UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ANA PAULA ESKILDSEN PAGANO

**Efeitos de interações intermoleculares sobre as
propriedades fotofísicas de betalaínas naturais**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

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

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

10/11/2017

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

P131e	<p>Pagano, Ana Paula Eskildsen</p> <p>Efeitos de interações intermoleculares sobre as propriedades fotofísicas de betalaínas naturais / Ana Paula Eskildsen Pagano. -- São Paulo, 2017. 199p.</p> <p>Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Bastos, Erick Leite</p> <p>1. Fotoquímica : Físico-química : orgânica 2. Fotofísica I. T. II. Bastos, Erick Leite, orientador.</p> <p style="text-align: right;">547.135 CDD</p>
-------	---

ANA PAULA ESKILDSEN PAGANO

**Efeitos de interações intermoleculares sobre as
propriedades fotofísicas de betalaínas naturais**

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

Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo

2017

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Dedico esta Tese à minha tão amada avó Frida (i.m.).

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Agradecimentos

À minha família por ser minha base, meu colo, meu ânimo, minha razão de viver. Por sempre me apoiarem e me incentivarem a seguir meus sonhos.

Aos meus pais por terem se desdobrado em um milhão para que eu conseguisse chegar aqui. Por sempre estarem presentes e interessados. Por me ensinarem a agir com o coração e seguir minha intuição. Por me ensinarem a sempre ver o lado bom das pessoas e situações. A minha mãe por me ensinar que basta eu querer. Ao meu pai por ter sempre exigido o melhor de mim.

À minha irmã por ser o meu lado doidinho e ao meu irmão por ser o meu lado sereno.

À minha sobrinha linda por ter trazido muita luz para nós e me motivar a sempre seguir em frente.

À minha avó Cecília pela preocupação, pelo zelo e pelo carinho demonstrados ao seu modo.

Aos meus avós Frida, Nicola e Guilherme que lá de cima, com certeza, estão olhando por mim.

Ao meu namorado e melhor amigo por estar sempre ao meu lado, escutando meus lamentos e desabafos. Por ter me ensinado a me preocupar menos e viver mais. Por enxergar a vida de uma maneira simples e prática. Por tornar meus dias sempre alegres. Por ser paciente com as minhas oscilações de humor, principalmente nessa reta final do Doutorado.

Às minhas amigas da vida; Amanda, Fe, Bia, Cathy, Mari, Rafinha, Dani e Re por estarem sempre presentes. Por sempre torcerem por mim e acreditarem em mim.

Pela amizade de anos, algumas 20, outras 14, mas todas com a mesma intensidade. Por voltarmos a ser criança quando estamos juntas. Por sermos tão unidas e malucas. Cada uma com suas características fazem de mim uma pessoa melhor.

Às amigas que fiz durante o Doutorado e levarei para a vida; Nathy, Carol e Lari. Saibam que sem vocês, tudo teria sido muito mais difícil. Obrigado por tudo; pelas risadas, pelos desabafos, pelos cinemas, pelas gordices, pelas viagens e pelos conselhos. Por me aceitarem com meu jeitinho nada delicado de ser. Por tornarem meus dias mais agradáveis e divertidos.

Ao Erick por ter me dado esta oportunidade. Por ter confiado em mim. Por sempre estar ali quando precisei, por ser humano além de orientador. Pela paciência durante esses anos. Ah, e pelos chocolates fornecidos durante todos esses anos, claro!

Aos colegas do BastosLab e todos os técnicos que trabalharam conosco por toda a ajuda.

Ao Cássio e ao Gustavo pela companhia tão agradável e pela ajuda nas minhas inúmeras dúvidas em relação aos sais de flavílio.

Ao Prof. Dr. Cassius V. Stevani, pelas análises no HPLC, e Prof. Dr. Thiago Correra, pelos experimentos de espectrometria de massas.

À Jennifer e ao André pelas análises de espectrometria de massas.

À Cristiane e Janaína pelo apoio nas análises de RMN.

Ao Willi, Joey, Lolo e Panda por terem me orientado e me ajudado tanto durante minha iniciação científica.

Ao grupo do Professor Nakajima em Tsukuba, em especial Prof. Marcos Neves e Dr. Nauman Khalid pelo acolhimento e ajuda nos experimentos.

Às pessoas maravilhosas que conheci no Japão e foram essenciais durante minha

estadia; Xenia, Boon, Kosaku e Grace.

À CAPES pela bolsa concedida e ao Instituto de Química pela estrutura fornecida. À Natura Cosméticos pela relação produtiva.

Por fim, agradeço a Deus. Por estar sempre ao meu lado e me dar forças para seguir em frente. Por escutar minhas orações e se fazer entender por meio de suas ações.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

*“The problem is not the problem; the
problem is your attitude about the problem”*

Capitão Jack Sparrow – Piratas do Caribe

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Resumo

PAGANO, A. P. E. **Efeitos de interações intermoleculares sobre as propriedades fotofísicas de betalaínas naturais**. 2017. 199 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Betalaínas são alcalóides coloridos que atuam como mediadores químicos e sensores em processos de interesse tecnológico. Esta Tese de Doutorado investiga o comportamento de betalaínas naturais, betanina e indicaxantina, em três sistemas químicos diferentes. O primeiro capítulo discute a estabilidade de emulsões água-óleo-água contendo betanina. As emulsões foram preparadas em um sistema de microcanais empregando-se óleo de soja e tensoativos grau alimentício. Betanina pura tende a estabilizar a emulsão em relação ao controle sem o pigmento, enquanto suco de beterraba liofilizado e betanina comercial diluída com maltodextrina não mostram a mesma atividade. No capítulo seguinte, a interação entre indicaxantina e cloreto de 7-metil-4-metóxi-flavílio revela a ocorrência de transferência de energia e dados de espectroscopia de ^1H -RMN indicam a formação de um complexo no estado fundamental. Finalmente, a interação entre betanina e paraquat na presença e ausência de luz e oxigênio é investigada. Dados de espectroscopia de ^1H -RMN sugerem a formação de um complexo entre as espécies e o estudo cinético sugere que betanina interfere na regeneração da forma oxidada do paraquat por oxigênio.

Palavras-chave – betalaínas, emulsão por microcanais, sal de flavílio, metil viologênio.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Abstract

PAGANO, A. P. E. **Effect of intermolecular interactions on the photophysical properties of natural betalains**. 2017. 199 p. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Betalains are colored alkaloids that act as chemical mediators and sensors in processes of technological interest. This doctoral thesis investigates the behavior of natural betalains, betanin and indicaxanthin, in three different chemical systems. The first chapter discusses the stability of water-oil-water emulsions containing betanin. The emulsions were prepared in a microchannel system using soybean oil and food grade surfactants. Pure betanin tends to stabilize the emulsion relative to the control without the pigment, while freeze-dried beet juice and commercial betanin diluted with dextrin do not show the same activity. In the following chapter, the interaction between indicaxanthin and 7-methyl-4-methoxyflavylium chloride reveals the occurrence of energy transfer and ^1H -NMR spectroscopy data suggests the formation of a complex in the ground state. Finally, the interaction between betanin and paraquat in the presence and absence of light and oxygen is investigated. ^1H -NMR spectroscopy data suggest the formation of a complex between species and the kinetic study suggests that betanin interferes in the regeneration of the oxidized form of paraquat by oxygen.

