

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

RENAN RODINI MATTIOLI

**Efeito da *N*-metilação sobre a estabilidade hidrolítica e
fluorescência de sondas betalaínicas**

Versão corrigida da Dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

12/11/2018

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

M444e Mattioli, Renan Rodini
 Efeito da *N*-metilação sobre a estabilidade
 hidrolítica e fluorescência de sondas betalainicas /
 Renan Rodini Mattioli. - São Paulo, 2018.
 119 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.

Orientador: Bastos, Erick Leite

1. Fluorescência: Físico-Química. I. T. II.
Bastos, Erick Leite, orientador.

RENAN RODINI MATTIOLI

**Efeito da *N*-metilação sobre a estabilidade hidrolítica e
fluorescência de sondas betalaínicas**

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

Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo

2018

Dedico este trabalho a meus pais

Roseli Rodini Mattioli e Rubens Mattioli (*in memoriam*).

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Erick Leite Bastos, pela oportunidade de ter trabalhado em seu grupo de pesquisa, pela confiança adquirida com o tempo e pelos seus esforços em formar um mestre em química digno.

Ao meu primeiro orientador do IQ-USP, Prof. Luiz Fernando da Silva Júnior (*in memoriam*), pela oportunidade de ter iniciado minhas atividades acadêmicas no mestrado, embora o destino nos tenha permitido apenas um breve relacionamento.

A todos os meus colegas do IQ-USP, que me permitiram não só o aprendizado em química quanto o aprendizado humano com muito carinho, amor, descontração e respeito.

Ao Dr. Stefan Andreev Dochev pela grande ajuda e pelos ensinamentos em sua breve visita ao laboratório durante meu mestrado.

A todos os meus colegas e à comunidade do IQ-UFRJ, local onde eu me graduei como químico. Apesar da distância, vocês me influenciaram nesta curta e passageira jornada que é o mestrado.

Aos meus pais por todo suporte possível que um ser humano é capaz de fornecer.

A todos os outros colegas e professores que direta ou indiretamente me influenciaram e fizeram parte da minha vida acadêmica.

E, não menos importante, aos órgãos de fomento, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro por intermédio das bolsas de mestrado de, respectivamente, processo nº 146934/2017-2, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e processo nº 2017/20133-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original.”*

Sr. Oliver Wendell Holmes, em
The Autocrat of the Breakfast Table

Resumo

MATTIOLI, R. R. **Efeito da *N*-metilação sobre a estabilidade hidrolítica e fluorescência de sondas betalaínicas**. 2018. 119 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Betalaínas são pigmentos vegetais encontrados em algumas espécies de flores fluorescentes. Betalaínas derivadas de aminocumarinas primárias (cBeets) e carboestiril 124 (csBeet124) foram desenvolvidas em nosso grupo de pesquisa para serem usadas como sondas fluorescentes em aplicações de biologia celular. Esta dissertação de mestrado mostra o efeito da metilação das porções imínicas das cBeets e da csBeet124 sobre as suas cinéticas de hidrólise e propriedades fotofísicas. Os quatro derivados *N*-metilados foram semissintetizados a partir do acomplamento entre o ácido betalâmico e as amins secundárias em rendimentos entre 15 – 60%. A *N*-metilação na porção imínica das betalaínas resultou em um aumento da estabilidade hidrolítica de cerca de 20 vezes, sem afetar drasticamente os perfis de absorção e fluorescência ou os rendimentos quânticos de fluorescência. Os resultados obtidos são importantes na ampliação do conhecimento acerca das relações entre a estrutura e as propriedades de betalaínas em solução aquosa.

Palavras-chave – betalaínas, cumarinas, carboestiril 124, fluorescência, estabilidade hidrolítica.

Abstract

MATTIOLI, R. R. Effect of *N*-methylation over the hydrolytic stability and fluorescence of betalainic probes. 2018. 119 p. Dissertation (Master's degree) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Betalains are plant pigments found in some species of fluorescent flowers. Betalains derived from primary aminocoumarins (cBeets) and carbostyryl 124 (csBeets124) were developed in our research group to be used as fluorescent cell probes. This dissertation shows the effect of the methylation at the imine portion from cBeets and csBeet124 on their hydrolytic kinetics and photophysical properties. The four *N*-methylated derivatives were semisynthesized from the coupling between betalamic acid and the secondary amines within 15 – 60% yields. *N*-methylation at the iminic portion of betalains resulted in a hydrolytic stability increase of about 20-fold without affecting drastically their absorption and fluorescence profiles or fluorescence quantum yield. The results obtained are important to increase the knowledge about the relationships between structure and properties of betalains in aqueous solution.

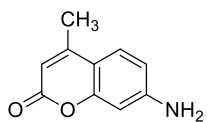
Keywords – betalains, coumarins, carbostyryl 124, fluorescence, hydrolytic stability.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

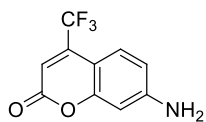
δ	Deslocamento químico
$\Delta\nu$	Deslocamento de Stokes
$\Delta m/z$	Diferença entre razões massa-carga
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ^{abs}	Comprimento de onda máximo de absorção
λ^{em}	Comprimento de onda máximo de emissão
λ_{EM}	Comprimento de onda de emissão
λ_{EX}	Comprimento de onda de excitação
Φ_{FI}	Rendimento quântico de fluorescência
$[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{exp}}$	Íon <i>quasi</i> -molecular experimental
$[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{teo}}$	Íon <i>quasi</i> -molecular teórico
$[\text{M}]^+_{\text{exp}}$	Íon molecular experimental
$[\text{M}]^+_{\text{teo}}$	Íon molecular teórico
c120	Cumarina 120, 7-amino-4-metilcumarina
c151	Cumarina 151, 7-amino-4-(trifluorometil)cumarina
cbz	6-Amino-3,4-benzocumarina
cs124	Carboestiril 124, 7-amino-4-metilcarboestiril
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dqi	Duplo quarteto invertido

EM	Espectrometria de Massas
f^{em}	Fenda de emissão
f^{ex}	Fenda de excitação
HBt	Ácido betalâmico
k_{obs}	Constante cinética observada
m	Multiplete
$m\sigma$	Valor de mSigma
m/z	Razão massa-carga
<i>N</i> -Me c120	4-Metil-7-(metilamino)cumarina
<i>N</i> -Me c151	7-(Metilamino)-4-(trifluorometil)cumarina
<i>N</i> -Me cbz	3,4-Benzo-6-(metilamino)cumarina
<i>N</i> -Me cs124	4-Metil-7-(metilamino)carboestiril
q	Quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
t	Triplete
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida

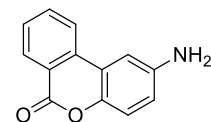
Lista de estruturas



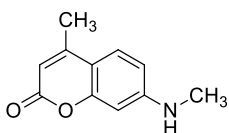
7-amino-4-metilcumarina



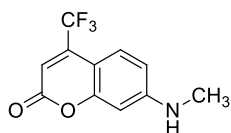
7-amino-4-(trifluorometil)cumarina



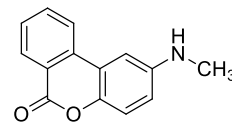
6-amino-3,4-benzocumarina



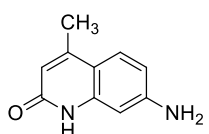
4-metil-7-(metilamino)cumarina



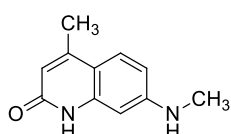
7-(metilamino)-4-(trifluorometil)cumarina



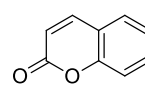
3,4-benzo-6-(metilamino)cumarina



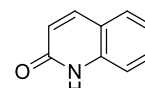
7-amino-4-metilcarboestiril



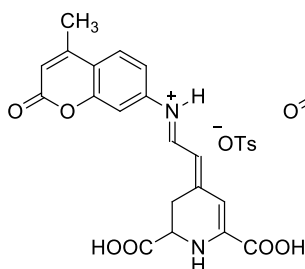
4-metil-7-(metilamino)carboestiril



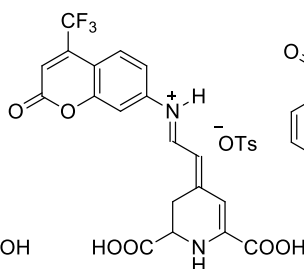
cumarina



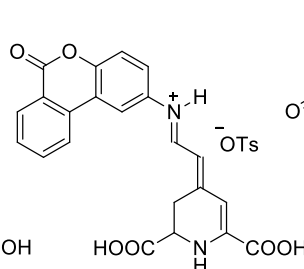
carboestiril



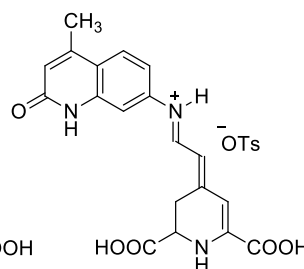
cBeet120



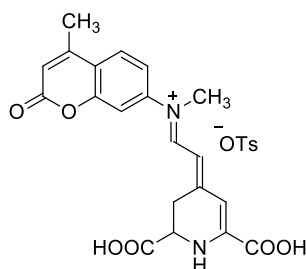
cBeet151



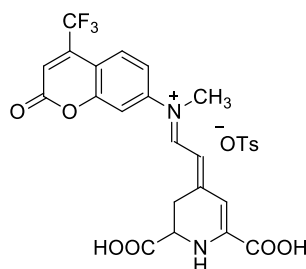
cbzBeet



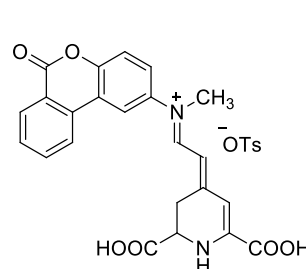
csBeet124



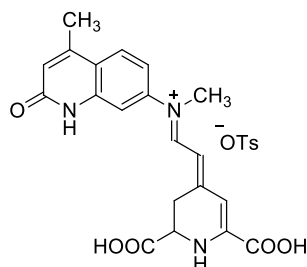
N-Me cBeet120



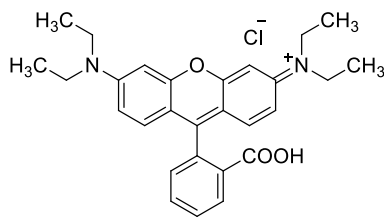
N-Me cBeet151



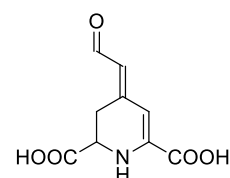
N-Me cbzBeet



N-Me csBeet124



rodamina B



ácido betalâmico

Sumário

Agradecimentos.....	i
Resumo	v
Abstract.....	vi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	vii
Lista de estruturas	ix
1. Introdução	13
1.1. Cumarina e carboestiril.....	14
1.2. Betalaínas	17
1.3. Hidrólise de iminas e sais de imínio e persistência de betalaínas em água.....	21
2. Objetivos	25
2.1. Objetivos específicos.....	25
3. Resultados e discussão.....	27
3.1. <i>N</i> -metilação de cumarinas e carboestiril 124	30
3.2. Síntese e caracterização estrutural das betalaínas	42
3.3. Cinéticas de decomposição e hidrólise	56
3.4. Caracterização fotofísica das betalaínas.....	61
3.5. Comparação de propriedades entre betalaínas	64
4. Conclusões.....	72
5. Parte Experimental	73
5.1. Materiais.....	73
5.2. Métodos.....	75
6. Referências	84
7. Súmula Curricular.....	92

8. Anexos.....	96
8.1. 4-metil-7-(metilamino)cumarina	96
8.2. 7-(metilamino)-4-(trifluorometil)cumarina.....	100
8.3. 3,4-benzo-6-(metilamino)cumarina	104
8.4. 4-metil-7-(metilamino)carboestiril	108
8.5. <i>N</i> -Me cBeet120	112
8.6. <i>N</i> -Me cBeet151	114
8.7. <i>N</i> -Me cbzBeet.....	116
8.8. <i>N</i> -Me csBeet124.....	118

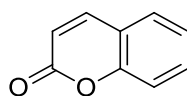
1. Introdução

Entender a natureza pode ter sido a motivação que levou ao desenvolvimento do método científico. A partir desta premissa, pode-se concluir que, do ponto de vista filosófico, a ciência deriva da natureza e o contato entre ambas depende da obtenção e análise de informação. Deve haver, então, uma infinidade de informações ocultas na vastidão da natureza que ainda não foi descoberta pela ciência, mas que pode ser obtida por pessoas curiosas. Cientistas constantemente criam hipóteses a partir de suas observações e as testam através de experimentos. A consequência deste processo é a conversão de observações do mundo que nos cerca em informação científica. Avanços na ciência, em geral, se originam do entendimento das informações provenientes da natureza e na capacidade humana em transformá-la, empregando processos químicos, físicos e biológicos, para o benefício da sociedade.

Na natureza há muitos compostos fluorescentes, ou seja, compostos que emitem luz a partir de uma entidade eletronicamente excitada com retenção de multiplicidade de spin.¹ A literatura científica é repleta de exemplos de materiais fluorescentes em organismos vivos.² Exemplos incluem muitas moléculas produzidas por organismos vivos, *viz.*, produtos naturais, como por exemplo o quinino, as cumarinas e as betalaínas. O estudo da química de produtos naturais tem sido fundamental para o desenvolvimento tecnológico humano e baseia-se, entre outros processos, em extração, síntese, no estabelecimento de relações estrutura-propriedade e no estudo de atividade biológica.³⁻⁶ A fluorescência é um fenômeno de sinalização importante sob o ponto de vista de interação entre espécies e que permite “marcar” espécies e ambientes de interesse de forma conveniente.⁷

1.1. Cumarina e carboestiril

Cumarina é um produto natural da classe das benzopironas que apresenta um odor forte de baunilha (Esquema 1). Trata-se de um composto aromático que se apresenta como um sólido branco volátil (p.f.: 68 – 70 °C) e que pode ser encontrado em plantas (*Asperula* e *Melilotus officinalis*) e óleos essenciais (lavanda e canela) – Figura 1. Cumarina é usada como agente fixador e intensificador de odor em perfumes, além de ser adicionada em sabonetes, cremes dentais e tabaco.⁸ Cumarinas são tóxicas, porém seu uso em alimentos e bebidas só provocaria danos em um consumo de uma enorme quantidade. Além de suas diversas aplicações em itens de higiene e de consumo, a cumarina é alvo de contínuas investigações de interesse biológico anti-HIV, anti-tuberculose, anti-influenza, doença de Alzheimer, anti-inflamatório, antimicrobiana, entre outras.⁹ Aliado às suas aplicações em sistemas biológicos, a cumarina possui uma outra interessante propriedade fotofísica, a fluorescência. O rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FI}), *i.e.*, a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, de sua solução em diclorometano é igual a 0,69.¹⁰ Infelizmente, a cumarina é pouco solúvel (0,17 g/100 ml) e seu rendimento quântico de fluorescência é drasticamente inibido pela alta polaridade da água.¹¹



Esquema 1. Estrutura da cumarina.

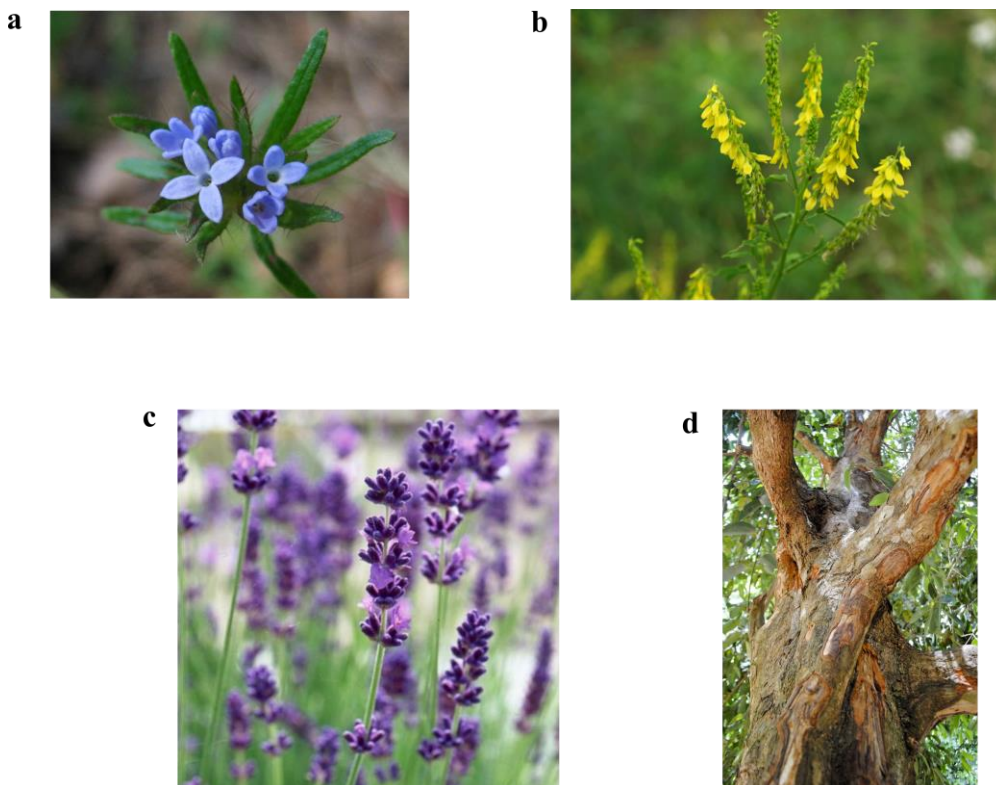
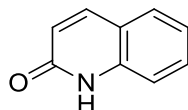


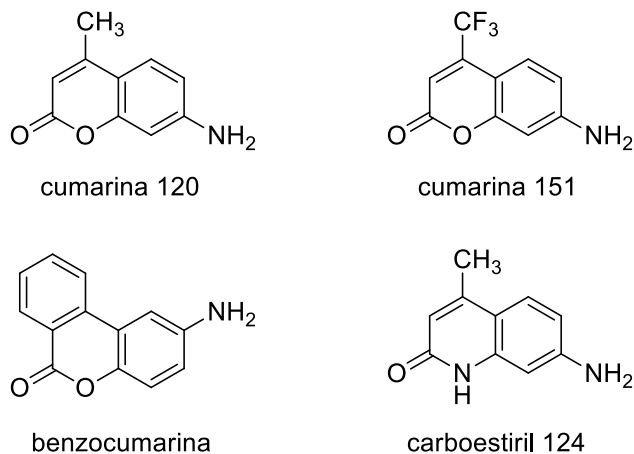
Figura 1. Cumarina pode ser encontrada em plantas como (a) *Asperula arvensis*, (b) *Melilotus officinalis* e (c) lavanda e em troncos de (d) caneleira.

O carboestiril (Esquema 2), ou 2-quinolona, é um análogo nitrogenado não natural da cumarina – também tóxico – que foi sintetizado pela primeira vez em 1852 pelo químico italiano Luigi Chiozza ao reagir o ácido *trans*-2-nitrocínâmico com sulfeto de amônio aquoso, em refluxo.¹² Apesar do carboestiril não ser encontrado na natureza, esta estrutura é um isómero de peptídios com pontes lactâmicas e, portanto, tem aplicação farmacológica muito relevante.¹³ Curiosamente, muitas das propriedades de cumarinas e carboestiril são diferentes. Por exemplo, carboestiril é um sólido azul escuro com ponto de fusão muito mais alto do que seu análogo oxigenado (p.f.: 198 – 199 °C).^{14,15} Além disso, o carboestiril tem rendimento quântico de fluorescência em clorofórmio igual a 0,032¹⁶, ou seja, é muito menos fluorescente que a cumarina.



Esquema 2. Estrutura do carboestiril.

Cumarina e carboestiril são estruturas-base para compostos fluorescentes muito conhecidos. Grupos auxocrômicos foram usados para aumentar o caráter de transferência de carga nestas moléculas, em especial grupos doadores de elétron conjugados aos carbonos elétron-deficientes das porções lactona e lactama da cumarina e do carboestiril, respectivamente. Por exemplo, percebeu-se que grupos NR_1R_2 e OR_1 ($R_1, R_2 = H$, alquil) introduzidos na posição 7 destes compostos aumentavam o rendimento quântico de fluorescência dos derivados em relação às estruturas-base.¹⁷ Grupos atraentes de elétron na posição 4, *e.g.*, CF_3 , favorecem este efeito, devido ao aumento do caráter de transferência de carga nestas moléculas. Muitas cumarinas e carboestiril fazem parte da ampla lista de corantes de *lasers*, que também inclui rodaminas e fluoresceínas.¹⁸ Alguns exemplos de cumarinas muito fluorescentes utilizadas como corantes de *lasers* são as cumarinas 120 e 151 (Esquema 3).¹⁹ Assim como as cumarinas 120 e 151, outras também possuem seu perfil de fluorescência aprimorado com a introdução de um grupo amino na estrutura-base da cumarina, como benzocumarina (6-amino-3,4-benzocumarina), e na estrutura-base do carboestiril, como o carboestiril 124 (Esquema 3).



Esquema 3. Estrutura de alguns corantes de *lasers*.

1.2. Betalaínas

As betalaínas são uma classe de pigmentos naturais nitrogenados, solúveis em água e atóxicos, que podem ser encontrados em plantas e fungos (Figura 2, Esquema 4).^{2,20-25}

As pétalas de variedades amarelas de flores pigmentadas por betalaínas, e.g., *Mirabilis jalapa* e *Portulaca grandiflora*, são fluorescentes, embora o papel deste fenômeno na natureza ainda seja desconhecido.^{26,27} A indicaxantina possui um valor de Φ_{Fl} igual a 0,004 em solução aquosa,² valor que dificilmente explica o comportamento de betalaínas fluorescentes em meio celular.

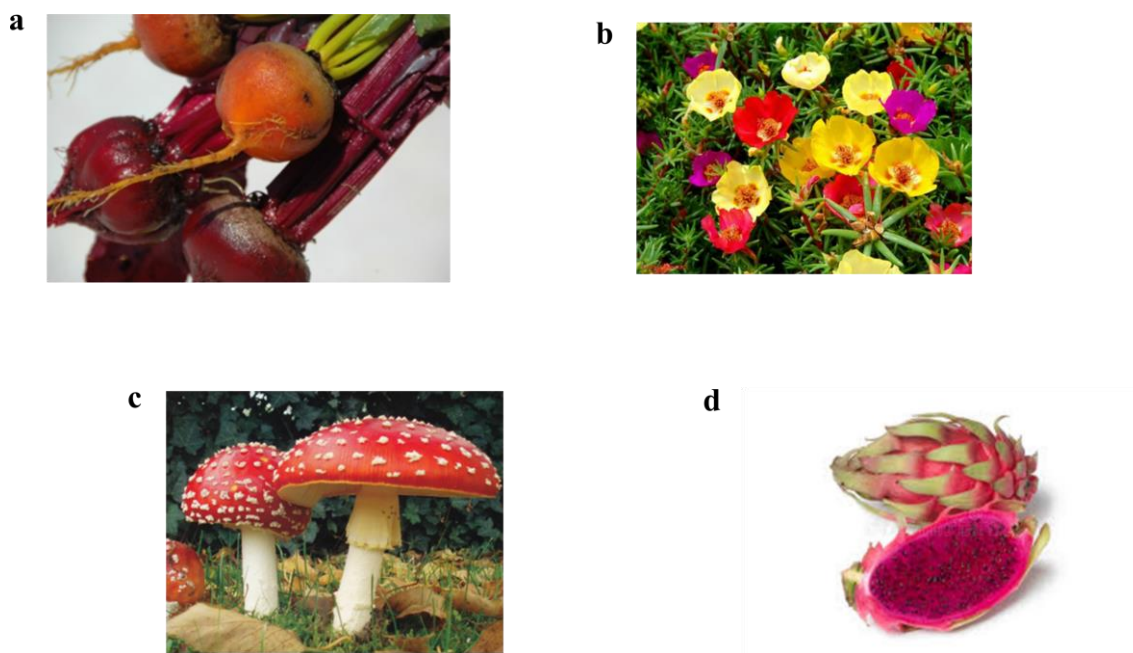
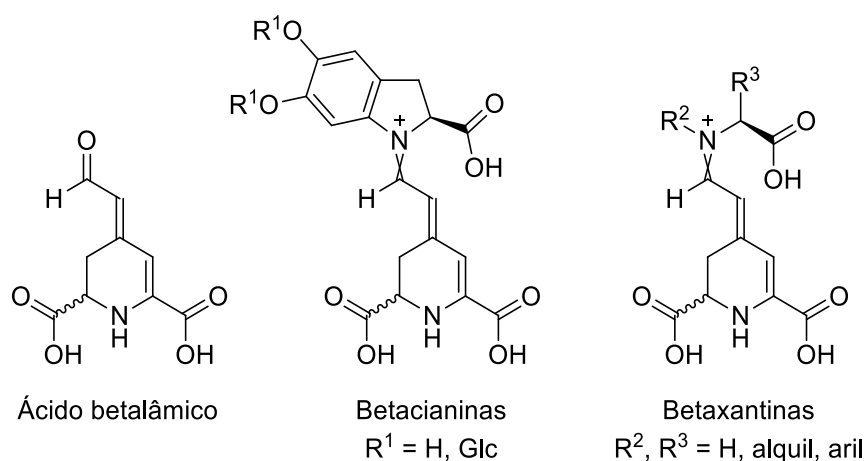


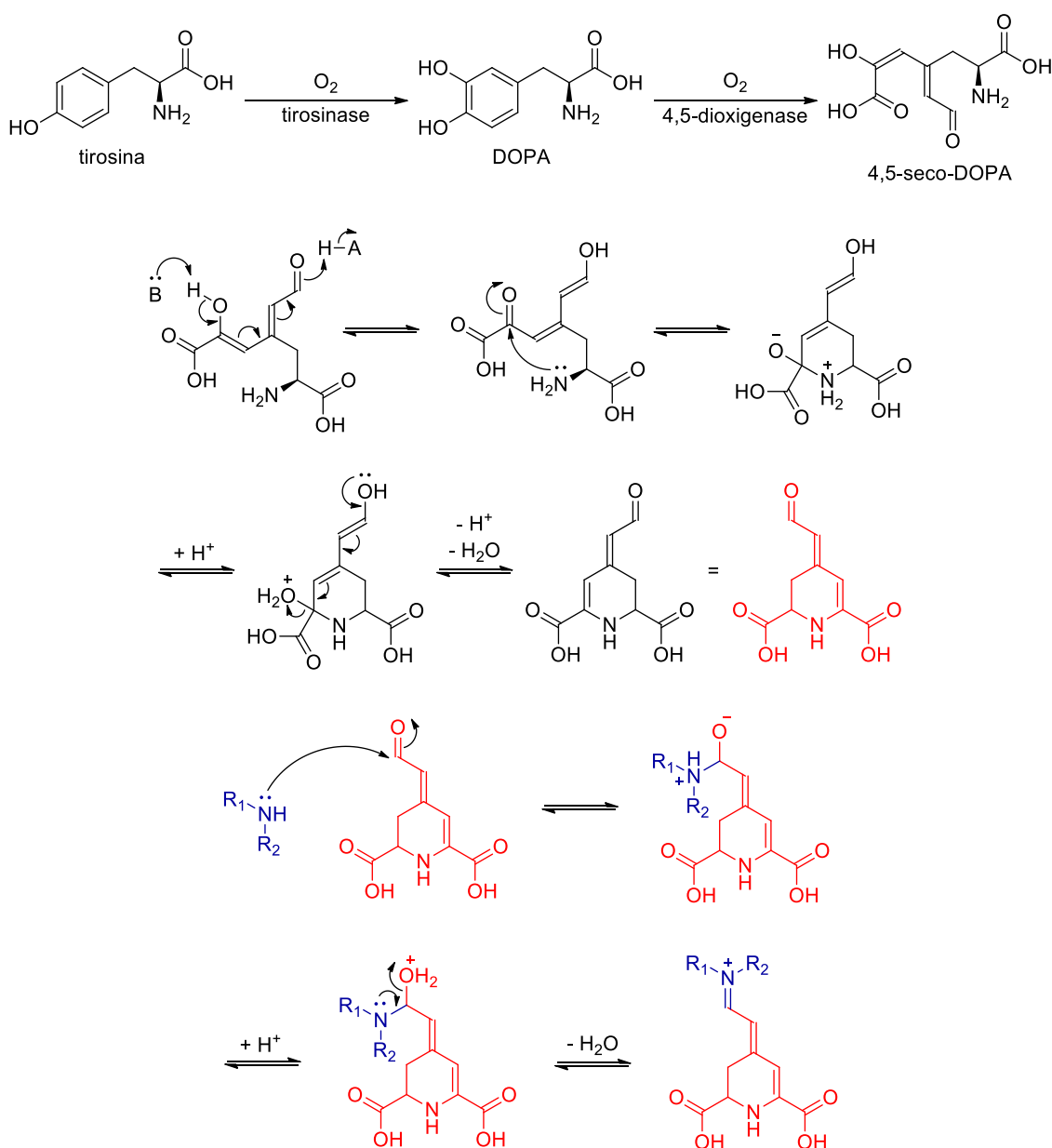
Figura 2. Betaláínas naturais podem ser encontradas em (a) beterrabas roxa e amarela, (b) onze-horas, (c) agário-das-moscas e (d) pitaya rosa.



Esquema 4. Estrutura do ácido betalâmico e estruturas gerais de betacianinas e betaxantinas. O acoplamento aldímico entre o ácido betalâmico e aminoácidos não é estereosseletivo. Quando a configuração absoluta do carbono assimétrico do anel 1,2,3,4-tetrahidropiridínico é (*R*), as betaláínas recebem o prefixo *iso* no nome.

A biossíntese das betaláínas se inicia com a oxidação no anel aromático da L-tirosina a L-DOPA. Em seguida, a clivagem oxidativa do anel aromático da L-DOPA catalisada por uma dioxigenase na presença de oxigênio forma a 4,5-seco-DOPA cuja ciclização leva ao ácido betalâmico, o precursor de todas as betaláínas (Esquema 5). Betacianinas têm cor vermelho-violeta são biossintetizadas a partir do acoplamento espontâneo do

ácido betalâmico com ciclo-3,4-dihidróxifenilalanina (*ciclo-DOPA* ou leucodopacromo) glicosilada ou não.²⁸ Já as betaxantinas, são caracterizadas pela coloração amarela e podem ser obtidas pela conjugação do ácido betalâmico com outros aminoácidos (Esquema 4).^{21,29-31}

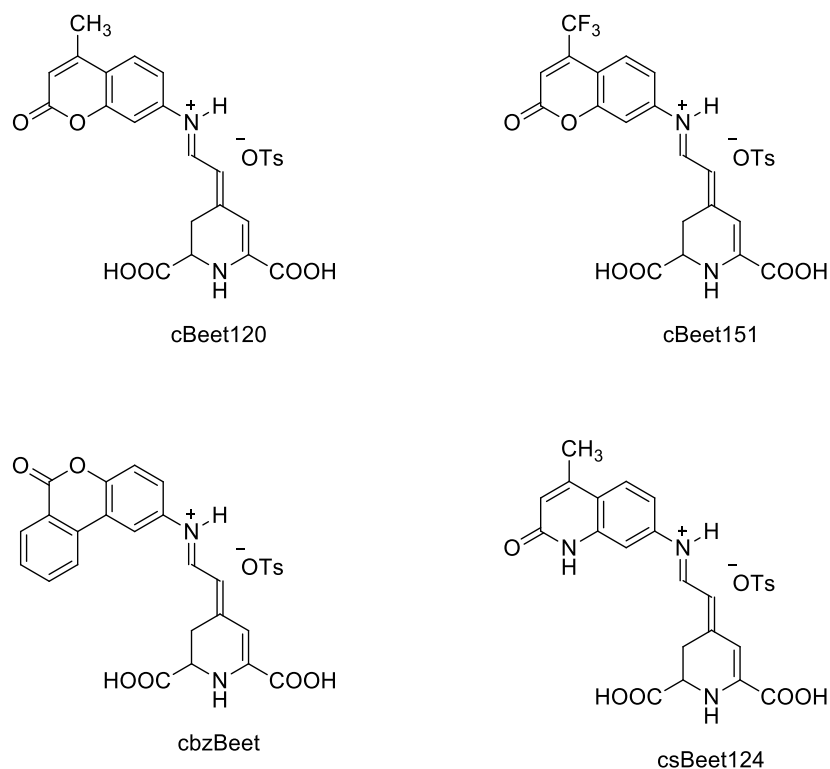


Esquema 5. Esquema mecanístico de intermediários plausível para a biossíntese do ácido betalâmico (em vermelho) e para o acoplamento com uma amina genérica (em azul).

Betalaínas não naturais podem ser semissintetizadas a partir de aminas que não são encontradas em organismos que realizam a biossíntese do ácido betalâmico.^{30,32} Em meio

aquoso ou acetato de etila e na presença de um catalisador ácido, o ácido betalâmico participa de um acoplamento aldimínico que leva a betalaínas com propriedades diferentes daquelas encontradas na natureza.³³⁻³⁵ Com o intuito de aumentar a fluorescência de betalaínas naturais, betalaínas não naturais foram semissintetizadas no grupo de pesquisa a partir de derivados fluorescentes de cumarina e carboestiril, originando as betalaínas chamadas cBeets e a csBeet124 (Esquema 6).³⁶ Estas betalaínas são pouco fluorescentes em solução aquosa ($\Phi_{FL} < 0,02$) e sua meia-vida em água pura varia entre 2 e 4 h, características que – *a priori* – limitariam a aplicação destes compostos como sondas fluorescentes.^{7,33} Contudo, a fluorescência destes compostos é muito sensível à viscosidade e à polaridade do meio, eles atravessam a membrana de células de eritrócitos, *Plasmodium* spp. e de diversas linhagens de células animais imortalizadas, e apresentam alta seção de choque para absorção de dois fótons (*ca.* 300 GM) na região do infravermelho próximo, tornando estes compostos excelentes modelos para desenvolvimento de novos fluoróforos para aplicações em biologia celular.^{7,33,36}

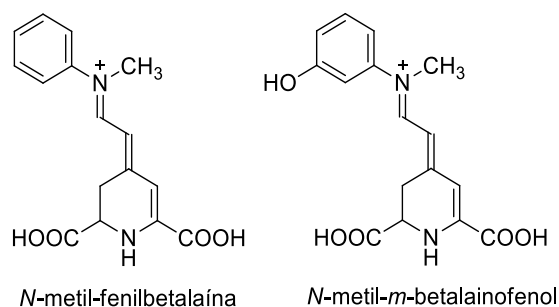
Uma sonda fluorescente, para aplicação em sistemas biológicos, é constituída basicamente por duas características em sua estrutura: (i) uma funcionalidade que permita a sua interação/ligação com biomoléculas e (ii) um grupo funcional fluorescente, o qual é responsável pela emissão de luz. A marcação e identificação empregando-se sondas fluorescentes se estabeleceu como padrão em muitas aplicações na bioquímica e sua crescente utilização é consequência de sua sensibilidade e versatilidade.³⁷ A cBeet120 (Esquema 6), por sua vez, atende aos dois requisitos básicos de uma sonda fluorescente. Seus dois grupos carboxílicos desprotonados em água tornam a sonda carregada negativamente e favorecem sua penetração celular através de canais aniônicos. Seu grupo funcional anexado ao nitrogênio imínico modula as características de emissão de luz.⁷



Esquema 6. Estruturas das betalainas cBeets e csBeet124.

