Express* **9**, 567 (2001).
9. Vignolini, S. *et al.* Pointillist structural color in Pollia fruit. *PNAS* **109**, 15712–15715 (2012).
10. Di Marco, A. *et al.* 'Daunomycin', a new antibiotic of the rhodomycin group. *Nature* **201**, 706–707 (1964).

11. Mateus, N., Silva, A. M. S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. & De Freitas, V. A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1919–1923 (2003).
12. Mateus, N. & De Freitas, V. Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during port wine aging. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5217–5222 (2001).
13. Oliveira, J., Santos-Buelga, C., Silva, A. M. S., De Freitas, V. & Mateus, N. Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in Port wine. *Anal. Chim. Acta* **563**, 2–9 (2006).
14. Stintzing, F. C. & Carle, R. Analysis of betalains. *Food Color. Chem. Funct. Prop.* 507–520 (2008).
15. Strack, D., Vogt, T. & Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247–269 (2003).
16. Weiss, M. R. Floral Color Change: A Widespread Functional Convergence. *Am. J. Bot.* **82**, 167–185 (1995).
17. Tanaka, Y., Sasaki, N. & Ohmiya, A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* **54**, 733–749 (2008).
18. Strack, D., Vogt, T. & Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247–269 (2003).
19. Roberts, M. F., Strack, D. & Wink, M. *Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition* **40**, (2010).
20. Christinet, L. & Zryd, J.-P. in *Annual Plant Reviews, Plant Pigments and their Manipulation* **14**, 1–7 (2009).
21. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Betalain Stability and Degradation — Structural and Chromatic Aspects. *Journal Food Sci.* **71**, 41–50 (2006).
22. Azeredo, H. M. C. Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A

- review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 2365–2376 (2009).
23. Allegra, M. *et al.* Indicaxanthin from Cactus Pear Fruit Exerts Anti-Inflammatory Effects in Carrageenin-Induced Rat Pleurisy^{1,2}. *J. Nutr.* **144**, 185–192 (2014).
 24. Martinez, R. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of betalain-rich dye of *Beta vulgaris*: Effect on edema, leukocyte recruitment, superoxide anion and cytokine production. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 494–504 (2015).
 25. 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**, 6895–6901 (2002).
 26. Cai, Y. Z., Sun, M. & Corke, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2288–2294 (2003).
 27. Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A. & D'Alessio, P. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1028**, 481–486 (2004).
 28. Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M. & Livrea, M. A. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 391–395 (2004).
 29. Tesoriere, L., Butera Daniela, Allegra Mario, Fazzari, M. & Livrea, M. A. Distribution of Betalain Pigments in Red Blood Cells after Consumption of Cactus Pear Fruits and Increased Resistance of the Cells to ex Vivo Induced Oxidative Hemolysis in Humans. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1266–1270 (2005).
 30. Tesoriere, L. *et al.* Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radic. Res.* **37**, 689–696 (2003).
 31. Naselli, F. *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and

- isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16INK4a gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 652–658 (2014).
32. Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Gentile, C. & Livrea, M. A. Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in β -thalassemia red blood cells. *Free Radic. Res.* **40**, 753–761 (2006).
 33. Kanner, J., Harel, S. & Granit, R. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5178–5185 (2001).
 34. Tesoriere, L., Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D. & Livrea, M. A. Absorption , excretion , and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs : Potential health effects of betalains in humans betalains in LDLs : potential health effects of betalains in humans 1 – 3. 941–945 (2004).
 35. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Botany: floral fluorescence effect. *Nature* **437**, 334 (2005).
 36. 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).
 37. Wendel, M. *et al.* Photophysical properties of indicaxanthin in aqueous and alcoholic solutions. *Dye. Pigment.* **113**, 634–639 (2015).
 38. Brouwer, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **83**, 2213–2228 (2011).
 39. Wendel, M. *et al.* Photophysical properties of betaxanthins: Vulgaxanthin I in aqueous and alcoholic solutions. *J. Lumin.* **167**, 289–295 (2015).
 40. 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).
41. Stintzing, F. C. & Carle, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 19–38 (2004).
 42. Wybraniec, S., Stalica, P., Spórna, A. & Mizrahi, Y. Profiles of betacyanins in epidermal layers of grafted and light-stressed cacti studied by LC-DAD-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 5347–5354 (2010).
 43. Ibdah, M. *et al.* Spectral dependence of flavonol and betacyanin accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation. *PLANT CELL Environ.* **25**, 1145–1154 (2002).
 44. Vogt, T. *et al.* Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry* **52**, 583–592 (1999).
 45. Bartoloni, F. H. *et al.* Photophysics and hydrolytic stability of betalains in aqueous trifluoroethanol. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **144**, 567–571 (2013).
 46. Huang, A. S. & von Elbe, J. H. Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. *J. Food Sci.* **52**, 1689–1693 (1987).
 47. von Elbe, J. H., Maing, I.-Y. & Amundson, C. H. Color stability of betanin. *J. Food Sci.* **39**, 334–337 (1974).
 48. Attoe, E. L. & von Elbe, J. Photochemical Degradation of Betanine & Selected Anthocyanins. *J. Food Sci.* **46**, 1934–1937 (1981).
 49. Pasch, J. H. & von Elbe, J. H. Betanine degradation as influenced by water activity. *J. Food Sci.* **40**, 1145–1147 (1975).
 50. Cohen, E. & Saguy, I. Effect of Water Activity and Moisture Content on the Stability of Beet Powder Pigments. **48**, 703–707 (1983).
 51. Wybraniec, S. & Mizrahi, Y. Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya

- (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6704–6712 (2005).
52. Huang, A. & von Elbe, J. Kinetics of the Degradation and Regeneration of Betanine. *J. Food Sci.* **50**, 1115–1120 (1985).
 53. Drdák, M. & Vallová, M. Kinetics of the thermal degradation of betanine. *Nahrung* **34**, 307–310 (1990).
 54. Saguy, I. Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-I): influence of pH and temperature. *J. Food Sci.* **44**, 1554–1555 (1979).
 55. Saguy, I., Kopelman, I. J. & Mizrahi, S. Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 360–362 (1978).
 56. Herbach, K. M., Stinzing, F. C. & Carle, R. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J. Food Sci.* **69**, 491–498 (2004).
 57. Sapers, G. M. & Hornstein, J. S. Varietal Differences in Colorant Properties and Stability of Red Beet Pigments. *J. Food Sci.* **44**, 1245–1248 (1979).
 58. Slinger, J. W. & von Elbe, J. H. Degradation rates of Vulgaxanthine I. *J. Food Sci.* **45**, 489–491 (1980).
 59. Schwartz, S. J. & Elbe, J. H. Identification of betanin degradation products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **176**, 448–453 (1983).
 60. von Elbe, J. H., Schwartz, S. J. & Hildenbrand, B. E. Loss and Regeneration of Betacyanin Pigments During Processing of Red Beets. *J. Food Sci.* **46**, 1713–1715 (1981).
 61. Esteves, L. C. *et al.* Revisiting the Mechanism of Hydrolysis of Betanin. *Photochem. Photobiol.* n/a-n/a doi:10.1111/php.12897
 62. Cai, Y., Sun, M. & Corke, H. Colorant Properties and Stability of *Amaranthus*