Keywords – betalains, emulsion by microchannels, flavylium salt, methyl viologen.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

δ	Deslocamento químico, em ppm
ΔG	Energia de Gibbs
$\Delta^\ddagger G_{\text{coal}}$	Energia de ativação de Gibbs do processo de coalescência
$\Delta^\ddagger G_{\text{floc}}$	Energia de ativação de Gibbs do processo de floculação
ε	Coeficiente de atenuação molar, em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
ϕ_{Ai}	Fração de volume da fase quosa interna
Φ_{FL}	Rendimento quântico de fluorescência
γ_{ab}	Tensão interfacial entre os líquidos a e b
λ_{em}	Comprimento de onda e emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
η	Viscosidade
τ_{FL}	Tempo de vida de fluorescência
$\tau_{1/2}$	Tempo de meia vida
χ	Fração molar
A_{ab}	Área interfacial entre os líquidos a e b
A/O	Água em óleo
$A/O/A$	Água em óleo em água
Bn	Betanina
C_a	Número de capilaridade
$C_{\text{CR-310}}$	Concentração de CR-310, em $\text{m/m}_{\text{fc(A/O)}}$
C_{Tween20}	Concentração de Tween 20, em $\text{m/ m}_{\text{fc(A/O/A)}}$
C_{Bn}	Concentração de betanina, em $\text{m/m m}_{\text{fd(A/O)}}$

BtP	Indicaxantina
$d_{3,2}$	Diâmetro médio de Sauter
$f_{A/O}$	Fluxo da fase dispersa
f_{em}	Fenda de emissão
f_{em}	Fenda de excitação
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> , largura total a meia altura
HBt	Ácido betalâmico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
$m_{fd(A/O)}$	Massa da fase dispersa da emulsão A/O
$m_{fc(A/O)}$	Massa da fase contínua da emulsão A/O
$m_{fc(A/O/A)}$	Massa da fase contínua da emulsão A/O/A
MCE	<i>Microchannel emulsification</i> , emulsificação por microcanais
ME	<i>Membrane emulsification</i> , emulsificação por membranas
MFE	<i>Microfluidic emulsification</i>
MMF	Cloreto de 7-metil-4metóxiavilíio
MV	Metilviologênio, paraquat
p	Pressão interna da gota e/ou pressão de Laplace
r	Raio da gota da emulsão
RMN de 1H	Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de hidrogênio
RSF	<i>Relative span factor</i> , fator relativo de distribuição
TPi	Tampão fosfato
U	Fluxo da fase dispersa

Lista de estruturas

Betanina

Ácido betalâmico

Indicaxantina

7-metil-4-metóxi flavílio

Metilviologênio

CR-310

Tween 20

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Sumário

Agradecimentos.....	i
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xi
Lista de estruturas	xiii
Prólogo	19
Aspectos gerais da química de betalaínas	21
Pigmentos vegetais.....	21
Estabilidade de betalaínas	27
Estabilização de betalaínas	30
Capítulo 1. Microencapsulação de betanina em emulsão monodispersa A/O/A.....	31
1-1. Introdução	31
1-1.1. Propriedades de emulsões simples	32
1-1.2. Emulsões multiplas	35
1-1.3. Obtenção de emulsões A/O/A por emulsificação por microcanais	36
1-2. Objetivos	38
1-2.1. Objetivos específicos.....	38
1-3. Resultados e discussão.....	40
1-3.1. Otimização da emulsão de camada dupla A/O/A	40

1-3.2. Efeito da fonte de betanina	47
1-3.3. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento	49
1-3.4.1 Coloração da emulsão	55
1-4. Conclusão	56
1-5. Parte experimental	59
Reagentes químicos e solventes	59
Soluções tampão	60
Obtenção de betanina	60
Análise cromatográfica	61
Espectroscopia de absorção UV-vis	61
Formulação de emulsões A/O, fase dispersa	62
Formulação de emulsões A/O/A através de emulsificação em microcanal	62
Determinação do diâmetro médio de Sauter ($d_{3,2}$) e da distribuição do tamanho das gotas das emulsões A/O/A	63
Acompanhamento da estabilidade física das emulsões A/O/A contendo betanina	63
Análise de dados.....	64
Capítulo 2. Interação de indicaxantina com sal de flavílio	65
2-1. Introdução	65
2-1.1. Indicaxantina e MMF: compostos-modelo	68
2-1.1.1. Efeitos do pH do meio	68
2-1.1.2. Propriedades fotofísicas e fotoquímicas.....	69
2-2. Objetivos	71
2-2.1 Objetivos específicos.....	71

2-3. Resultados	73
2-3.1. Preparações	73
2-3.1.1. Indicaxantina	73
2-3.1.2. Cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio.....	79
2-3.2. Caracterização fotofísica de BtP e MMF	82
2-3.3. Estudo da interação de betalaínas com sais de flavílio	82
2-3.4. Efeito do solvente na interação entre BtP e MMF.....	85
2-3.4.1. Caracterização fotofísica de BtP e MMF	86
2-3.4.2. Supressão de fluorescência de MMF por BtP	89
2-3.4.3. Tentativa de caracterização do complexo BtP-MMF por espectroscopia de RMN	94
2-4. Discussão	97
2-4.1. Caracterização estrutural de indicaxantina.....	97
2-4.2. Caracterização estrutural de cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio.....	99
2-4.3. Estudo da interação de betalaínas com sais de flavílio.....	102
2-5. Conclusão	111
2-6. Parte experimental	112
Reagentes e solventes	112
Semissíntese e purificação de indicaxantina (BtP)	113
Síntese do cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF)	115
Caracterização estrutural	116
Caracterização fotofísica	117
Estudo da interação de betalaínas com sais de flavílio	119
Efeito do solvente na interação de BtP com MMF.....	120

Prólogo

Nesta Tese de Doutorado serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos estudos da interação de betalaínas naturais com diferentes classes de compostos químicos. As consequências destas interações serão interpretadas de forma a entender as funções de betalaínas *em plantas* e para desenvolver aplicações que dependam de processos fotoredox e de transferência de energia. O texto contém uma introdução geral, que apresenta algumas propriedades e funções de pigmentos vegetais com destaque para a classe das betalaínas, três capítulos e uma conclusão final.

O primeiro capítulo trata do estudo do comportamento de betanina, a betalaína majoritária na beterraba, em uma emulsão ternária A/O/A (água/óleo/água). As condições de emulsificação usando óleo de soja e água e empregando-se SY-Glyster CR-310 (tetraglicerol éster do ácido poliricinoléico, não iônico) e Tween 20 (polisorbato 20, não iônico) como emulsificantes, foram otimizadas. A estabilidade das emulsões e da betanina obtida de três diferentes fontes (betanina comercial em maltodextrina, betanina extraída de beterraba (*Beta vulgaris*) e suco de beterraba em pó preparado por secagem por aspersão) foi avaliada ao longo do tempo.

No capítulo seguinte, a interação entre cloreto de 7-metoxi-4-metilflavílio (MMF) e indicaxantina é descrita e os resultados racionalizados em termos da mútua exclusividade entre betalaínas e antocianinas em plantas. O estudo foi realizado empregando-se métodos espectrofotométricos e espectroscopia de RMN de ^1H empregando-se os pigmentos puros e suas misturas em solução aquosa de HCl pH 5, $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ pH 5/etanol 50:50_{v/v} e etanol puro.

O último capítulo descreve o estudo da interação entre metilviologênio, um

herbicida facilmente reduzível, e betanina. O estudo foi realizado em água variando-se o pH do meio e empregando-se espectrofotometria de absorção, espectrofluorimetria e espectroscopia de RMN de ^1H . Finalmente, uma conclusão geral relaciona os três capítulos e discute perspectivas para a aplicação de betalaínas.

Esta Tese de Doutorado foi realizada em paralelo a um projeto com a empresa Natura Cosméticos. Contudo, nenhum dos resultados aqui apresentados consta do projeto com a Natura e não há nenhuma sobreposição nos objetivos ou resultados dos dois projetos.