1.3. Hidrólise de iminas e sais de imínio e persistência de betalainas em água

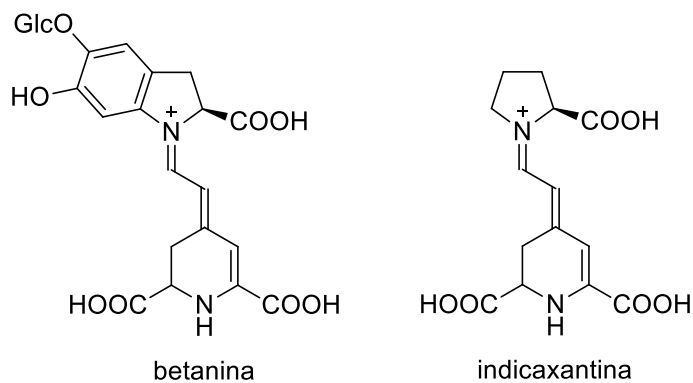
Dois betalainas *N*-metiladas na porção imínica (*N*-metil-fenilbetalaina e *N*-metil-*m*-betalainofenol, Esquema 7) semissintetizadas no grupo de pesquisa foram comparadas com suas análogas não metiladas (fenilbetalaina e *m*-betalainofenol).³⁸ Observou-se que, em água pura a 25 °C, a metilação aumentava os tempos de meia-vida das betalainas metiladas em cerca de 20 vezes, mas diminuía pela metade os rendimentos quânticos de fluorescência.³⁸ Desta forma, a *N*-metilação pode contribuir para a obtenção de betalainas com maior estabilidade hidrolítica.



Esquema 7. Estruturas das *N*-metil-fenilbetalaína e *N*-metil-*m*-betalainofenol.

Do ponto de vista estrutural, betalaínas são iminas ou sais de imínio e, portanto, a hidrólise é sua principal via de decomposição, embora outras formas de decomposição, como oxidação e descarboxilação, têm sido relatadas.^{36,38-41} Tanto a hidrólise da porção aldimínica quanto do anel 2-piperideínico são possíveis, justificando em parte a baixa persistência em água das betalaínas.^{36,39}

Betanina e indicaxantina (Esquema 8) têm tempos de meia-vida em água pura a 25 °C de 996 e 130 h, respectivamente.⁴² Este resultado não é facilmente racionalizado considerando-se as estruturas dos dois compostos, que são similares. A presença da porção catecol na betanina pode estabilizar a carga positiva da posição imínica diminuindo a eletrofilicidade do carbono aldimínico. Ainda, a presença de uma glicose na porção *ciclo*-DOPA pode diminuir a atividade de água, aumentando a persistência da betanina em comparação com a indicaxantina.



Esquema 8. Estruturas das betanina e indicaxantina.

Quando comparadas às *N*-metil-fenilbetalaína e *N*-metil-*m*-betalainofenol, cujos tempos de meia-vida são 67 e 97 h, respectivamente,³⁸ conclui-se que betalaínas naturais são muito mais estáveis frente a hidrólise. Apesar disso, os derivados não metilados das betalaínas não naturais têm tempos de vida muito mais curtos, ambos 4 h, o que só faz sentido se o pK_{aH} das porções imínicas for alto o suficiente para inferir a presença de carga positiva nas betalaínas naturais derivadas de aminas primárias.^{36,38}

2. Objetivos

Semissintetizar quatro *N*-metil betalaínas não naturais e determinar o efeito da metila sobre a sua estabilidade hidrolítica e propriedades fotofísicas.

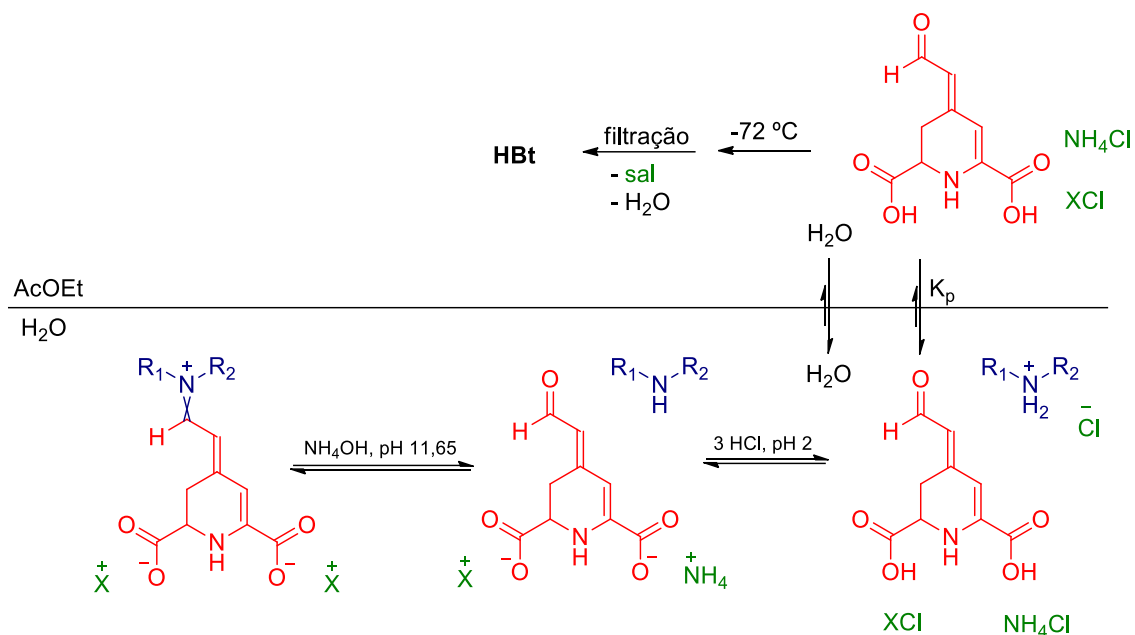
2.1. Objetivos específicos

- i. medir o tempo de meia-vida e o rendimento quântico de fluorescência das quatro novas betalaínas em H₂O a 25 °C;
- ii. comparar e racionalizar as propriedades hidrolíticas e fotofísicas das betalaínas semissintetizadas com suas análogas não metiladas.

3. Resultados e discussão

Betalaínas reagem com DMSO, são insolúveis ou reagem na grande maioria dos solventes orgânicos (*e.g.*, CH₂Cl₂, THF, acetona, EtOH, MeOH, dentre muitos outros), são sensíveis à temperatura e possuem solubilidade limitada em H₂O.⁴² Além de betalaínas sofrerem hidrólise em H₂O, uma tentativa de *N*-metilação em meio aquoso torna-se uma tarefa complexa, uma vez que as betalaínas possuem diversos centros nucleofílicos que podem reagir com agentes metilantes. Uma abordagem envolvendo grupos protetores pode contornar esta adversidade, porém a introdução de mais etapas de proteção e desproteção torna esta metodologia pouco atraente, uma vez que reações envolvendo betalaínas possuem, majoritariamente, baixos rendimentos.^{28,35}

A obtenção de betalaínas metiladas no nitrogênio imínico torna-se uma abordagem simplificada quando se realiza o acoplamento aldimínico entre o ácido betalâmico e a amina secundária adequada.^{29,36,38,43,44} O ácido betalâmico pode ser sintetizado, porém sua rota sintética total envolve múltiplas etapas com baixos rendimentos.⁴⁵ Alternativamente, o ácido betalâmico pode ser obtido a partir de hidrólise alcalina do suco de beterraba, seguido de uma extração com AcOEt da fase aquosa acidificada, conforme ilustrado no Esquema 9.^{28,36,38,39,43}



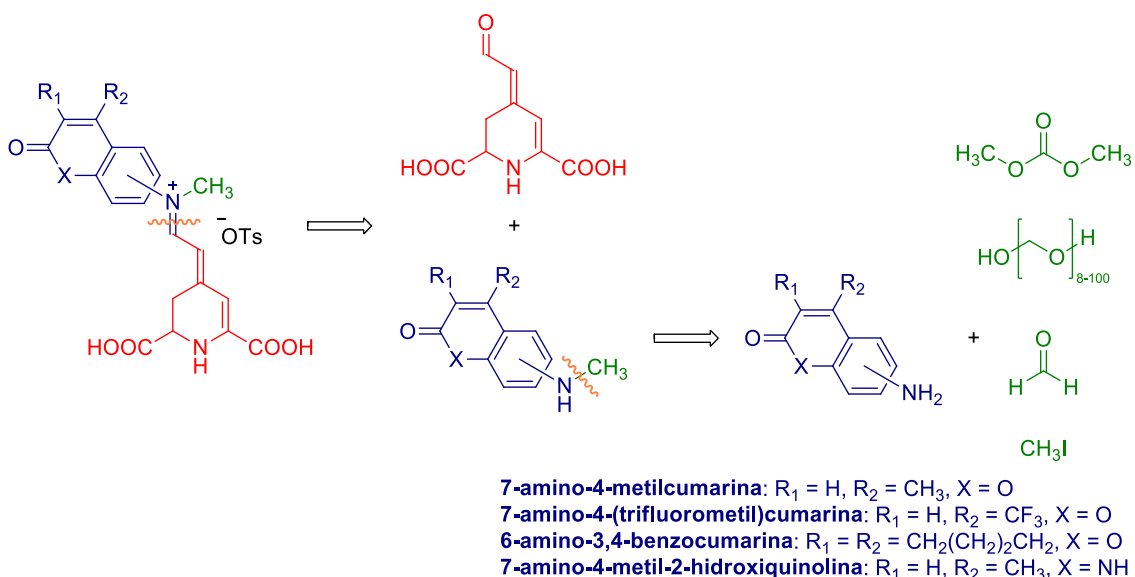
Esquema 9. Obtenção de ácido betalâmico a partir de suco de beterraba.

O Esquema 9 mostra os equilíbrios envolvidos na extração de ácido betalâmico por meio de acetato de etila. O rendimento da extração é fortemente dependente do pH da fase aquosa. Grande extensão da forma neutra do ácido betalâmico é alcançada em pH 2. O rendimento da extração de HBT é baixo porque o equilíbrio descrito por K_p é amplamente deslocado para a fase aquosa, onde K_p está relacionado com o equilíbrio de partição do ácido betalâmico entre as fases aquosa e orgânica.

Inicialmente o suco de beterraba contém diversas betalaínas, representadas no Esquema 9 por uma estrutura genérica sem diferenciação de isômeros geométricos. A hidrólise destas betalaínas em pH 11,65 gera o ácido betalâmico em sua forma totalmente desprotonada e as respectivas aminas. Em seguida, o meio é acidificado (pH 2) para levar o ácido betalâmico à sua forma totalmente protonada. As aminas presentes no meio são levadas a seus sais de amônio, representados em verde. Agora em sua forma neutra, o ácido betalâmico é extraído da água com acetato de etila, cujo equilíbrio é representado pelo coeficiente de partição K_p . Após a extração, a solução de ácido betalâmico em AcOEt

não pode ser secada com $MgSO_4$ porque o ácido betalâmico seria perdido devido sua alta afinidade com H_2O , o que resultaria em uma perda substancial deste. Alternativamente, a fase orgânica é resfriada em banho de $CO_2/EtOH$ ($-72\text{ }^\circ C$) e filtrada em funil de Büchner, assim, tanto H_2O como sais são grosseiramente retirados. O ácido betalâmico obtido desta maneira pode ser utilizado prontamente em reações químicas subsequentes.

Uma *N*-metilação factível das betalainas cBeets e csBeet124 proposta neste trabalho está apresentada no Esquema 10. A via de semissíntese proposta foi racionalizada a partir de todas as dificuldades de se realizar uma transformação química eficiente em uma betalaina.



Esquema 10. Retrossíntese proposta para a *N*-metilação das betalainas dos tipos cBeets e csBeet124.

Pelo outro lado da retrossíntese do Esquema 10, a amina *N*-metilada é obtida através da reação de metilação das respectivas aminas primárias precursoras comerciais. A seguir, serão abordados os métodos de obtenção das aminas *N*-metiladas utilizados neste trabalho e caracterizações detalhadamente, assim como as reações de obtenção das betalainas, seguido das respectivas caracterizações e determinação das propriedades hidrolíticas e fotofísicas.

3.1. *N*-metilação de cumarinas e carboestiril 124

Aminas são blocos construtores importantes na química orgânica para a síntese de compostos biologicamente ativos, tais como drogas e defensivos agrícolas. Funcionalizações de aminas continuam na fronteira da pesquisa em química orgânica sintética devido à importância química de ligações carbono-nitrogênio e suas propriedades. Esforços em estudos metodológicos de funcionalização de aminas para a busca de maior eficiência, novas rotas e novas reatividades ainda são largamente investidos.^{19,46,47}

A reação química de *N*-metilação mais fundamental e prática é a que envolve uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), por exemplo, entre uma amina e iodeto de metila (CH_3I). A *N*-metilação de aminas primárias com iodeto de metila é fácil sob o ponto de vista experimental, ao passo que um excesso do material de partida normalmente é usado para obtenção de rendimentos razoáveis.⁴⁸ Além desta, outra forma de se realizar *N*-metilação, que também é muito bem estabelecida na literatura, é a formação de uma imina, a partir da amina precursora e formaldeído, e sua subsequente redução com um agente redutor (boroidreto de sódio, cianoboroidreto de sódio, triacetoxiboroidreto de sódio, dentre outros).⁴⁸⁻⁵⁰

A utilização de iodeto de metila também é possível dentro de outras metodologias sintéticas, como por exemplo, através da proteção com pirocarbonato de di-*t*-butil dicarbonato (também chamado de boc), na qual rendimentos maiores que 90% podem ser obtidos considerando apenas a etapa de formação da ligação carbono-nitrogênio.⁵¹ Entretanto, a utilização do grupo protetor boc encarece substancialmente a síntese.

Além da S_N2 com CH_3I e a aminação redutiva, outros métodos surgem com o passar do tempo para tornar as funcionalizações alternativas mais eficientes de aminas, como

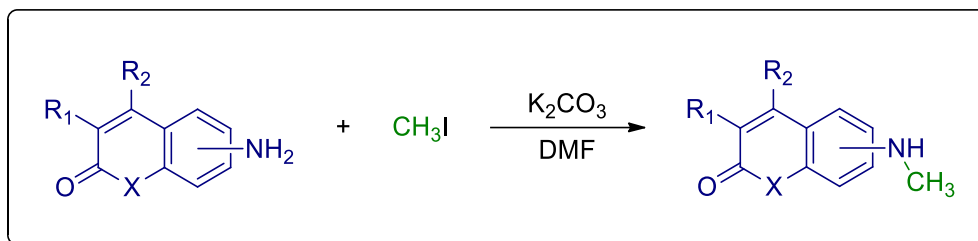
por exemplo a *N*-metilação seletiva de aminofenóis sob catálise heterogênea.⁵² Este método envolve a utilização de dimetilcarbonato (DMC) como agente alquilante e zeólita faujasita do tipo NaY como catalisador para a *N*-metilação de *o*-,*m*- e *p*-aminofenóis, com rendimentos excelentes, que variam de 89 a 99%. Além da descoberta de uma reação altamente seletiva para a *N*-metilação de aminofenóis, esta metodologia tem altíssima importância e relevância na pesquisa de funcionalização de amins devido sua grande utilização como blocos construtores de intermediários na indústria de corantes⁵³ e preocupação com o meio ambiente⁵⁴, na utilização de um agente alquilante menos tóxico que os mais clássicos (CH₃I, dimetilsulfato, fosgênio) e do uso de zeólita como catalisador, cuja ocorrência na natureza é abundante. Apesar de ser um reagente inflamável e ter odor parecido com metanol, o dimetilcarbonato não provoca irritação, tão pouco efeitos mutagênicos por inalação ou contato.⁵⁵

Neste trabalho, foram investigados os seguintes métodos de *N*-metilação: (i) utilizando CH₃I; (ii) utilizando DMC e (iii) via aminação redutiva. A seguir, estes métodos serão abordados e discutidos com base nos resultados obtidos.

3.1.1. Utilizando CH₃I

Iodeto de metila é comumente encontrado em laboratórios de síntese orgânica. O manuseio e a utilização deste reagente líquido são mais seguros e práticos quando comparado aos haletos análogos de massa molar menor, que são gases. Além disto, o iodeto de metila apresenta maior eletrofilicidade que estes análogos. Em uma única etapa reacional, a prática utilização do iodeto de metila permitiu que a reatividade dos derivados de cumarina e carboestiril fosse prontamente experimentada.

A *N*-metilação das cumarinas e carboestiril 124 foi realizada, então, utilizando-se CH₃I em DMF na presença de K₂CO₃ como catalisador básico, conforme Esquema 11.



Esquema 11. Método de *N*-metilação de cumarinas e carboestiril utilizando CH_3I .^{38,46}

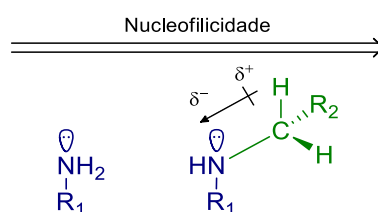
O alto ponto de ebulição do DMF (153 °C) acarreta em diversas desvantagens experimentais. Apesar disto, este solvente foi o mais adequado para a realização deste procedimento experimental.⁴⁶ Diversas condições reacionais foram investigadas para este tipo de reação, tais como temperatura, estequiometrias (em relação ao material de partida) dos reagentes CH_3I e K_2CO_3 e o tempo de reação. A Tabela 1 resume as condições experimentais empregadas para os substratos.

Tabela 1. Condições experimentais utilizadas para a reação de *N*-metilação utilizando CH_3I . As estequiometrias dos reagentes CH_3I e K_2CO_3 são mostradas em relação a 1 equivalente dos substratos. Para cada 0,1 mmol de substrato, 5 ml de MDF foram utilizados.

CH_3I	K_2CO_3	Temperatura	Tempo
1	2	t.a.	1 d
1,1	1,1	70 °C	2,5 h
1,1	1,5	refluxo	15 min
1,5	1,5	120 °C	5 h
2	1	t.a.	1 d
3	1	t.a.	5 d
10	1,1	100 °C	4,5 h
10	2	120 °C	2 h
11	1,1	120 °C	2 h
11	1,1	120 °C	8 h

Todas as combinações de condições experimentadas fornecem uma mistura de produtos mais o material de partida no meio reacional (vide Método 5.2.5), como previsto. Ou seja, esta reação, por mais que as condições reacionais sejam alteradas, não é seletiva ao produto *N*-metilado (condições reacionais com excesso de carboestiril 124 e benzocumarina não eram viáveis devido à baixa quantidade disponível). Além disso, a mistura de diferentes moléculas com polaridades muito próximas dificulta a etapa de purificação (vide Método 5.2.3) da espécie química de interesse. Rendimentos abaixo de 20% foram obtidos após purificação. Os produtos foram caracterizados de acordo com os Métodos 5.2.8, 5.2.9 e 5.2.10. Todos os espectros de caracterização estão em Anexos.

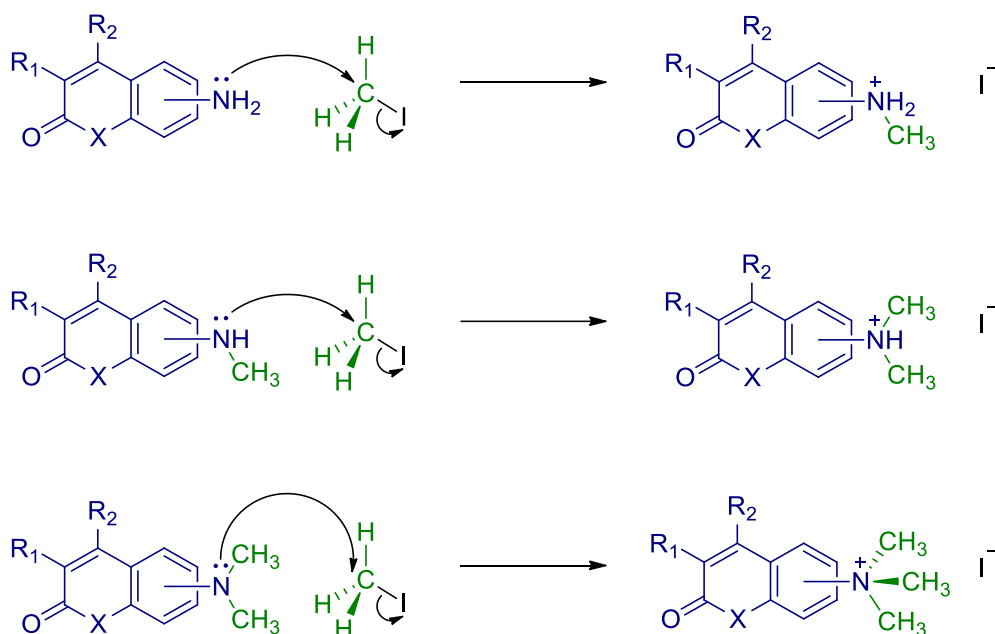
Aminas primárias são nucleófilos competentes em reações de S_N2 , assim como CH_3I também é um excelente eletrófilo para este tipo de reação. Entretanto, sabe-se também que aminas secundárias provenientes da alquilação de aminas primárias possuem um maior caráter nucleofílico, proporcionado pela hiperconjugação do grupo alquila em sentido ao átomo de nitrogênio (Esquema 12). Portanto, cuidados estequiométricos devem ser tomados para evitar a formação de subprodutos indesejáveis neste tipo de reação.



Esquema 12. Comportamento da nucleofilicidade de aminas por hiperconjugação provenientes do grupo alquila ($R_2 = H$, alquil).

Observando o Esquema 13, podem-se correlacionar os dados experimentais obtidos com a reatividade proposta dos intermediários reacionais através da ascensão contínua e descontrolada de reatividade das aminas a cada etapa subsequente. Devido a isso, é

impossível obter rendimentos altos (em relação ao reagente limitante) reacionais sem a utilização de um excesso de material de partida.



Esquema 13. Esquema mecanístico de intermediários envolvidos na *N*-metilação de cumarinas e carboestiril 124 utilizando CH_3I .

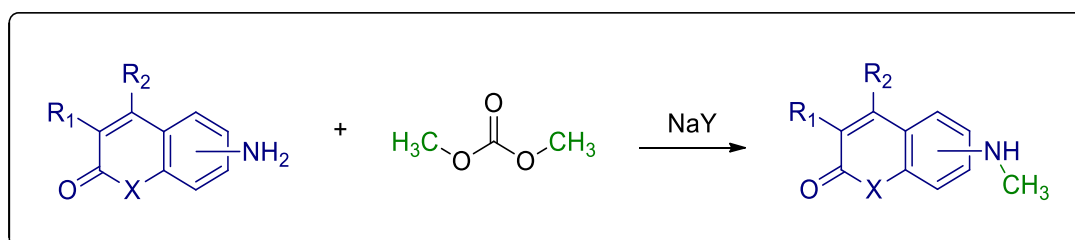
De acordo com o Esquema 13, o material de partida em questão reage a primeira vez com iodeto de metila para a formação do intermediário *N*-metilado. Porém, agora mais nucleofílico, este intermediário *N*-metilado compete com o material de partida restante do meio reacional para reagir com iodeto de metila, podendo levar à formação do intermediário *N,N*-dimetilado. Seguindo o mesmo raciocínio, caso ainda haja quantidade de iodeto de metila suficiente, a formação do intermediário *N,N,N*-trimetilado também poderá ocorrer.

3.1.2. Utilizando DMC

Assim como na reação com iodeto de metila, o dimetilcarbonato pode ser utilizado na metilação de aminas em uma única etapa reacional na presença de zeólita NaY.⁵² Além disso, o estado físico do dimetilcarbonato também é líquido, conferindo as mesmas

vantagens de manipulação que o iodeto de metila, em adição que este primeiro não é tóxico.⁵⁵ A utilização deste método possui um apelo adicional de química verde, pois a utilização de dimetilcarbonato também é ambientalmente amigável.^{54,55} Pensou-se que os materiais de partida deste trabalho fossem se comportar de uma forma similar, devido sua semelhança estrutural, tal como as moléculas utilizadas no trabalho que realiza a *N*-metilação sob catálise heterogênea com excelentes rendimentos. O fato de se poder obter produtos *N*-metilados de derivados de cumarina e carboestiril em uma única etapa reacional e com altos rendimentos impulsionou a experimentação desta metodologia.

Realizaram-se experimentos de *N*-metilação das cumarinas e carboestiril 124 utilizando DMC na presença de zeólita faujasita do tipo NaY, conforme é mostrado no Esquema 14. Por se tratar de uma catálise heterogênea com excesso de DMC (39 equivalentes), NaY em proporção fixa de 1:1 m/m com o material de partida e refluxo, apenas o parâmetro tempo foi variado entre os experimentos.



Esquema 14. Método de *N*-metilação de cumarinas e carboestiril 124 utilizando DMC.⁵²

Foi observado (vide Método 5.2.5) que, para todos os substratos, as reações tomavam cerca de mais de 50 h para se completarem, ao passo que nas reações-modelo⁵² os tempos de reação variam entre 3 e 7 h. Com o intuito de diminuir o tempo reacional da *N*-metilação dos substratos deste trabalho, empregou-se este método utilizando micro-ondas, porém não foi obtido sucesso. Além disso, para nenhum substrato, foi encontrada a mesma seletividade para a formação do produto *N*-metilado. Para as cumarinas 120 e

151, houve maior quantidade de produto *N*-metilado em relação ao *N,N*-dimetilado e ao material de partida, porém, para a benzocumarina e a carboestiril 124, o mesmo padrão de reatividade com CH₃I foi observado. Tanto o longo tempo reacional quanto o desvio de comportamento previsto tornaram este método pouco atrativo para as aplicações neste trabalho. Houve a mesma dificuldade na purificação (vide Método 5.2.3) dos produtos que na *N*-metilação utilizando CH₃I. Não houveram rendimentos superiores a 40% após purificação. Os produtos foram caracterizados de acordo com os Métodos 5.2.8, 5.2.9 e 5.2.10. Todos os espectros de caracterização estão em Anexos.

Os baixos rendimentos obtidos, em relação à literatura⁵², podem ser explicados devido ao maior tamanho da estrutura dos materiais de partida utilizados neste trabalho em comparação aos aminofenóis. Por esta reação envolver uma ativação do DMC promovida dentro da cavidade da zeólita, o tamanho do substrato a ser metilado é decisivo, uma vez que este também deve se comportar dentro das cavidades da zeólita.⁵⁶

Da mesma forma que reagir com iodeto de metila, o material de partida forma intermediários *N*-metilados que podem reagir novamente com dimetilcarbonato (ou metilcarbonato) e formar subprodutos indesejáveis.

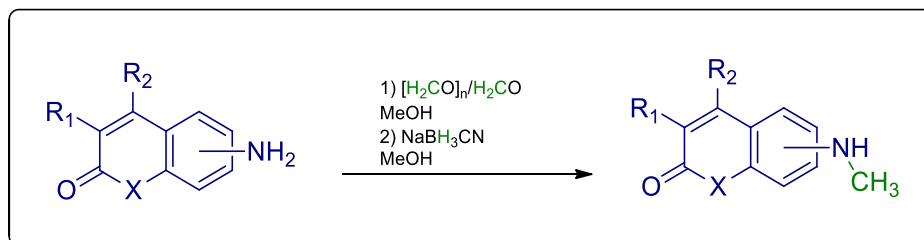
3.1.3. Via aminação redutiva

A aminação redutiva é a metodologia que garantidamente, frente às outras duas abordadas, controla a reatividade dos intermediários envolvidos e evita a formação de subprodutos. Na aminação redutiva, o intermediário imina é formado, e este, por sua vez, não reage com o agente alquilante do meio reacional ainda presente na primeira etapa, como acontece nos outros dois métodos já abordados.⁴⁸ Neste método, foram utilizados dois tipos de agentes alquilantes: paraformaldeído e formaldeído (solução aquosa, estabilizado com 15% de MeOH).

O paraformaldeído é um sólido branco, estável, seguro e de fácil manuseio e armazenamento. Comumente abreviado por PFA ou simbolizado por $[\text{H}_2\text{CO}]_n$, o paraformaldeído é um polímero constituído de monômeros de formaldeído que foi utilizado como estratégia para a geração do formaldeído *in situ* em metanol em refluxo. Em temperaturas maiores que 40 °C, o paraformaldeído sofre desmonomerização em solução e a espécie formaldeído livre é gerada gradativamente. Este método é uma alternativa ao uso de formaldeído diretamente sob a forma gasosa.

Uma alternativa comumente utilizada à manipulação de gás formaldeído é o uso de uma solução já contendo formaldeído em sua forma livre dissolvido. Esta solução aquosa (com 15% de metanol) contém formaldeído em equilíbrio com sua forma de hidrato. Deste modo, sempre haverá a espécie reativa do formaldeído livre no meio sendo consumida à medida que a reação avança.

Inicialmente, foram realizados experimentos de *N*-metilação utilizando ambos agentes alquilantes para os quatro materiais de partida, de acordo com Esquema 15.



Esquema 15. Método de *N*-metilação de cumarinas e carboestiril 124 via aminação redutiva.⁴⁹

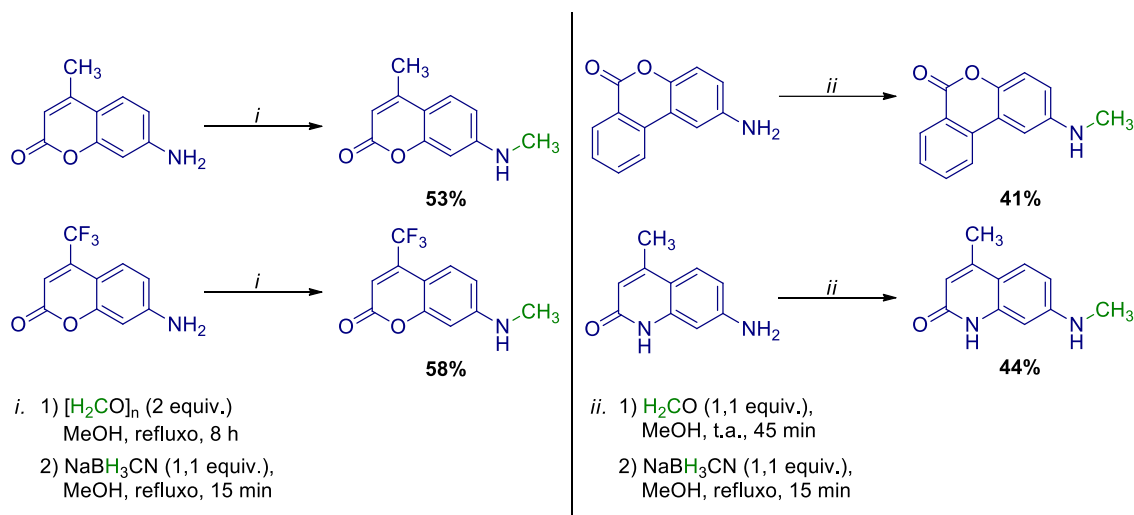
Os experimentos de *N*-metilação das cumarinas e carboestiril 124 foram realizados utilizando paraformaldeído (ou formaldeído) em MeOH na 1^a etapa para a formação da imina e NaBH₃CN em MeOH na 2^a etapa para reduzir a imina e formar o produto *N*-metilado. Diversas condições reacionais foram investigadas para este tipo de reação, tais

como temperatura, estequiometrias (em relação ao material de partida) dos reagentes $[\text{H}_2\text{CO}]_n/\text{H}_2\text{CO}$ e NaBH_3CN e o tempo de reação, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Condições experimentais utilizadas para a reação de *N*-metilação via aminação redutiva. As estequiometrias dos reagentes $[\text{H}_2\text{CO}]_n/\text{H}_2\text{CO}$ e NaBH_3CN são mostradas em relação a 1 equivalente dos substratos. Para cada 0,2 mmol de substrato, 5 ml de MeOH foram utilizados. A temperatura da 2ª etapa (tempo 2) é refluxo para todos os casos.

$[\text{H}_2\text{CO}]_n^a/\text{H}_2\text{CO}^b$	NaBH_3CN	Temperatura 1	Tempo 1	Tempo 2
1 ^a	1	refluxo	4 h	15 min
1 ^b	1	0 °C	2 h	5 min
1,1 ^b	1,1	t.a.	45 min	15 min
1,5 ^a	1,1	refluxo	4 h	5 min
1,5 ^b	1,1	refluxo	4 h	5 min
2 ^a	1,1	refluxo	8 h	15 min
2 ^a	1,25	refluxo	6 h	6 h
2 ^a	2	refluxo	20 h	15 min
2 ^b	2	t.a.	45 min	15 min
6 ^a	1	refluxo	8 h	15 min
6 ^a	1,25	refluxo	5 h	5 min
6 ^a	1,25	refluxo	7 h	6,5 h
6 ^a	1,5	refluxo	5,5 h	5 min
6 ^a	1,5	refluxo	7 h	5 min
400 ^b	1	refluxo	2 h	5 min

As melhores condições e os respectivos rendimentos encontrados, após a investigação dos parâmetros reacionais, estão resumidos no Esquema 16.



Esquema 16. Melhores condições reacionais encontradas para *N*-metilação de todos os materiais de partida via aminação redutiva. Para ambas etapas de ambos procedimentos (*i* e *ii*), 5 ml de MeOH foram utilizados para cada 0,2 mmol de substrato.

O produto *N*-Me c120 foi obtido na forma de sólido amarelo (p. f.: 185 – 187 °C); RMN de 1H (500,13 MHz, $CDCl_3$): δ 7,36 (d, $J = 8,7$ Hz, 1 H), δ 6,51 (dd, $J = 8,7, 2,4$ Hz, 1 H), δ 6,44 (d, $J = 2,3$ Hz, 1 H), δ 5,98 (d, $J = 1,0$ Hz, 1 H), δ 4,28 (d, $J = 1,2$ Hz, 1 H), δ 2,90 (d, $J = 4,4$ Hz, 3 H), δ 2,35 (d, 1,1 Hz, 3 H); RMN de ^{13}C (125,75 MHz, $CDCl_3$): δ 162,2, δ 156,2, δ 153,1, δ 152,6, δ 125,6, δ 110,7, δ 110,2, δ 109,6, δ 97,9, δ 30,4, δ 18,7; EM/EM (modo positivo, MeOH): $[M+H]^+ = 190,0862$ m/z (calculado: 190,0863 m/z); UV-Vis (H_2O): $\lambda^{abs} = 357$ nm.