- Betacyanin Pigments. *Seven* 4491–4495 (1998). doi:10.1021/jf980457g
63. Cai, Y. Z. & Corke, H. Effect of Postharvest Treatments on Amaranthus Betacyanin Degradation Evaluated by Visible / Near-Infrared Spectroscopy. *J. Food Sci.* **66**, 1112–1118 (2001).
 64. Blandamer, M. J., Engberts, J. B. F. N., Gleeson, P. T. & Reis, J. C. R. Activity of water in aqueous systems; a frequently neglected property. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 440–458 (2005).
 65. Pellerin, P., O'Neill, M. A. & O'Neill, M. A. The interaction of the pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II with heavy metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analisis* **26**, 32–36 (1998).
 66. Czapski, J. Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **191**, 275–278 (1990).
 67. Attoe, E. L. & von Elbe, J. H. Oxygen involvement in betanin degradation - Oxygen uptake and influence of metal ions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **179**, 232–236 (1984).
 68. Kuusi, T., Pyysalo, H. & Pippuri, A. The effect of iron, tin, aluminium, and chromium on fading, discoloration, and precipitation in berry and red beet juices. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **163**, 196–202 (1977).
 69. 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).
 70. von Elbe, J. H. & Attoe, E. L. Oxygen involvement in betanine degradation- Measurement of active oxygen species and oxidation reduction potentials. *Food Chem.* **16**, 49–67 (1985).
 71. Bilyk, A., Kolodij, M. A. & Sapers, G. M. Stabilization of Red Beet Pigments with

- Isoascorbic. **46**, 1616–1617 (1981).
72. Bonacin, J. A., Engelmann, F. M., Severino, D., Toma, H. E. & Baptista, M. S. Singlet Oxygen Quantum Yields (ϕ_D) in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs. *J. Braz. Chem. Soc.* **20**, 31–36 (2009).
 73. Huang, A. S. & Von Elbe, J. H. Stability comparison of two betacyanine pigments—amaranthine and betanine. *J. Food Sci.* **51**, 670–674 (1986).
 74. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem.* **131**, 231–238 (2012).
 75. Miller, H. E. *et al.* Biogenese der Betalaine Biotransformation von Dopa und Tyrosin in den Betalaminsäureteil des Betanins. *Helv. Chim. Acta* **51**, 1470–1474 (1967).
 76. Brockington, S. F., Walker, R. H., Glover, B. J., Soltis, P. S. & Soltis, D. E. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytol.* **190**, 854–864 (2011).
 77. Kobayashi, N. Contributions to betalain biochemistry. New structures, condensation reactions, and vacuolar transport. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002).
 78. Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H. & Strack, D. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* **208**, 114–124 (1999).
 79. Schliemann, W., Kobayashi, N. & Strack, D. The Decisive Step in Betaxanthin Biosynthesis Is a Spontaneous Reaction. *Plant Physiol.* **119**, 1217–1232 (1999).
 80. 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).
 81. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell

- Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. *PLoS One* **8**, e53874 (2013).
82. Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. & Jiménez-Atiénzar, M. One-step synthesis of betalains using a novel betalamic acid derivatized support. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 3776–3782 (2014).
 83. Nakashima, K. K. Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalaínas. (Universidade de São Paulo, 2015).
 84. Pioli, R. M. Efeito da modificação da porção imínica de betalaínas sobre as suas propriedades eletrônicas. (Universidade de São Paulo, 2018).
 85. Rodrigues, A. C. B. Betalaínas funcionais : semissíntese , propriedades fotofísicas e interações intermoleculares. (Univesidade de São Paulo, 2017).
 86. Loudet, A. & Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **107**, 4891–4932 (2007).
 87. Jameson, L. P. & Dzyuba, S. V. Expeditious, mechanochemical synthesis of BODIPY dyes. *Beilstein J. Org. Chem.* **9**, 786–790 (2013).
 88. Yu.schmidt, E. *et al.* A general synthetic strategy for the design of new BODIPY fluorophores based on pyrroles with polycondensed aromatic and metallocene substituents. *Chem. - A Eur. J.* **17**, 3069–3073 (2011).
 89. Hensle, E. M., Esfandiari, N. M., Lim, S. G. & Blum, S. A. Bodipy fluorophore toolkit for probing chemical reactivity and for tagging reactive functional groups. *European J. Org. Chem.* **2014**, 3347–3354 (2014).
 90. Clayden, J., Greeves, N. & Warren, S. *Organic Chemistry*. (Oxford University Press Inc., 2012).
 91. Goud, T. V., Tutar, A. & Biellmann, J. F. Synthesis of 8-heteroatom-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene dyes (BODIPY). *Tetrahedron* **62**, 5084–5091 (2006).