Aspectos gerais da química de betalaínas

Pigmentos vegetais

A diversidade de cores encontrada na natureza tem origem na interação de espécies químicas com a luz visível.¹ Neste contexto, certos grupos químicos podem absorver radiação eletromagnética visível, levando a uma transição eletrônica com a formação de estados excitados. A radiação que não é absorvida é refletida e refratada e, ao atingir o aparelho visual de animais, excitam um intrincado sistema supramolecular que converte fótons em elétrons. Os impulsos neurais resultantes são transmitidos ao cérebro pelo nervo ótico e interpretados como imagem colorida.¹

A comunicação visual intra e entre espécies se beneficia da sinalização com cores. No reino vegetal existem, dentre as centenas de milhares de compostos, uma enorme quantidade de substâncias químicas coloridas que serão chamados neste texto de pigmentos vegetais^{†, 2}. Além de proporcionar beleza estética, pigmentos vegetais possuem outras funções, podendo agir como antioxidantes³⁻⁵, fotoprotetores⁶ e como mecanismos de defesa frente ao ataque de outros organismos. As principais classes de pigmentos vegetais são antocianinas, porfirinas, carotenóides e betalaínas (Esquema 1).⁷

Carotenóides são terpenóides lipossolúveis muito difundidos na natureza⁷, estando presentes em plantas vasculares, algas, fungos, bactérias e pelo menos em uma espécie de cada forma de vida animal, como insetos, crustáceos, peixes e pássaros. Estes pigmentos não são sintetizados nesses animais, mas sim acumulados pela ingestão de

[†] O conceito de corantes e pigmentos está relacionado à solubilidade; corantes são colorantes solúveis, enquanto pigmentos são insolúveis. Entretanto, compostos colorantes extraídos de produtos naturais são chamados de pigmentos.

plantas e microorganismos.¹ Pigmentos desta classe são vermelhos, laranjas e amarelos e se localizam nos cloroplastos e cromoplastos de plantas onde protegem o aparelho fotossintético do dano induzido pela luz e servem como precursores na biossíntese de ácido abscísico, um fitohormônio envolvido nos processos de desenvolvimento das plantas e na resposta frente ao estresse e ao ataque por agentes patogênicos.⁸ Porfirinas são tetrapirróis cíclicos que atuam como ligantes de cátions metálicos e, por isso, estão presentes como grupo prostético em citocromos, peroxidases, catalases e vitamina B₁₂, além da hemoglobina e a mioglobina que possuem um átomo de Fe²⁺ ligado aos nitrogênios pirrólicos. Clorofilas são o subgrupo mais importante dentro das porfirinas.¹ Elas possuem um átomo de Mg²⁺ coordenado ao centro do anel porfirínico e um grupamento monoinsaturado de 20 carbonos como substituinte, o que as torna parcialmente lipossolúveis. Clorofilas estão presentes em cloroplastos de plantas verdes, algas e bactérias, possuem coloração verde e sua principal função é a produção de energia *via* fotossíntese.⁷

Esquema 1: Exemplos de compostos pertencentes às principais classes de pigmentos naturais: clorofila (tertrapirrol), betacaroteno (carotenoide), pelargonidina (antocianina) e betanidina (betalaína).⁹

Antocianinas são pigmentos solúveis em água, responsáveis pela coloração vermelha, azul e violeta de flores e frutos.¹⁰⁻¹³ Elas estão presentes nas Angiospermas, exceto em algumas famílias de plantas pertencentes à ordem das Caryophyllales, onde são substituídas pelas betalaínas.¹⁴ Antocianinas derivam da glicosilação enzimática de antocianidinas, agliconas que possuem um esqueleto fundamental de 2-fenil-benzopirano, conhecido como cátion flavílio, que possui três anéis denominados A, B e C (Esquema 2).² Nas plantas, antocianinas garantem sinalização visual para atrair polinizadores e oferecem proteção frente ao estresse fotooxidativo, dadas as suas propriedades fotofísicas^{6, 15} e ação antioxidante.^{1, 13, 16} Por exemplo, cianidina-3-rutinosídeo apresentou atividade antirradicalar de 80% frente aos íons superóxido formados em estudo de atividade antioxidante e reduziu de 20 a 40% a apoptose e hemólise de eritrócitos expostos a danos oxidativos.¹⁷

O pH do meio modula a cor das antocianinas. Em meio aquoso com pH entre 1 e 8, antocianinas formam, pelo menos, cinco espécies distintas (Esquema 2).^{1-2, 6, 18} O cátion flavílio é a espécie dominante em meio ácido com $\text{pH} < 2$, e confere coloração avermelhada às antocianinas. Quando o meio se torna mais alcalino, ocorrem dois processos paralelos: (i) a desprotonação do cátion flavílio, dando origem a bases quinoidais de cor azulada; (ii) o ataque nucleofílico da água ao C-2, dando origem a um hemiacetal incolor que tautomeriza a uma *cis*-chalcona.⁶ A isomerização da *cis*-chalcona leva à *trans*-chalcona, um processo de interesse fotoquímico.¹⁹⁻²²

Esquema 2: Estrutura básica de antocianidina, onde R = OH, H ou OCH₃ e reatividade de antocianina em meio aquoso. A hidratação e a desprotonação do cátion flavílio dando origem ao hemiacetal e às bases quinoidais, respectivamente, são dependentes do pH e ocorrem em uma escala de tempo menor (segundos a minutos) se comparadas ao tautomerismo de hemiacetal dando origem a *cis*-chalcona (minutos a horas). R¹ = açúcar.

O principal processo de estabilização da cor de antocianinas em plantas é a copigmentação.² Copigmentos são metabólitos de plantas ricos em elétrons π e que, em geral, absorvem luz ultravioleta; exemplos incluem ácidos orgânicos, *e.g.*, fumárico e caféico, catecol e seus derivados. A interação entre antocianinas e copigmentos resulta em um complexo molecular com maior coeficiente de absorção molar (efeito hiperacrômico) e com máximo de absorção deslocado para comprimentos de onda de menor energia (deslocamento batocrômico) dado o maior grau de deslocalização de carga no complexo quando comparado à antocianina.²³ Complexos supramoleculares envolvendo antocianinas, copigmentos e cátions metálicos, *e.g.*, Al³⁺, são azuis.²⁴⁻³¹ No vacúolo das plantas (pH 5), a complexação *via* cátion flavílio previne a perda de cor das

antocianinas. Acreditava-se que a força motriz para a formação do complexo era o efeito hidrofóbico, porém estudos recentes demonstram uma relevância da transferência de carga nesse processo de estabilização.³² Na copigmentação, ocorre uma transferência de carga do copigmento para a antocianina, diminuindo a carga positiva no C-2 do cátion flavílio, o que resulta em uma redução da constante de equilíbrio de hidratação. Dessa forma, a formação das espécies incolores, hemiacetal e chalconas, é desfavorecida, resultando em uma maior estabilização da cor das antocianinas (Esquema 3).²³

Esquema 3: A formação do complexo de transferência de carga desloca o equilíbrio para a espécie responsável pela coloração das antocianinas, o cátion flavílio.²³

Betalaínas são pigmentos vacuolares vegetais, atóxicos e solúveis em água. Elas são encontradas na maioria das famílias de plantas da ordem Caryophyllales e também em alguns fungos Basidiomicetos, sendo a beterraba sua principal fonte natural (Figura 1).¹⁻² As betalaínas possuem um sistema 1,7-diazaheptametínico (1,7-dHm) como cromóforo e são divididas em duas classes de acordo com sua estrutura (Esquema 4). As betacianinas possuem coloração magenta-violácea (máximo de absorção (λ_{abs}) em torno de 540 nm) e são produtos de condensação entre ácido betalâmico com derivados

glicosilados e/ou acilados da ciclo-DOPA, enquanto betaxantinas possuem coloração amarelo-alaranjada (máximo de absorção entre 460 e 480 nm) e se originam do acoplamento aldimínico entre ácido betalâmico e aminoácidos essenciais.⁹ Betaxantinas são fracamente fluorescentes,³³⁻³⁴ enquanto betacianinas não apresentam fluorescência. As betalaínas naturais betanina e indicaxantina apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória em meio biológico, exibindo interação com membranas e lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDLs).³⁵⁻³⁷ Sua biodisponibilidade assemelha-se a dos flavonóides,³⁸ podendo chegar a ordem de μmol no plasma sanguíneo humano, no caso da indicaxantina.³⁹

Figura 1: Fontes de betalaínas naturais; (a) flor da maravilha (*Mirabilis jalapa*), (b) flores do cactus opuntia (*Opuntia ficus-indica*), (c) frutos da pitaia (*Hylocereus undutu*), (d) beterrabas vermelha e amarela (*Beta vulgaris*), (e) flor da onze-horas (*Portulaca grandiflora*), (f) flor da primavera (*Boungaivillea spectabilis*).