O produto *N*-Me c151 foi obtido na forma de sólido amarelo (p.f.: 185 – 186 °C); RMN de 1H (500,13 MHz, $CDCl_3$): δ 7,47 (dqi, $J = 8,8, 1,8$ Hz, 1 H), δ 6,55 (dd, $J = 8,9, 2,4$ Hz, 1 H), δ 6,48 (d, $J = 2,4$ Hz, 1 H), δ 6,43 (s, 1 H), δ 4,47 (s, 1 H), δ 2,93 (d, 5,1 Hz, 3 H); RMN de ^{13}C (125,75 MHz, $CDCl_3$): δ 160,5, δ 157,3, δ 153,2, δ 142,2, δ 126,3, δ 111,2, δ 108,9, δ 108,9, δ 104,0, δ 97,9, δ 30,2; EM/EM (modo positivo, MeOH): $[M+H]^+ = 244,0581$ m/z (calculado: 244,0580 m/z); UV-Vis (H_2O): $\lambda^{abs} = 337$ nm.

O produto *N*-Me cbz foi obtido na forma de sólido amarelo (p.f.: 108 – 110 °C); RMN de 1H (500,13 MHz, $CDCl_3$): δ 8,41 (d, $J = 7,9$ Hz, 1 H), δ 8,08 (d, $J = 8,1$ Hz, 1

H), δ 7,81 (m, 1 H), δ 7,57 (t, $J = 7,6$ Hz, 1 H), δ 7,22 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H), δ 7,15 (d, $J = 2,6$ Hz, 1 H), δ 6,77 (dd, $J = 8,8, 2,7$ Hz, 1 H), δ 2,94 (s, 3 H); RMN de ^{13}C (125,75 MHz, CDCl_3): δ 161,7, δ 146,3, δ 143,9, δ 135,0, δ 134,5, δ 130,6, δ 128,6, δ 121,6, δ 121,5, δ 118,4, δ 118,4, δ 116,3, δ 103,4, δ 31,2; EM/EM (modo positivo, MeOH): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 226,0869$ m/z (calculado: 226,0863 m/z); UV-Vis (H_2O): $\lambda^{\text{abs}} = 321$ nm.

O produto *N*-Me cs124 foi obtido na forma de sólido amarelo pálido (p.f.: 160 – 163 °C, decomposição); RMN de ^1H (500,13 MHz, DMSO-d_6): δ 11,12 (s, 1 H), δ 7,38 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H), δ 6,48 (dd, $J = 8,8, 2,3$ Hz, 1 H), δ 6,28 (d, $J = 2,3$ Hz, 1 H), δ 5,95 (s, 1 H), δ 5,75 (s, 1 H), δ 4,03 (q, $J = 7,1$ Hz, 1 H), δ 2,70 (d, 5,0 Hz, 3 H), δ 2,29 (d, $J = 1,1$ Hz, 3 H); RMN de ^{13}C (125,75 MHz, DMSO-d_6): δ 162,8, δ 152,1, δ 148,4, δ 141,5, δ 125,8, δ 115,1, δ 110,7, δ 109,8, δ 94,2, δ 29,8, δ 18,9; EM/EM (modo positivo, MeOH): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 189,1027$ m/z (calculado: 189,1022 m/z); UV-Vis (H_2O): $\lambda^{\text{abs}} = 342$ nm.

A caracterização por Espectrometria de Massas (Método 5.2.8) mostra, para as quatro aminas metiladas, que as razões massa-carga (m/z) experimentais são coerentes com as teóricas, com erros experimentais aceitáveis ($|\Delta m/z| \leq 5$ ppm e $m\text{Sigma} \leq 30$ ppm), conforme Tabela 3. O valor de $m\sigma$ ($m\text{Sigma}$) expressa o quanto a distribuição isotópica experimental se assemelha com a teórica - quanto menor $m\text{Sigma}$, maior semelhança.

Tabela 3. Descrição resumida das caracterizações das aminas metiladas por Espectrometria de Massas.

Amina	<i>N</i>-Me c120	<i>N</i>-Me c151	<i>N</i>-Me cbz	<i>N</i>-Me cs124
Fórmula	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_2$	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$
$[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{teo}}$	190,0863 m/z	244,0580 m/z	226,0863 m/z	189,1022 m/z
$[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{exp}}$	190,0862 m/z	244,0581 m/z	226,0869 m/z	189,1027 m/z
$\Delta m/z$ (ppm)	0,5	-0,4	-2,7	-2,6
$m\sigma$ (ppm)	6,7	13,1	9,5	9,6

Após a observação do comportamento reativo dos quatro substratos frente às condições reacionais mostradas (vide Método 5.2.5), percebeu-se que as cumarinas 120 e 151 se transformam em imina com maior eficiência utilizando $[\text{H}_2\text{CO}]_n$ em refluxo, na 1ª etapa, ao passo que a benzocumarina e o carboestiril 124 se transformam de maneira mais eficiente utilizando H_2CO em temperatura ambiente.

Isso é proveniente da observação de uma espontânea redução da imina formada a partir da benzocumarina e do carboestiril 124 em refluxo com $[\text{H}_2\text{CO}]_n$ já a partir dos momentos iniciais de reação, na 1ª etapa. Este acontecimento é minimizado realizando esta reação em condições mais brandas, utilizando H_2CO . Esta redução espontânea também é observada para as cumarinas 120 e 151, com $[\text{H}_2\text{CO}]_n$ em refluxo, porém em tempos reacionais mais longos, maiores que 8 h. A 1ª etapa da iminação redutiva para os quatro materiais de partida utilizados neste trabalho não se dá por completa, mesmo com a utilização de excesso (6 equivalentes) dos agentes metilantes.

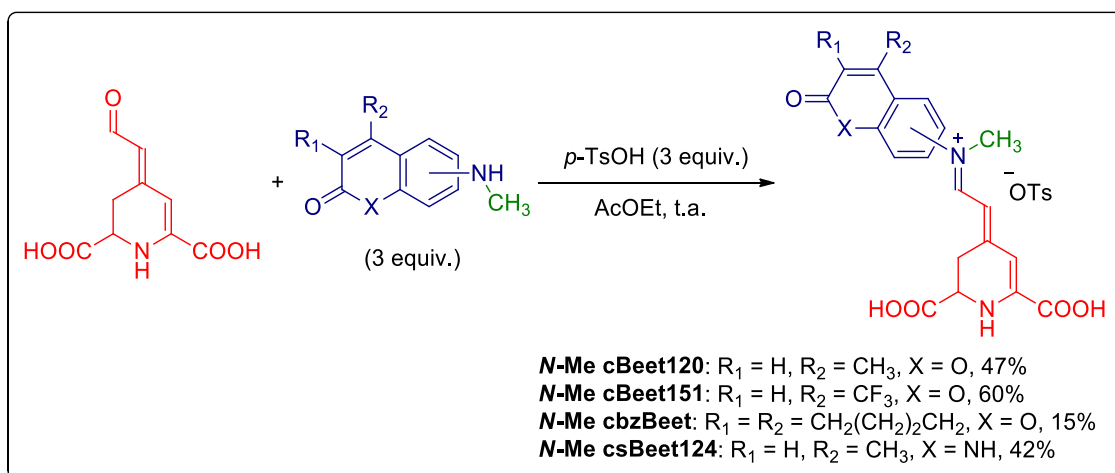
Esforços foram tomados para tentar descobrir a origem desta redução espontânea das iminas formadas na 1ª etapa. Reações em atmosfera inerte (N_2) e/ou na ausência de luz foram realizadas, porém o fenômeno ainda assim era observado.

Sob o ponto de vista reacional, o material de partida reage com o formaldeído (tanto o proveniente de solução quanto o formado *in situ* pela quebra do paraformaldeído por aquecimento), formando um intermediário tetraédrico que, através de um equilíbrio protônico, pode eliminar água e formar a imina correspondente. O sucesso desta reação está no interrompimento de reatividade química do intermediário imina formado frente ao eletrófilo formaldeído ainda presente no meio reacional. Isto permite que a redução da imina seja controladamente realizável em uma segunda etapa, com a utilização de um agente redutor específico, como o cianoboroidreto de sódio. Na segunda etapa, há uma

transferência de hidrogênio do cianoboroidreto de sódio para o carbono da imina, de caráter eletrofílico, formando o produto *N*-metilado.

3.2. Síntese e caracterização estrutural das betalainas

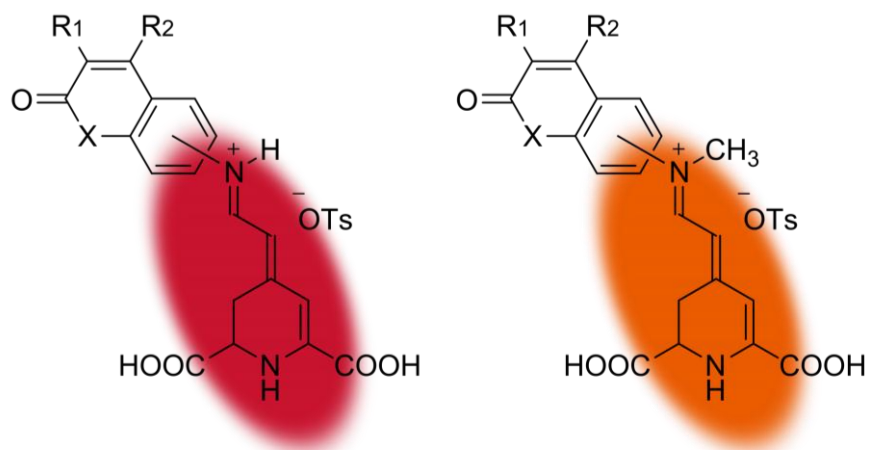
Há diversos trabalhos na literatura que realizam a semissíntese de betalainas em H₂O.^{28,34,35} Porém, devido à baixa solubilidade das cumarinas e carboestiril 124 em H₂O, opta-se por realizar a reação em AcOEt, utilizando uma adaptação da metodologia de Schliemann^{28,33}, uma vez que o ácido betalâmico já se encontra em AcOEt. Este método aprimorado consiste em reagir as aminas e o ácido betalâmico em AcOEt na presença de ácido *p*-toluenossulfônico a temperatura ambiente com transformação instantânea de amarelo (cor do ácido betalâmico em solução) para alaranjado (cor das betalainas-alvo em solução). Posteriormente, mantém-se o meio reacional a -20 °C para precipitação do produto. A síntese das betalainas está descrita no Método 5.2.2 e o Esquema 17 ilustra este procedimento reacional.



Esquema 17. Método de síntese das betalainas *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124.

Após a purificação das betalainas, percebeu-se que os quatro sólidos obtidos se distinguiam sistematicamente dos outros quatro sólidos obtidos no trabalho anterior do grupo.³⁶ A *N*-metilação das betalainas cBeets e csBeet124 levou a uma alteração da cor

das moléculas de vermelho para laranja, como ilustrado no Esquema 18.



Esquema 18. Comparação visual entre as cores dos sólidos do trabalho anterior do grupo (esquerda)³⁶ e deste trabalho (direita). Estas cores foram obtidas diretamente a partir dos sólidos originais utilizando linguagem RGB.

O produto *N*-Me cBeet120 foi obtido na forma de sólido laranja; RMN de ¹H (500,13 MHz, D₂O): δ 8,14 (d, J = 12,9 Hz, 1 H), δ 7,87 (d, J = 9,4 Hz, 1 H), δ 7,69 (d, J = 8,3 Hz, 2 H), δ 7,45 (m, 2 H), δ 7,37 (d, J = 7,9 Hz, 2 H), δ 6,38 (m, 2 H), δ 6,14 (d, J = 13,0 Hz, 1 H), δ 4,39 (dd, J = 7,8, 7,1 Hz, 1 H), δ 3,58 (s, 3 H), δ 3,33 (dd, J = 17,5, 6,7 Hz, 1 H), δ 3,16 (dd, J = 17,6, 8,1 Hz, 1 H), δ 2,50 (d, J = 1,1 Hz, 3 H), δ 2,4 (s, 3 H); CLAE-EM/EM (modo positivo, H₂O/MeCN): t_R = 5,7 min, [M]⁺ = 383,1241 m/z; UV-Vis (H₂O): λ^{abs} = 504 nm. A Figura 3 mostra o espectro de RMN de ¹H e a Figura 4 mostra o cromatograma e o espectro de massas de alta resolução do produto *N*-Me cBeet120.

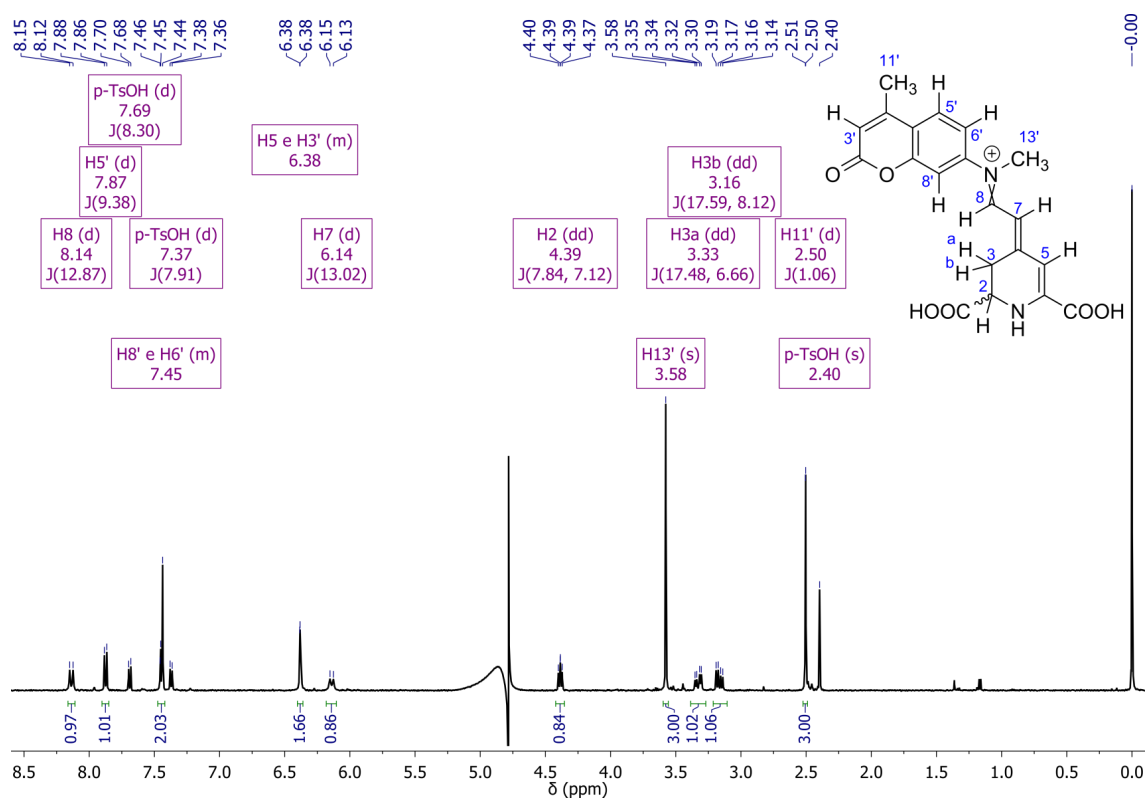


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz do produto *N*-Me cBeet120 em D_2O .

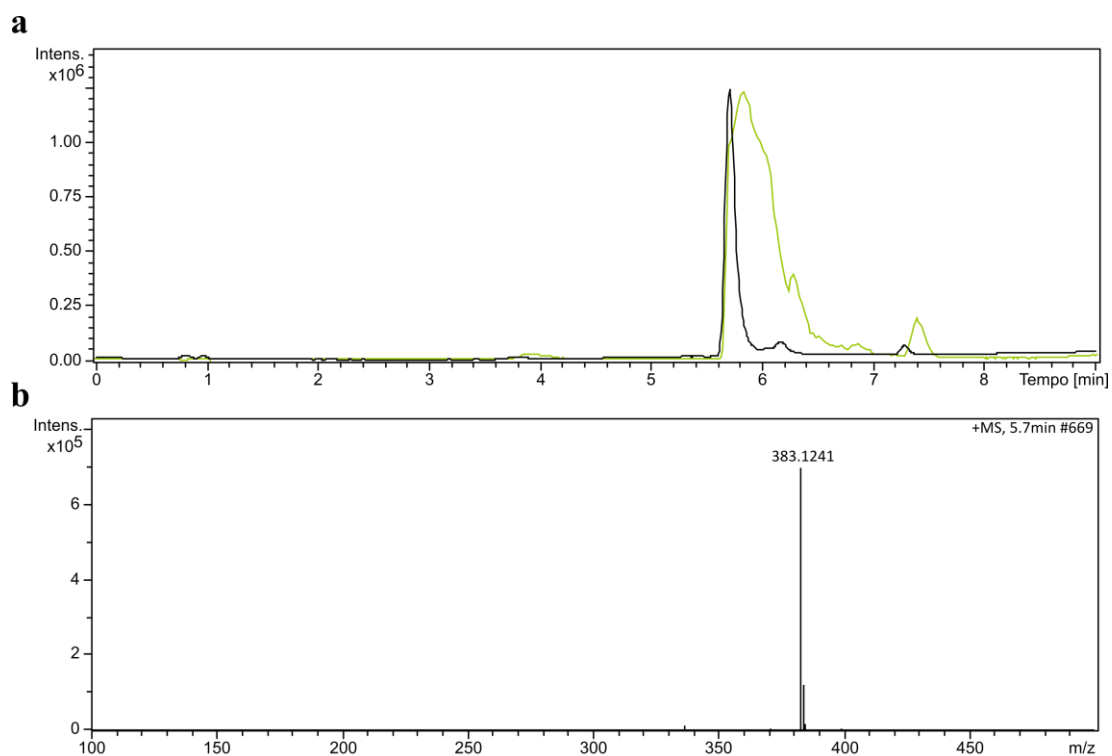


Figura 4. (a) Cromatograma com detecções por espectroscopia de absorção em 254 nm (em preto) e por espectrometria de massas (em verde) e (b) espectro de massas de alta resolução do produto *N*-Me cBeet120 (*electrospray*, modo positivo) registrado no tempo de 5,7 min da detecção por espectrometria de massas.

O produto *N*-Me cBeet151 foi obtido na forma de sólido laranja; RMN de ^1H (500,13 MHz, D_2O): δ 8,14 (d, $J = 13,0$ Hz, 1 H), δ 7,91 (dd, 1 H), δ 7,69 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H), δ 7,53 (d, $J = 2,3$ Hz, 1 H), δ 7,50 (dd, $J = 8,9, 2,4$ Hz, 1 H), δ 7,38 (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H), δ 6,95 (s, 1 H), δ 6,43 (s, 1 H), δ 6,19 (d, $J = 12,9$ Hz, 1 H), δ 4,42 (dd, $J = 8,0, 6,8$ Hz, 1 H), δ 3,58 (s, 3 H), δ 3,36 (dd, $J = 17,7, 6,7$ Hz, 1 H), δ 3,19 (dd, $J = 17,7, 8,2$ Hz, 1 H), δ 2,40 (s, 3 H); CLAE-EM/EM (modo positivo, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$): $t_{\text{R}} = 6,6$ min, $[\text{M}]^+ = 437,0961$ m/z ; UV-Vis (H_2O): $\lambda^{\text{abs}} = 508$ nm. A Figura 5 mostra o espectro de RMN de ^1H e a Figura 6 mostra o cromatograma e o espectro de massas de alta resolução do produto *N*-Me cBeet151.

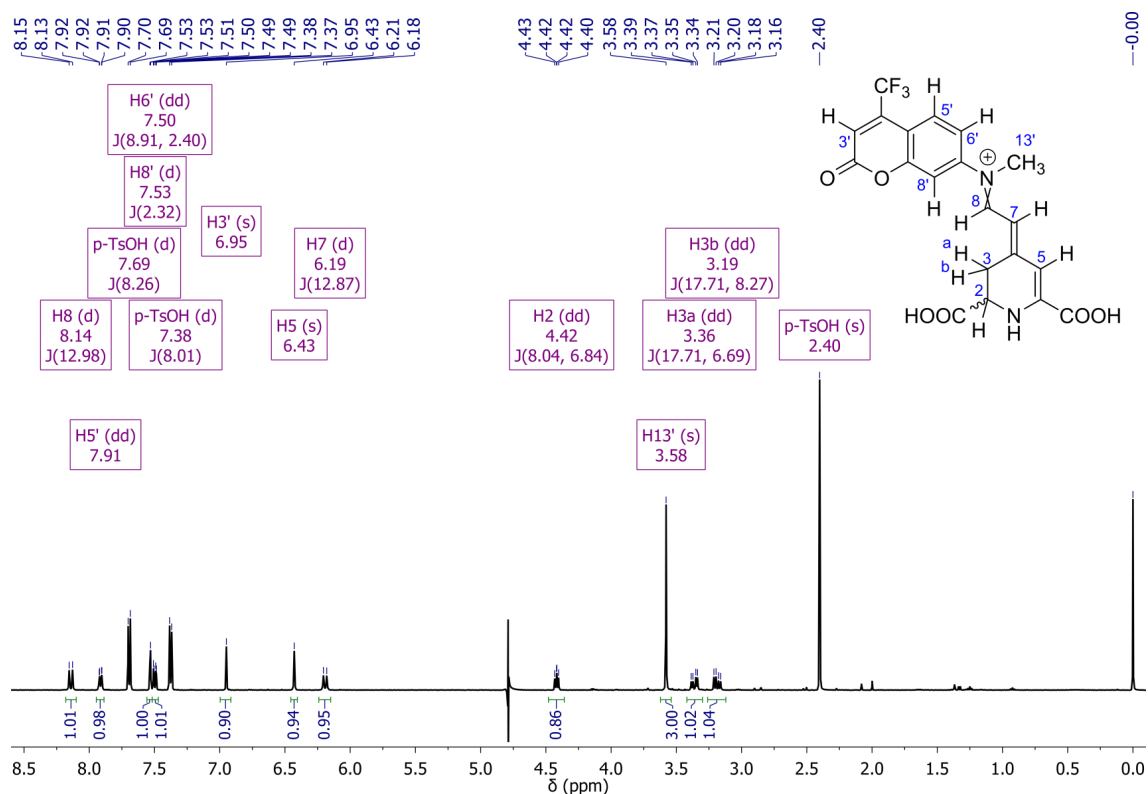


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz do produto *N*-Me cBeet151 em D_2O .

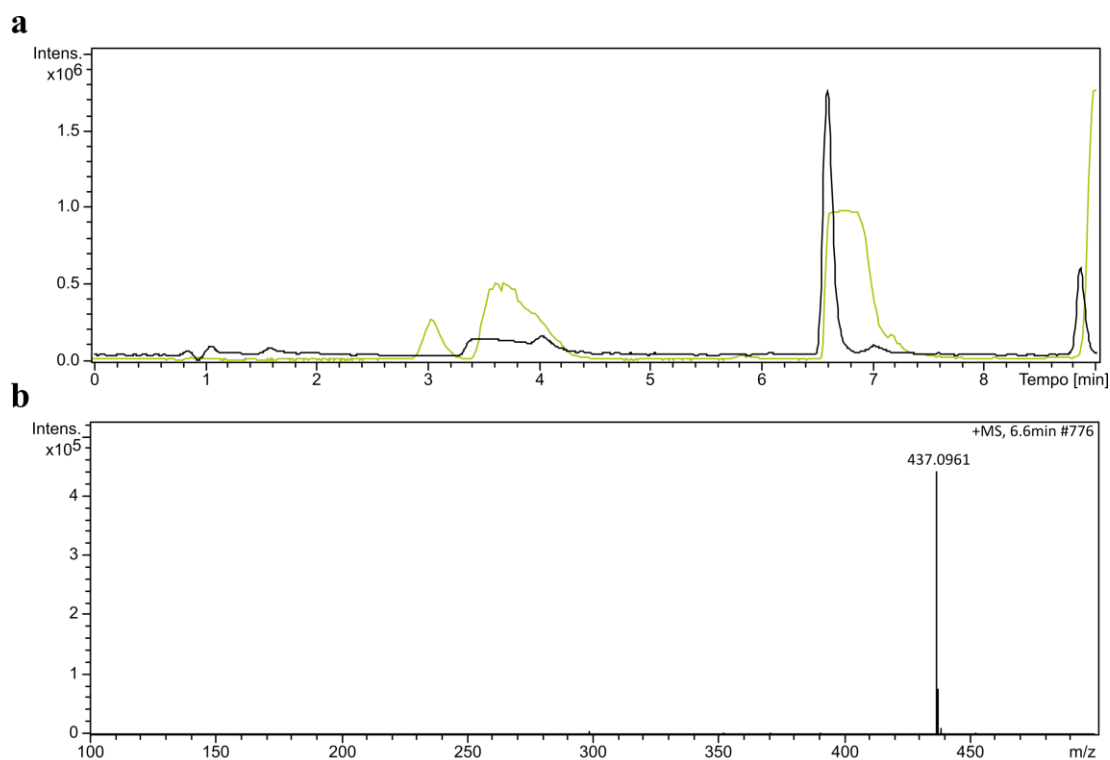


Figura 6. (a) Cromatograma com detecções por espectroscopia de absorção em 254 nm (em preto) e por espectrometria de massas (em verde) e (b) espectro de massas de alta resolução do produto *N*-Me cBeet151 (*electrospray*, modo positivo) registrado no tempo de 6,6 min da detecção por espectrometria de massas.

O produto *N*-Me cbzBeet foi obtido na forma de sólido laranja; RMN de ¹H (500,13 MHz, D₂O): δ 8,34 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), δ 8,30 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), δ 8,18 (s, 2 H), δ 8,00 (t, J = 7,7 Hz, 1 H), δ 7,74 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), δ 7,70 (d, J = 8,2 Hz, 2 H), δ 7,59 (dd, J = 8,7, 2,1 Hz, 1 H), δ 7,52 (s, 1 H), δ 7,38 (d, J = 8,1 Hz, 2 H), δ 6,35 (s, 1 H), δ 6,18 (s, 1 H), δ 4,34 (t, J = 6,7 Hz, 1 H), δ 3,65 (s, 3 H), δ 3,30 (dd, J = 10,7, 5,9 Hz, 1 H), δ 3,16 (dd, J = 17,2, 7,8 Hz, 1 H), δ 2,41 (s, 3 H); CLAE-EM/EM (modo positivo, H₂O/MeCN): t_R = 6,5 min, [M]⁺ = 419,1243 m/z; UV-Vis (H₂O): λ^{abs} = 494 nm. A Figura 7 mostra o espectro de RMN de ¹H e a Figura 8 mostra o cromatograma e o espectro de massas de alta resolução do produto *N*-Me cbzBeet.

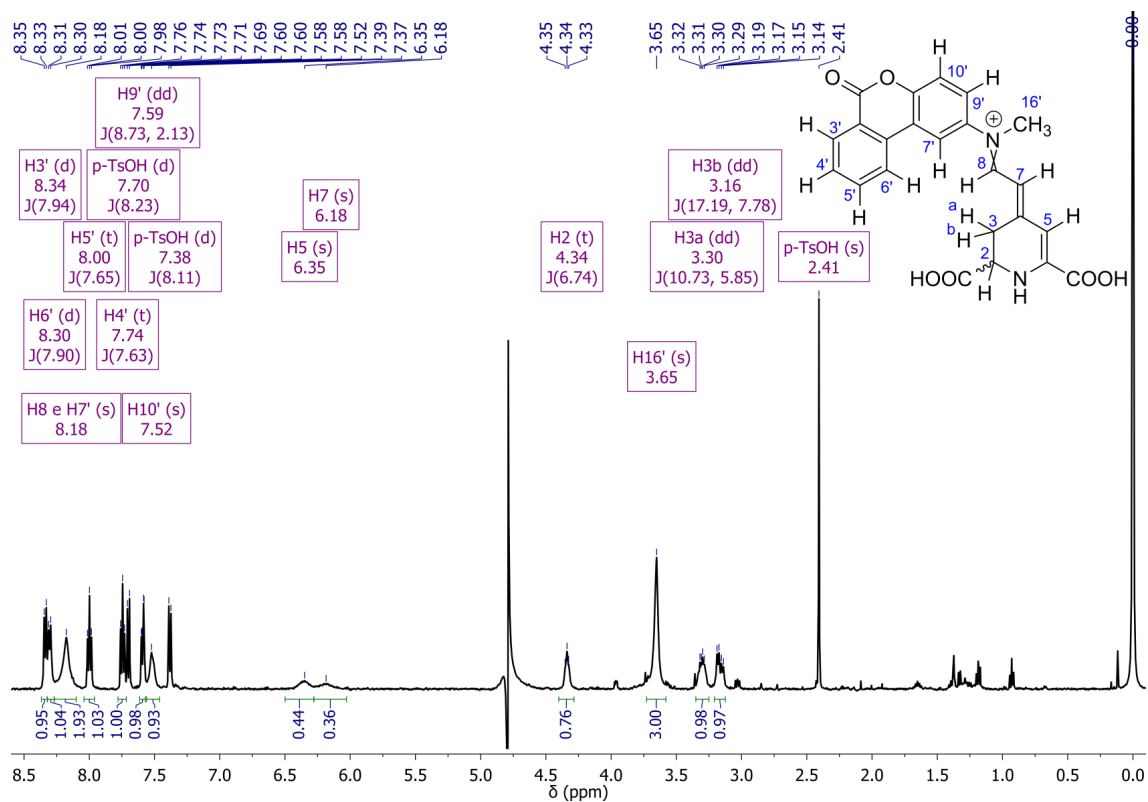


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz do produto *N*-Me cbzBeet em D_2O .

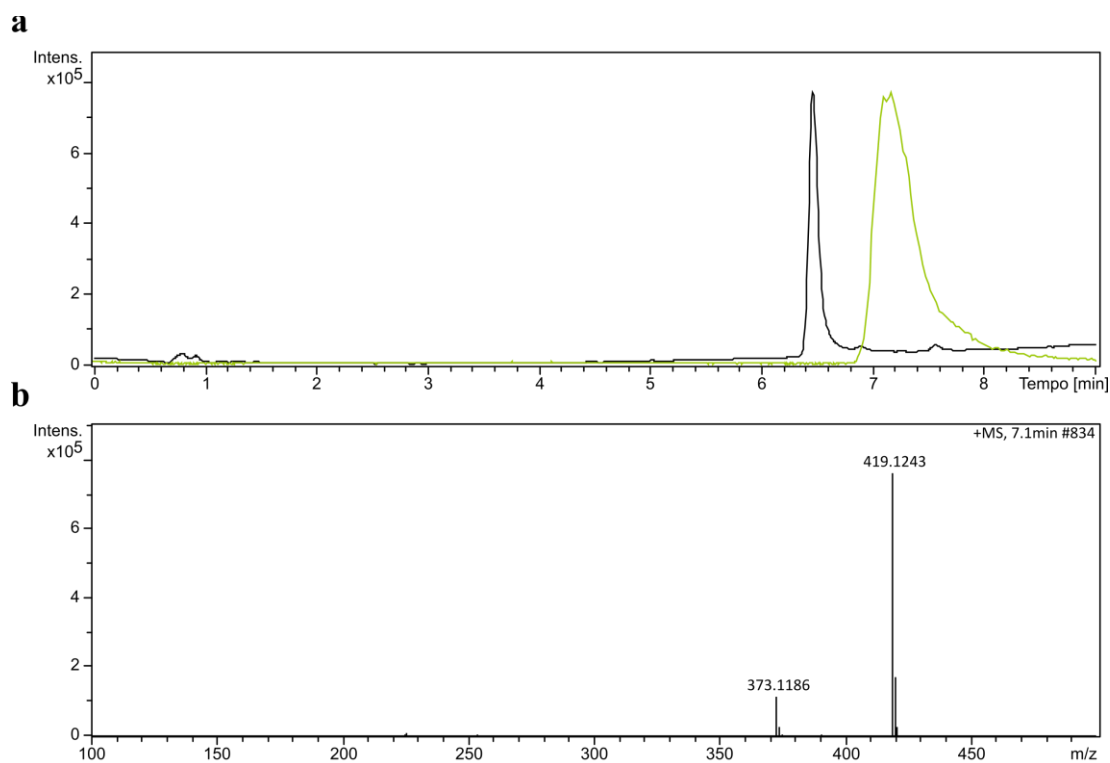


Figura 8. (a) Cromatograma com detecções por espectroscopia de absorção em 254 nm (em preto) e por espectrometria de massas (em verde) e (b) espectro de massas de alta resolução do produto *N*-Me cbzBeet (*electrospray*, modo positivo) registrado no tempo de 7,1 min da detecção por espectrometria de massas.

O produto *N*-Me csBeet124 foi obtido na forma de sólido laranja; RMN de ^1H (500,13 MHz, D_2O): δ 8,16 (d, $J = 13,0$ Hz, 1 H), δ 7,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H), δ 7,70 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H), δ 7,41 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H), δ 7,38 (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H), δ 7,31 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H), δ 6,57 (s, 1 H), δ 6,36 (s, 1 H), δ 6,12 (d, $J = 10,6$ Hz, 1 H), δ 4,37 (t, $J = 7,3$ Hz, 1 H), δ 3,60 (s, 3 H), δ 3,33 (dd, $J = 17,3, 6,0$ Hz, 1 H), δ 3,16 (dd, $J = 17,5, 8,0$ Hz, 1 H), δ 2,55 (s, 3 H), δ 2,41 (s, 3 H); CLAE-EM/EM (modo positivo, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$): $t_{\text{R}} = 5,3$ min, $[\text{M}]^+ = 382,1400$ m/z ; UV-Vis (H_2O): $\lambda^{\text{abs}} = 502$ nm. A Figura 9 mostra o espectro de RMN de ^1H e a Figura 10 mostra o cromatograma e o espectro de massas de alta resolução do produto *N*-Me csBeet124.