92. Wagner, R. W. & Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure Appl. Chem* **68**, 1373–1380 (1996).
93. Stintzing, F. C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U. & Carle, R. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **65**, 415–422 (2004).
94. Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B. & Mizrahi, Y. ¹H and ¹³C NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1725–1728 (2006).
95. Stintzing, F. C., Kugler, F., Carle, R. & Conrad, J. First ¹³C-NMR Assignments of Betaxanthins. *Helv. Chim. Acta* **89**, 1008–1016 (2006).
96. Alard, D., Wray, V., Grotjahn, L., Reznik, H. & Strack, D. Neobetanin: isolation and identification from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry* **24**, 2383–2385 (1985).
97. Xia, Y., Moran, S., Nikonowicz, E. P. & Gao, X. Z-restored spin-echo ¹³C 1D spectrum of straight baseline free of hump, dip and roll. *Magn. Reson. Chem.* **46**, 432–435 (2008).
98. Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy*. (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
99. Hwang, T.-L. & Shaka, A. J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J. Magn. Reson.* 275–279 (1995). doi:10.1006/jmra.1995.1047
100. Keith W. Wiitala, Thomas R. Hoyer & Christopher J. Cramer*. Hybrid Density Functional Methods Empirically Optimized for the Computation of ¹³C and ¹H Chemical Shifts in Chloroform Solution. *J. Chem. Theory Comput.* **2**, 1085–1092 (2006).
101. Reichardt, C. Chiral polymethine dyes: A remarkable but forgotten conjugated ?

- system. *J. Phys. Org. Chem.* **8**, 761–773 (1995).
102. Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*. (University Science Books, 1991).
 103. Gonçalves, L. C. P. *et al.* Betalainas: Das cores das beterrabas à fluorescência das flores. *Rev. Virtual Quim.* **7**, 292–309 (2015).
 104. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **232**, 449–460 (2010).
 105. Gonçalves, L. C. P. Betalainas: semissíntese, capacidade antirradicalar e aplicação como sondas em sistemas biológicos. (Universidade Federal do ABC, 2012).
 106. 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).
 107. Pérez-Lustres, J. L. *et al.* Ultrafast proton transfer to solvent: Molecularity and intermediates from solvation- and diffusion-controlled regimes. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5408–5418 (2007).
 108. Wendel, M. *et al.* Ultrafast internal conversion in neobetanin in comparison to betacyanins. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **332**, 602–610 (2017).
 109. Kimura, Y., Alfano, J. C., Walhout, P. K. & Barbara, P. F. Ultrafast transient absorption spectroscopy of the solvated electron in water. *J. Phys. Chem.* **98**, 3450–3458 (1994).
 110. Malone, R. J., Miller, A. M. & Kohler, B. Singlet Excited-state Lifetimes of Cytosine Derivatives Measured by Femtosecond Transient Absorption. *Photochem. Photobiol.* **77**, 158–164 (2003).
 111. Murov, S. L. & Carmichael, G. L. H. *Handbook of photochemistry*. (CRC Press, 1993).

112. Wendel, M. *et al.* Chemical quenching of singlet oxygen by betanin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **15**, 872–878 (2016).
113. Esteves, L. C. Estudo cinético da hidrólise de betalaínas-modelo. (Universidade de São Paulo, 2016).
114. Nilsson, T. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbrukshögskolans Ann.* **36**, 179–219 (1970).
115. Piattelli, M., Minale, L. & Protà, G. Isolation , Structure and Absolute Configuration of Indicaxanthin. *Tetrahedron* **20**, 2325–2329 (1964).
116. Nara, S. J., Valgimigli, L., Pedulli, G. F. & Pratt, D. A. Tyrosine analogues for probing proton-coupled electron transfer processes in peptides and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 863–872 (2010).
117. Anslyn, E. V. & Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*. (University Science Books, 2006).
118. Strack, D., Vogt, T. & Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247–269 (2003).
119. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 2006).
120. 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).
121. Brynn Hibbert, D. & Thordarson, P. The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis. *Chem. Commun.* **52**, 12792–12805 (2016).
122. Olson, E. J. & Bühlmann, P. Getting more out of a job plot: Determination of reactant to product stoichiometry in cases of displacement reactions and n: N