Esquema 4: Betacianinas, betaxantinas e seu precursor comum, o ácido betalâmico.

Estabilidade de betalaínas

Betalaínas são compostos sensíveis a fatores como irradiação luminosa intensa,⁴⁰ alta atividade de água,⁴¹⁻⁴² extrema acidez ou basicidade⁴³⁻⁴⁵ e altas temperaturas^{44, 46-47}. Cada um desses fatores afeta um ou mais grupos funcionais presentes nas betalaínas, causando a sua degradação. No Esquema 5 são apresentadas algumas vias de degradação de betacianinas, bem como os principais agentes para estas transformações.⁴⁸ Além de descarboxilação, desidrogenação e desglicosilação, as betalaínas ainda podem sofrer hidrólise, dando origem ao precursor ácido betalâmico e a amina correspondente. Na presença de ácido, pode ocorrer epimerização, dando origem às isobetalaínas, e abertura do anel 1,2,3,4-tetraidropiridínico, levando à formação de 4,5-*seco*-DOPA. Apesar da presença de luz induzir a formação de betalaínas *in vivo*,⁴⁹⁻⁵² a irradiação de betalaínas em solução favorece a sua decomposição.^{40, 53} Luz na região UV-vis favorece a decomposição de betalaínas através de processos oxidativos, *i.e.*, $E_a = 104,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ no escuro e $80,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ sob iluminação.^{40, 44, 54-56}

Esquema 5: Possíveis vias de degradação de betacianinas.^{48, 57} Na betanina, ligações duplas em vermelho são sujeitas à isomerização, ligações em azul podem sofrer isomerização e ligações em verde são passíveis de oxidação para formação de dupla ligação. neoBn: neobetalaína. Soluções de betalaínas são estáveis em uma faixa de pH entre 3 e 7.

O aumento da temperatura acelera a degradação de betalaínas. A decomposição térmica de betanina em extratos de beterraba segue cinética de primeira ordem, apresentando constantes de degradação variando de $6,2 \text{ min}^{-1}$ (25°C) a 35 min^{-1} (75°C).⁵⁶ Betacianinas são mais estáveis do que betaxantinas frente ao aumento da temperatura e à hidrólise.^{46, 58-59} Por exemplo, o tempo de meia-vida da betanina tratada termicamente ($\tau_{1/2} = 1100 \text{ min}$) é 11 vezes maior que o da vulgaxantina I ($\tau_{1/2} = 100 \text{ min}$).⁶⁰ Estudos sobre termoestabilidade de betalaínas sugerem mecanismos de degradação e caracterizam os produtos de decomposição. Sob aquecimento em meio ácido, betalaínas epimerizam para a forma *iso*, possivelmente *via* tautomerização, e mantém sua coloração magenta.⁶¹ A desidrogenação de betalaínas dá origem às neobetalaínas, as quais possuem coloração amarelada. Neobetanina e neobetanidina, assim como seus derivados descarboxilados foram identificados por HPLC-MS em estudos de termoestabilidade de betalaínas provenientes de suco de pitaia roxa.⁶² Processos de descarboxilação resultam em compostos com comprimento de onda deslocado para o azul devido a diminuição da deslocalização dos elétrons π .⁶¹ O sítio de descarboxilação de betalaínas depende do solvente utilizado no estudo. Enquanto etanol e sua mistura com água promovem a descarboxilação no C-17, em meio aquoso a descarboxilação do C-2 é favorecida. Entretanto, após aquecimento prolongado essa diferença não é mais observada e todos os sítios são afetados.⁶³ A hidrólise de betalaínas também é favorecida pelo aumento da temperatura.⁶⁴ Devido a formação de ácido betalâmico, a solução passa a ser amarela. Fato interessante desse processo de degradação é sua reversibilidade com a acidificação do meio (no caso de hidrólise alcalina) ou resfriamento⁶⁵, porém a regeneração dos pigmentos não é completa.⁶⁶

Considerando que betalaínas são susceptíveis a hidrólise, a presença de água é

desvantajosa. Nas suas matrizes naturais, as betaxantinas^{60, 67} e as betacianinas⁴⁴ são mais estáveis que em solução aquosa. Os constituintes vegetais como açúcares, ácidos e pectinas diminuem a atividade de água (a_w)^{68,69}, aumentando a persistência⁷⁰ dos pigmentos em meio aquoso.⁷¹ O aumento na persistência de betanina foi observado em condições onde a_w era menor que 0,63.⁷²

Estabilização de betalaínas

A estabilidade de betalaínas pode ser aumentada através da utilização de técnicas de microencapsulação, nas quais o pigmento é envolvido por uma cápsula ou cobertura em uma escala micrométrica (tipicamente menor que 300 μm) de forma a diminuir sua interação com espécies químicas ou fatores externos que possam levar a sua degradação.⁷³ Atualmente, as técnicas mais utilizadas pela indústria são a secagem por aspersão (*spray drying*) e a formação de emulsões. Betalaínas do extrato de frutos da opuntia (*Opuntia ficus-indica*) foram microencapsuladas com maltodextrinas de forma a aumentar sua aplicação como matérias primas na indústria de alimentos. Embora o material obtido tenha maior persistência frente ao aquecimento, ainda se mostrou bastante sensível a irradiação luminosa.⁷⁴⁻⁷⁵ MiraxantinaV e betanidina também foram encapsuladas com maltodextrina e quitosana, empregando-se o método de secagem por aspersão.⁷⁶ As micropartículas obtidas com quitosana são menores comparadas a maltodextrina. A combinação destes pigmentos em proporções diferentes permitiu obter cores entre o amarelo e o magenta, passando pelo vermelho, em um material com boa estabilidade térmica, mas ainda bastante sensível a luz.⁷⁶ Extrato aquoso de beterraba também foi encapsulado em emulsões de camada dupla do tipo A/O/A, porém a emulsão obtida mostrou-se polidispersa e instável, apresentando a formação de creme após alguns dias armazenada a temperatura ambiente.⁷⁷

Capítulo 1.

Microencapsulação de betanina em emulsão monodispersa A/O/A

1-1. Introdução

O número de consumidores que prefere matérias primas de origem natural a substâncias artificiais nos alimentos e bebidas que ingerem vem crescendo.⁷⁸⁻⁷⁹ Produtos sem (*ou com poucas*) substâncias artificiais, incluindo aditivos corantes, são chamados de "*clean label*" e são associados a um menor risco à saúde e a um menor impacto ambiental.⁸⁰⁻⁸² Pigmentos naturais têm sido utilizados como colorantes na indústria alimentícia há séculos e, eventualmente, atuam como micronutrientes com propriedades benéficas à saúde humana.^{3, 83-88} Betanina é o componente principal da beterraba em pó, um aditivo corante atóxico de cor magenta usado em alimentos (EEC# E162) que foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) em 1967. Entretanto, a betanina é sensível à decomposição térmica^{44, 46-47, 56, 62, 89-91} e fotoquímica⁴⁰ e sujeita à hidrólise em meio ácido ou básico^{41-45, 56, 92-93} que alteram a sua cor e limitam a sua aplicação em alimentos. Apesar disso, betalaínas apresentam um poder tintorial três vezes maior que antocianinas, *i.e.*, quantidades menores de pigmento são necessárias para colorir o produto final,⁹⁴ e ainda, betalaínas são coloridas em uma faixa de pH entre 3 e 7, condição em que antocianinas são praticamente incolores (*vide* Esquema 2).