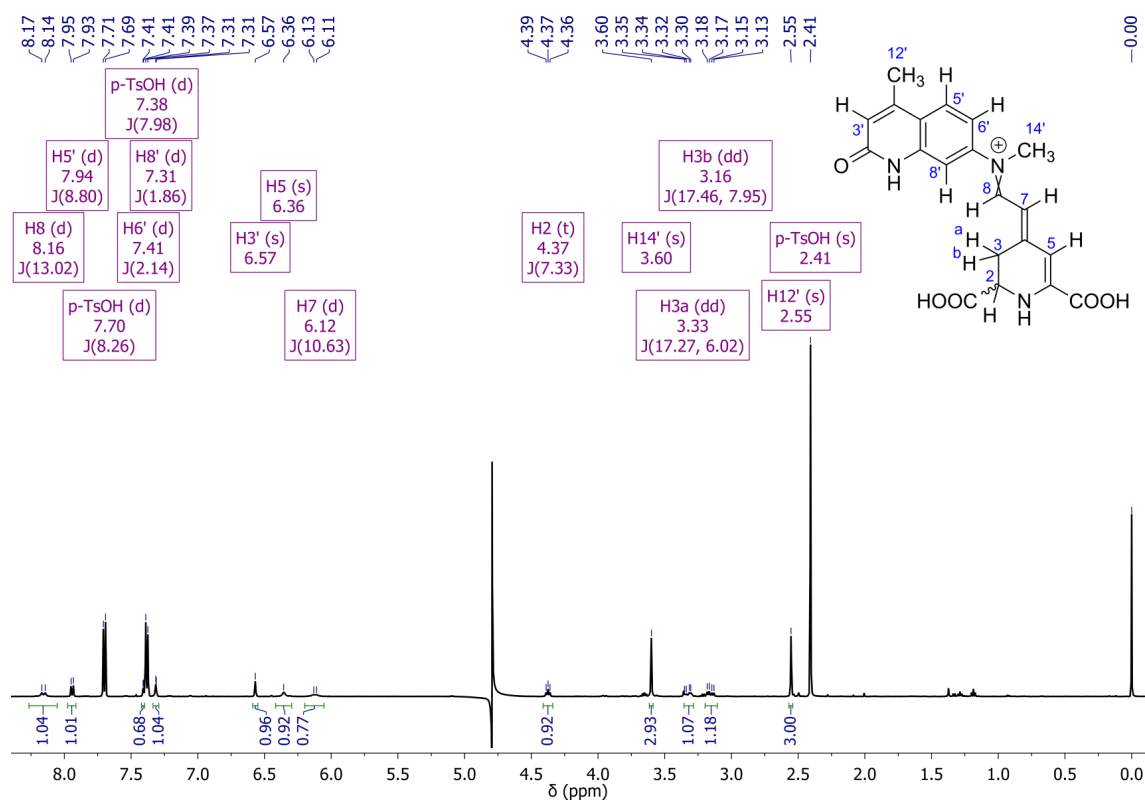


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz do produto *N*-Me csBeet124 em D_2O .

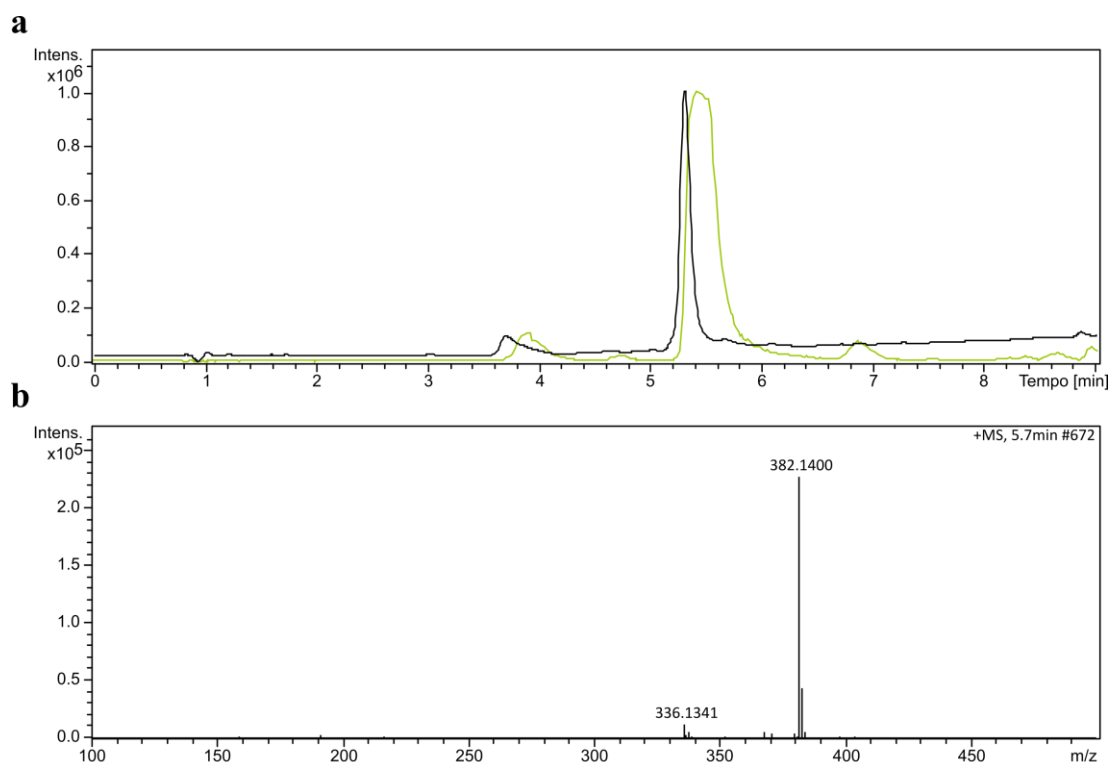


Figura 10. (a) Cromatograma com detecções por espectroscopia de absorção em 254 nm (em preto) e por espectrometria de massas (em verde) e (b) espectro de massas de alta resolução do produto *N*-Me csBeet124 (*electrospray*, modo positivo) registrado no tempo de 5,7 min da detecção por espectrometria de massas.

A caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (Método 5.2.7) mostra, para as quatro novas betalaínas, que as razões massa-carga (m/z) experimentais são coerentes com as teóricas, com erros experimentais aceitáveis ($|\Delta m/z| \leq 5$ ppm e $m\sigma \leq 30,0$ ppm), conforme Tabela 4.

Tabela 4. Descrição resumida das caracterizações das betalaínas *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas.

Betalaína	<i>N</i> -Me cBeet120	<i>N</i> -Me cBeet151	<i>N</i> -Me cbzBeet	<i>N</i> -Me csBeet124
Fórmula	$C_{20}H_{19}N_2O_6^+$	$C_{20}H_{16}F_3N_2O_6^+$	$C_{23}H_{19}N_2O_6^+$	$C_{20}H_{20}N_3O_5^+$
$[M]^+_{teo}$	383,1238 m/z	437,0955 m/z	419,1238 m/z	382,1397 m/z
$[M]^+_{exp}$	383,1241 m/z	437,0961 m/z	419,1243 m/z	382,1400 m/z
$\Delta m/z$ (ppm)	-0,8	-1,4	-1,2	-0,8
$m\sigma$ (ppm)	20,4	30,0	22,0	23,7

Os cromatogramas com detecção por espectroscopia de absorção em 254 nm adquiridos para as quatro betalaínas mostram majoritariamente a presença do produto através do pico cromatográfico de maior intensidade. Os cromatogramas com detecção por espectrometria de massas adquiridos para as quatro betalaínas mostram também majoritária intensidade nos picos relativos aos produtos.

Os espectros de massas de alta resolução registrados a partir dos cromatogramas com detecção por espectrometria de massas das quatro betalaínas mostram a massa dos íons moleculares em maior intensidade e a ausência ou pequena presença de fragmentos descarboxilados dos íons moleculares, evidenciado pela perda de CO₂ e H₂, o que resulta em uma perda de massa exata teórica de 46,0055. Este resultado fornece um indício de como a estrutura das betalaínas podem ser sensíveis à ionização por *electrospray*.

A caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (Método 5.2.9) para compostos do tipo betalaínas possui grande dificuldade. A obtenção de espectros de RMN de ¹H é dificultada devido à baixa estabilidade hidrolítica e solubilidade de betalaínas em H₂O. Poucos solventes orgânicos são capazes de dissolver betalaínas e os poucos que o fazem, reagem. A escolha do solvente foi baseada no trabalho anterior do grupo³⁶, no qual foi utilizado D₂O para os experimentos de caracterização por RMN de ¹H de todas betalaínas. Esta escolha permite comparação de efeitos eletrônicos entre as estruturas químicas das betalaínas de ambos trabalhos. Na literatura, existem poucos trabalhos com espectros de RMN de ¹H e ainda menos trabalhos com RMN de ¹³C de betalaínas.^{57,58}

A caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (Método 5.2.9) mostra, para as quatro novas betalaínas, que os sinais dos hidrogênios possuem boa resolução e pequena quantidade de impurezas interferentes, como por exemplo de solventes³⁸ (entre

2 – 1 ppm) – Figura 11. Todos os experimentos de RMN de ^1H foram realizados com supressão do sinal de H_2O em 4,8 ppm, entretanto os espectros ainda apresentam um sinal anômalo respectivo à H_2O (Anexos). Este sinal ocorre nos espectros de RMN de ^1H das quatro betalaínas e pode ser explicado pela baixa solubilidade das betalaínas, acarretando em uma alta concentração de H_2O em relação às betalaínas nas soluções preparadas.

Os quatro espectros de RMN de ^1H mostram com clareza o sinal da metila adicionada às betalaínas na região entre 3,65 – 3,58 ppm. Um deslocamento químico típico de uma metila ligada a um grupo alifático não substituído é próximo a 1 ppm. Entretanto, ligado ao nitrogênio com carga positiva, os hidrogênios do grupo metila sofrem desblindagem eletrônica, conferindo aos sinais da metila um deslocamento químico maior que 1 ppm. Os sinais do contra-íon *p*-toluenossulfonato estão presentes em todos nos espectros, com deslocamentos químicos em cerca de 2,4 ppm (metila) e 7,7 e 7,4 ppm (aromáticos).

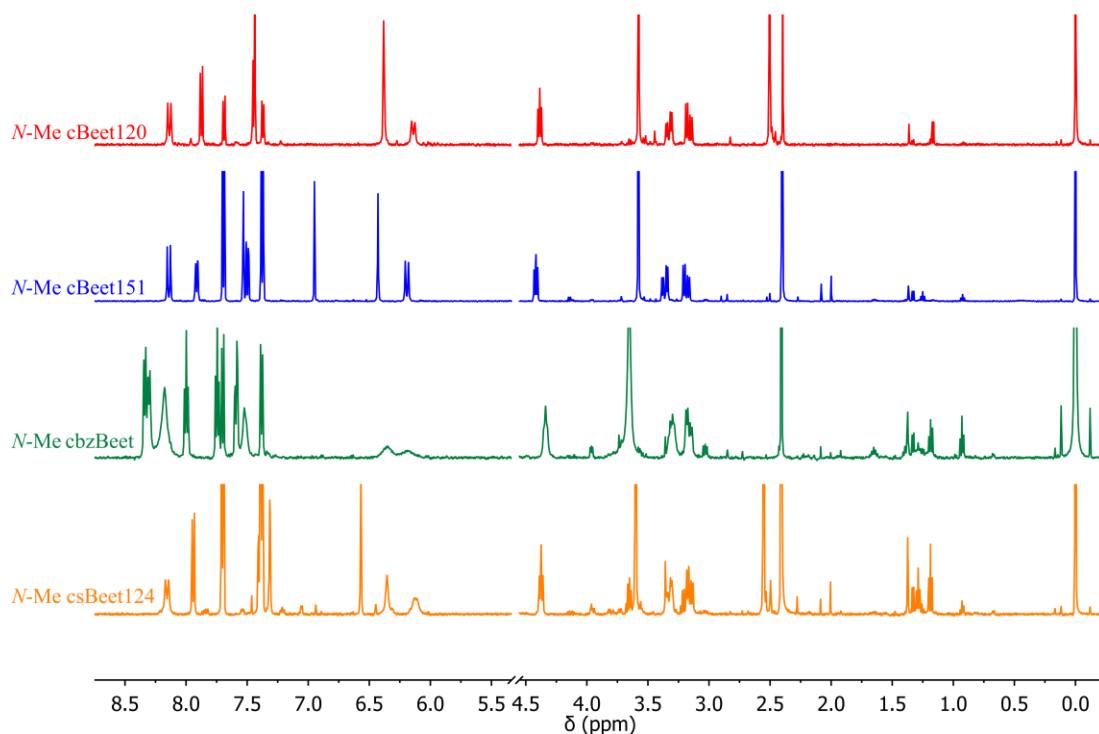


Figura 11. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H empilhados das quatro betalaínas. O sinal suprimido de H_2O (4,8 ppm) foi cortado para maior clareza.

Ampliando-se os resultados obtidos por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , pode-se observar com maior clareza os sinais característicos (em destaque os hidrogênios 5, 7 e 8) de betalaínas presentes no sistema conjugado – Figura 12.

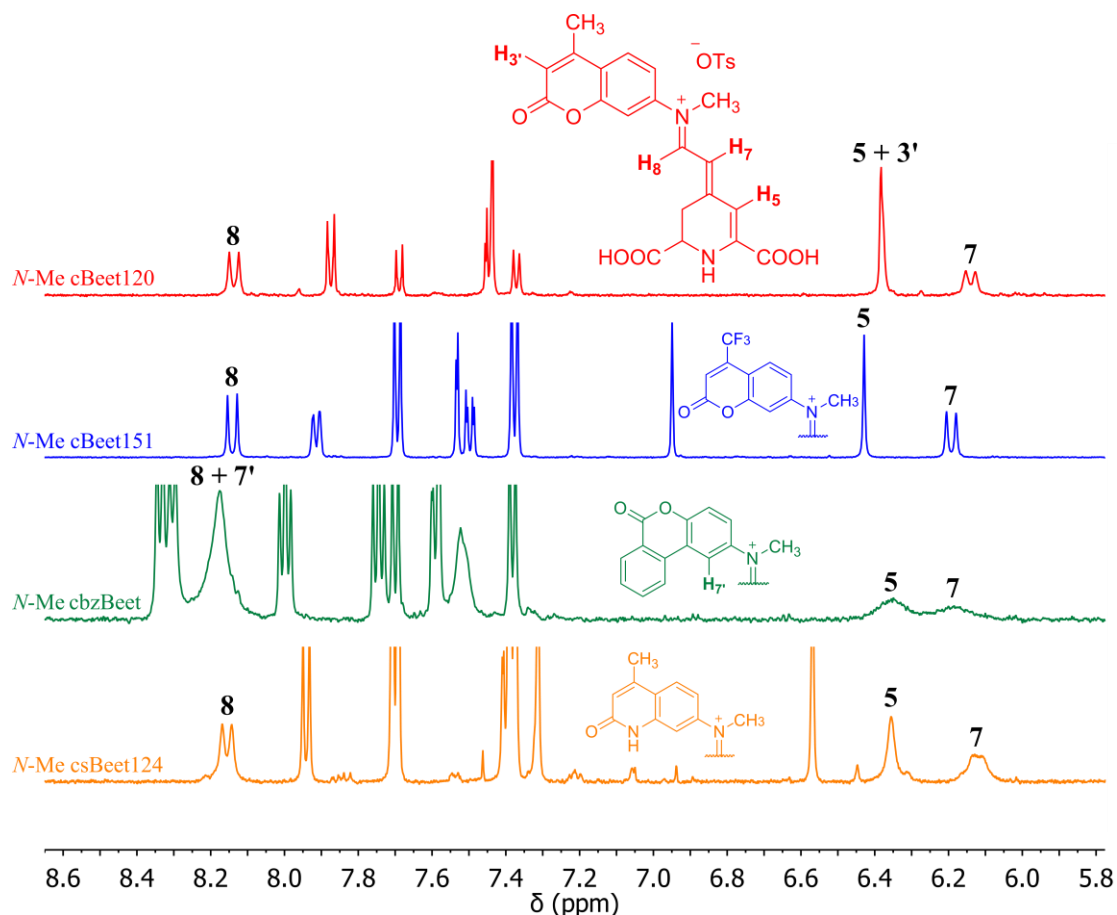


Figura 12. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H empilhados das quatro betalaínas, na região de 8,6 – 5,8 ppm. Em evidência, estão os hidrogênios 5, 7 e 8 do sistema 1,5-pentametínico das betalaínas.

Os espectros de RMN de ^1H ampliados na região de 8,6 – 5,8 ppm das quatro novas betalaínas semissintetizadas na Figura 12 revelam certas características do caráter eletrônico do sistema conjugado 1,5-pentametínico. Além disso, por se tratar de uma molécula passível de isomerização geométrica na ligação imínica proveniente da amina precursora, há indícios da presença predominante de uma das duas formas possíveis. Neste sistema conjugado, os sinais que trazem maiores informações sobre este são os hidrogênios 5, 7 e 8. Em conformidade com os dados de trabalho anterior do grupo³⁶, os

sinais destes hidrogênios em questão possuem alta resolução, exceto para o exemplo envolvendo a benzocumarina (em verde), possuindo forma de singletos largos, o que dificulta a comparação mais precisa entre deslocamentos químicos da molécula análoga não metilada.

Estudos metodológicos de síntese e caracterização de betalaínas provenientes de derivados de anilina com substituinte R na posição *para* (onde R = NH₂, OH, OCH₃, CH₃, H, F, I, Cl, Br, CO₂H, CF₃, CN, NO₂) realizados no grupo de pesquisa mostram um comportamento sistemático do deslocamento químico dos hidrogênios 5, 7 e 8 em experimentos de RMN de ¹H em D₂O.⁵⁹ Nestes estudos, observa-se que o deslocamento químico do hidrogênio 5 deste sistema aumenta gradualmente à medida que o substituinte R se torna mais retirador de elétrons. O hidrogênio 7, por sua vez, possui um comportamento análogo ao hidrogênio 5, porém menos pronunciado. Por outro lado, o deslocamento químico do hidrogênio 8 diminui à medida que o grupo R se torna mais retirador de elétrons. Nesta escala, quando R = NO₂ (máximo efeito retirador), os deslocamentos químicos dos hidrogênios 5, 7 e 8 são, respectivamente, 6,42, 6,27 e 8,23 ppm. No outro extremo da escala, quando R = NH₂ (máximo efeito doador), os deslocamentos químicos dos hidrogênios 5, 7 e 8 são, respectivamente, 6,15, 6,22 e 8,33 ppm. Em comparação aos dados obtidos neste trabalho, nota-se que os valores de deslocamento químico dos hidrogênios 5, 7 e 8 das quatro betalaínas, em média, são mais próximos aos valores da betalaína derivada da *p*-nitroanilina de trabalho anterior do grupo⁵⁹, conferindo aos grupos derivados de cumarina e carboestiril alto caráter retirador de elétrons do sistema 1,5-pentametínico.

Nota-se da Figura 12 que o hidrogênio 8 das quatro betalaínas possui um ambiente químico extremamente deficiente em elétrons, conferindo deslocamentos químicos de

8,14, 8,14, 8,18 e 8,16 ppm respectivamente para *N*-Me cBeet120, *N*-Me cBeet151, *N*-Me cbzBeet e *N*-MecsBeet124. Em comparação, os hidrogênios das betalaínas análogas não metiladas possuem deslocamento químico de 8,12, 8,18, 7,96 e 8,06 ppm, respectivamente, em conformidade com Tabela 5.³⁶

Tabela 5. Resumo dos deslocamentos químicos dos hidrogênios 5, 7 e 8 das betalaínas *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124 em comparação às cBeets e csBeet124³⁶.

Betalaína	δ_{H5} (ppm)	δ_{H7} (ppm)	δ_{H8} (ppm)
cBeet120	6,30	6,11	8,12
<i>N</i>-Me cBeet120	6,38	6,14	8,14
cBeet151	6,38	6,21	8,18
<i>N</i>-Me cBeet151	6,43	6,19	8,14
cbzBeet	6,15	5,93	7,96
<i>N</i>-Me cbzBeet	6,35	6,18	8,18
csBeet124	6,24	6,12	8,06
<i>N</i>-Me csBeet124	6,36	6,12	8,16

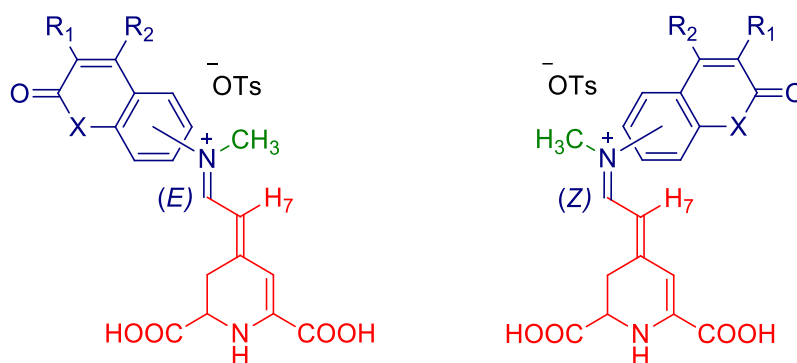
Levando em conta a sobreposição de sinais na betalaína *N*-Me cbzBeet (Figura 12), que leva a um ocultamento do deslocamento químico verdadeiro do sinal do hidrogênio 8, assume-se que os valores dos deslocamentos químicos do hidrogênio 8 entre as betalaínas metiladas e as análogas não metiladas são comparativamente indistinguíveis. Sob o ponto de vista do efeito hiperconjugativo, portanto, o grupo metila parece não ter exercido influência significativa na eletrofilicidade do carbono ligado ao hidrogênio 8.

Por outro lado, os hidrogênios 5 e 7, mais afastados da carga formal do nitrogênio imínico, possuem deslocamentos químicos menores que o hidrogênio 8, como esperado. Os hidrogênios 5 possuem deslocamentos químicos de 6,38, 6,43, 6,35 e 6,36 ppm,

respectivamente nas betalaínas *N*-metiladas, e de 6,30, 6,38, 6,15 e 6,24 ppm nas análogas não metiladas, respectivamente.³⁶ Novamente, não é possível diferenciar os deslocamentos químicos entre as betalaínas dos trabalhos diferentes pelos mesmos motivos de proximidade dos valores, e de resolução para o caso da *N*-Me cbzBeet (e sua análoga não metilada).

Para os hidrogênios 7, o mesmo comportamento é observado pelos mesmos motivos. Estes possuem deslocamentos químicos de 6,14, 6,19, 6,18 e 6,12 ppm, respectivamente, nas betalaínas *N*-metiladas, e de 6,11, 6,21, 5,93 e 6,12 ppm nas análogas não metiladas, respectivamente.³⁶

Os resultados de RMN de ¹H sugerem, então, que a estrutura química das betalaínas metiladas é a que possui a carga positiva no nitrogênio imínico, devido principalmente aos valores similares de deslocamento químico do hidrogênio 8 entre as betalaínas metiladas e não metiladas. Estes resultados mostram também, para as quatro novas betalaínas, que há a presença predominante de um isômero geométrico da ligação imínica (Esquema 19), porém não há dados suficientes para a comprovação de qual isômero (*E* ou *Z*) é o predominante.



Esquema 19. Comparação entre a estereoisomeria da ligação dupla da porção imínica (em azul) das betalaínas semissintetizadas.

Supõe-se, então, que a estrutura predominante seja a que possui menor impedimento

estérico entre o hidrogênio 7 e o restante da estrutura – isomeria *E* – assim como é proposto para as betalaínas análogas não metiladas.³⁶ Experimentos de RMN utilizando a técnica NOESY, podem ajudar a se determinar a estereoisomeria predominante destas betalaínas.

A estereoisomeria da ligação dupla exocíclica ligada ao anel piperideínico (Esquema 19, em vermelho) das betalaínas, por sua vez, é oriunda da estereoisomeria do ácido betalâmico. Há diversos trabalhos na literatura que tratam esta ligação dupla do ácido betalâmico. Há diversos trabalhos na literatura que tratam esta ligação dupla do ácido betalâmico extraído da natureza como sendo (*E*).^{34,60,61} Há indícios, em dados de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência realizados em nosso grupo de pesquisa, de que o ácido betalâmico, extraído de acordo com o método descrito neste trabalho, possui um estereoisômero majoritário em uma proporção elevada, supostamente (*E*), de acordo com a literatura. Adicionalmente, não há indícios de que esta ligação sofra isomerização desde sua extração até a síntese e caracterização de novas betalaínas.

3.3. Cinéticas de decomposição e hidrólise

Para se determinar o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e o coeficiente de absorvidade molar (ϵ), foram realizados experimentos de decomposição parcial das betalaínas em água pura a 25 °C e hidrólise das betalaínas em tampão pH 9,0 a 25 °C, respectivamente. Depois de determinados os parâmetros citados, uma comparação com os mesmos parâmetros das betalaínas análogas não metiladas deve elucidar o efeito que a metila exerce sobre as betalaínas em questão.

Os tempos de meia-vida das betalaínas foram obtidos através de experimentos em triplicata com acompanhamento espectrofotométrico na região do ultravioleta-visível durante a decomposição parcial das betalaínas (Método 5.2.14), conforme Figura 13.

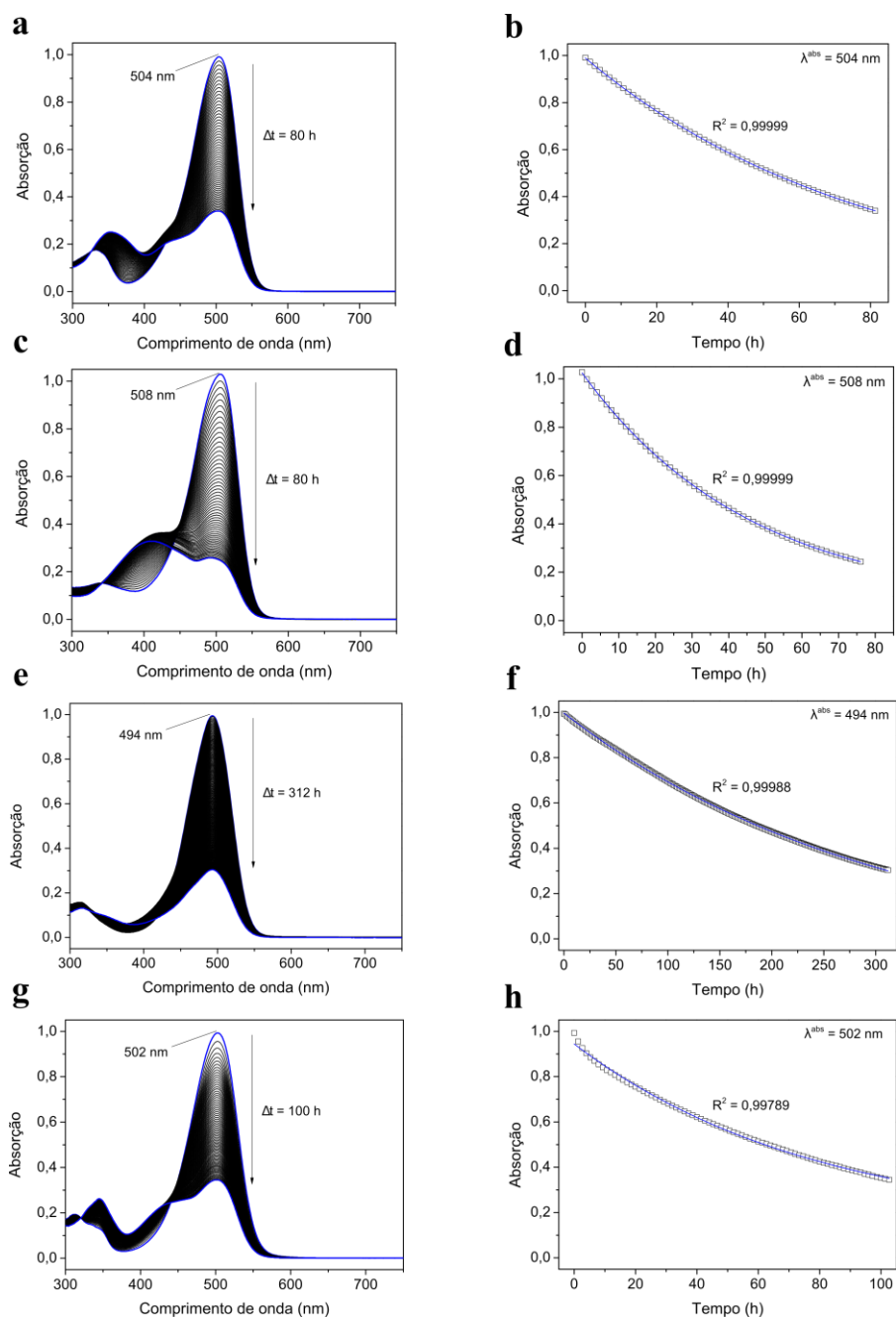


Figura 13. Espectros de varredura (esquerda) e decaimento exponencial (direita) das betalaínas (a, b) *N*-Me cBeet120, (c, d) *N*-Me cBeet151, (e, f) *N*-Me cbzBeet e (g, h) *N*-Me csBeet124 em H₂O a 25 °C. Cada item representa apenas um experimento das triplicatas para ilustração.

Analisando os espectros de varredura das cinéticas de decomposição das betalaínas em H₂O a 25 °C (Figura 13, esquerda), não é possível ver com clareza a presença do ácido betalâmico ($\lambda^{abs} = 420 \text{ nm}$), o produto de hidrólise previsto, ao final do experimento. A formação de ácido betalâmico no meio é dependente da velocidade com que as betalaínas

são hidrolisadas, porém, nestas condições experimentais, o ácido betalâmico também é instável e se decompõe. Uma explicação plausível para não se observar ácido betalâmico nas cinéticas de decomposição das betalaínas em H₂O a 25 °C é supor que a velocidade de formação de ácido betalâmico, por hidrólise das betalaínas, é mais lenta que a velocidade de consumo de ácido betalâmico, por decomposição.

Após a realização dos experimentos de decomposição para cada betalaína em H₂O a 25 °C, notou-se que o perfil de decaimento da concentração de betalaína com o tempo seguia um comportamento monoexponencial (Figura 13, direita). Com isso, foi possível ajustar os dados de decaimento da absorção em função do tempo, no comprimento de onda máximo de absorção de cada betalaína, e determinar experimentalmente (Método 5.2.14) a constante cinética observada de decomposição (k_{obs}).

A Tabela 6 resume os valores encontrados para os tempos de meia-vida e constante cinética observada. O comportamento hidrolítico obtido foi condizente com o esperado, pois, em trabalho anterior do grupo³⁸, as duas betalaínas em questão aumentaram sua persistência em água em cerca de 20 vezes. O mesmo aumento médio esperado foi obtido experimentalmente neste trabalho.

Tabela 6. Resumo dos valores de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e constante cinética observada (k_{obs}) obtidos nos experimentos de decomposição realizados em H₂O a 25 °C para cada betalaína em triplicata.

Betalaína	<i>N</i>-Me cBeet120	<i>N</i>-Me cBeet151	<i>N</i>-Me cbzBeet	<i>N</i>-Me csBeet124
$t_{1/2}$ (h)	52 ± 4	35 ± 4	(21 ± 1) x 10 ¹	56 ± 1
k_{obs} (s ⁻¹)	(3,5 ± 0,3) x 10 ⁻⁶	(5,5 ± 0,6) x 10 ⁻⁶	(9 ± 1) x 10 ⁻⁷	(3,5 ± 0,1) x 10 ⁻⁶

O coeficiente de absortividade molar das betalaínas é um parâmetro fundamental para o estudo fotofísico e físico-químico quantitativo, além de ser útil para o cálculo de rendimento sintético de novas betalaínas, pois betalaínas são compostos higroscópicos e

de difícil pesagem, devido também a sua síntese envolver pequenas massas (cerca de unidades de miligramas) neste trabalho. Portanto, para a determinação do valor de ϵ , foram realizados experimentos de decomposição das betalaínas em pH 9,0 a 25 °C, em triplicata, utilizando o método do ponto final (Figura 14).⁴⁴

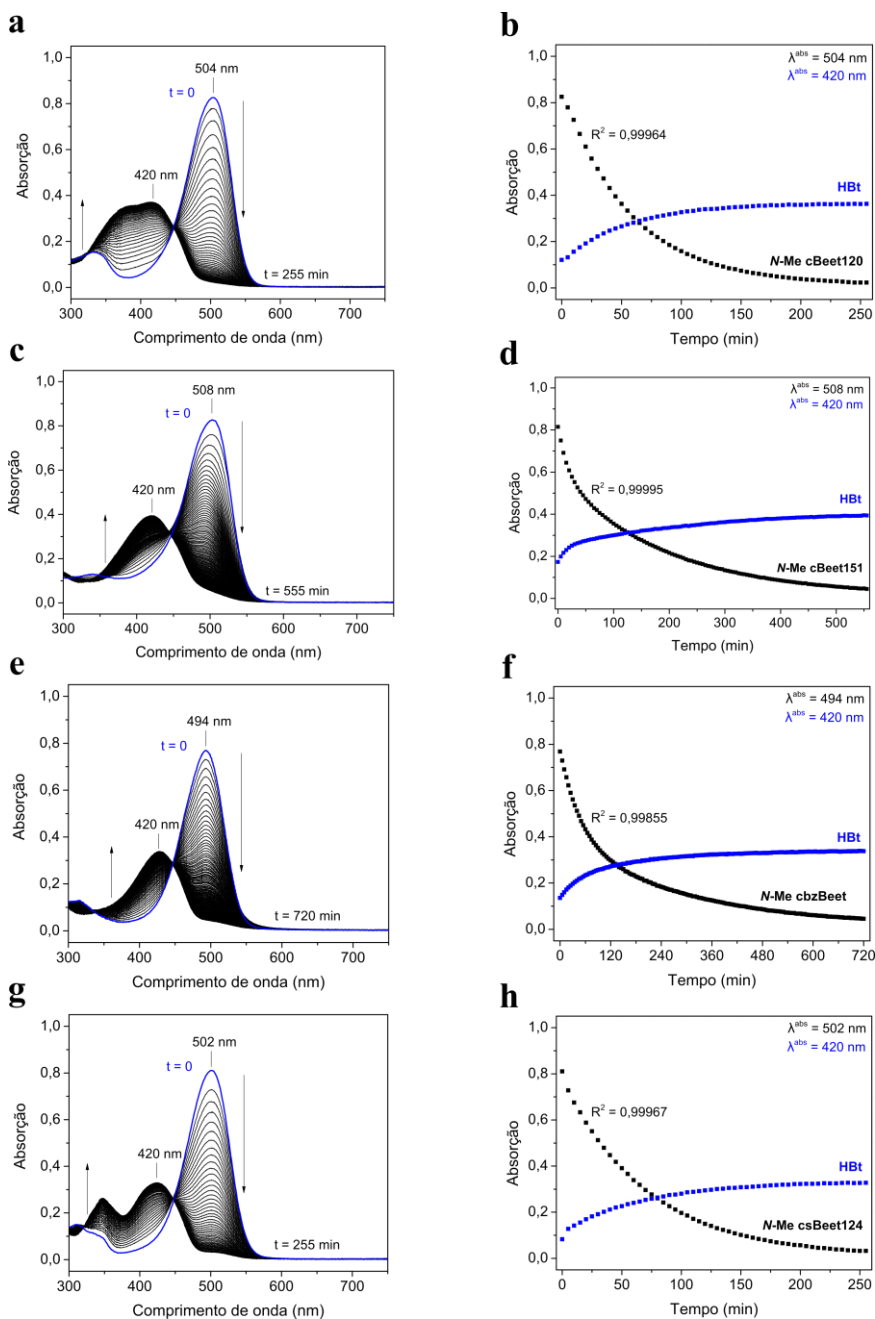


Figura 14. Espectros de varredura (esquerda) e comportamento exponencial (direita) das betalaínas (a, b) *N*-Me cBeet120, (c, d) *N*-Me cBeet151, (e, f) *N*-Me cbzBeet e (g, h) *N*-Me csBeet124 em pH 9,0 a 25 °C. Cada item representa apenas um experimento das triplicatas para ilustração. O primeiro ponto (esquerda, em azul) foi realizado em tampão pH 7,0. Para as betalaínas *N*-Me cBeet151 e *N*-Me cbzBeet, o valor de R^2 é referente à curva em preto a partir de 100 min.