- complex formation. *J. Org. Chem.* **76**, 8406–8412 (2011).
123. Renny, J. S., Tomasevich, L. L., Tallmadge, E. H. & Collum, D. B. Method of continuous variations: Applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 11998–12013 (2013).
124. Jenkins, A. L. & Murray, G. M. Enhanced Luminescence of Lanthanides: Determination of Europium by Enhanced Luminescence. *J. Chem. Educ.* **75**, 227 (1998).
125. Jones, G. & Vullev, V. I. Medium effects on the stability of terbium(III) complexes with pyridine-2,6-dicarboxylate. *J. Phys. Chem. A* **106**, 8213–8222 (2002).
126. Guerriero, P., Casellato, U., Sitran, S., Vigato, P. A. & Graziani, R. Preparation and properties of lanthanide complexes with pyridine-2,6-dicarboxylic and thiophene-2,5-dicarboxylic acids. Crystal structure of diaqua-bis(dipicolinate)lanthanum(III) tetrahydrate. *Inorganica Chim. Acta* **133**, 337–345 (1987).
127. *CRC Handbook of chemistry and physics*. (CRC Press, 2014).
128. McPhee, J. T., Scott, E., Levinger, N. E. & Van Orden, A. Cy3 in AOT reverse micelles I. Dimer formation revealed through steady-state and time-resolved spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **115**, 9576–9584 (2011).
129. Bayraktutan, T., Meral, K. & Onganer, Y. Photophysical properties of pyronin dyes in reverse micelles of AOT. *J. Lumin.* **145**, 925–929 (2014).
130. Tatikolov, A. S. & Costa, S. M. B. Photophysics and photochemistry of hydrophilic cyanine dyes in normal and reverse micelles. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 211–218 (2002).
131. Zulauf, M. & Eicke, H.-F. Inverted Micelles and Microemulsions in the Ternary

- System H₂O/Aerosol-OT/Isooctane as Studied by Photon Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **83**, 480–486 (1979).
132. Suryawanshi, V. D., Walekar, L. S., Gore, A. H., Anbhule, P. V & Kolekar, G. B. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *J. Pharm. Anal.* **6**, 56–63 (2016).
 133. Patra, S., Santhosh, K., Pabbathi, A. & Samanta, A. Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorescence correlation spectroscopy. *RSC Adv.* **2**, 6079–6086 (2012).
 134. Bhattacharya, B., Nakka, S., Guruprasad, L. & Samanta, A. Interaction of bovine serum albumin with dipolar molecules: fluorescence and molecular docking studies. *J. Phys. Chem. B* **113**, 2143–2150 (2009).
 135. Apadopoulou, A. T. P., Reen, R. E. J. G. & Razier, R. I. A. F. Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin : A Fluorescence Quenching Study. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 158–163 (2005).
 136. Kuznetsova, I. M., Sulatskaya, A. I., Povarova, O. I. & Turoverov, K. K. Reevaluation of ANS binding to human and bovine serum albumins: Key role of equilibrium microdialysis in ligand - receptor binding characterization. *PLoS One* **7**, e40845 (2012).
 137. Ge, S., Kojio, K., Takahara, a & Kajiyama, T. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **9**, 131–150 (1998).
 138. Majorek, K. A. *et al.* Structural and immunologic characterization of bovine , horse , and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–182 (2012).
 139. Chakraborty, T., Chakraborty, I., Moulik, S. P. & Ghosh, S. Physicochemical and conformational studies on BSA - Surfactant interaction in aqueous medium.