A encapsulação de betalaínas em matrizes complexas aumenta a sua persistência.⁹⁵ Existem diversas técnicas para microencapsulação de substâncias

químicas, que incluem a emulsificação seguida por remoção de solvente,⁹⁶ secagem por aspersão e moagem. Moagem resulta em amostras polidispersas, com tamanhos de partícula não uniformes, e – assim como a secagem por aspersão – não é adequada para amostras sensíveis a temperatura. Emulsões água-em-óleo (A/O), aonde *óleo* se refere a qualquer líquido insolúvel em água, são apropriadas para encapsular substâncias polares, mas também tendem a produzir amostras polidispersas. Emulsões múltiplas do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) permitem encapsular substâncias hidrofílicas e incorporá-las em água como alto grau de monodispersão, dependendo da técnica usada para a preparação da emulsão.⁹⁵ Extrato aquoso de beterraba foi encapsulado em emulsão de camada dupla do tipo A/O/A para estudo de sua digestão intestinal *in vitro*, porém a emulsão obtida demonstrou-se polidispersa e instável, apresentando formação de creme após armazenamento a temperatura ambiente.⁷⁷

1-1.1. Propriedades de emulsões simples

Emulsões são misturas entre dois ou mais líquidos imiscíveis, *e.g.*, água e óleo, nas quais gotas de um deles estão dispersas (*fase dispersa*) em uma *fase contínua* do outro.⁹⁷ Emulsões são dispersões coloidais com tamanho de partícula dispersa entre 100 nm e 100 µm e que tendem a ter uma aparência opaca dado o espalhamento de luz nas suas várias interfaces.[‡]

Emulsões são, *a priori*, termodinamicamente instáveis.⁹⁸ A variação de energia de Gibbs (ΔG) para emulsificação em uma dada temperatura tem duas contribuições:

[‡] A concentração da emulsão determina a sua cor: quando a luz é espalhada de maneira homogênea a emulsão é branca; contudo, ao ser suficientemente diluída a emulsão adquire tonalidade azul graças ao maior espalhamento da luz com menor comprimento de onda, *viz.*, efeito Tyndall, e, analogamente, se torna amarela quando mais concentrada. Microemulsões e nanoemulsões, nas quais o tamanho das gotas é inferior a 100 nm, são, entretanto, translúcidas.

um termo relacionado às energias interfacial ($\gamma_{ab}\Delta A_{ab}$; em uma interface entre os líquidos a e b , A_{ab} é definida como a área interfacial, e γ_{ab} é a tensão interfacial) e um termo entrópico que reflete o aumento do número de estados quando força mecânica dispersa um líquido no outro:

$$\Delta G = \gamma_{ab}\Delta A_{ab} - T\Delta S \approx \gamma_{ab}A_{ab}^{em} - T\Delta S \quad \text{Eq. 1}$$

Como o aumento do número de gotas durante a emulsificação resulta em aumento na entropia configuracional, na maioria dos casos $\gamma_{ab}\Delta A_{ab} \gg -T\Delta S$, o que implica em ΔG positivo, ou seja, a formação da emulsão não é espontânea e o sistema emulsionado é termodinamicamente instável. Como resultado, observa-se a quebra da emulsão por diversos mecanismos, incluindo floculação, coalescência, envelhecimento de Ostwald. Nestas condições, não existe uma barreira potencial para a quebra da emulsão por floculação e coalescência, que são controlados por difusão (das gotas ou do líquido entre gotas, respectivamente).⁹⁹

Na presença de um estabilizante, tipicamente um agente tensoativo, surgem barreiras potenciais, as energias de ativação de Gibbs $\Delta^\ddagger G_{\text{floc}}$ e $\Delta^\ddagger G_{\text{coal}}$, que podem proporcionar estabilidade cinética à emulsão. Uma emulsão floculada pode, caso o valor de $\Delta^\ddagger G_{\text{coal}}$ seja suficientemente alto, permanecer neste estado metaestável por longos períodos de tempo. Da mesma forma, quando a $\Delta^\ddagger G_{\text{coal}}$ é alta, a emulsão pode permanecer indefinidamente em um estado formado por uma fase dispersa e uma fase contínua.⁹⁹ A escolha do tensoativo é realizada com base em seu balanço hidrofílico-lipofílico (HLB). HLB é uma medida da proporção relativa entre os componentes hidrofílico e lipofílico da molécula e sua escala varia de 0 a 20. Quanto maior o valor de HLB, maior a solubilidade deste tensoativo em água.¹⁰⁰⁻¹⁰¹ Emulsões A/O requerem tensoativos com baixo HLB (3 - 6), enquanto emulsões O/A requerem tensoativos com

alto valor de HLB (8 – 18).⁹⁸ Em geral, a regra de Bancroft se aplica e agentes emulsificantes tendem a promover a dispersão da fase na qual são menos solúveis.¹⁰²

Floculação e coalescência resultam em aumento do tamanho da gota e, geralmente levam a formação de creme ou sedimentação. Esses dois processos são o resultado do aumento da atração de van der Waals entre átomos e moléculas, *i.e.*, dipolo-dipolo (*Keesom*), dipolo-dipolo-induzido (*Debye*) e dispersão (forças de London), em detrimento da repulsão eletrostática (ou estérica) na *interface*[§] criada pelo agente emulsificante. A inversão de fase consiste na transformação de uma emulsão A/O em uma emulsão O/A e vice-versa. Isso ocorre quando há uma mudança na propriedade do tensoativo devido, por exemplo, a variações na temperatura. O envelhecimento de Ostwald ocorre quando gotas menores difundem pela fase contínua da emulsão e se fundem a gotas maiores. Devido sua instabilidade termodinâmica, as emulsões tendem a reduzir sua energia livre de Gibbs (ΔG) através do aumento do diâmetro das gotas da emulsão, reduzindo assim a área interfacial total. Gotas menores possuem um maior potencial químico interno devido a maior pressão interna da gota (p) e tendem a fundir com gotas maiores para diminuir este potencial.¹⁰³ A pressão interna da gota, também conhecida como pressão de Laplace, é definida pela equação 2, onde γ_{ab} é a tensão interfacial entre as fases dispersa e contínua da emulsão e r é o raio da gota. Emulsões monodispersas, ou seja, com uma distribuição uniforme do tamanho das gotas diminuem o envelhecimento de Ostwald, uma vez que as gotas terão tamanhos semelhantes entre si.⁹⁹

[§] *Interfase* e *interface* são expressões usadas de forma bastante ampla. Interfase é definida como a fase intermediária entre dois materiais em equilíbrio, irão se juntar para resultar em um sistema microheterogêneo. Interface é o limite superficial entre fases homogêneas em equilíbrio termodinâmico.

$$p = \frac{2\gamma_{ab}}{r} \quad \text{Eq. 2}$$

Figura 2: Principais processos de desestabilização de emulsões.

1-1.2. Emulsões multiplas

Emulsões de camada dupla, *e.g.*, água-óleo-água (A/O/A) ou óleo-água-óleo (O/A/O) (Figura 3), tem ganhado destaque na encapsulação de princípios ativos.⁹⁷ No caso da emulsão A/O/A, uma fase aquosa interna é dispersa em uma fase oleosa. Então, essa fase oleosa é dispersa em uma fase aquosa contínua. A principal característica desta emulsão é a capacidade de encapsulação de um composto hidrofílico com posterior aplicação em um meio também hidrofílico, o que não é possível em uma emulsão do tipo A/O. Betanina, por exemplo, é solúvel em água, porém é instável em meios alcalinos ($\text{pH} > 8$) e bastante ácidos ($\text{pH} < 3$), não podendo ser utilizada em produtos cuja formulação apresente estes valores de pH. Uma vez encapsulada em uma emulsão de camada dupla, betanina estaria protegida pela fase oleosa e poderia ser

utilizada nessas formulações. O maior problema das emulsões de camada dupla é sua instabilidade termodinâmica devido à existência de *duas* interfaces.

Figura 3: Representação de emulsões A/O e de emulsões de camada dupla A/O/A.