Neste método (5.2.12), pode-se determinar o valor de ϵ de qualquer betalaína que possa ser transformada totalmente em ácido betalâmico de forma controlada em um intervalo de tempo não maior que 12 horas. A Figura 14 mostra o acompanhamento espectrofotométrico das cinéticas de hidrólise para a formação de HBt (esquerda), assim como os decaimentos exponenciais em função do tempo (direita).

Analisando os espectros de varredura das cinéticas de hidrólise das betalaínas em tampão pH 9,0 a 25 °C (Figura 14, esquerda), observa-se apenas a presença do ácido betalâmico ($\lambda^{\text{abs}} = 420 \text{ nm}$) ao final dos experimentos, como previsto. Em comparação com as cinéticas de decomposição parcial em H₂O a 25 °C (Figura 13, esquerda), nota-se que a identificação de ácido betalâmico ao final do experimento é dependente do valor de pH da solução. O ácido betalâmico é formado mais rapidamente em pH 9,0 que em H₂O (pH 7,0), logo, a velocidade de formação de ácido betalâmico se torna maior que a velocidade de sua decomposição em pH 9,0.

Após a realização dos experimentos de hidrólise das betalaínas em tampão pH 9,0 a 25 °C, foi possível determinar os valores de constante de absorvidade molar (ϵ) e constante cinética observada (k'_{obs}). A Tabela 7 resume os valores encontrados. Os valores possuem uma incerteza experimental propagada razoavelmente elevada devido à incerteza experimental atrelada ao próprio valor de ϵ de HBt em H₂O.

Tabela 7. Resumo dos valores de constante de absorvidade molar (ϵ) e constante cinética observada (k'_{obs}) obtidos nos experimentos de hidrólise realizados em tampão pH 9,0 a 25 °C para cada betalaína em triplicata ($[\epsilon] = \text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\text{mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$). Para as betalaínas *N*-Me cBeet151 e *N*-Me cbzBeet, as constantes cinéticas foram determinadas a partir de 100 min devido a um comportamento cinético diferente nos primeiros 100 min. Os quatro valores de k'_{obs} foram obtidos através das curvas betalânicas (Figura 14, direita, em preto).

Betalaína	<i>N</i> -Me cBeet120	<i>N</i> -Me cBeet151	<i>N</i> -Me cbzBeet	<i>N</i> -MecsBeet124
$\epsilon (\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	$(6,1 \pm 0,5) \times 10^4$	$(6,3 \pm 0,5) \times 10^4$	$(6,0 \pm 0,5) \times 10^4$	$(6,2 \pm 0,5) \times 10^4$
$k'_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(8,6 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(7,7 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^{-4}$

3.4. Caracterização fotofísica das betalaínas

As betalaínas foram caracterizadas por Espectroscopia de Absorção e Fluorescência na região do ultravioleta-visível (Método 5.2.11, Figura 15). Os espectros de absorção (em preto), emissão (em azul) e excitação (em vermelho) de todas betalaínas, na Figura 15, mostram comportamento similar com trabalho anterior do grupo³⁶ e de acordo com o esperado. Todos espectros estão normalizados por motivos de comparação visual.

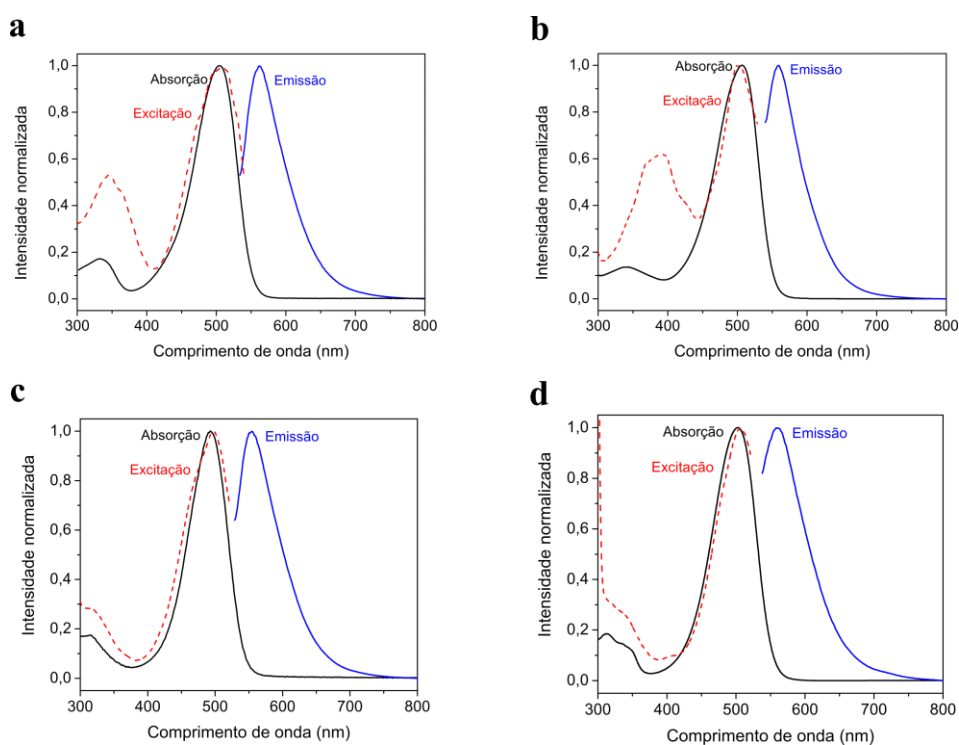


Figura 15. Caracterização fotofísica das betalaínas (a) *N*-Me cBeet120, (b) *N*-Me cBeet151, (c) *N*-Me cbzBeet e (d) *N*-Me cBeet124 em H₂O a 25 °C.

Os valores dos máximos de absorção (λ^{abs}) e emissão (λ^{em}) e deslocamentos de Stokes ($\Delta\nu$) das betalaínas *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124 estão resumidos na Tabela 8. Os valores dos máximos de absorção das quatro betalaínas variam pouco entre si, apesar das diferenças estruturais. Os deslocamentos de Stokes, por sua vez, variam entre 1800 e 2100 cm^{-1} . Estes altos valores para o deslocamento de Stokes são resultantes de uma boa separação entre os espectros de absorção e emissão das betalaínas. Uma boa separação

espectral minimiza erros de auto-absorção de amostras.

Tabela 8. Resumo dos valores de máximos de absorção e emissão e deslocamentos de Stokes ($\Delta\nu$) das betalaínas *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124 obtidas por Espectroscopia de Absorção e Fluorescência na região do ultravioleta-visível.

Betalaína	<i>N</i>-Me cBeet120	<i>N</i>-Me cBeet151	<i>N</i>-Me cbzBeet	<i>N</i>-Me csBeet124
λ^{abs} (nm)	504	508	494	502
λ^{em} (nm)	560	560	550	560
$\Delta\nu$ (nm)	56	52	56	58
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	1984	1828	2061	2063

Na Figura 15, todos espectros de absorção das betalaínas *N*-metiladas mostram duas transições eletrônicas oriundas do sistema 1,5-pentametínico conjugado, uma de mais baixa energia (S_0 - S_1), em torno de 500 nm, e outra de mais alta energia (S_0 - S_2), em torno de 325 nm. Sabe-se que ambas transições eletrônicas são oriundas das betalaínas porque nos experimentos de purificação por cromatografia líquida, os picos puros das betalaínas apresentaram os mesmos dois máximos de absorção.

Complementarmente, experimentos de excitação auxiliam na comprovação da origem da fluorescência em experimentos de emissão. O resultado obtido é condizente com o esperado. Todos os perfis de excitação estão de acordo com os perfis de absorção das betalaínas, mostrando que a fluorescência é de fato proveniente do sistema estudado. Entretanto, nos espectros de excitação (em vermelho, Figura 15) das betalaínas *N*-Me cBeet120 e *N*-Me cBeet151, nota-se uma contribuição maior que a esperada no intervalo próximo à transição S_0 - S_2 , o que sugere que deve haver uma outra espécie emitindo fluorescência em solução. Sugere-se que haja contaminação das aminas precursoras inerente ao equilíbrio das betalaínas em água, uma vez que o rendimento quântico de

fluorescência das aminas precursoras são cerca de 2 ordens de grandeza maior e seus máximos de absorção (Anexos) estão compreendidos neste intervalo.^{17,62,63}

Os rendimentos quânticos de fluorescência das betalaínas foram obtidos através de experimentos em triplicata com o auxílio do espectrofluorímetro (Método 5.2.13), através de uma comparação com padrão secundário, rodamina B. Os valores obtidos estão resumidos na Tabela 9. Em média, o mesmo comportamento foi observado em comparação ao trabalho anterior do grupo³⁸ – no qual o rendimento quântico de fluorescência das duas betalaínas metiladas em questão diminuiu pela metade – exceto para a betalaína *N*-Me csBeet124, exemplo no qual não houve variação do rendimento quântico de fluorescência.

Tabela 9. Resumo dos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{FI}) obtidos nos experimentos realizados em triplicata para cada betalaína.

Betalaína	<i>N</i>-Me cBeet120	<i>N</i>-Me cBeet151	<i>N</i>-Me cbzBeet	<i>N</i>-Me csBeet124
$\Phi_{FI} \times 10^{-3}$	4,1 ± 0,1	7,0 ± 0,4	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1

Os rendimentos quânticos de fluorescência das betalaínas *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124 variam entre cerca de 10^{-2} – 10^{-3} . Estes valores são baixos quando comparados a moléculas que possuem rendimento quântico próximos a 1, como por exemplo fluoresceína, em NaOH 0,1 M, igual a $0,95 \pm 0,03$ ⁶⁴ e perileno, em benzeno, igual a $0,99 \pm 0,03$ ⁶⁵, porém a estrutura das betalaínas possui uma gama de possibilidades de aplicações, como por exemplo, interações com outras moléculas químicas em ambientes mais complexos. A estrutura das betalaínas é rica em termos de possibilidades de interações químicas, pois nela há grupos com carboxilatos, imina, enamina, conjugação 1,5-pentametínica, além de propriedades químicas já estabelecidas, como propriedades redox^{36,38,66–68}, marcadores celulares⁷ e corantes alimentares^{21–25}. Ainda que 2 a 3 ordens

de grandeza menos fluorescentes que moléculas já existentes, betalaínas ainda podem ser usadas como fluoróforos e sondas fluorescentes em geral. Betalaínas possuem o apelo de serem usadas como sondas que ligam, do inglês *turn-on*, como por exemplo a betalaína cBeet120, a qual já foi registrada na literatura como sonda betalaínica.⁷ Neste caso, a cBeet120 é afetada pelo ambiente celular, resultando em um aumento de sua fluorescência, favorecendo a marcação em questão. Com o aumento da persistência em H₂O através da *N*-metilação desta última, sugere-se que a *N*-Me cBeet120 possa ser uma forte candidata a substituir sua análoga não metilada em experimentos como sondas fluorescentes em células.

3.5. Comparação de propriedades entre betalaínas

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, as propriedades fotofísicas e físico-químicas de betalaínas dos tipos cBeets e csBeet124 podem ser comparadas com as dos tipos *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124. A Tabela 10 mostra, resumidamente, as principais propriedades estudadas em comum para ambos conjuntos de betalaínas não naturais.

Da Tabela 10, pode-se notar que tanto os comprimentos de onda de absorção quanto de emissão das betalaínas *N*-Me cBeets e *N*-MecsBeet124 estão deslocados para o azul em relação às betalaínas análogas não metiladas. Como as condições experimentais nas quais foram obtidos estes resultados (solvente e temperatura) são iguais, este efeito hipsocrômico pode ser explicado pela concentração de carga no derivado metilado que resulta no aumento da diferença da energia entre os orbitais envolvidos na transição eletrônica. Deste modo, menos deslocalização dos pares eletrônicos das duplas ligações do sistema 1,5-pentametínico ocorre em sentido ao nitrogênio imínico com carga positiva.

Tabela 10. Resumo das principais propriedades das betalainas *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124 em comparação às cBeets e csBeet124³⁶.

Betalaina	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) x 10 ⁴	Φ_{Fl} x 10 ⁻³	(ϵ x Φ_{Fl}) x 10 ³
cBeet120	520	570	1687	2	6,5	6,3 ± 0,1	0,41
<i>N</i>-Me cBeet120	504	560	1984	52 ± 4	6,1 ± 0,5	4,1 ± 0,1	0,25
cBeet151	519	570	1724	2	6,5	21,4 ± 0,3	1,4
<i>N</i>-Me cBeet151	508	560	1828	35 ± 4	6,3 ± 0,5	7,0 ± 0,4	0,44
cbzBeet	512	564	1800	4	6,4	3,4 ± 0,2	0,22
<i>N</i>-Me cbzBeet	494	550	2061	(21 ± 1) x 10 ¹	6,0 ± 0,5	1,0 ± 0,1	0,06
csBeet124	518	570	1761	2,5	6,6	3,2 ± 0,1	0,21
<i>N</i>-Me csBeet124	502	560	2063	56 ± 1	6,2 ± 0,5	3,3 ± 0,1	0,21

O abaixamento dos valores de máximo absorção na região do visível das betalaínas sintetizadas, em relação às análogas metiladas, sugere um aumento da energia inerente à transição eletrônica S_0-S_1 . Entretanto, a variação de energia desta transição em cerca de 15 nm pode não ser facilmente detectável. Os dados de RMN de ^1H obtidos corroboram com esta dificuldade na tentativa de se diferenciar o ambiente químico do cromóforo entre as betalaínas metiladas e não metiladas em questão.

Em relação ao deslocamento de Stokes, as betalaínas metiladas sintetizadas neste trabalho apresentam um aumento sistemático em relação às análogas não metiladas. As betalaínas *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124 apresentam um deslocamento de Stokes entre 1800 e 2100 cm^{-1} , ao passo que as betalaínas cBeets e csBeet124 possuem seu valor entre 1600 e 1800 cm^{-1} .

O parâmetro que mais se destaca na Tabela 10 é o tempo de meia-vida. Em média, a persistência das betalaínas foi aumentada em cerca de 20 vezes, ou seja, a introdução do grupo metila resultou em um efeito sistemático de estabilização. Esta observação permite racionalizar o possível papel químico da metila na estrutura das betalaínas frente ao ambiente que elas são dispostas. Sugere-se que a introdução da metila na estrutura das betalaínas tenha diminuído sua reatividade frente à H_2O .

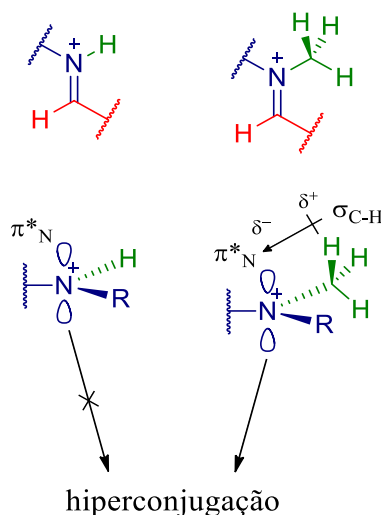
Em termos de interação entre moléculas, espera-se que a introdução de uma metila nas betalaínas possa ter aumentado sua lipofilicidade. Este aumento de lipofilicidade é geralmente proveniente de um fenômeno chamado de “efeito metila”. A introdução de grupos metila em moléculas geralmente vem acompanhada de um aumento de lipofilicidade (ou hidrofobicidade), conhecido como $\log P$, *e.g.*, logaritmo do coeficiente de partição da molécula entre *n*-octanol e água.⁶⁹

Cálculos realizados a partir de programas básicos de predição mostram que as

betalaínas cBeets e csBeet124 possuem seu valor de log P diminuído de cerca de -1,0 para cerca de -3,0 após a *N*-metilação, resultado contrário ao esperado segundo o “efeito metila”.

O hipotético aumento de lipofilicidade das betalaínas semissintetizadas com a *N*-metilação pode explicar, em partes, certa diminuição do ataque nucleofílico de moléculas de água, provavelmente pela forma com a qual as betalaínas se arranjam no espaço. Sabe-se que o ataque nucleofílico da água em íons imínio ocorre segundo o ângulo de Bürgi-Dunitz, ângulo (cerca de 107°) de interação entre orbitais ligante e antiligante ideal. É razoável supor que qualquer perturbação estrutural em átomos vizinhos, que compõem o orbital antiligante da ligação carbono-nitrogênio, possa prejudicar este ângulo e, conseqüentemente, prejudicar a hidrólise.

Em termos eletrônicos, a metila possui uma característica importante frente a átomos vizinho com orbitais vazios. O Esquema 20 mostra, na esquerda, uma estrutura genérica de uma betalaína proveniente de uma amina primária genérica e, na direita, proveniente de uma *N*-metilamina genérica.



Esquema 20. Comparação estrutural-eletrônica entre betalaínas dos tipos cBeets e csBeet124 com *N*-Me cBeets e *N*-Me csBeet124.

Uma visão lateral da porção imínica de ambas betalaínas evidencia uma característica importante de betalaínas *N*-metiladas: A interação entre orbitais σ_{C-H} e π^*_N através da hiperconjugação. Na direita, o par eletrônico da ligação σ_{C-H} (em verde) é capaz de interagir lateralmente como orbital sp^2 (em azul) vazio do nitrogênio vizinho. Esta interação, também chamada de hiperconjugação, resulta em uma diminuição do caráter positivo do átomo vizinho. Esta diminuição do caráter positivo possui uma implicação imediata; diminuição da eletrofilicidade do carbono imínico vizinho ao nitrogênio. Ou seja, a doação de densidade eletrônica, proveniente da metila, gera um balanço de cargas que percorre 2 átomos. Uma vez estabilizado, o carbono da porção imínica está menos reativo, e, conseqüentemente, haverá maior estabilidade em solventes que podem realizar o ataque nucleofílico neste carbono, como por exemplo a água. Entretanto, os dados de RMN de 1H discutidos anteriormente sugerem que este efeito não é observado com clareza, contrariamente ao esperado.

O pK_{aH} calculado – a partir de programas básicos de predição – da porção imínica das betalaínas cBeets e csBeet124 é cerca de 5,5, ao passo que a da porção enamínica é cerca de 0,5. Esta simples predição sugere que as betalaínas cBeets e csBeet124 podem estar protonadas no nitrogênio imínio em água pura. Estes valores também corroboram com o fato destas betalaínas não metiladas sofrerem hidrólise mais facilmente. Com a *N*-metilação, não se aplica mais o conceito de pK_{aH} ao nitrogênio imínico e o pK_{aH} enamínico mantém seu valor de 0,5 aproximadamente.

Em relação ao valor do coeficiente de absorvidade molar das betalaínas, nota-se que o valor determinado para as metiladas possui um ligeiro decréscimo sistemático. Entretanto, os valores de incerteza das medidas mostram que os valores entre cada par de betalaínas (metiladas e não metiladas) devem ser tratados como iguais. Este valor de

incerteza é grande e oriundo da utilização de um método (5.2.12) que se baseia em um valor com uma grande incerteza experimental associada – valor de ϵ do HBt em água.

O coeficiente de absorvidade molar é um valor que indica quanta luz uma substância é capaz de absorver em um dado comprimento de onda (na maioria dos casos, no comprimento de onda de máxima absorção). Em geral, betalaínas possuem alto coeficiente de absorvidade molar, por conseguinte, soluções aquosas bem diluídas, cerca de $10^{-4} - 10^{-3}$ M, podem fornecer absorção em torno de 1. Isto permite a realização de experimentos, utilizando espectroscopia de absorção, com uma quantidade muito pequena de betalaína.

A estabilidade adicional gerada nas betalaínas semissintetizadas neste trabalho, por outro lado, resultou em uma diminuição, porém não drástica, do rendimento quântico de fluorescência das betalaínas cumarínicas. De acordo com a Tabela 10, quando as betalaínas cBeets foram metiladas, seus valores de rendimento quântico diminuíram, ao passo que, a metilação da csBeet124 não alterou seu valor.

A fluorescência é um fenômeno que atrai interesse de muitos cientistas. Este é um fenômeno que pode ser tanto encontrado em moléculas disponíveis na natureza quanto sintetizadas. Há diversos parâmetros que podem afetar a fluorescência de uma molécula, como por exemplo propriedades estruturais, solvente, temperatura, dentre outros.^{17,65} Na comparação de todas as propriedades das betalaínas metiladas com suas análogas não metiladas, tanto o solvente quanto a temperatura foram mantidos constantes. Do ponto de vista estrutural, houve uma alteração não só de um hidrogênio por uma metila, mas também, ocorreu uma perturbação na variação de dipolo elétrico da molécula, o que justifica uma variação na fluorescência. A diminuição da fluorescência pode estar relacionada com a diminuição da variação do momento de dipolo elétrico após a *N*-

metilação das betalaínas. Ao analisar a estrutura das cBeets, nota-se que o grupo cumarínico é atraente de elétrons e, perto a este, há o grupo imínico protonado, que intensifica o caráter retirador desta parte da molécula. A introdução de um grupo metila no lugar do próton deve diminuir o caráter atraente de elétrons e, de maneira geral, diminuir a variação de momento de dipolo das betalaínas análogas metiladas como um todo. Este efeito pode não ter sido observado na metilação da betalaína cBeet124 devido a diferença eletrônica entre os grupos funcionais lactona para lactama.

Um parâmetro útil para a comparação simples entre moléculas fluorescentes é o produto entre o coeficiente de absorvidade molar e o rendimento quântico de fluorescência ($\epsilon \times \Phi_{\text{Fl}}$). Este produto é diretamente proporcional ao brilho do fluoróforo, pois leva em conta tanto a quantidade de luz absorvida quanto a eficiência no processo de fluorescência. O brilho, portanto, manteve-se na mesma ordem de grandeza para as betalaínas *N*-Me cBeet120 e *N*-Me csBeet124, apenas. Nos dois outros exemplos, foi perdida uma ordem de grandeza.

O brilho é um parâmetro levado em conta no estudo de fluoróforos.⁷⁰ As cumarinas 120 e 151 são amplamente utilizadas como corantes de *lasers* e sabe-se que seus valores de brilho são cerca de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ com emissão em torno de 430 e 480 nm, respectivamente.³³ Contudo, as betalaínas semissintetizadas neste trabalho possuem brilho cerca de uma a duas ordens de grandeza abaixo das cumarinas precursoras, porém são solúveis em água e, além disso, possuem emissão em comprimentos de onda diferente (560 nm). Fluoróforos muito conhecidos e utilizados, como tirosina, triptofano, NADH e iodeto de propídio, possuem brilho na mesma ordem de grandeza que as betalaínas deste trabalho.⁷⁰ O rendimento quântico de fluorescência de betalaínas pode chegar em até 20% em micelas reversas³³, podendo haver um ganho adicional de brilho e estas serem

comparáveis com as cumarinas 120 e 151, porém com propriedades fotofísicas e físico-químicas diferentes e mais atraentes.

4. Conclusões

A *N*-metilação das quatro betalaínas aumentou sua persistência em água, como esperado, em comparação às análogas não metiladas. Entretanto, a introdução de um grupo metila na porção imínica parece ter diminuído a fluorescência das betalaínas em água, mas não drasticamente. Apenas em um exemplo a fluorescência não foi alterada. Os perfis de absorção e emissão variaram de forma sistemática, com deslocamento para o azul, o que mostra claramente a mudança de vermelho (não metiladas) para laranja (metiladas) na cor dos sólidos. De fato, este trabalho confirma a hipótese que foi realizada no trabalho anterior do grupo³⁶ – das quatro betalaínas não metiladas – no qual sugeriu-se que as betalaínas estão protonadas no nitrogênio imínico em solução aquosa.

5. Parte Experimental

5.1. Materiais

Todos compostos químicos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 11.

Tabela 11. Compostos químicos utilizados neste trabalho.

Composto químico	Fórmula estrutural/Abreviatura
Acetato de etila	AcOEt
Acetona	CH ₃ COCH ₃
Acetonitrila	MeCN
Ácido acético	CH ₃ COOH
Ácido bórico	H ₃ BO ₃
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄
Ácido fórmico	HCOOH
Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico	TsOH
Água	H ₂ O
Água deuterada	D ₂ O
<i>m</i> -aminofenol	-
6-Amino-3,4-benzocumarina	cbz
7-Amino-4-metilcarboestiril	cs124
7-Amino-4-metilcumarina	c120
7-Amino-4-(trifluorometil)cumarina	c151
Boroidreto de sódio	NaBH ₄
Carbonato de potássio	K ₂ CO ₃
Cianoboroidreto de sódio	NaBH ₃ CN

Cloreto de cálcio	CaCl ₂
Cloreto de hidrogênio	HCl
Cloreto de sódio	NaCl
Cloreto de zinco	ZnCl
Clorofórmio	CHCl ₃
Clorofórmio deuterado	CHD ₃
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂
Dimetilcarbonato	DMC
1,2-dimetóxietano	DME
<i>N,N</i> -dimetilformamida	DMF
Dimetilsulfóxido deuterado	DMSO-d ₆
Dióxido de carbono	CO ₂
Etanol	EtOH
Éter dietílico	EtOEt
Faujasita NaY	NaY
Formaldeído	H ₂ CO
Heptano	-
Hidrogenocarbonato de sódio	NaHCO ₃
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH
Hidróxido de potássio	KOH
Hidróxido de sódio	NaOH
Hipoclorito de sódio	NaClO
Iodeto de metila	CH ₃ I
Metanol	MeOH

Paraformaldeído	[H ₂ CO] _n
Peneira molecular 4 Å	-
Pentóxido de fósforo	P ₂ O ₅
Rodamina B	-
Sephadex LH 20	-
Sílica gel	-
Sódio metálico	Na
Sulfato de magnésio	MgSO ₄
Tolueno	-

5.2. Métodos

5.2.1. Extração do ácido betalâmico²⁸

Beterrabas frescas (*Beta vulgaris*) foram cortadas e processadas em uma centrífuga de alimentos tipo *juicer* (Phillips-Walita, modelo PI1855). Cerca de 500 ml de suco foram filtrados em filtro de pano e transferidos para um béquer de 1 litro e resfriado entre 0 – 2 °C. Sob agitação mecânica, foi adicionado hidróxido de amônio 27%, até que a solução atingisse valor de pH 11,65, acompanhado com o auxílio de um eletrodo de pH mergulhado cuidadosamente no suco e mantendo-se a temperatura. Após cerca de 30 min, ainda sob agitação mecânica, foi observada a mudança de coloração da solução de vinho para castanho amarelado, indicando que houve a hidrólise das betalaínas presentes no suco, formando ácido betalâmico em sua forma totalmente desprotonada. Mantendo-se a temperatura não superior a 0 °C, foi adicionado rapidamente HCl 37%, até que o valor de pH da solução atingisse 1,5 – 2,0, formando a espécie protonada (neutra) do ácido betalâmico. Duas extrações com 200 ml de AcOEt gelado foram realizadas. A suspensão

contendo fase orgânica (ácido betalâmico em AcOEt) e suco foi centrifugada a 7.000 x g, 5 min, 3 °C. O sobrenadante amarelo foi congelado em banho de etanol e gelo seco (-72 °C), de forma que cristais brancos de gelo, contendo sais e água, se formassem. O precipitado foi filtrado e a concentração da solução de ácido betalâmico em AcOEt foi determinada espectrofotometricamente. Não há um valor exato na literatura do valor de $\epsilon_{\text{água}}$ para HBt, então foi determinado o valor médio destes valores como valor de referência e estimou-se a incerteza utilizando o desvio padrão; $(25 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.^{39,71,72} Em uma extração típica são obtidos 250 ml de ácido betalâmico em uma concentração cerca de 10^{-4} M^{-1} .

5.2.2. Semissíntese das betalaínas

A uma solução de ácido betalâmico $\sim 10^{-3} \text{ M}$ em AcOEt, foram adicionados amina *N*-metilada (3 equivalentes) e ácido *p*-toluenossulfônico (3 equivalentes). Agitou-se e notou-se, instantaneamente, o início da evolução de cor amarela a alaranjada, indicando a formação da betalaína correspondente. A mistura reacional foi, então, mantida a -20 °C por 3 dias para precipitação. Depois, o precipitado foi centrifugado a $12.000 \times \text{g}$, 2 °C, por 15 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com acetato de etila gelado para remoção do excesso de amina precursora. Repetiu-se este processo 2 vezes. O precipitado bruto foi seco por meio de fluxo de N_2 após completa lavagem.

5.2.3. Purificação das cumarinas e carboestiril 124 *N*-metilados

As cumarinas e carboestiril *N*-metilados foram purificadas por Cromatografia Líquida em Coluna. Todas as purificações foram realizadas utilizando sílica gel como fase estacionária. A fase móvel escolhida foi otimizada para cada produto. A detecção do produto foi realizada através de Cromatografia em Camada Fina, revelando-se com luz nos comprimentos de onda 365 e 254 nm.

O método das corridas cromatográficas utiliza cerca de 50 – 80 g de sílica gel em uma coluna de 2,5 x 20 cm (cumarinas) com pressão de 20 psi ou 1,5 x 70 cm (carboestiril 124) por gravidade para cerca de 50 – 100 mg de amostra. A amostra é introduzida na coluna sob a forma de solução sólida com a mínima quantidade de sílica possível. As frações puras foram coletadas, evaporadas à pressão reduzida, secas em alto vácuo e armazenadas a temperatura ambiente. Condições otimizadas das fases móveis: Cumarina 120 – tolueno/AcOEt 7:3 (v/v); Cumarina 151 – tolueno/AcOEt 9:1 (v/v); Benzocumarina – tolueno/MeOH 85:15 (v/v); Carboestiril 124 – tolueno/MeOH 4:1 (v/v).

5.2.4. Purificação das betalaínas

Após secagem das betalaínas brutas semissintetizadas, estas foram purificadas por Cromatografia Líquida em Coluna por Permeação em Gel. Todas as purificações foram realizadas utilizando Sephadex LH 20 como fase estacionária e H₂O como fase móvel. A detecção da fração pura foi realizada visualmente, uma vez que a betalaína possui cor laranja e, o ácido betalâmico, amarelo. Qualquer resto de amina precursora na amostra bruta fica retida na base.

O método das corridas cromatográficas utiliza cerca de 15 g de Sephadex LH 20 em uma coluna de 1,5 x 20 cm com pressão de 20 psi. A introdução da betalaína é realizada por ressuspensão em H₂O, e em seguida, as frações puras coletadas foram congeladas e liofilizadas para armazenamento a -20 °C.

5.2.5. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas das cumarinas e carboestiril 124 *N*-metilados

O progresso e a formação dos intermediários nas reações de *N*-metilação das cumarinas e carboestiril 124 foram acompanhados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de baixa resolução. Todas as corridas foram realizadas no

cromatógrafo gasoso-espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP2010S em coluna de 5% difenil / 95% dimetil polisiloxana.

O método das corridas cromatográficas consistiu em 1 – 5 μ l de volume de injeção de soluções com cerca de 1 mg/ml em AcOEt, temperatura de injeção igual a 260 °C, *splitless*, com temperatura inicial de 80 °C por 1 minuto, rampa de 15 °C/min até 280 °C, mantendo-se por 3 minutos (tempo total = 17,33 minutos).

5.2.6. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das betalaínas

O progresso e a formação das betalaínas foram acompanhados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Todas corridas foram realizadas no cromatógrafo líquido HPLC Shimadzu Prominence em coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm – 1,8 μ m).

O método das corridas cromatográficas consistiu em 4 μ l de volume de injeção de soluções com cerca de 0,1 μ mol/ml em H₂O, coluna a temperatura ambiente, fase móvel sendo uma mistura de água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) com 0,05% de ácido fórmico, fluxo de 0,2 ml min⁻¹ e detecção em 254 e 500 nm. A mistura da fase móvel foi utilizada da seguinte maneira: gradiente linear de 5 – 100% de B em 9 min, mantendo-se até 11 min em 100% de B, seguido de outro gradiente linear de 100 – 5% até 11,2 min, mantendo-se até 15,5 min em 5% de B (tempo total = 15,5 minutos).

5.2.7. Caracterização estrutural por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas das betalaínas

Os experimentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas foram realizados no cromatógrafo líquido-espectrômetro de massas HPLC Shimadzu Prominence acoplado ao Bruker Daltonics q-TOF maXis 3G em coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm – 1,8 μ m).

O método das corridas cromatográficas consistiu em 4 μl de volume de injeção de soluções com cerca de 0,01 $\mu\text{mol/ml}$ em H_2O , coluna a temperatura ambiente, fase móvel sendo uma mistura de água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) com 0,05% de ácido fórmico, fluxo de 0,2 ml min^{-1} e detecção em 254 e 370 nm. A mistura da fase móvel foi utilizada da seguinte maneira: gradiente linear de 5 – 100% de B em 9 min, mantendo-se até 11 min em 100% de B, seguido de outro gradiente linear de 100 – 5% até 11,2 min, mantendo-se até 15,5 min em 5% de B (tempo total = 15,5 minutos). As detecções de massas foram realizadas através de ionização por *electrospray* em modo positivo.

5.2.8. Caracterização estrutural por Espectrometria de Massas das cumarinas e carboestiril 124 *N*-metilados

Os experimentos de Espectrometria de Massas foram realizados no cromatógrafo espectrômetro de massas Bruker Daltonics q-TOF maXis 3G por injeção direta. As detecções de massas foram realizadas através de ionização por *electrospray* em modo positivo, utilizando MeOH como solvente.

5.2.9. Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H das betalaínas e ^1H e ^{13}C das cumarinas e carboestiril 124 *N*-metilados

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500,13 MHz para ^1H e 125,75 MHz para ^{13}C , a 25 °C. Utilizou-se D_2O como solvente para as betalaínas, CDCl_3 para as cumarinas *N*-metiladas e DMSO-d_6 para o carboestiril 124 *N*-metilado. Para as betalaínas, os experimentos foram realizados com supressão do sinal de H_2O (4,8 ppm).

Os experimentos foram realizados com 550 μL de solvente com soluções de concentrações próximas a 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ para as betalaínas e 10 mg/ml para as cumarinas e carboestiril 124.

5.2.10. Caracterização fotofísica por Espectroscopia de Absorção na região do ultravioleta-visível das cumarinas e carboestiril 124 *N*-metilados

Os espectros de absorção foram adquiridos em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 com aquisição do espectro de absorção na faixa de 300 – 750 nm, com banho termostaticado TCC-Controller a 25 °C. As medições foram realizadas em cubetas de quartzo de 1,5 ml, caminho ótico de 10 mm, com um volume final de solução de 1 ml.

5.2.11. Caracterização fotofísica por Espectroscopia de Absorção e Emissão na região do ultravioleta-visível das betalaínas

Os espectros de absorção foram adquiridos em espectrofotômetro Varian-Cary 50 Bio e, os espectros de emissão, em espectrofluorímetro Varian-Cary Eclipse. A temperatura das celas foi mantida a 25 °C por meio de banho termostaticado acoplado a ambos os equipamentos, Agilent Technologie-PCB 1500 e Agilent Technologie-Cary Temperature Controller, respectivamente. Os espectros de emissão ($\lambda_{EX} = 500$ nm, $\lambda_{EM} = 520 - 800$ nm, $f^{ex} = f^{em} = 10$ mm, tensão = 600 V) e absorção (300 – 750 nm) da amostra foram adquiridos em cubeta de quartzo de 1,5 ml com caminho ótico de 10 mm.