- Langmuir* **25**, 3062–3074 (2009).
140. Darzynkiewicz, Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. *Curr. Protoc. Cytom.* **7.2**, 1–9 (2011).
 141. Zembruski, N. C. L., Stache, V., Haefeli, W. E. & Weiss, J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal. Biochem.* **429**, 79–81 (2012).
 142. Usenko, C. Y., Harper, S. L. & Tanguay, R. L. In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. **45**, 1891–1898 (2007).
 143. Wixon, J. Danio rerio , the zebrafish. *Yeast* 225–231 (2000).
 144. Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W. & Peterson, R. E. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicol. Sci.* **86**, 6–19 (2018).
 145. Ton, C., Lin, Y. & Willett, C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* **76**, 553–567 (2006).
 146. Scholz, S., Fischer, S. & Gündel, U. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment — applications beyond acute toxicity testing. 394–404 (2008). doi:10.1007/s11356-008-0018-z
 147. Howe, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498–503 (2013).
 148. OECD guidelines for the testing of chemicals - Fish embryo acute toxicity (FET) test. (2013).
 149. Armarego, W. L. F. & Chai, C. L. L. *Purification of laboratory chemicals*. (Butterworth Heinemann, 2003).
 150. Van Stokkum, I. H. M., Larsen, D. S. & Van Grondelle, R. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1657**, 82–104 (2004).

151. El-Zohry, A., Orthaber, A. & Zietz, B. Isomerization and aggregation of the solar cell dye D149. *J. Phys. Chem. C* **116**, 26144–26153 (2012).
152. Marcus, Y. Recommended methods for the purification of solvents and tests for impurities: 1,2-Ethenediol and 2,2,2-Trifluoroethanol. *Pure Appl. Chem.* **62**, 139–147 (1990).
153. Williams, A. T. R., Winfield, S. A. & Miller, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst* **108**, 1067–1071 (1983).
154. E2 Embryo Media with Methylene Blue. *Zebrafish International Resource Center* **2** (2013). Available at: https://zebrafish.org/documents/protocols/pdf/Fish_Nursery/E2_solution.pdf.

Súmula Curricular

I DADOS PESSOAIS

Nome: Barbara Coelho de Freitas Dörr

Local e data de nascimento: São Paulo – SP, 05 de março de 1991

II EDUCAÇÃO

Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, 2009 – 2013, Bacharel em Farmácia e Bioquímica

III FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Não possui

IV ATIVIDADES ACADÊMICAS

IV.I. Estágios de monitoria acadêmica realizados no Instituto de Química – USP

Período	2º semestre/2014 (Bolsista PAE)
Disciplina	QFL 2343 – Química Orgânica Experimental
Curso de graduação	Bacharelado em Química
Supervisor	Prof. Dr. Josef W. Baader
Período	1º semestre/2014
Disciplina	QFL 0150 – Química Orgânica
Curso de graduação	Bacharelado em Ciências Biomédicas
Supervisor	Prof. Dr. Erick L. Bastos

V PUBLICAÇÕES

V.I. Artigos completos publicados em periódicos

Gonçalves, L. C. P.; Marcato, A. C.; Rodrigues, A. C. B.; Pagano, A. P. E.; Freitas, B. C. de; Machado, C. de O.; Nakashima, K. K.; Esteves, L. C.; Lopes, N. B.; Bastos, E. L. Betalains: from the Colors of Beetroots to the Fluorescence of Flowers. *Rev. Virtual. Quim.* **2014**, 7, p 292-309.

Reis, J. S.; Fernandes, A. B.; Freitas-Dörr, B. C.; Bastos, E. L.; Stefani, H. A. Oxazoline as acceptor moiety for excited-state intramolecular proton transfer. *Tetrahedron* **2018**, 74, p 6866-6872

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

FREITAS, B. C.; RODRIGUES, A. C. B.; OLIVEIRA, C. C. S.; ITRI, R.; CAMARGO, P. H. C.; BASTOS, E. L. Uso de betalainas na fabricação de nanopartículas de ouro. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. **SBQ**, 2014. P.FOT-008.

FREITAS-DÖRR, B. C.; MACHADO, C de O.; DÖRR, F. A.; PINTO, E.; BASTOS, E. L. Design and synthesis of BeetBlue: towards stable betalains. 46th World Chemistry Congress, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo.