1-1.3. Obtenção de emulsões A/O/A por emulsificação por microcanais

Emulsões A/O/A são produzidas em duas etapas utilizando diferentes técnicas, incluindo homogeneização utilizando um rotor-estator, ultrassom ou alta rotação.¹⁰⁴ Todas essas técnicas dão origem a emulsões polidispersas. Contudo, novas técnicas, *e.g.*, emulsificação por membranas (*membrane emulsification*, ME), por microcanais (*microchannel emulsification*, MCE) ou técnicas baseadas em microfluídica (*microfluidic emulsification*, MFE), foram desenvolvidas a fim de melhorar a estabilidade física de emulsões¹⁰⁴⁻¹⁰⁵. A emulsificação por microcanais foi proposta em 1997 por Kawakatsu e colaboradores e resulta em emulsões monodispersas.¹⁰⁶ O sistema consiste em um módulo de aço inoxidável que é montado de forma a imobilizar uma placa de microcanais entre duas placas de vidro. Cada microcanal é formado por um microfuro e uma microrranhura orientado como um T¹⁰⁷⁻¹⁰⁹; a fases dispersa e contínua são bombeadas por lados opostos da placa e armazenadas em um recipiente. A geração de gotas ocorre espontaneamente devido a tensão interfacial existente entre os dois líquidos, da geometria do microcanal e do espaçamento entre os diversos

microcanais.¹¹⁰⁻¹¹¹ Um microscópio invertido é usado para monitorar a formação das gotas.

1-2. Objetivos

Encapsular betanina em uma emulsão A/O/A formada por água, óleo de soja e tensoativos apropriados para uso alimentício.

1-2.1. Objetivos específicos

- i. Determinar a formulação mais adequada da emulsão, variando-se a fração de volume da fase aquosa interna, a concentração do emulsificante hidrofóbico, a concentração de betanina, a concentração do emulsificante hidrofílico e o fluxo da fase dispersa;
- ii. Determinar a influência de diferentes fontes de betanina na formulação da emulsão;
- iii. Determinar a estabilidade física das emulsões contendo diferentes fontes de betanina a 4 °C, 25 °C e 60 °C ao longo de 7 dias;
- iv. Determinar a variabilidade de cor da betanina encapsulada quando mantida a 4 °C, 25 °C e 60 °C ao longo de 7 dias.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

1-3. Resultados e discussão

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade de Tsukuba, Japão, sob a supervisão do Prof. Marcos Neves e com a ajuda do aluno de Doutorado Nauman Khalid.

1-3.1. Otimização da emulsão de camada dupla A/O/A

O estudo de encapsulação de betanina em emulsão múltipla A/O/A foi iniciado com betanina comercial (amostra A), uma mistura de beterraba em pó e dextrina. A emulsão usada para encapsular a betalaína foi estudada anteriormente pelo grupo do Prof. Kobayashi e do Prof. Neves na Universidade de Tsukuba e requer duas etapas para ser formulada.^{104-105, 109, 112} Com o auxílio de um rotor-estator, prepara-se uma emulsão A/O formada por uma fase aquosa tamponada (TPi pH 6,2, 100 mmol L⁻¹), contendo betanina (até 1,0% m/m_{fd(A/O)}) e D-glicose (1% m/m_{fd(A/O)}), dispersa em uma fase contínua formada por óleo de soja e o emulsificante CR-310. D-Glicose foi usada como redutor da atividade de água para estabilizar a betanina.⁶¹ Os emulsificantes foram selecionados considerando-se suas toxicidades e valores na escala semi-empírica HLB:¹⁰⁰⁻¹⁰¹ Tween 20 tem HLB = 16,7, sendo adequado para estabilizar emulsões A/O enquanto o CR-310, HLB < 1, que estabiliza emulsões O/A (Esquema 6). A emulsão A/O foi dispersa na fase aquosa contínua contendo Tween 20 empregando-se um sistema de emulsificação por microcanais (MCE). Nesse sistema, uma placa de silício área com ativa de 10 mm² contendo ca. 14.000 microcanais, cada um formado por um microfuro e um microencaixe, é alimentada com as fases contínua e dispersa de forma a produzir gotas (Figura 4).

41

Os efeitos de diferentes fatores experimentais (Tabela 1) sobre as características da emulsão A/O/A foram investigados. Para cada condição experimental, determinaram-se a distribuição do tamanho das gotas, o seu diâmetro médio de Sauter ($d_{3,2}$) e o grau de dispersão da emulsão, medido pelo fator de distribuição relativo, *Relative Span Factor*, RSF. O diâmetro médio de Sauter das gotas ($d_{3,2}$) é definido como o diâmetro da esfera que possui a mesma proporção volume/área superficial que a partícula de interesse:

$$d_{3,2} = \frac{6V}{S} \quad \text{Eq. 3}$$

onde V e S representam o volume e a área superficial da gota, respectivamente.

Como cada parâmetro foi variado individualmente, foram definidas condições experimentais padrão: fração de volume da fase aquosa interna (ϕ_{Ai}): 30%, concentração de CR-310 (C_{CR-310}): 4% m/m_{fc(A/O)}, concentração de Tween 20 ($C_{Tween20}$): 2% m/m_{fc(A/O/A)}, concentração de betanina (C_{Bn}): 0,5% m/m_{fd(A/O)} e fluxo da fase dispersa ($f_{A/O}$): 10 L m⁻² h⁻¹.

Tabela 1. Condições experimentais usadas na etapa de otimização da formulação da emulsão.

Variável	Condição		
	Mínima	Intermediária	Máxima
ϕ_{Ai}	0,1	0,2	0,3
C_{CR-310} , %m/m _{fc(A/O)}	2,0	4,0	8,0
$C_{Tween20}$, %m/m _{fc(A/O/A)}	1,0	2,0	3,0
C_{Bn} , %m/m _{fd(A/O)}	0,1	0,5	1,0

$f_{A/O}$, L m⁻² h⁻¹. 5 20 100

Os gráficos de radar modificados apresentados na Figura 5 mostram que somente o fluxo da fase dispersa afeta o diâmetro médio de Sauter, *viz.*, quando o fluxo é aumentado de 5,0 para 100 L m⁻² h⁻¹ o valor de $d_{3,2}$ aumenta ca. de 10 µm. Um aumento sutil do valor de $d_{3,2}$ é provocado também com o aumento da concentração de CR-310. O grau de monodispersão, conforme medido pelo RSF, diminui no fluxo máximo utilizado, resultando em uma emulsão polidispersa, *i.e.*, valor de RSF > 0.5 indica polidispersão. As demais variáveis parecem não afetar o valor de RSF. Quando a concentração de CR-310 foi usada na condição mínima (2% m/m_{f_c(A/O)}), observou-se quebra da emulsão com separação de fase, impossibilitando a sua caracterização (Anexo 1).

Figura 5. Gráficos de radar modificado que indicam o efeito das condições experimentais (mínima, intermediária e máxima) de cada variável independente sobre o diâmetro médio de Sauter ($d_{3,2}$) e do *Relative Span Factor*, RSF. Os dados são apresentados em escala logarítmica e os contornos utilizam suavização Belzier modificada, conforme implementado no programa Origin.

As medidas de distribuição de tamanho das gotas foram feitas em um analisador de espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*, DLS) determinado por difração a laser e são apresentadas na Figura 6. Com fluxo da fase dispersa de $10 \text{ mL m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, uma concentração de CR-310 intermediária (4% $\text{m/m}_{\text{fc(A/O)}}$) resultou em partículas monodispersas com menor largura à meia altura (FWHM = $7,7 \text{ }\mu\text{m}$). Contudo, se o fluxo é aumentado acima de $80 \text{ mL m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, a emulsão se torna polidispersa, conforme inferido pela análise dos valores de RSF (Anexo 2).

Figura 6: Distribuição do tamanho das gotas geradas variando-se a fração de volume de fase aquosa interna (A), concentração de Tween 20 (B), concentração de CR-310 (C) e concentração de betanina (C).

Esses resultados são confirmados pela visualização da formação das gotas no sistema de microcanais (Figura 7). O aumento do fluxo de 5 para $20 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ aumenta o número de gotas, sem afetar significativamente seu tamanho. Contudo, quando o fluxo é levado acima de $100 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ observa-se que o tamanho das gotas aumenta e a emulsão se torna polidispersa. Na emulsificação em microcanais, i.e., *microfluídica*, a formação das gotas é um processo espontâneo que depende da tensão interfacial entre os líquidos e da viscosidade, sendo definida pelo número de capilaridade (C_a):

$$C_a = \frac{\eta U}{\gamma} \quad \text{Eq. 4}$$

onde η é a viscosidade da fase dispersa (caso seja a fase mais viscosa), U é o fluxo da fase dispersa e γ é a tensão interfacial. Valores de $C_a \gg 1$ resultam quando a viscosidade ou o fluxo aumentam e resultam na deformação irregular das gotas, resultando em um maior volume das gotas na fenda e, conseqüentemente, uma menor área de contato com o microcanal. Como resultado, as gotas adquirem caráter polidisperso e tamanhos maiores.