5.2.12. Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) das betalaínas

O coeficiente de absorvidade molar (ϵ) das betalaínas foi determinado pelo método do ponto final.⁴⁴ A decomposição das betalaínas em solução tampão Britton- Robinson pH 9,0 foi monitorada em cubeta de quartzo (1,5 ml com caminho ótico de 10 mm) por Espectroscopia de Absorção na faixa de 300 – 750 nm, a 25 °C, em triplicata.

O método para determinação do valor de ϵ consistiu em utilizar cerca de 20 – 50 μ l de solução 0,1 μ mol/ml das betalaínas em 500 μ l de tampão pH 7,0; após seu espectro de absorção ser registrado, a mesma diluição das betalaína foi realizada substituindo o tampão pH 7,0 por uma solução tampão em pH 9,0. As cinéticas de hidrólise em pH 9,0

foram acompanhadas com aquisição de espectros de absorção a cada 5 min iniciando em uma absorção perto de 0,8. O valor de ϵ foi determinado correlacionando a concentração final de ácido betalâmico, produto da hidrólise, cujo valor de ϵ é conhecido, com a concentração inicial da betalaína em tampão pH 7,0:

$$C_{HBt}^{final} = C_{Beet}^{início} \quad \text{Eq. 1}$$

Considerando-se a Lei de Lambert-Beer:

$$\frac{Abs^{Beet}}{\epsilon^{Beet}} = \frac{Abs^{HBt}}{\epsilon^{HBt}} \quad \text{Eq. 2}$$

Reorganizando a Equação 2, o coeficiente de absorvidade molar das betalaínas foi então determinado pela seguinte relação:

$$\epsilon^{Beet} = \frac{Abs^{Beet}}{Abs^{HBt}} \epsilon^{HBt} \quad \text{Eq. 3}$$

Com o auxílio da Equação 3, foram determinados os valores dos coeficientes de absorvidade molar das betalaínas semissintetizadas. Este valor é imprescindível para o cálculo do rendimento das reações envolvendo betalaínas.

5.2.13. Determinação do rendimento quântico de fluorescência das betalaínas

Os espectros de emissão das amostras e do padrão foram adquiridos em cubeta de quartzo de 1,5 ml com caminho ótico de 10 mm. As soluções foram diluídas de forma que, nos máximos de absorção, esta fosse inferior a 0,1, a fim de evitar efeitos de reabsorção da amostra nos experimentos de emissão. Os espectros de emissão do padrão e das betalaínas foram adquiridos nas mesmas condições do equipamento ($\lambda_{EX} = 500$, $\lambda_{EM} = 520 - 800$ nm, $f^{ex} = f^{em} = 20$ mm, tensão = 600 V) em triplicata. A temperatura foi mantida a 25 °C com banho termostatizado Agilent Technologies-Cary Temperature

Controller, acoplado ao espectrofluorímetro Varian-Cary Eclipse.

Um gráfico que correlaciona a área de emissão com a absorção do composto foi construído para a betalaína e o coeficiente angular da reta traçada com intercepto igual a zero é correlacionado com o padrão de acordo com a Equação 4:

$$\Phi_{Fl}^x = \Phi_{Fl}^p \frac{\alpha^x}{\alpha^p} \left(\frac{n^x}{n^p}\right)^2 \quad \text{Eq. 4}$$

onde, Φ_{Fl} = rendimento quântico de fluorescência, a = coeficiente angular do gráfico área sob a curva de emissão de fluorescência versus absorção e n = índice de refração; x e p se referem à betalaína e à rodamina B, respectivamente.

5.2.14. Cinética de decomposição das betalaínas em água pura

As cinéticas de decomposição em H₂O foram acompanhadas com o auxílio de espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 com aquisição do espectro de absorção na faixa de 300 – 750 nm, com banho termostatizado TCC-Controller a 25 °C em triplicata. Os experimentos foram realizados durante o decaimento de 2 meias-vidas, com aquisição espectral a cada 80 minutos, iniciando em uma absorção perto de 1,0. As medições foram realizadas em cubetas de quartzo de 1,5 ml, caminho ótico de 10 mm, com um volume final de solução de 1 ml. Uma vez que a cinética de decomposição das betalaínas pode ser ajustada empregando-se uma função monoexponencial, é possível determinar o tempo de meia-vida através da seguinte relação:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \quad \text{Eq. 5}$$

5.2.15. Destilação da *N,N*-dimetilformamida

150 ml de DMF foram destilados na presença de 10 g de P₂O₅ no balão de destilação,

com coluna de Vigreux e tubo secante na unha do condensador. Recolheu-se o destilado em balão contendo peneira molecular de 4 Å ativada. A peneira molecular de 4 Å foi ativada previamente em estufa (cerca de 150°C) por 4 h.

5.2.16. Tampão Britton-Robinson

2,5 g de H_3BO_3 ($\text{pK}_a = 9,24$), 2,3 ml de CH_3COOH ($\text{pK}_a = 4,76$, $d = 1,049$ g/ml) e 1,9 ml de H_3PO_4 ($\text{pK}_{a1} = 2,14$; $\text{pK}_{a2} = 7,21$; $\text{pK}_{a3} = 12,36$, $d = 1,685$ g/ml) foram dissolvidos em 1 litro de água. Foram adicionados, sob agitação, porções de solução de NaOH 0,2 M ajustando os valores de pH da solução tampão para os valores desejados.

6. Referências

1. Braslavsky, S. E. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl. Chem.* **79**, 293–465 (2007).
2. Gonçalves, L. C. P. *et al.* Betaláínas: Das cores das beterrabas à fluorescência das flores. *Rev. Virtual Quim.* **7**, 292–309 (2015).
3. Zhang, Q. W., Lin, L. G. & Ye, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)* **13**, (2018).
4. Kinder, J. R. *et al.* Total syntheses of bengamides B and E. *J. Org. Chem.* **66**, 2118–2122 (2001).
5. Feher, M. & Schmidt, J. M. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 218–227 (2003).
6. Elnakady, Y. A. *et al.* Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
7. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. *PLoS One* **8**, (2013).
8. Cohen, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Food and Cosmetics Toxicology* **17**, 277–289 (1979).
9. Bittencourt, S. C., Caponi, S. & Maluf, S. Farmacologia no século XX: a ciência dos medicamentos a partir da análise do livro de Goodman e Gilman. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* **20**, 499–520 (2013).

10. Qu, J. *et al.* A ferrocene/Neuropium assembly showing phototriggered anticancer activity and fluorescent modality imaging. *Dalt. Trans.* **47**, 1479–1487 (2018).
11. Jones, G., Jackson, W. R., Choi, C. Y. & Bergmark, W. R. Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism. *J. Phys. Chem.* **89**, 294–300 (1985).
12. Chiozza, L. Ueber die Einwirkung des Schwefelammoniums auf die Nitrozimmtsäure. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **83**, 117–120 (1852).
13. Tashima, T. The structural use of carbostyryl in physiologically active substances. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 3415–3419 (2015).
14. Erlenmeyer, E. & Rosenhek, J. Ueber Carbostyryl. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **18**, 3295–3295 (1885).
15. Friedländer, P. & Ostermaier, H. Ueber das Carbostyryl. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **14**, 1916–1921 (1881).
16. Yokoo, H., Ohsaki, A., Kagechika, H. & Hirano, T. Unique properties of 1,5-naphthyridin-2(1H)-one derivatives as environmental-polarity-sensitive fluorescent dyes. *European J. Org. Chem.* **2018**, 679–687 (2018).
17. Rettig, W. & Klock, A. Intramolecular fluorescence quenching in aminocoumarines. Identification of an excited state with full charge separation. *Can. J. Chem.* **63**, 1649–1653 (1985).
18. Kuehne, A. J. C. & Gather, M. C. Organic Lasers: Recent Developments on Materials, Device Geometries, and Fabrication Techniques. *Chemical Reviews* **116**, 12823–12864 (2016).
19. Kürti, L. Streamlining amine synthesis. *Science (80-.)*. **348**, 863–864 (2015).
20. Stintzing, F. C. & Carle, R. Analysis of betalains. *Food Color. Chem. Funct. Prop.*

- 507–520 (2008).
21. Stintzing, F. C. & Carle, R. *Food colorants chemical and functional properties edited by Carmen Socaciu*. (CRC Press, 2008).
 22. Gengatharan, A., Dykes, G. A. & Choo, W. S. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Sci. Technol.* **64**, 645–649 (2015).
 23. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Fluorescent pigments: New perspectives in betalain research and applications. in *Food Research International* **38**, 879–884 (2005).
 24. Nemzer, B. *et al.* Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chem.* **127**, 42–53 (2011).
 25. Gonalves, L. C. P. *et al.* A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem.* **131**, 231–238 (2012).
 26. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Botany: floral fluorescence effect. *Nature* **437**, 334 (2005).
 27. Lagorio, M. G., Cordon, G. B. & Iriel, A. Reviewing the relevance of fluorescence in biological systems. *Photochemical and Photobiological Sciences* **14**, 1538–1559 (2015).
 28. Schliemann, W., Kobayashi, N. & Strack, D. The Decisive Step in Betaxanthin Biosynthesis Is a Spontaneous Reaction¹. *Plant Physiol.* **119**, 1217–1232 (1999).
 29. Strack, D., Vogt, T. & Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247–269 (2003).
 30. Tanaka, Y., Sasaki, N. & Ohmiya, A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* **54**, 733–749 (2008).

31. Stafford, H. A. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sci.* **101**, 91–98 (1994).
32. Fischer, N. & Dreiding, A. S. Biosynthesis of Betalaines. On the Cleavage of the Aromatic Ring during the Enzymatic Transformation of Dopa into Betalamic Acid. *Helv. Chim. Acta* **55**, 649–658 (1972).
33. Rodrigues, A. C. B. *et al.* Bioinspired water-soluble two-photon fluorophores. *Dye. Pigment.* **150**, 105–111 (2018).
34. 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).
35. 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).
36. Rodrigues, A. C. B. & Bastos, E. L. Betalaínas cBeet e csBeet: semissíntese, propriedades fotofísicas e interações intermoleculares. (Universidade de São Paulo, 2017).
37. Shults, M. D. & Imperiali, B. Versatile Fluorescence Probes of Protein Kinase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14248–14249 (2003).
38. Nakashima, K. K. & Bastos, E. L. Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalaínas. (Universidade de São Paulo, 2015).
39. Gonçalves, L. C. P. & Bastos, E. L. Betalaínas: semissíntese, capacidade antirradicalar e aplicação como sondas em sistemas biológicos. (Universidade de São Paulo, 2012).
40. Badgett, B., Parikh, I. & Dreiding, A. S. Totalsynthese eines Neobetanidin-

- Derivates und des Neobetenamins. *Helv. Chim. Acta* **53**, 433–448 (1970).
41. Chang, C., Kimler, L. & Mabry, T. J. Biogenesis of betalamic acid. *Phytochemistry* **13**, 2771–2775 (1974).
 42. Bartoloni, F. H. *et al.* Photophysics and hydrolytic stability of betalains in aqueous trifluoroethanol. *Monatshefte fur Chemie* **144**, 567–571 (2013).
 43. Esteves, L. C. & Bastos, E. L. Estudo cinético da hidrólise de betalaínas-modelo. (Universidade de São Paulo, 2016).
 44. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **232**, 449–460 (2010).
 45. Büchi, G., Fliri, H. & Shapiro, R. A Synthesis of Betalamic Acid. *Journal of Organic Chemistry* **42**, 2192–2194 (1977).
 46. Tsai, C.-S., Liu, P.-Y., Yen, H.-Y., Hsu, T.-L. & Wong, C.-H. Development of trifunctional probes for glycoproteomic analysis. *Chem. Commun. (Camb)*. **46**, 5575–5577 (2010).
 47. Kattamuri, P. V. *et al.* Practical Singly and Doubly Electrophilic Aminating Agents: A New, More Sustainable Platform for Carbon-Nitrogen Bond Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 11184–11196 (2017).
 48. Clayden, J. J., Greeves, N. & Warren, S. *Organic Chemistry. Oxford University Press* (2012).
 49. Barluenga, J., Bayón, A. & Asensio, G. A new and specific method for the monomethylation of primary amines. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1334–1335 (1984).
 50. Abdel-Magid, A. F., Maryanoff, C. A. & Carson, K. G. Reductive amination of

- aldehydes and ketones by using sodium triacetoxyborohydride. *Tetrahedron Lett.* **31**, 5595–5598 (1990).
51. Malkov, A. V, Vranková, K., Černý, M. & Kočovský, P. On the Selective N - Methylation of BOC-Protected Amino Acids. *J. Org. Chem.* **74**, 8425–8427 (2009).
 52. Selva, M., Tundo, P. & Perosa, A. Reaction of Functionalized Anilines with Dimethyl Carbonate over NaY Faujasite. 3. Chemoselectivity toward Mono- N - methylation. *J. Org. Chem.* **68**, 7374–7378 (2003).
 53. Stephen C., M., Carmichael, P. & Waring, R. Aminophenols. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (2001).
 54. Tundo, P. & Selva, M. The chemistry of dimethyl carbonate. *Acc. Chem. Res.* **35**, 706–716 (2002).
 55. Budavari and Smith, A. H. The Merck index. *An Encycl. Chem. Drugs Biol.* **11**, 2–3 (1989).
 56. Bonino, F. *et al.* Dimethyl carbonate in the supercages of NaY zeolite: The role of local fields in promoting methylation and carboxymethylation activity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 4774–4777 (2005).
 57. Stintzing, F. C., Kugler, F., Carle, R. & Conrad, J. First ¹³C-NMR assignments of betaxanthins. *Helv. Chim. Acta* **89**, 1008–1016 (2006).
 58. Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B. & Mizrahi, Y. ¹H and ¹³C NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1725–1728 (2006).
 59. Pioli, R. M. & Bastos, E. L. Efeito da modificação da porção imínica de betalaínas sobre as suas propriedades eletrônicas. (Universidade de São Paulo, 2018).

60. Gandia-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiol.* **138**, 421–432 (2005).
61. Dumbravă, A., Enache, I., Oprea, C. I., Georgescu, A. & Gîrțu, M. A. Toward a more efficient utilisation of betalains as pigments for Dye-Sensitized solar cells. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **7**, 339–351 (2012).
62. Pal, H., Nad, S. & Kumbhakar, M. Photophysical properties of coumarin-120: Unusual behavior in nonpolar solvents. *J. Chem. Phys.* **119**, 443–452 (2003).
63. Saroja, G., Sankaran, N. B. & Samanta, A. Photophysical study of two carbostyryl dyes: Investigation of the possible role of a rotary decay mechanism. *Chem. Phys. Lett.* **249**, 392–398 (1996).
64. Brannon, J. H. & Magde, D. Absolute quantum yield determination by thermal blooming. Fluorescein. *J. Phys. Chem.* **82**, 705–709 (1978).
65. Dawson, W. R. & Windsor, M. W. Fluorescence yields of aromatic compounds. *J. Phys. Chem.* **72**, 3251–3260 (1968).
66. Kanner, J., Harel, S. & Granit, R. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5178–5185 (2001).
67. 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. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **1028**, 481–486 (2004).
68. Allegra, M. *et al.* Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 837–844 (2005).
69. Barreiro, E. J., Kümmerle, A. E. & Fraga, C. A. M. The methylation effect in

- medicinal chemistry. *Chemical Reviews* **111**, 5215–5246 (2011).
70. Lavis, L. D. & Raines, R. T. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chemical Biology* **3**, 142–155 (2008).
71. Sciuto, S., Oriente, G. & Piattelli, M. Betanidin glucosylation in opuntia dillenii. *Phytochemistry* **11**, 2259–2262 (1972).
72. Trezzini, G. F. & Zrýb, J. P. Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. *Phytochemistry* **30**, 1901–1903 (1991).

7. Súmula Curricular

I DADOS PESSOAIS

Nome: Renan Rodini Mattioli

Local e data de nascimento: São Paulo – SP, 11 de junho de 1994

II EDUCAÇÃO

2017 – 2018: Ensino Superior, Mestrado em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP

2012 – 2016: Ensino Superior, Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ

2009 – 2011: Ensino Médio, Colégio Imperatriz Leopoldina, São Paulo – SP

2001 – 2008: Ensino Fundamental, Colégio Imperatriz Leopoldina, São Paulo – SP

1998 – 2000: Ensino Infantil, Colégio Imperatriz Leopoldina, São Paulo – SP

III FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

III.I Proficiência em línguas estrangeiras

2012: Diploma de español como lengua extranjera, Nivel A1

2011: Bescheinigung, Kenntnisse der deutschen Sprache in Hören, Sprechen und Lesen, Niveau B2

2011: Deutsches Sprachdiplom, Niveau B1

2008: Zentrale Deutschprüfung, Niveau A2

2004: Kleine Deutschprüfung

III.II Cursos de língua estrangeira no exterior

Junho – Julho/2011: Sprachkurs Deutsch, did deutsch-institut, Alemanha, Nürnberg, dias 27 de junho a 15 de julho.

Julho/2010: Sprachkurs Deutsch, did deutsch-institut, Alemanha, Aschaffenburg, dias 5 a 23.

Julho/2009: Sprachkurs Deutsch, did deutsch-institut, Alemanha, Augsburg, dias 6 a 24.

IV ATIVIDADES ACADÊMICAS

IV.I Iniciação científica

2014 – 2015: Bolsa FAPERJ, Processo: E-26/101.029/2014, Matrícula: 2013.05833.1, Orientador: Prof. Dr. Marcio Contrucci Saraiva de Mattos, Título: Estudo de Reações de Halogenação com Ácidos Triolo-Isocianúricos, Programa: IC 2013/02, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

IV.II Estágio

2015 – 2016: Orientador: Prof. Dr. Rafael Alves Allão Cassaro, Título: Síntese e Estudo de Compostos com Transição de *Spin*, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

IV.III Participação em eventos

Outubro/2018: 4th Organic Chemistry Congress with International Participation, Side Star Elegance Hotel, Turquia, Side, dias 4 a 7.

Setembro/2018: Simpósio de Estatística em Ciência e Transferência de Tecnologia, Instituto de Química, USP, São Paulo, SP, dias 13 e 14.

Junho/2018: 1º Curso de Manipulação de Pirofóricos: aplicação, manuseio, descarte e atendimento emergencial, Instituto de Química, USP, São Paulo, SP, dia 12.

Outubro/2016: 7ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, dias 17 a 21.

Mai/2016: Cursos “Introdução à Ciência de Polímeros e Aplicações”, Dra. Viviane Alves Escócio e “Terras Raras”, Prof. Oswaldo Antônio Serra, 24ª Semana da Química, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, dias 9 a 12.

Abril/2015: Cursos “Produtos Naturais”, Profa. Renata Biegelmeyer da Silva Rambo e “Desenhando (e Enxergando) Moléculas Orgânicas em 3D”, Prof. Marcio Contrucci Saraiva de Mattos, 23ª Semana da Química, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, dias 6 a 9.

Março/2014: Cursos “Princípios Gerais de Síntese Orgânica”, Prof. Marcio Contrucci Saraiva de Mattos e “A Química e Controle de Dopagem no Esporte: História, Procedimentos Analíticos e Desafios Futuros”, Prof. Henrique Marcelo Gualberto Pereira, 22ª Semana da Química, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, dias 17 a 20.

Mai/2013: Cursos “Lixo Eletroeletrônico”, Prof. Júlio Carlos Afonso e “Iniciação ao Estudo dos Explosivos”, Prof. Ubirajara da Silva Valença, 21ª Semana da Química, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, dias 13 a 16.

Abril/2012: Curso “Segurança no Laboratório e na Indústria”, Prof. Milton Roedel Salles, 20ª Semana da Química, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, dias 9 a 12.

Maio/2011: V Olimpíada Brasileira de Foguetes, Colégio Imperatriz Leopoldina, São Paulo, SP, dia 13.

Maio/2011: XIV Olimpíada Brasileira de Astronomia e Astronáutica – Medalha de Prata, Colégio Imperatriz Leopoldina, São Paulo, SP, dia 13.

Maio/2010: XIII Olimpíada Brasileira de Astronomia e Astronáutica – Medalha de Bronze, Colégio Imperatriz Leopoldina, São Paulo, SP, dia 14.

IV.IV Organização de eventos

Julho/2018: Processo Seletivo para Ingresso no Programa de Pós-Graduação em Direito da Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo, para o ano letivo de 2019, Fase Inicial, Escola Politécnica – Prédio do Biênio, USP, São Paulo, SP, dia 22.

Janeiro/2018: Vestibular FUVEST 2018, Segunda Fase, Universidade Paulista – Campus Sorocaba, Sorocaba, SP, dias 7 a 9.

Novembro/2017: Vestibular FUVEST 2018, Primeira Fase, Faculdade de Engenharia – Prédio FAENG II, Fundação Santo André, Santo André, SP, dia 26.

V. PUBLICAÇÕES

V. I. Artigos completos publicados em periódicos

Não possui

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

MATTIOLI, R. R.; RODRIGUES, A. C. B.; LOPES, N. B.; MACHADO, C. O.; BASTOS, E. L. Synthesis, Hydrolytic Stability and Photophysical Properties of *N*-Methylated Non-Natural Betalains. In: 4th Organic Chemistry Congress with Internacional Participation, 2018, Side. **OrgChemTR-4**, 2018. p. PP-85.

MATTIOLI, R. R.; ADDLA, D.; PONETI, G.; FERREIRA, S. B.; KAISER, C. R.; NOVAK, M. A.; CASSARO, R. A. A. Binuclear Iron(III) Complexes Obtained by Template Reaction: Synthesis, Crystal Structure and Magnetic Properties. In: 6th European Conference on Molecular Magnetism, 2017, Bucharest. **ECMM2017**, 2017. p. PI-22.

VI OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

VII. Bolsas concedidas no mestrado

Bolsa FAPESP, Processo: 2017/20133-6, Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos, Título: Efeito da *N*-metilação sobre a estabilidade hidrolítica e fluorescência de sondas betalaínicas, Modalidade: Mestrado (MS).

Bolsa CNPq, Processo: 146934/2017-2, Projeto: 830038/2003-5, Modalidade: Mestrado (GM).

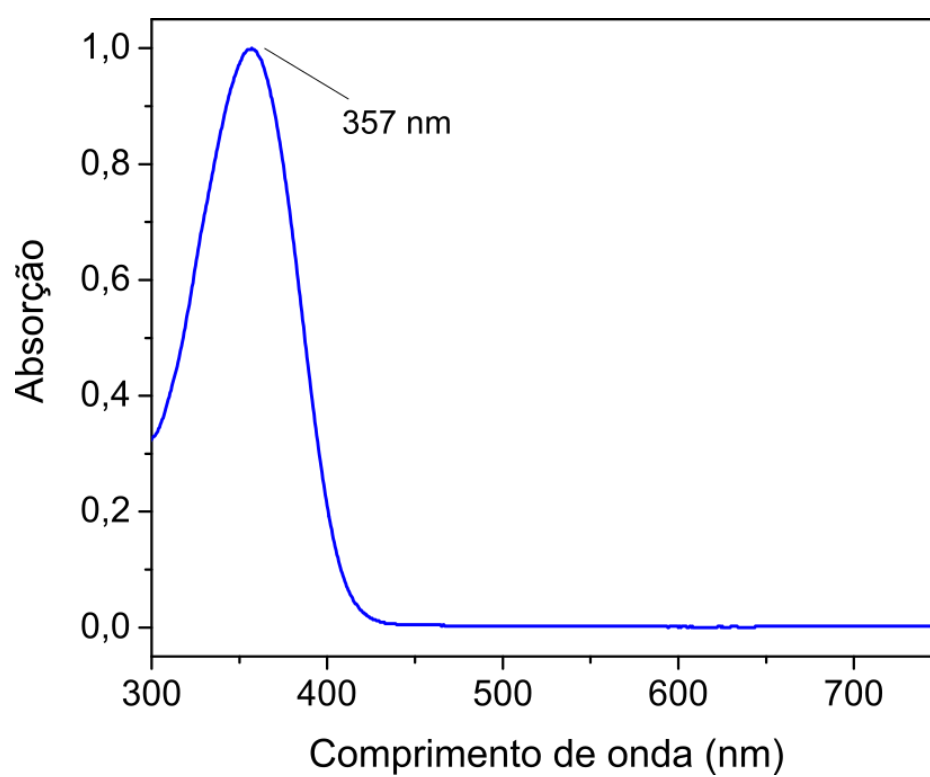
VI II. Prêmio acadêmico

Outubro/2018: Concessão de Certificado de Dignidade Acadêmica, Título *Magna cum laude*, Pró-Reitoria de Graduação, Curso de Química com Atribuições Tecnológicas, Auditório Professor Horta Barbosa – Centro de Tecnologia, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, dia 9.

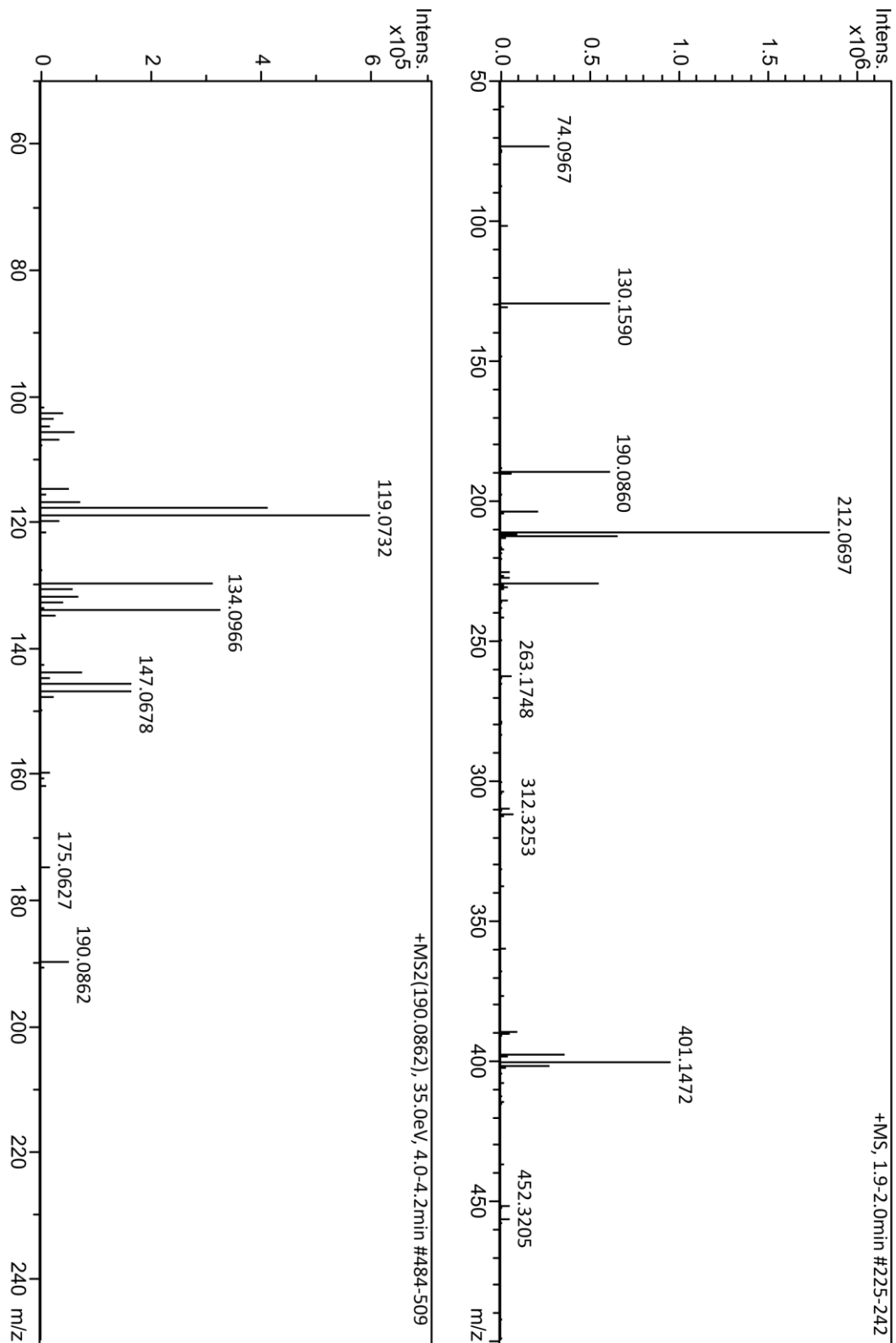
8. Anexos

8.1. 4-metil-7-(metilamino)cumarina

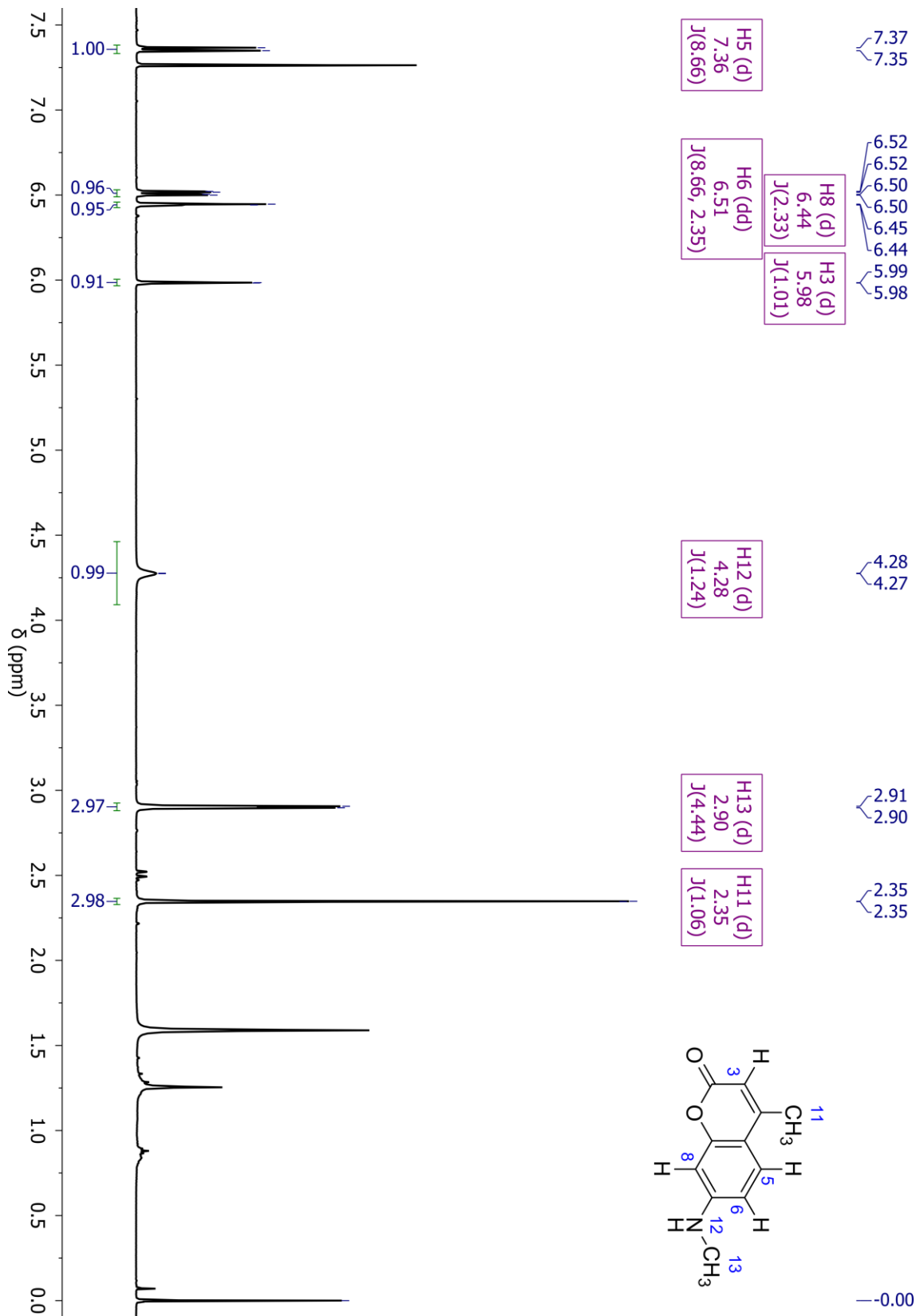
8.1.1. Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível em H₂O



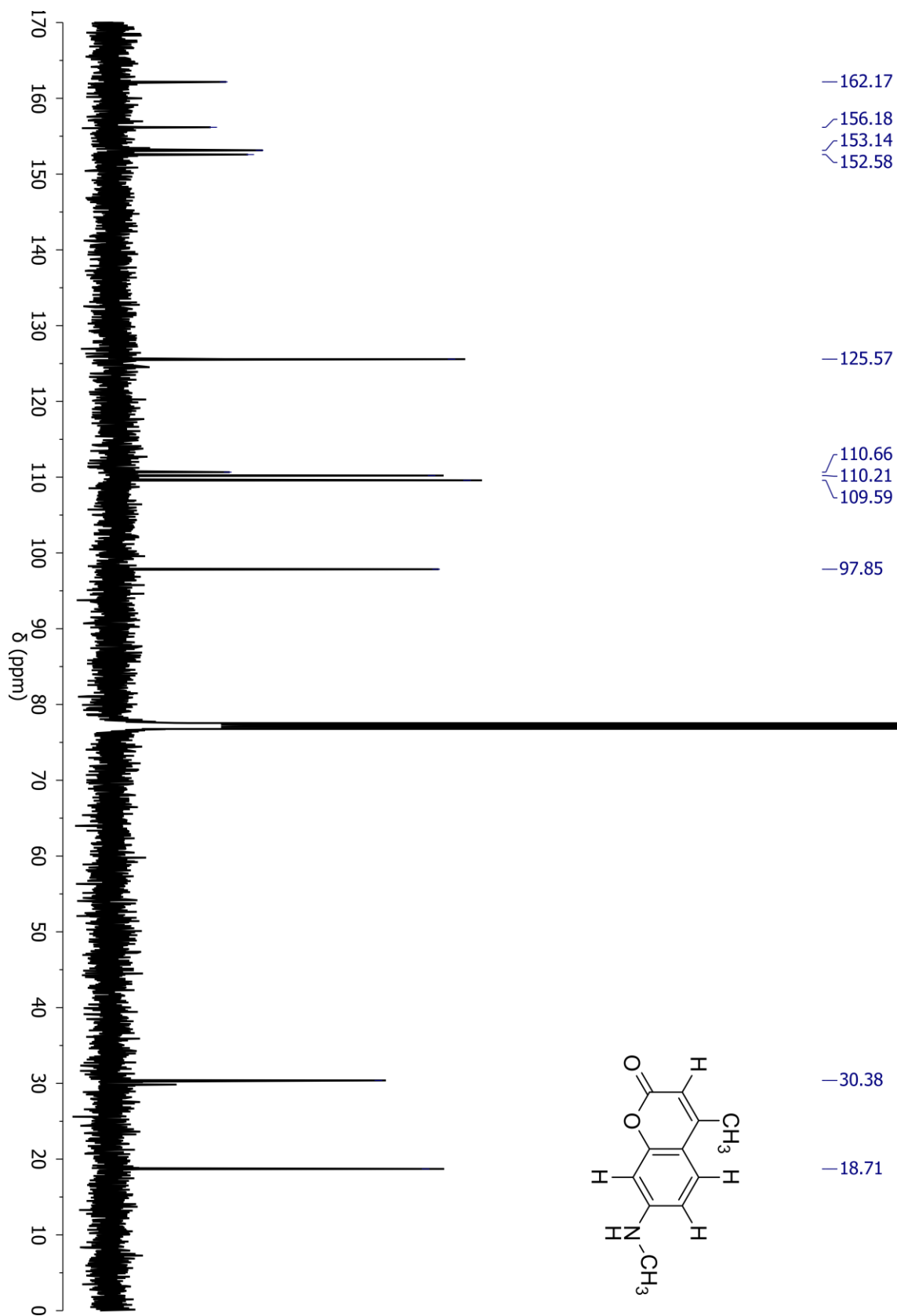
8.1.2. Espectros de massas de alta resolução em modo positivo e ionização por *electrospray* em MeOH