MACHADO, C de O; FREITAS-DÖRR, B. C.; RODRIGUES, A. C. B.; PINHEIRO, A. C.; ABDELAH, M.; SÁ, J.; BASTOS, E. L. Structure-photophysical properties relationship of synthetic betalains. 46th World Chemistry Congress, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo.

PIOLI, R. M.; FREITAS-DÖRR, B. C.; PINHEIRO, A. C.; RODRIGUES, A. C. B.; FERNANDES, A. B.; BAADER, W. J.; BASTOS, E. L. Substituent effects on the rate of hydrolysis and photophysical properties of phenylbetalains. 46th World Chemistry Congress, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo.

TEIXEIRA, T. S.; WATTS, C.; FREITAS-DÖRR, B. C.; ESTEVES, L. C.; GONÇALVES, L. C. P.; BASTOS, E. L. Effect of the concentration of acid catalyst and nucleophile on the rate of betalain formation. 46th World Chemistry Congress, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo.

VI OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

VI.I. Estágios de pesquisa realizados durante o doutorado

Janeiro/2018 a Fevereiro/2018: *Ångström Laboratoriet*, Universidade de Uppsala (Suécia) sob orientação do Prof. Dr. Jacinto Sá.

VI.II. Curso

Julho/2015: 6th Summer Research Program in Tsukuba, Universidade de Tsukuba (Japão).

7 Anexos

7.1	Espectro de ^1H – RMN (800 MHz) de BeetBlue	145
7.2	Espectro de ^{13}C – RMN (800 MHz) de BeetBlue	146
7.3	Espectro de ^1H , ^1H – NOESY de BeetBlue	147
7.4	Espectro de ^1H , ^{13}C -HMQC de BeetBlue	148
7.5	Espectro de ^1H , ^{13}C -HMBC	149
7.6	Coeficiente de atenuação molar (ϵ).....	150
7.7	Absorção transiente resolvida no tempo em escala de picossegundo	151
7.8	Absorção transiente resolvida no tempo em escala de micro e nanossegundo 152	
7.9	Cinéticas de decomposição de BeetBlue em Tampão Fosfato 10 mM pH 2 – 10, 60 °C	153
7.10	Monitoramento do decaimento de BeetBlue em Tampão Fosfato 10 mM pH 2 – 10, 60 °C	154
7.11	Cinéticas de decomposição de BeetBlue em Tampão Fosfato 10 – 500 mmol L^{-1} , pH 6,2, 60 °C.....	155
7.12	Monitoramento do decaimento de BeetBlue em Tampão Fosfato 10 – 500 mmol L^{-1} , pH 6,2, 60 °C	156
7.13	Cinéticas de decomposição de BeetBlue em Tampão Acetato 10 – 500 mM, pH 5,8, 60 °C	157
7.14	Monitoramento do decaimento de BeetBlue em Tampão Acetato 10 – 500 mM, pH 5,8, 60 °C.....	158

7.1 Espectro de ^1H – RMN (800 MHz) de BeetBlue

Figura 37 Espectro de ^1H RMN (800 Hz) de **BeetBlue** em D_2O a 15 °C. Foram utilizadas a sequência de pulso *zgpr* para o ^1H que presatura o sinal da $\text{H}_2\text{O}/\text{HOD}$ residuais em 4,79 ppm.

7.2 Espectro de ^{13}C – RMN (800 MHz) de BeetBlue

Figura 38 Espectro ^{13}C RMN (200 Hz) de **BeetBlue** em D_2O a 15 °C. Para aquisição do espectro de ^{13}C foi usada a sequência de pulso *zgpgspzr.v1.cga*⁹⁷. O espectro de ^{13}C foi aprimorado por apodização do decaimento livre de indução (FID) e atribuído em conjunto com outros experimentos e predição com o auxílio do algoritmo implementado no sistema online nmrdB.

7.3 Espectro de ^1H , ^1H – NOESY de BeetBlue

Figura 39 Espectro de ^1H , ^1H -NOESY da amostra **BeetBlue**, obtido em D_2O a 15 °C empregando-se a sequência de pulsos *noesyegpph* que suprime o sinal de $\text{H}_2\text{O}/\text{HOD}$ residuais⁹⁹.