Figura 7: Micrografia da geração de gotas por microcanais variando-se o fluxo da fase dispersa. a) $5 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, b) $10 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, c) $20 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, d) $40 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e e) $>100 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. A barra corresponde a $80 \mu\text{m}$.

Em regime de C_a baixo (< 1) a tensão interfacial é o termo mais importante, e seu aumento implica na diminuição da área interfacial levando à formação de gotas esféricas e à monodispersividade.¹¹³⁻¹¹⁴ Nestas condições a formação de gotas ocorre por que a pressão exercida pela fase dispersa sobre a fase contínua supera a chamada

pressão de ruptura da gota (P_{bt}), definida por:¹¹⁵

$$P_{bt} = \frac{4\gamma\cos\theta}{d} \quad \text{Eq. 5}$$

onde γ é a tensão interfacial entre a fase dispersa e a fase contínua, θ é o ângulo de contato entre a gota e a superfície do microcanal e d é o diâmetro do microcanal. Nos experimentos realizados com fluxo abaixo de $80 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, a passagem da emulsão A/O pela fenda resulta na formação de emulsões monodispersas com gotas de cerca de $50 \mu\text{m}$. Nesta faixa de fluxo, a formação das gotas provavelmente é controlada pela tensão superficial do líquido, *i.e.*, quando ângulo de contato atinge um valor crítico, ocorre o desprendimento da gota, que tem volume constante.

1-3.2. Efeito da fonte de betanina

Com estes experimentos, obtiveram-se as condições experimental otimizadas para a realização dos estudos com outras fontes de betanina: ϕ_{Ai} em 30%, C_{CR-310} : 4% m/m_{fc(A/O)}, $C_{Tween20}$: 1% m/m_{fc(A/O/A)}, C_{Bn} : 0,5% m/m_{fd(A/O)} e $f_{A/O}$: $10 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Nestas condições, emulsões A/O/A foram preparadas empregando-se outras duas fontes de betanina: betanina extraída de suco de beterraba e purificada (amostra B, *para detalhes da obtenção vide Cap. 3*) e suco de beterraba em pó obtido através de secagem por aspersão (amostra C). Para que o poder tintorial das amostras, bem como os efeitos da composição de cada amostra sobre as propriedades da emulsão, pudessem ser comparados, a concentração de amostra foi definida em 0,5% m/m_{fd(A/O)}, *i.e.*, 75 mg de amostra em 15 g de fase dispersa. As concentrações finais de betanina em cada amostra foram determinadas espectrofotometricamente em soluções aquosas considerando um coeficiente de absorção molar de $65.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 536 nm:¹¹⁶ $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (amostra A), $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (amostra B) e $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (amostra C). Para

medir a quantidade relativa de betalaínas na emulsão foi desenvolvida uma metodologia baseada na análise de imagem. Fotografias dos frascos contendo as emulsões iluminados de forma a criar uma zona de sombra foram adquiridas com o auxílio de um telefone celular, sempre em condições idênticas. A cor na interface entre luz e sombra foi amostrada e classificada de acordo com o espaço de cor CIELa^{*}b^{*} (Figura 8). Observa-se que a luminância (L) aumenta com a diminuição da quantidade de pigmento e é maior nas emulsões A/O do que nas emulsões A/O/A. Os valores do parâmetro a^{*} indica uma escala de cores que varia do vermelho (+) ao verde (-), enquanto b^{*} varia do amarelo (+) ao azul (-). Nas emulsões A/O é evidente o maior potencial tintorial da amostra B (betanina pura), evidenciado pelo valor mais alto e mais positivo de a^{*} e mais negativo de b^{*} (mais vermelho e mais azul, resultando em magenta) comparado às outras amostras. O mesmo efeito é observado em emulsões A/O/A; contudo, todas as amostras se tornam mais opacas, resultando em diminuição do grau de saturação (valores de a^{*} e b^{*} mais próximos de zero).

Nas condições experimentais otimizadas com a amostra A, a emulsão formulada com a amostra B também é monodispersa, porém a emulsão formulada com beterraba em pó (amostra C) é polidispersa (Figura 9 e Anexo 4). Essa polidispersão poderia ser explicada pela presença de enzimas e proteínas, que não são encontrados nas amostras A e B, e que podem afetar a tensão superficial e as características da emulsão. Considerando-se o efeito tintorial superior da betanina pura em comparação às outras amostras, o efeito da variação do fluxo da fase dispersa sobre a emulsão contendo a amostra B foi analisado e os resultados são apresentados no Anexo 5.

Figura 8. Emulsões A/O e A/O/A contendo 0,5% m/m da amostra A: betanina comercial em dextrina, a amostra B: betanina purificada e a amostra C: suco de beterraba em pó. O retângulo superior é um recorte da imagem do frasco contendo a emulsão (imagem bruta no anexo 3). O retângulo inferior é a cor média (área de 11 pixel²) e seu respectivo código CIE L*a*b*.

Figura 9: Distribuição do tamanho das gotas geradas variando-se a fonte de betanina. Amostra A, betanina comercial em dextrina: FWHM = 7,7 μm; amostra B, betanina pura: FWHM = 8,9 μm e amostra C, suco de beterraba em pó: FWHM = 31 μm.

1-3.3. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento

Emulsões A/O/A contendo betalaínas foram mantidas a 4 °C, 25 °C e 60 °C e monitoradas por sete dias. Uma emulsão A/O/A sem a adição de betanina foi usada como controle. Medidas de diâmetro de partícula (Figura 10) e imagens de microscopia ótica (Figura 11) foram realizadas no primeiro e último dia, para avaliar eventuais mudanças no tamanho e na forma das gotas e avaliar a estabilidade da emulsão. Todas

as amostras foram mantidas no escuro no período entre as análises.

A Figura 10 mostra a variação do diâmetro médio de Sauter ($d_{3,2}$) (a) e do RSF (b) das emulsões na ausência de betanina e na presença de 3 fontes de betanina nos dias 1 e 7. As linhas horizontais brancas representam os valores de $d_{3,2}$ e RSF em cada temperatura estudada e as linhas horizontais pretas representam o valor médio obtido, considerando-se todas as temperaturas. A emulsão controle (sem betanina) e a emulsão da amostra A apresentam uma variação semelhante no diâmetro médio das gotas ao longo de uma semana, enquanto a amostra C apresenta um intervalo maior, sugerindo que componentes do pó de beterraba bruto comprometem o efeito dos agentes emulsificantes presentes na emulsão. A amostra B apresenta uma sutil variação no diâmetro médio das gotas, sendo esta menor que a observada na emulsão controle. Este fato sugere que a betanina está estabilizando a emulsão. Os valores de RSF mostram que ao longo de uma semana a emulsão controle é polidispersa, enquanto a emulsão das amostras A e B são monodispersas. A emulsão da amostra C é polidispersa desde o início do ensaio de estabilidade, uma vez que no seu processo de emulsificação já é observada polidispersão.

Figura 10. Gráficos de Bean para o efeito da temperatura e tempo de armazenamento sobre (a) o diâmetro médio de Sauter ($d_{3,2}$) e (b) o RSF das emulsões formuladas na ausência de betanina e na presença de três diferentes fontes do pigmento. Os gráficos foram preparados com os dados obtidos a 4 °C, 25 °C e 60 °C (linhas brancas horizontais, dados brutos no Anexo 6). As linhas pontilhadas horizontais indicam o valor médio medido, enquanto a linha pontilhada vermelha em (b) indica o limite de uma emulsão monodispersa, $\text{RSF} = 0.5$.