8.1.3. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz e CDCl_3

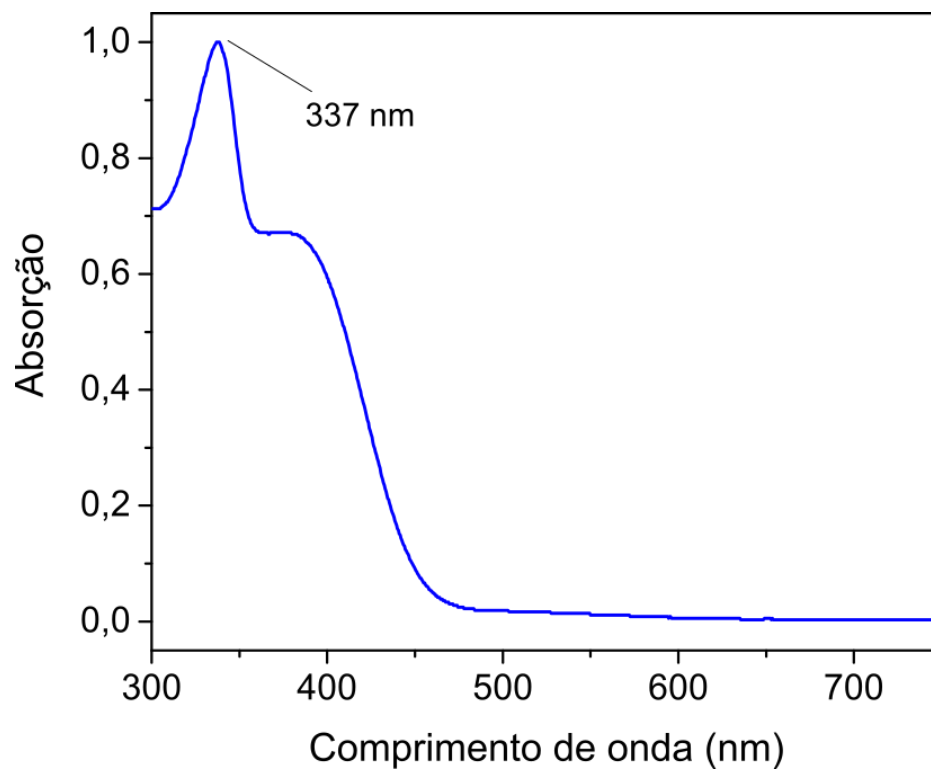


8.1.4. Espectro de RMN de ^{13}C em 500 MHz e CDCl_3

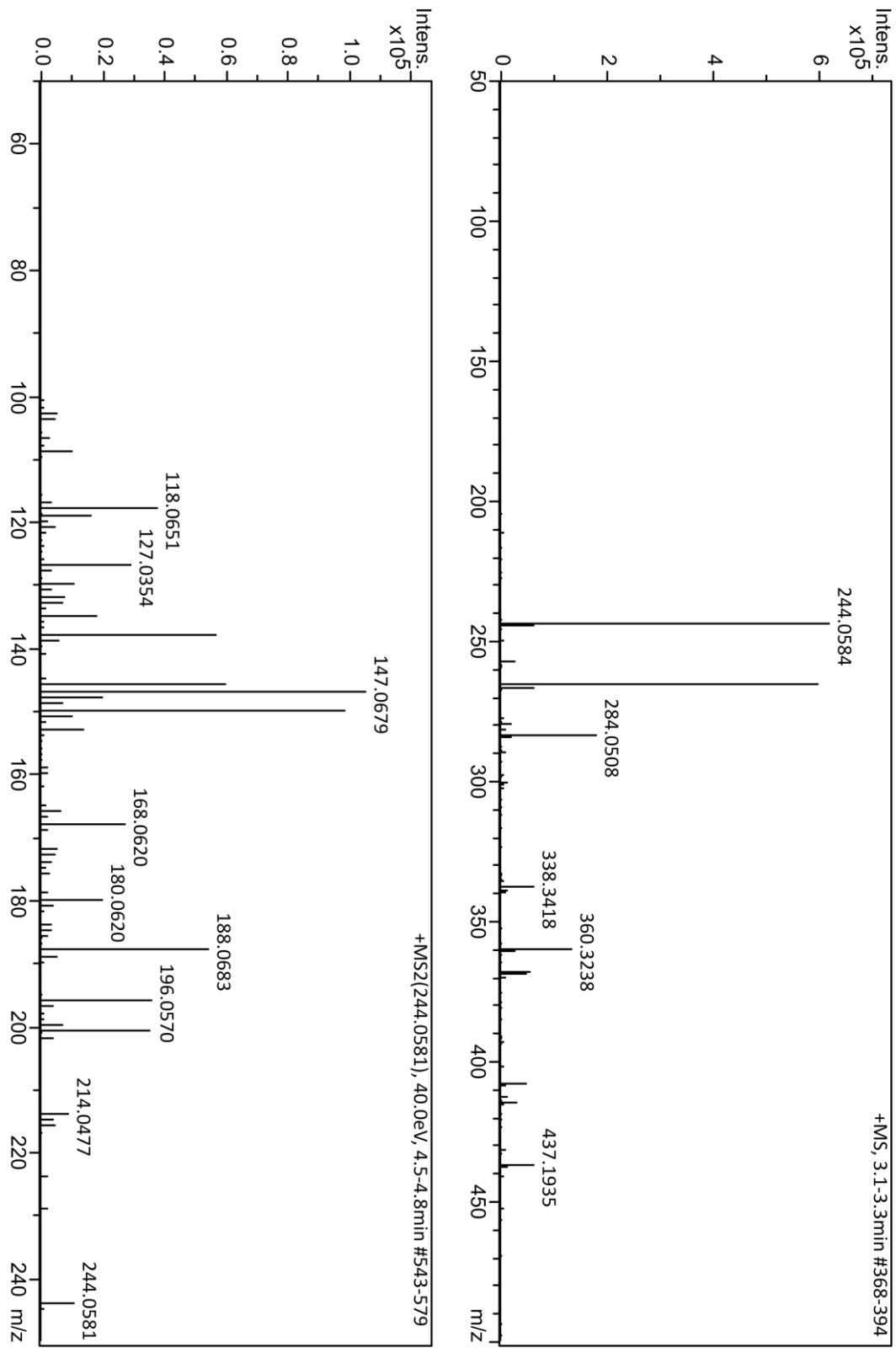


8.2. 7-(metilamino)-4-(trifluorometil)cumarina

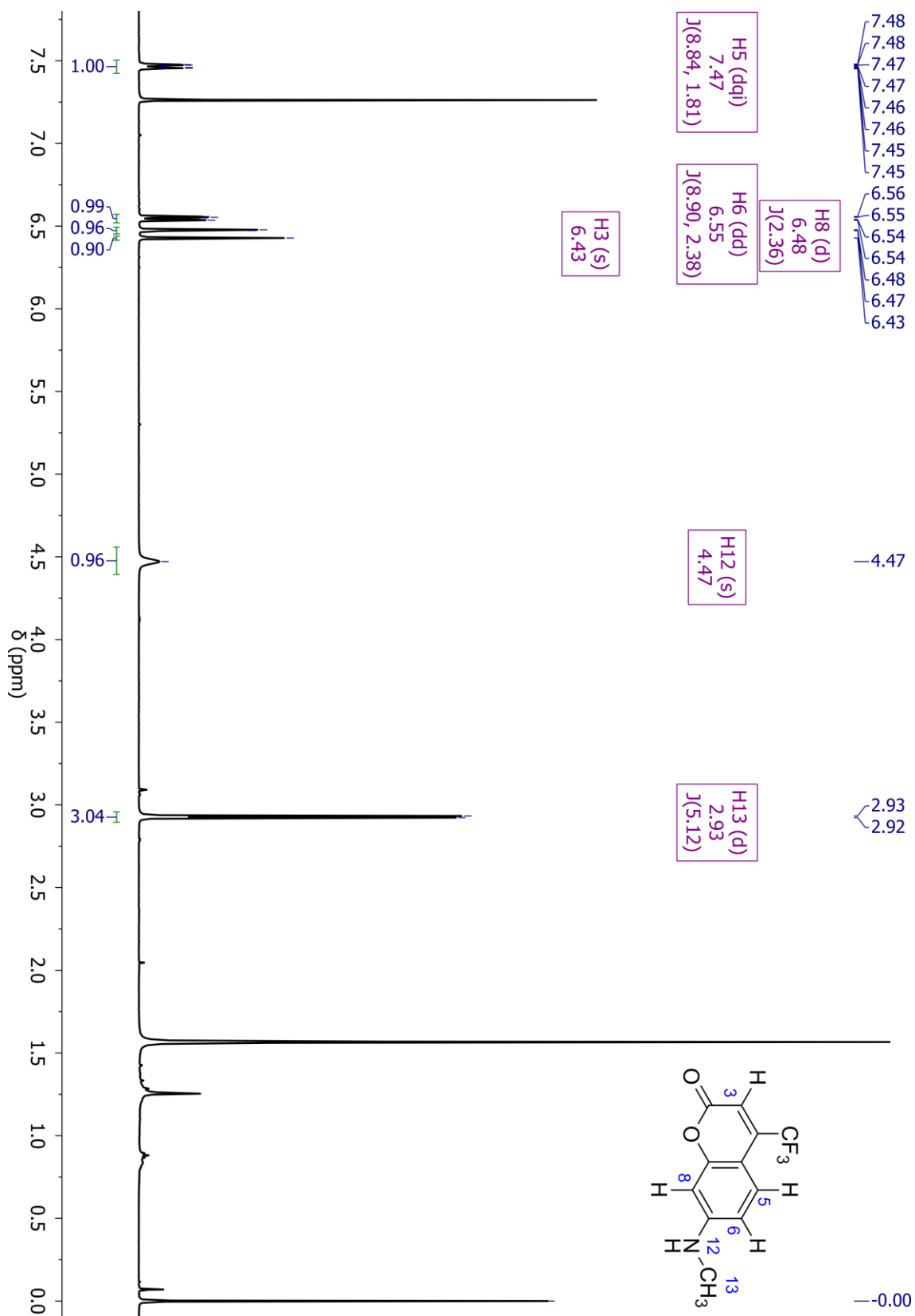
8.2.1. Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível em H₂O



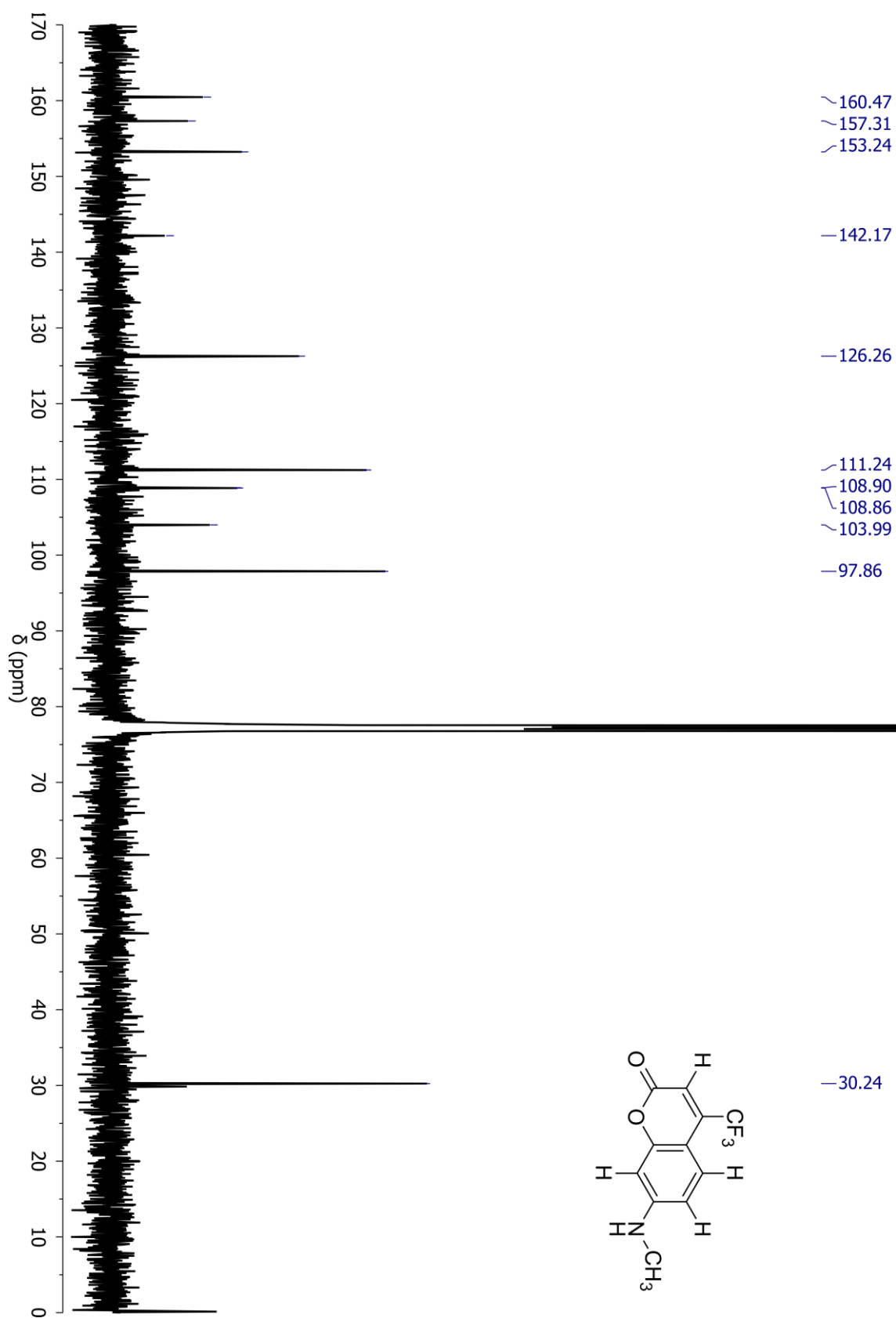
8.2.2. Espectros de massas de alta resolução em modo positivo e ionização por *electrospray* em MeOH



8.2.3. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz e CDCl_3

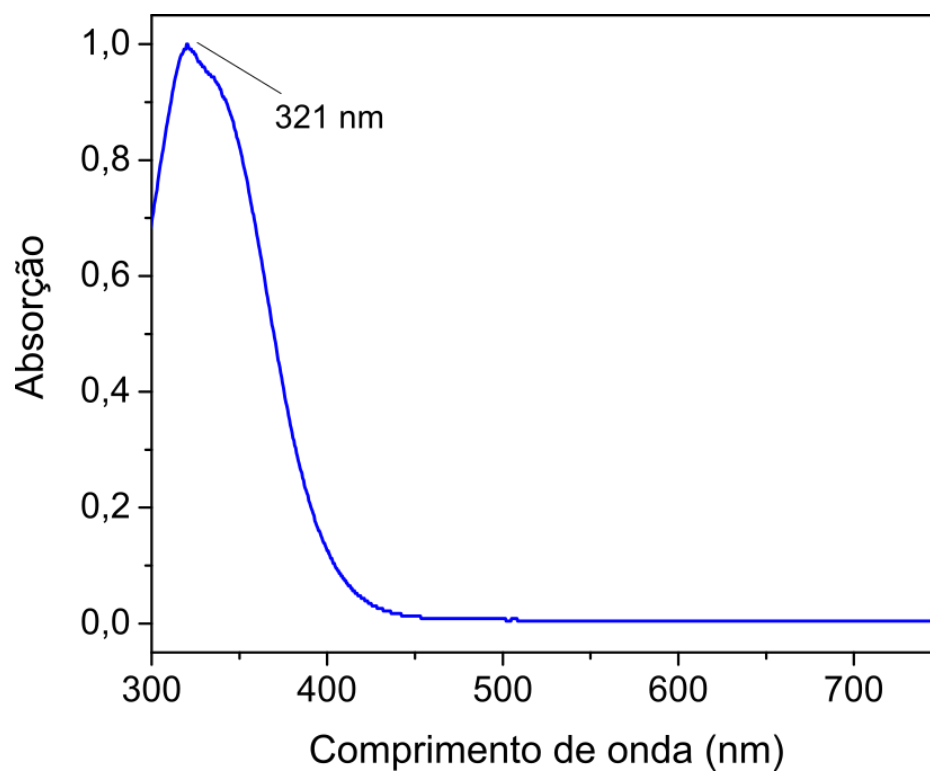


8.2.4. Espectro de RMN de ^{13}C em 500 MHz e CDCl_3

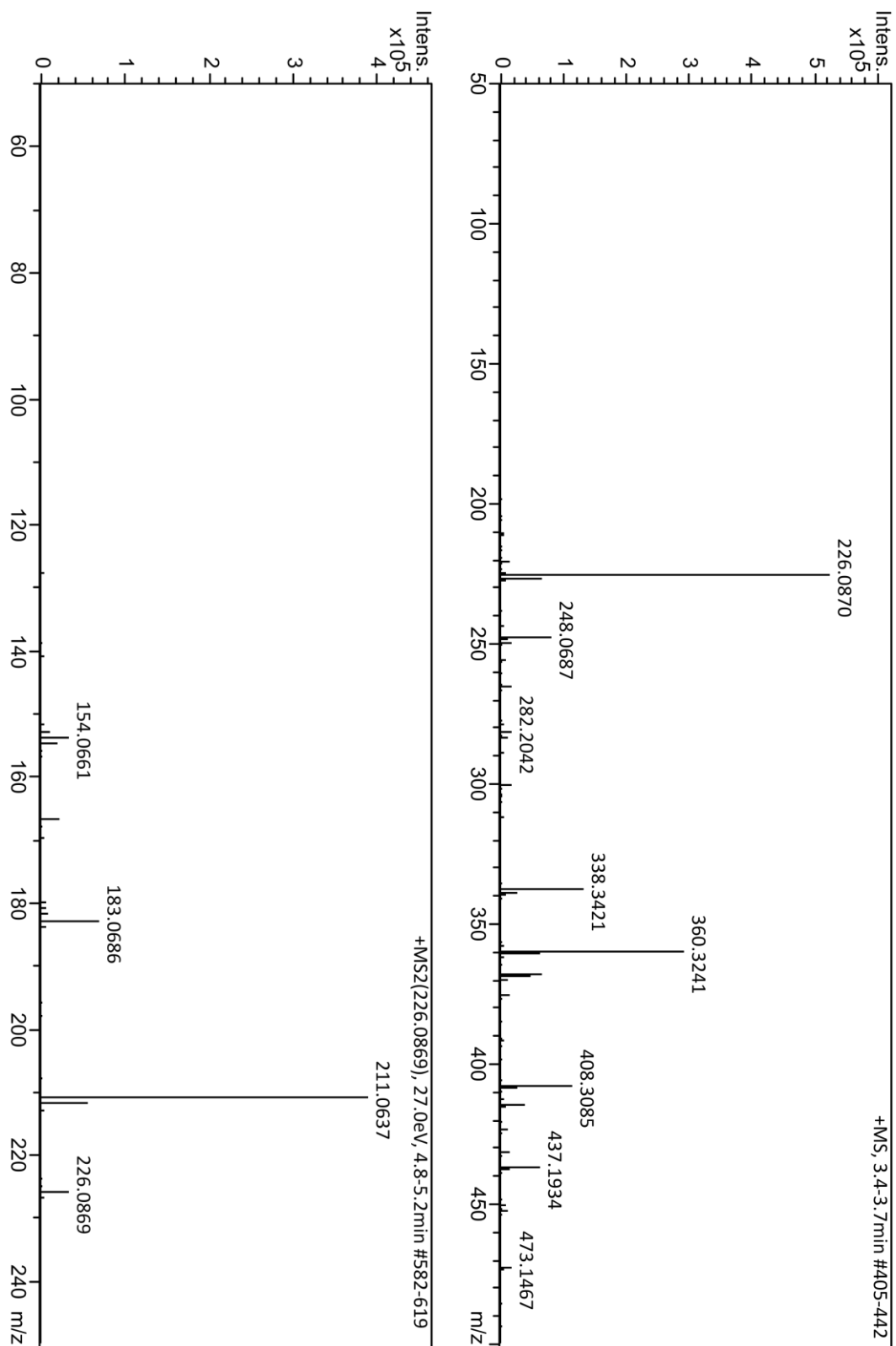


8.3. 3,4-benzo-6-(metilamino)cumarina

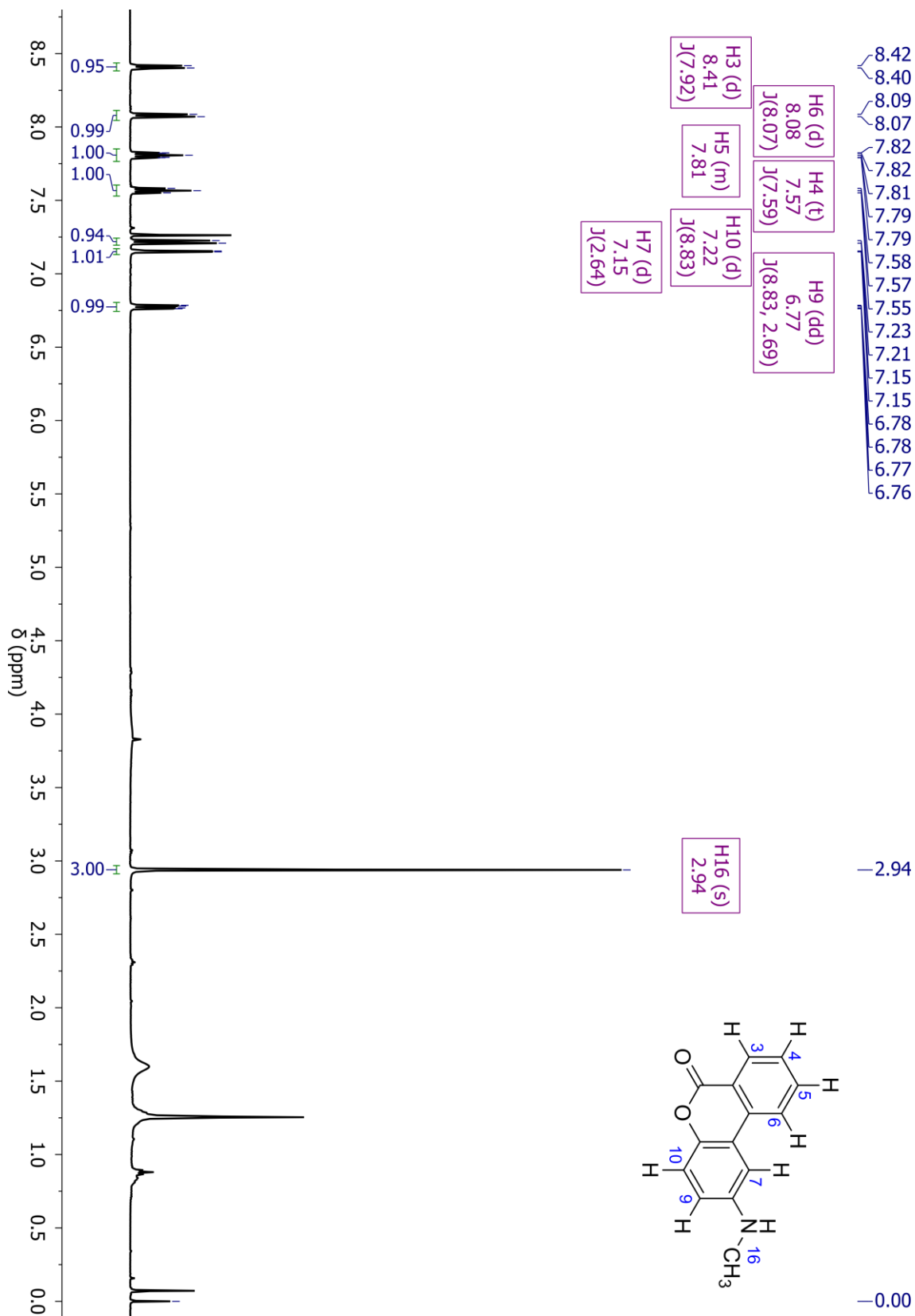
8.3.1. Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível em H₂O



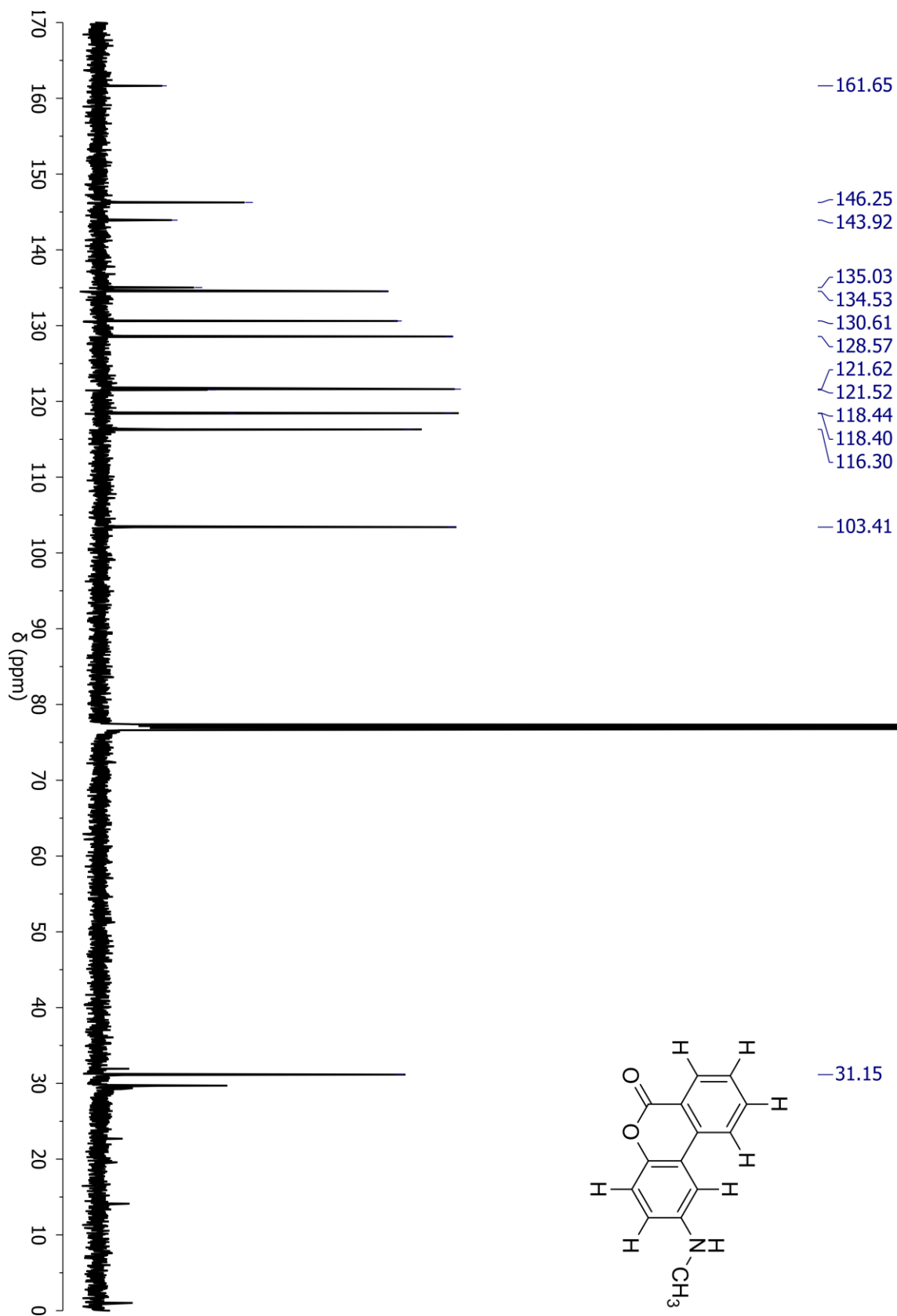
8.3.2. Espectros de massas de alta resolução em modo positivo e ionização por *electrospray* em MeOH



8.3.3. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz e CDCl_3

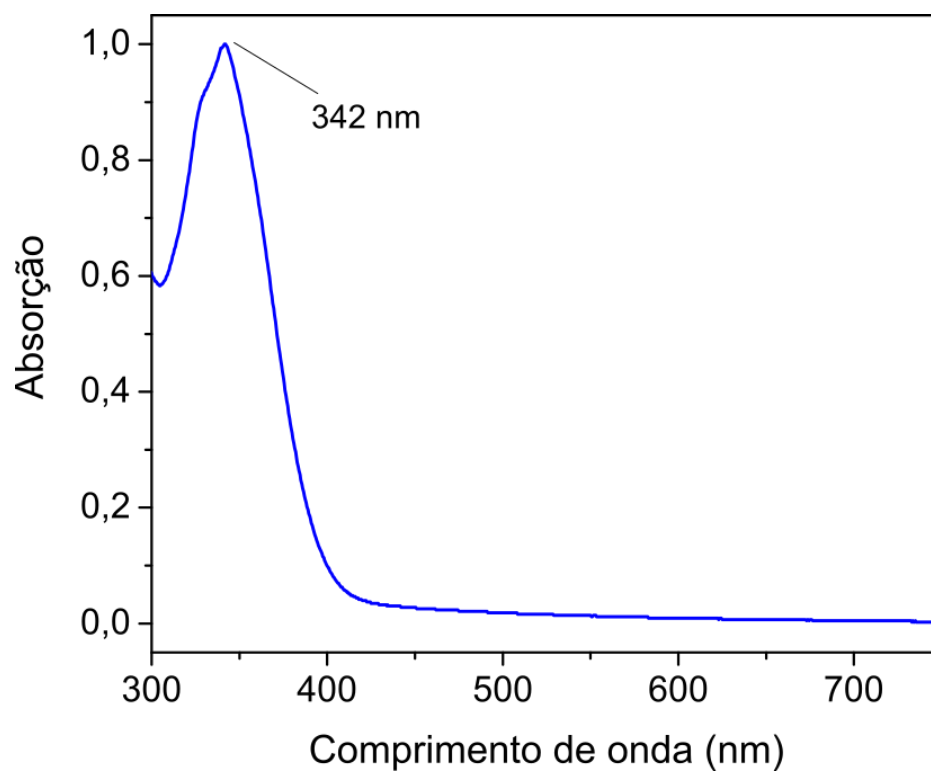


8.3.4. Espectro de RMN de ^{13}C em 500 MHz e CDCl_3

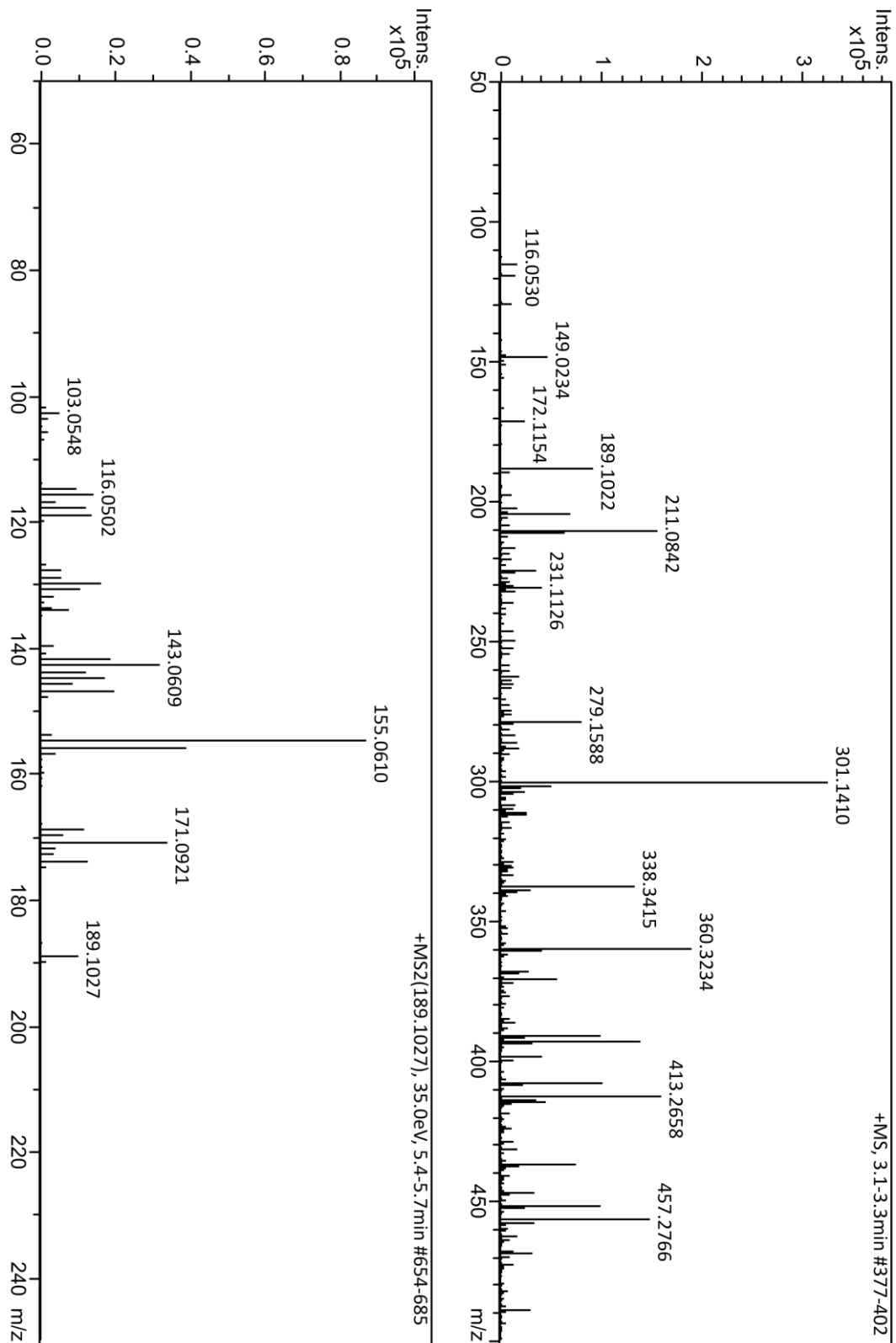


8.4. 4-metil-7-(metilamino)carboestiril

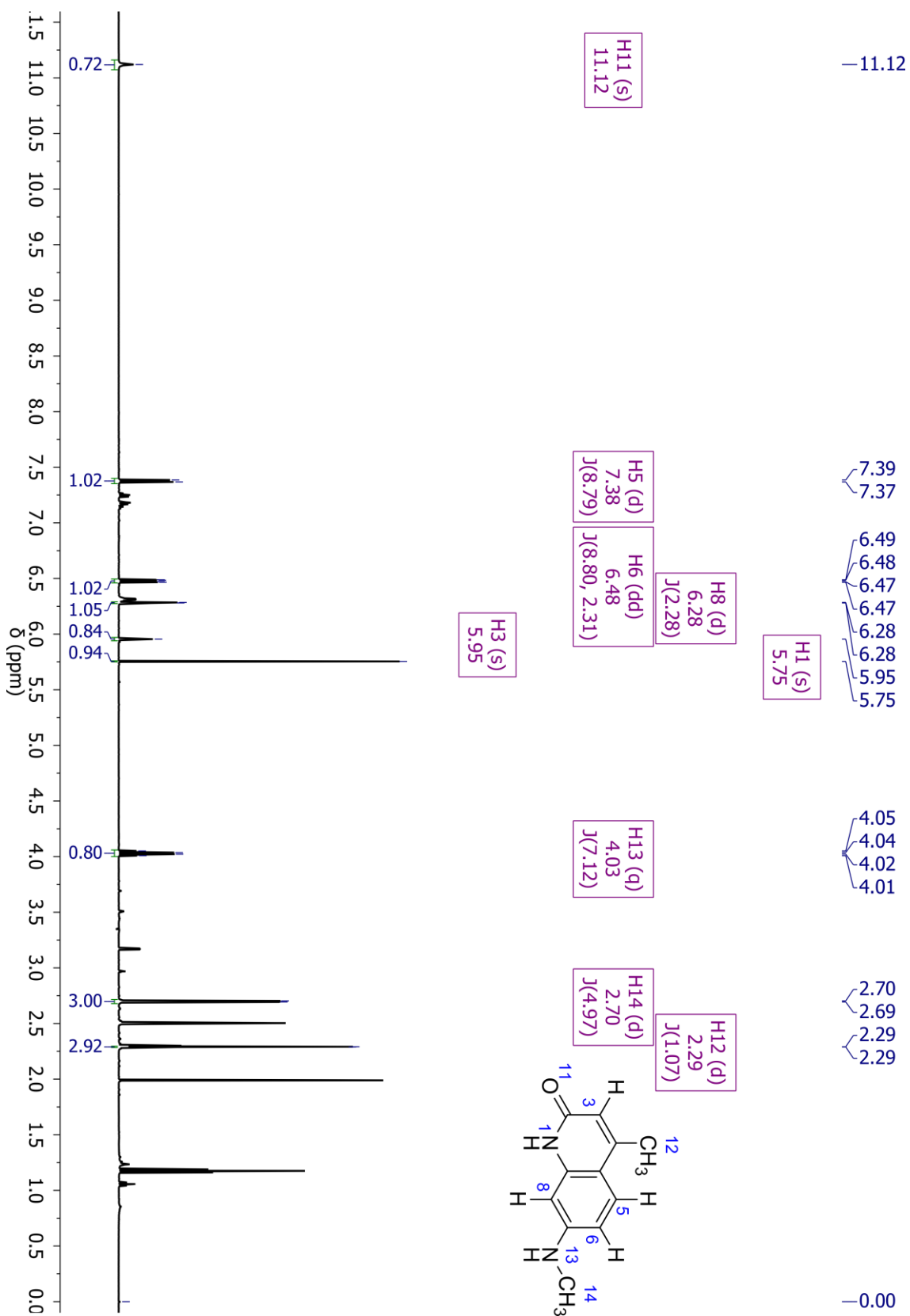
8.4.1. Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível em H₂O