7.4 Espectro de ^1H , ^{13}C -HMQC de BeetBlue

Figura 40 Espectro de ^1H , ^{13}C -HMQC (800 Hz para ^1H e 200 Hz para ^{13}C) da amostra **BeetBlue**, obtido em D_2O a 15 °C, empregando-se a sequência de pulsos *hmqcgpqf*.

7.5 Espectro de ^1H , ^{13}C -HMBC

Figura 41 Espectro de ^1H , ^{13}C -HMBC (800 Hz para ^1H e 200 Hz para ^{13}C) da amostra **BeetBlue**, obtido em D_2O a 15 °C empregando-se a sequência de pulsos *hmbcgplpndqf*.

7.6 Coeficiente de atenuação molar (ϵ)

Figura 42 (a) Perfil cinético de formação de **BeetBlue** em água acidificada com TFA, 25 °C e (b) monitoramento do decaimento de **HBt** em 428 nm e surgimento da banda de **BeetBlue** em 582 nm.

7.7 Absorção transiente resolvida no tempo em escala de picossegundo

Figura 43 (a) Espectro de absorção transiente resolvida em escala de picossegundo no tempo de **BeetBlue** em solução. $[\text{BeetBlue}] = 1 \times 10^{-5}$; pH = 5. (b) Ajuste não linear da variação da absorção em função do tempo com função monoexponencial ($\lambda^{\text{Abs}} = 466,6 \text{ nm}/579,94 \text{ nm}/630,18 \text{ nm}$).

7.8 Absorção transiente resolvida no tempo em escala de micro e nanossegundo

Figura 44 Espectros de absorção transiente resolvidos no tempo de **BeetBlue** em solução aerada e saturada com nitrogênio. $[\text{BeetBlue}] = 1 \cdot 10^{-5}$; pH = 5 e decaimento das bandas em 550 nm e 620 nm.

7.9 Cinéticas de decomposição de BeetBlue em Tampão Fosfato 10 mM pH 2 – 10, 60 °C

Figura 45 Perfis cinéticos de decomposição de **BeetBlue** em Tampão Fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 2 -10, a 60 °C.

7.10 Monitoramento do decaimento de BeetBlue em Tampão Fosfato 10 mM pH 2 – 10, 60 °C

Figura 46 Monitoramento do decaimento da cinética em seu $\lambda_{m\acute{a}x}$ em Tampão Fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 2 -10, a 60 °C.

7.11 Cinéticas de decomposição de BeetBlue em Tampão Fosfato 10 – 500 mmol L⁻¹, pH 6,2, 60 °C

Figura 47 Perfis cinéticos de decomposição de **BeetBlue** em Tampão Fosfato pH 6,2 (10 - 500 mmol L⁻¹), a 60 °C.

7.12 Monitoramento do decaimento de BeetBlue em Tampão Fosfato 10 – 500 mmol L⁻¹, pH 6,2, 60 °C

Figura 48 Monitoramento do decaimento das cinéticas de decomposição de **BeetBlue** em seu $\lambda_{m\acute{a}x}$ em Tampão Fosfato pH 6,2 (10 - 500 mmol L⁻¹), a 60 °C.

7.13 Cinéticas de decomposição de BeetBlue em Tampão Acetato 10 – 500 mM, pH 5,8, 60 °C

Figura 49 Perfis cinéticos de decomposição de **BeetBlue** em Tampão Acetato pH 5,8 (10 - 500 mmol L⁻¹), a 60 °C.

7.14 Monitoramento do decaimento de BeetBlue em Tampão Acetato 10 – 500 mM, pH 5,8, 60 °C

Figura 50 Monitoramento do decaimento das cinéticas de decomposição e BeetBlue em seu $\lambda_{\text{máx}}$ em Tampão Acetato pH 5,8 (10 - 500 mmol L⁻¹), a 60 °C.