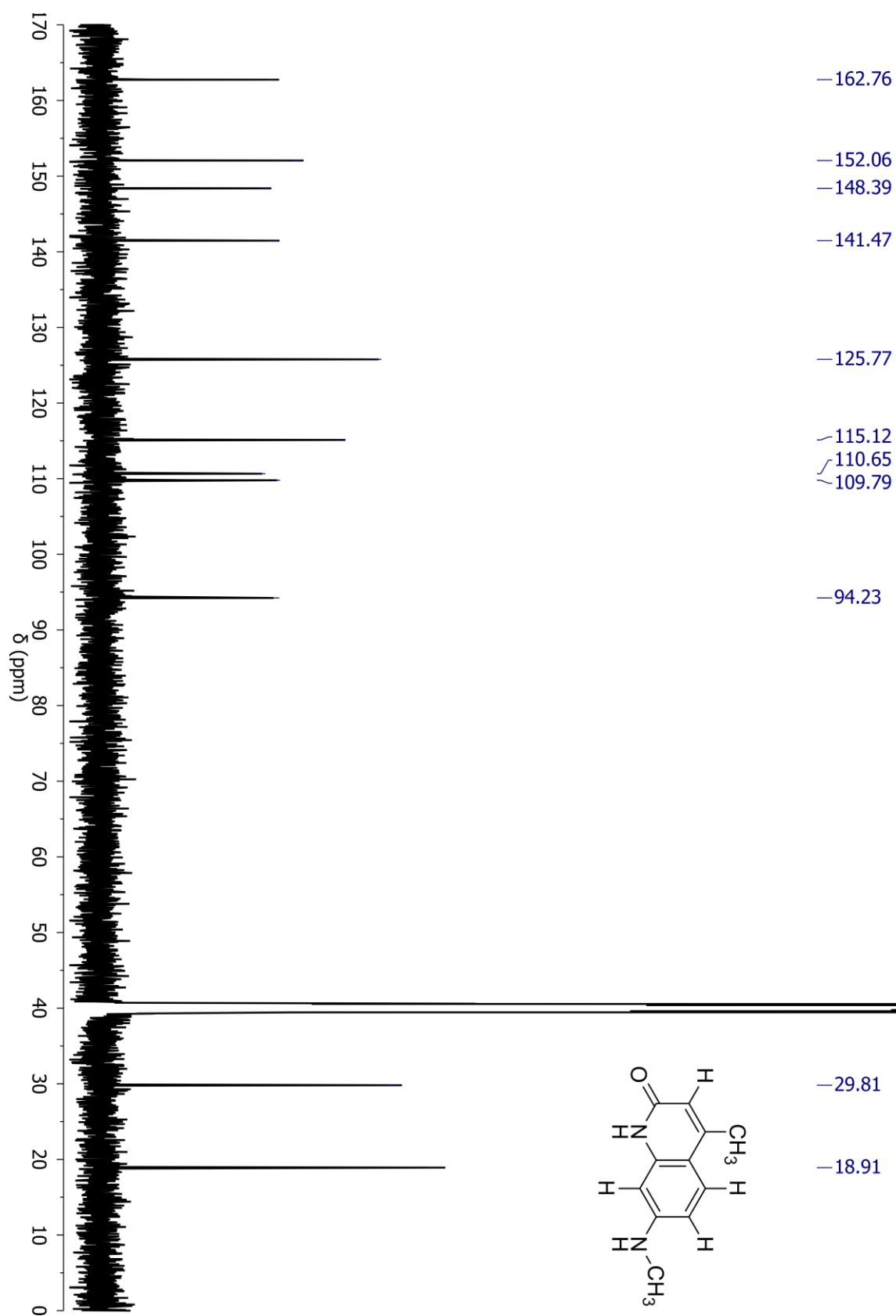
8.4.2. Espectros de massas de alta resolução em modo positivo e ionização por *electrospray* em MeOH



8.4.3. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz e DMSO-d_6

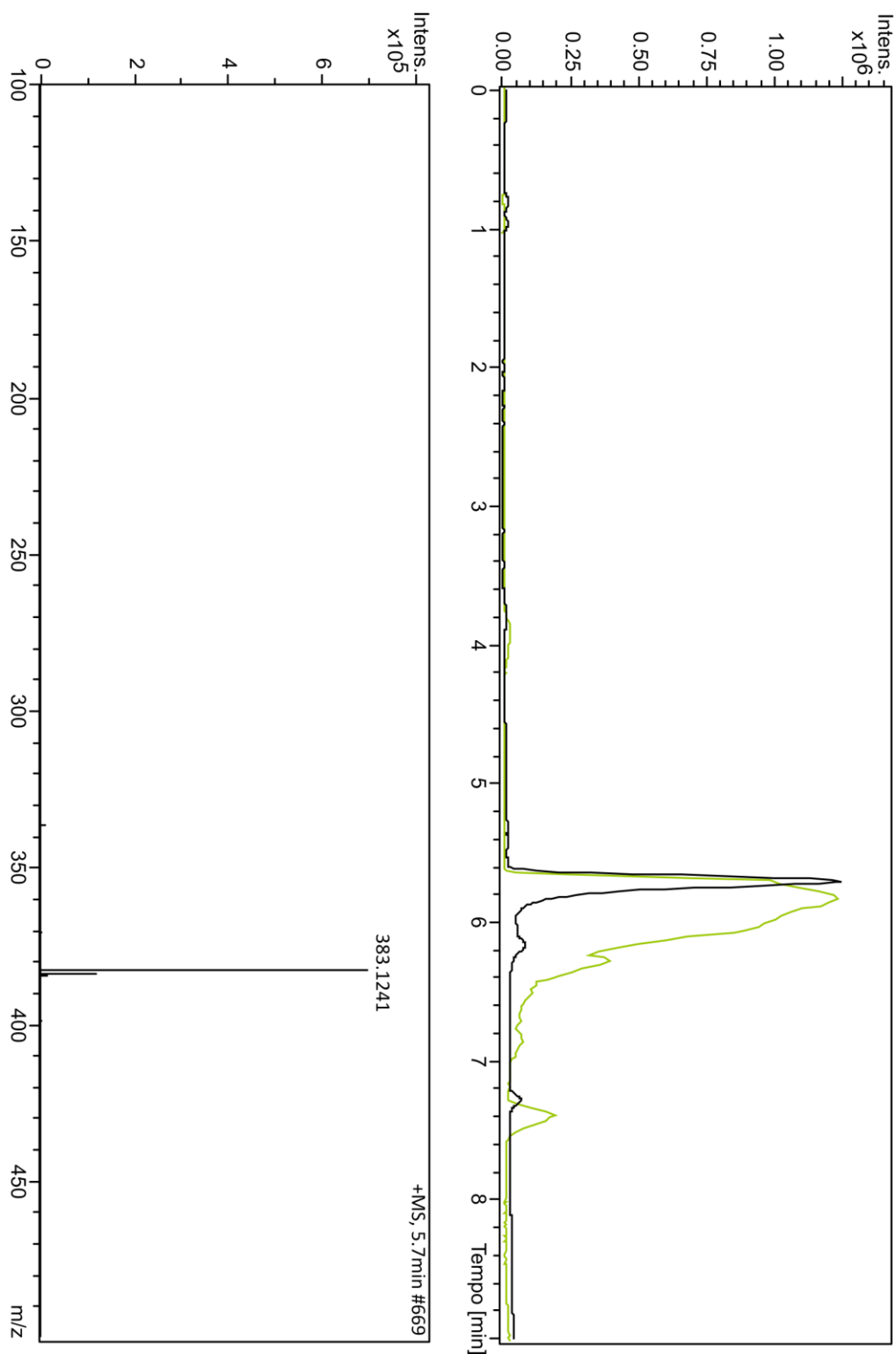


8.4.4. Espectro de RMN de ^{13}C em 500 MHz e DMSO-d_6

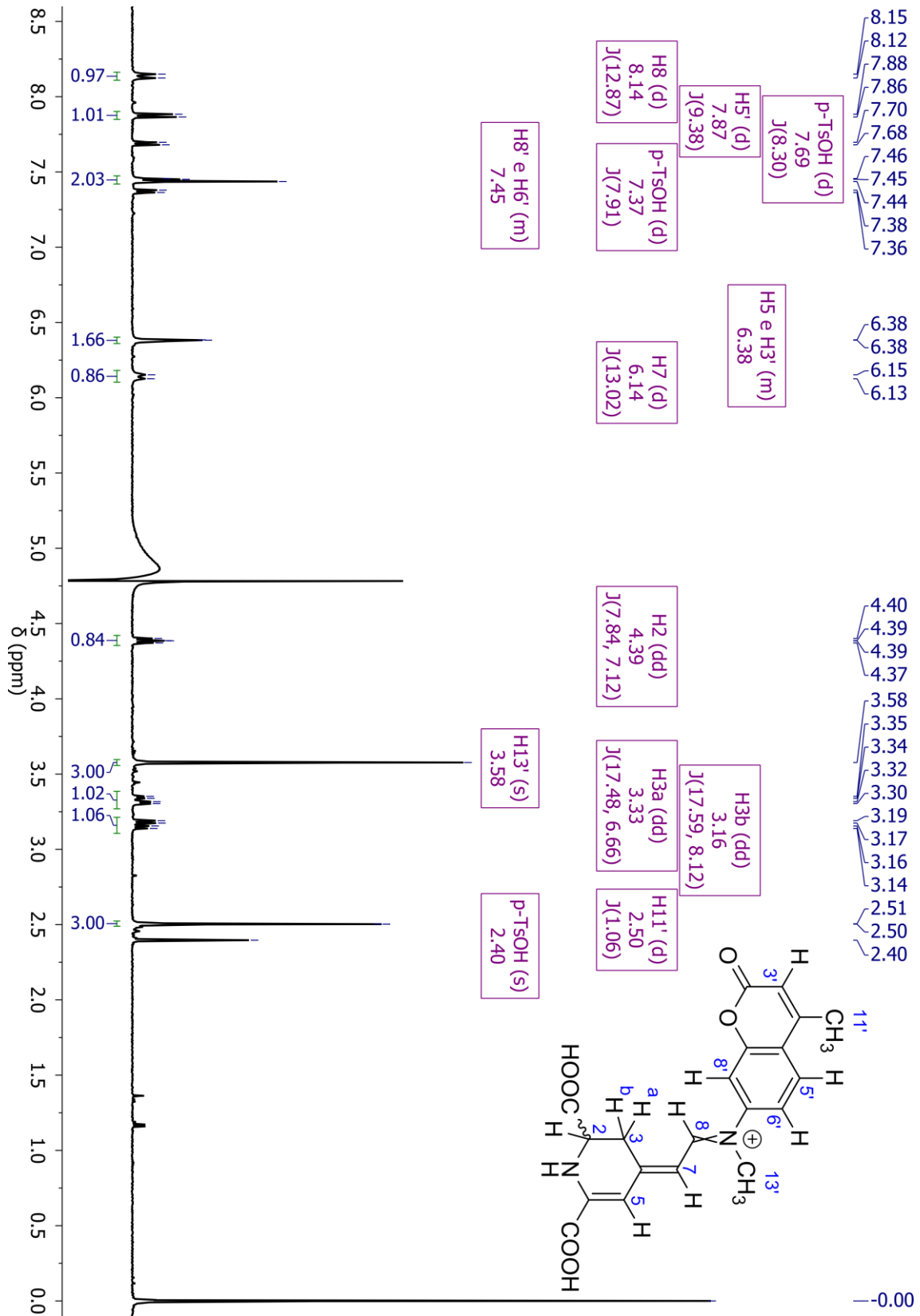


8.5. N-Me cBeet120

8.5.1. Cromatograma e espectro de massas de alta resolução em modo positivo e ionização por *electrospray*

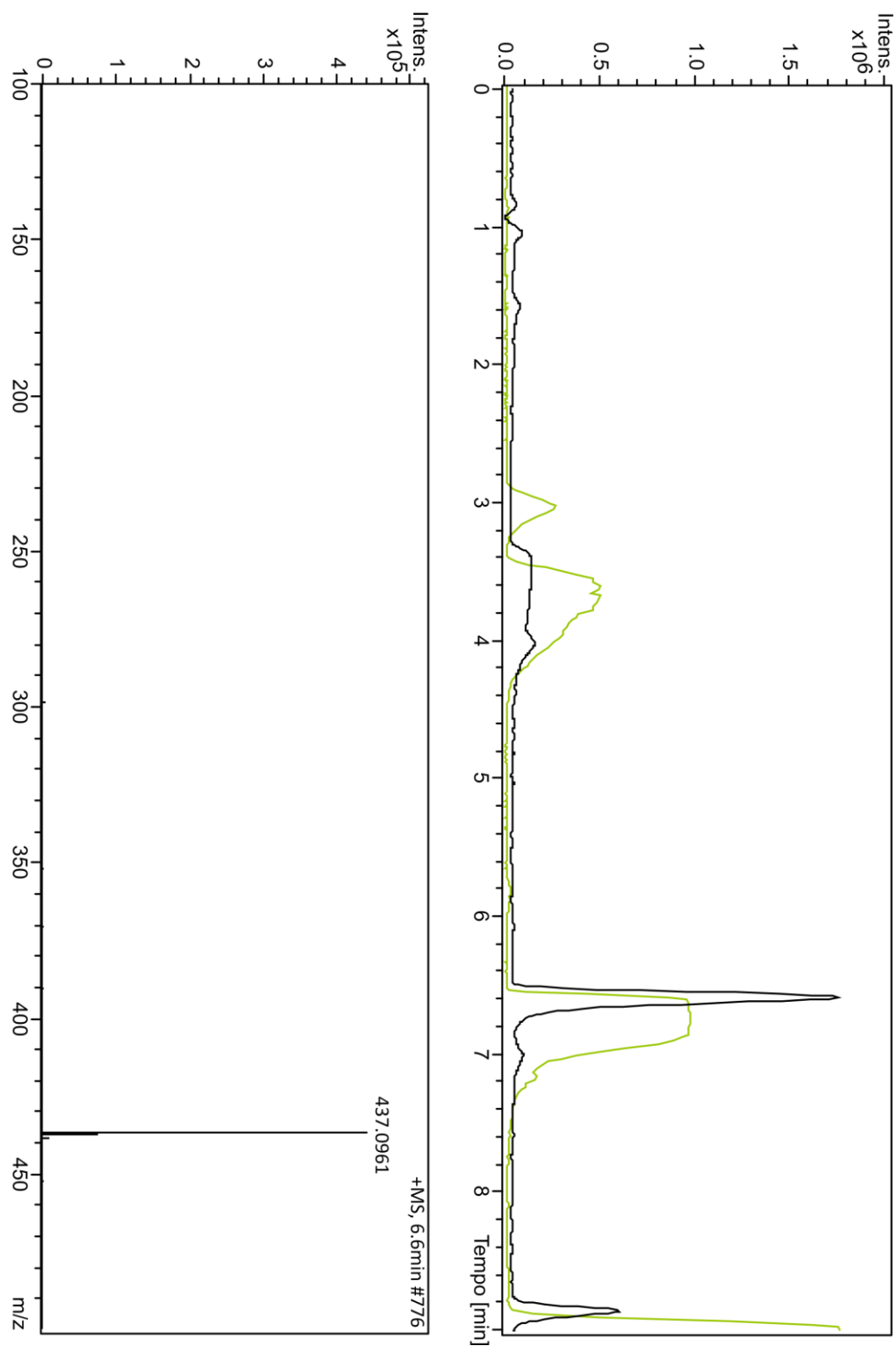


8.5.2. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz e D_2O

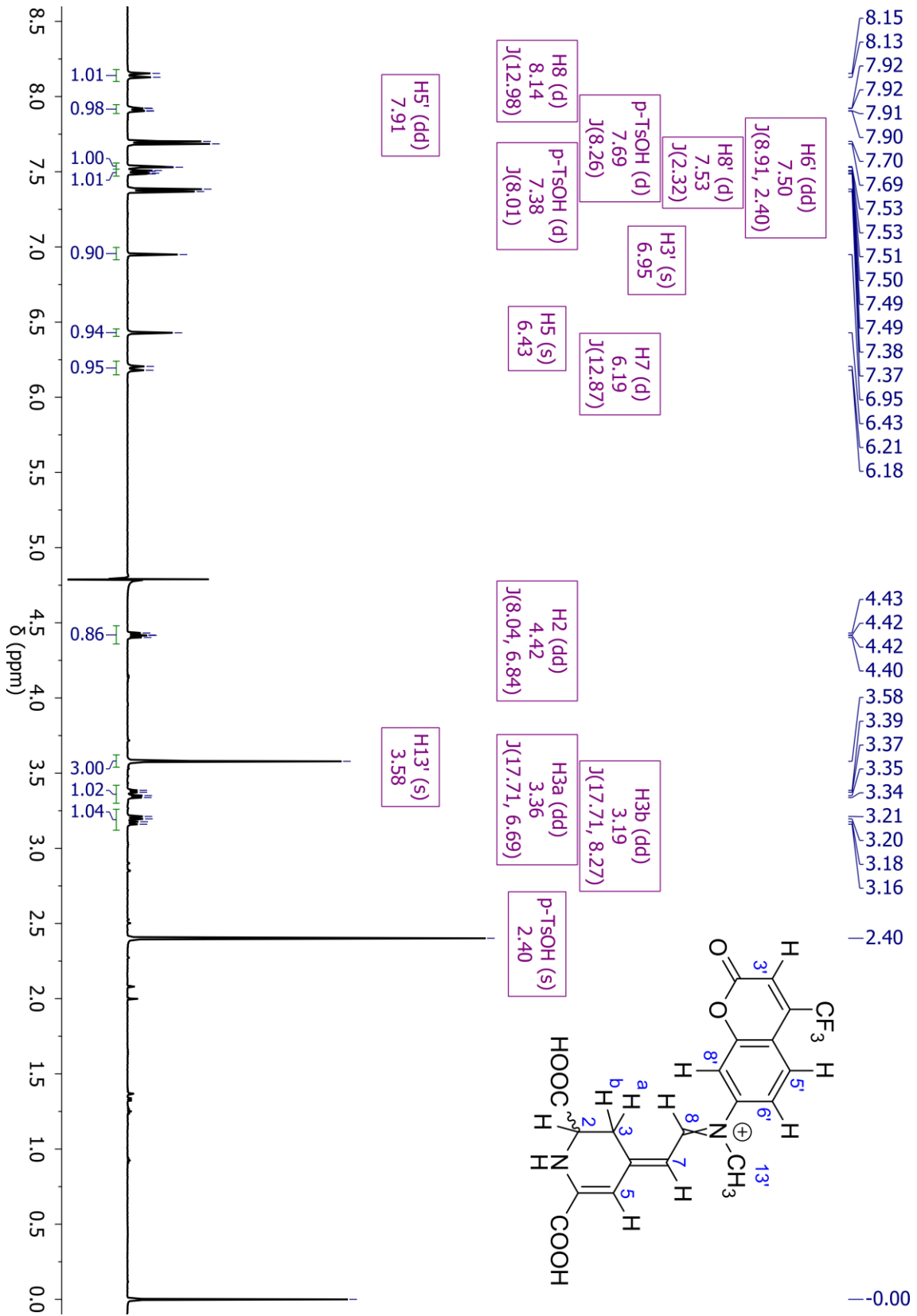


8.6. N-Me cBeet151

8.6.1. Cromatograma e espectro de massas de alta resolução em modo positivo e ionização por *electrospray*

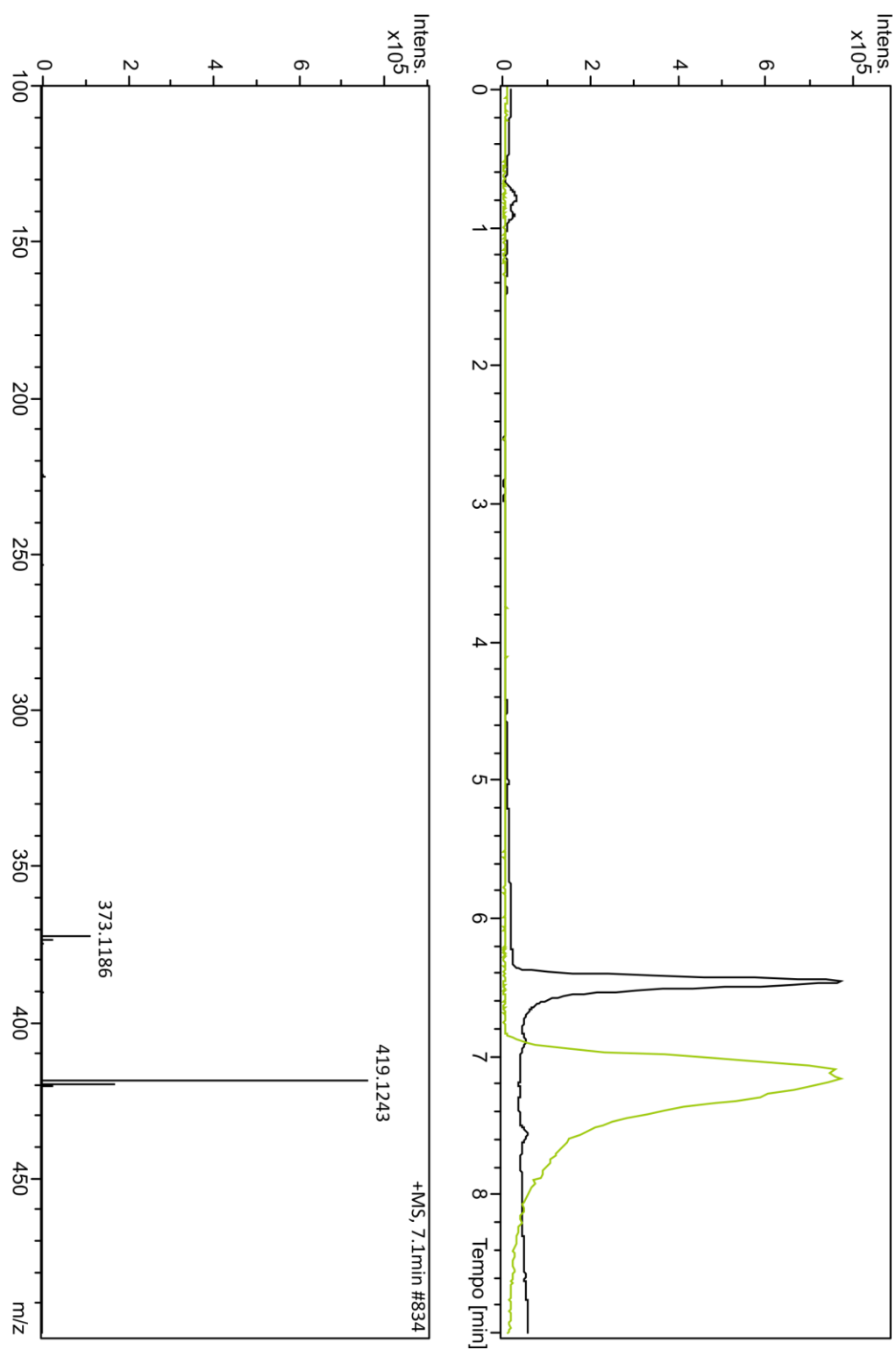


8.6.2. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz e D_2O

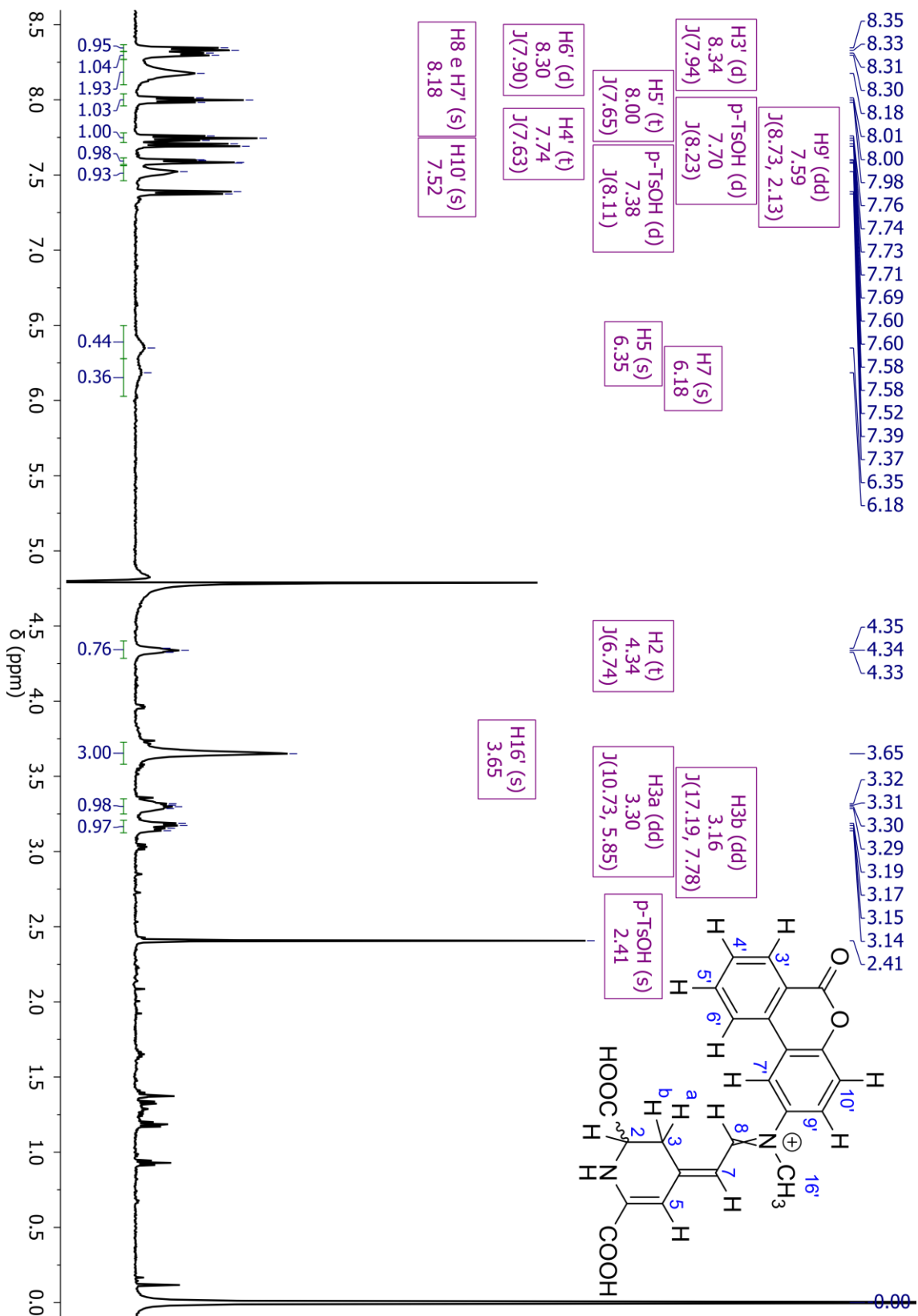


8.7. N-Me cbzBeet

8.7.1. Cromatograma e espectro de massas de alta resolução em modo positivo e ionização por *electrospray*

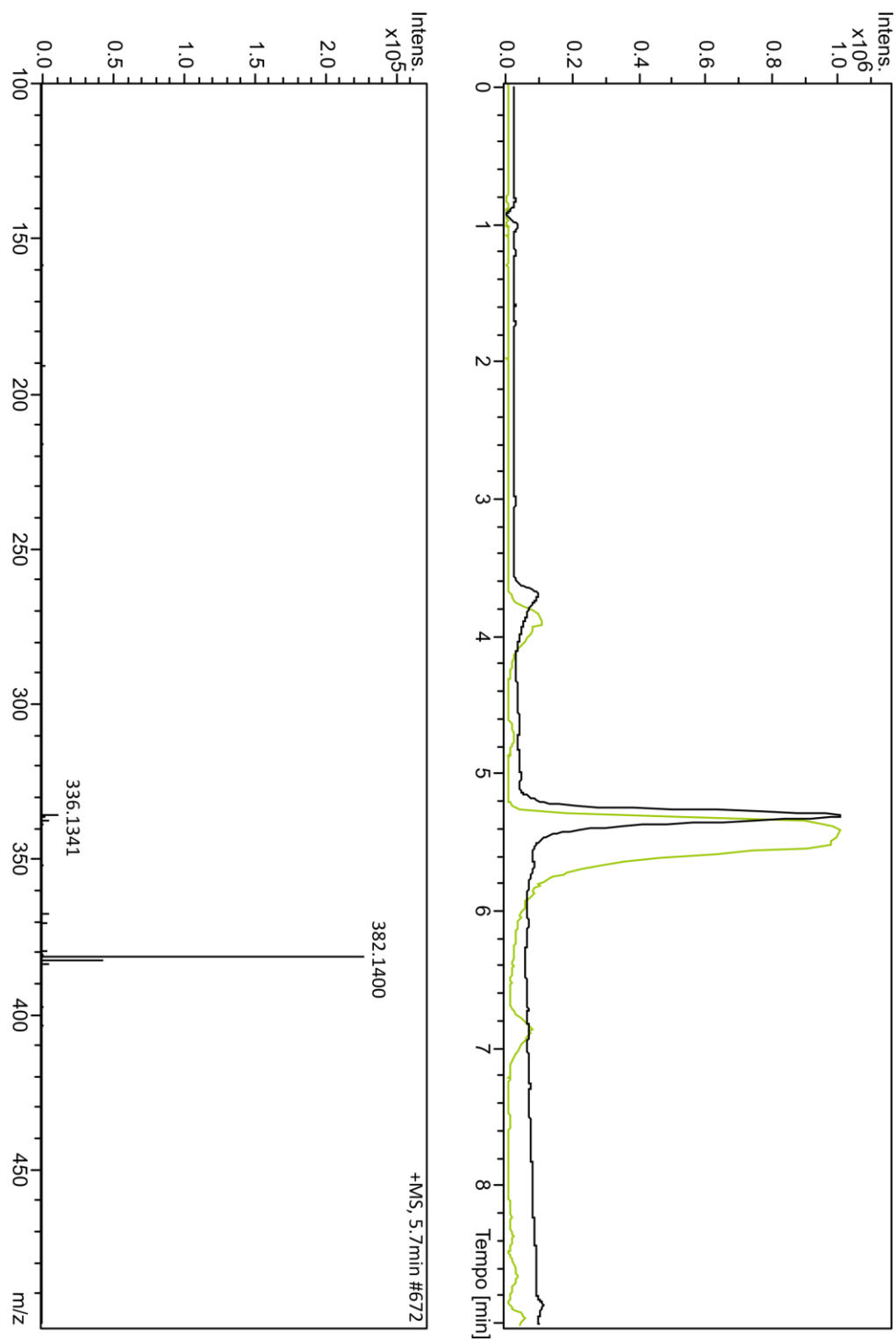


8.7.2. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz e D_2O



8.8. N-Me csBeet124

8.8.1. Cromatograma e espectro de massas de alta resolução em modo positivo e ionização por *electrospray*



8.8.2. Espectro de RMN de ^1H em 500 MHz e D_2O