A microscopia ótica mostra que as gotas em todas as amostras não sofrem alteração de tamanho ou morfologia quando a emulsão A/O/A é mantida a 4 °C por uma semana (Figura 11). As gotas presentes nas emulsões contendo as amostras A e B têm diâmetro similar, enquanto a amostra C resulta em gotas 25 μm maiores. A 25 °C a

emulsão da amostra A sofre uma sutil redução de tamanho em uma semana. A amostra B, além da diminuição das gotas no período, apresenta maior homogeneidade no interior da gota, o que sugere que a emulsão A/O/A se transformou em uma emulsão O/A. Um comportamento similar é observado para as gotas contendo as amostras C. As gotas das emulsões das amostras A e C mantidas a 60 °C sofreram uma redução abrupta no tamanho, apresentando valores de diâmetro menores que 3 µm no sétimo dia. A amostra B apresentou uma pequena diminuição no tamanho das gotas. Além disso, no primeiro dia do ensaio de estabilidade, o interior das gotas começa a apresentar uma heterogeneidade, o que sugere o início do processo de coalescência das gotas da emulsão. Após uma semana a 60 °C, a emulsão da amostra B sofre floculação, confirmando a hipótese de coalescência no início do ensaio.

Para verificar a influência das diferentes amostras de betanina na taxa de contração de volume das gotas da emulsão, o volume das gotas das emulsões mantidas a 25 °C nos dias 1 e 7 foi calculado a partir dos dados de diâmetro médio de Sauter ($d_{3,2}$) das gotas (Anexo 6) e pode ser visualizado na Figura 12. Os cálculos foram realizados considerando-se um comportamento ideal do sistema. A emulsão controle apresenta uma contração de 70% em seu volume, enquanto nas amostras A e B esta taxa é de 50% e 65%, respectivamente. A amostra C apresenta uma taxa de contração de volume de 95 %. Esses resultados corroboram com o comportamento observado na microscopia ótica e com a hipótese de betanina estar estabilizando a emulsão, uma vez que as amostras A e B apresentaram uma taxa de contração de volume menor que a emulsão controle.

Figura 11: Imagens de microscopia ótica das emulsões A/O/A contendo betanina comercial, betanina purificada e suco de beterraba a 4 °C, 25 °C e 60 °C nos primeiro e último (7) dias do ensaio de estabilidade. Todas as imagens estão na mesma escala; barra = 50 μ m.

Este resultado pode estar relacionado ao aumento das forças de repulsão entre as duplas camadas resultantes da presença de cargas negativas na betanina em $\text{pH} > 3,5$ ¹¹⁷, hipótese que encontra suporte na teoria de estabilidade de colóides de Deryaguin, Landau, Verwey e Overbeek (teoria DLVO).¹¹⁸ No suco de beterraba em pó, amostra C, a presença de altas concentrações de sal e biomoléculas que afetam a tensão interfacial

podem comprometer a estabilidade da emulsão. A amostra A, por outro lado não parece afetar as características das gotas quando comparada ao controle, visto que contém menor quantidade de betanina e grande quantidade de maltodextrina, um polisacarídeo neutro.

A diminuição do tamanho das gotas das emulsões mantidas a 60 °C (Figura 12) pode ser explicada pela diminuição da viscosidade da fase dispersa, que leva, de acordo com a Eq. 3, a uma diminuição do valor de C_a . Como consequência, a ruptura das gotas também é facilitada em temperaturas mais altas, bem como o surgimento de novas gotas de tamanho reduzido. O efeito da temperatura sobre a viscosidade do meio também explica um menor diâmetro médio das gotas a 25 °C em relação as emulsões A/O/A mantidas a 4 °C.

Figura 12. Microscopia ótica de uma gota selecionada das emulsões A/O/A contendo betanina comercial, betanina purificada e suco de beterraba a 4 °C, 25 °C e 60 °C nos primeiro e último (7) dias do ensaio de estabilidade. Todas as imagens estão na mesma escala; barra = 50 µm.

1-3.4.1 Coloração da emulsão

A coloração da betanina presente nas emulsões A/O/A foi acompanhada durante 7 dias. As amostras foram mantidas a 4 °C, 25 °C e 60 °C sob o abrigo de luz e fotografias foram registradas a cada dois dias, a fim de observar a mudança de coloração das emulsões. As imagens das emulsões A/O e A/O/A foram analisadas considerando-se o espaço de cor CIELAB, *i.e.*, as imagens foram analisadas utilizando-se o programa Adobe Photoshop, no qual foram determinados os parâmetros a^* e b^* .

Betanina proveniente de diferentes fontes encapsulada em emulsão A/O/A mostrou-se sensível à temperatura. Em todas as emulsões A/O ocorre uma diminuição dos valores de a^* com o aumento da temperatura, o qual demonstra uma perda da cor vermelha (Anexo 7 e Figura 13). Ao mesmo tempo é observado um aumento dos valores de b^* , indicando um deslocamento para a região do amarelo. Sabe-se que o produto de degradação da betanina, o ácido betalâmico, é amarelo. A partir disso pode-se inferir que o aumento da temperatura causa a degradação da betanina presente nas emulsões A/O. Comportamento similar é observado nas emulsões A/O/A e nas amostras controle. Ainda é possível observar que as emulsões A/O e A/O/A contendo betanina pura apresentam maiores valores de a^* , ou seja, coloração mais intensa. Isso se deve ao fato da concentração de betanina nessa emulsão ser maior em relação às emulsões contendo betanina comercial em dextrina e suco de beterraba em pó preparado por liofilização, como citado anteriormente.

Figura 13: Cores médias (11 × 11 pixel) medidas para emulsões A/O e A/O/A contendo betanina comercial, suco de beterraba e betanina mantidas a 4 °C, 25 °C ou 60 °C por 7 dias. As fotos e dados brutos são apresentados nos anexos 7 e 8. As imagens foram adquiridas sob fundo preto.

1-4. Conclusão

Betanina foi encapsulada em emulsões A/O/A usando a técnica de emulsificação por microcanais (MCE). As gotas formadas têm tamanho de partícula de $46 \pm 10 \mu\text{m}$ e são monodispersas. Agentes emulsificantes adequados para uso em alimentos e o uso de óleo de soja resultaram em uma emulsão A/O/A que pode ser usada na preparação de alimentos funcionais mantidos sob refrigeração por até 7 dias. As condições de emulsificação foram otimizadas e o fluxo da fase dispersa foi o fator mais importante para o tamanho e grau de dispersão das partículas, visto que esse parâmetro influencia

diretamente o número de capilaridade. O uso de suco de beterraba seco por aspersão como fonte de betanina resultou em uma emulsão polidispersa com partículas com maior diâmetro médio. Contudo, betanina pura tende a produzir gotas monodispersas com distribuição de tamanho mais uniforme quando comparada ao controle sem betalaínas, a suco de beterraba seco por aspersão e a betanina diluída com dextrina, provavelmente pelo aumento da repulsão eletrostática entre as gotas e aumento da barreira potencial para coalescência e floculação.

Essa página foi deixada intencionalmente em branco

1-5. Parte experimental

Reagentes químicos e solventes

As substâncias usadas e seus fornecedores estão listados na tabela Tabela 2 e foram usados sem purificação adicional.

Tabela 2: Reagentes e solventes utilizados nesta etapa do trabalho.

Reagente/Solvente	Fórmula/Abreviatura	Fornecedor	Obs.
Acetato de etila	AcOEt	Synth	99,5% v/v
Acetonitrila	MeCN	Tedia	grau HPLC
Ácido clorídrico	HCl	Synth	36,5-38%
Ácido trifluoroacético	TFA	Sigma	
Betanina comercial	—	ABCR GmbH	AB137484
D-(+)-glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	Wako	
Etanol	EtOH	Synth	99,5% v/v
Fosfato de sódio dibásico anidro	Na ₂ HPO ₄	Wako	
Fosfato de sódio monobásico dodecaidratado	NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	Wako	
Isopropanol	<i>i</i> -PrOH	Synth	99,5% v/v
Monolaureato de sorbitan etoxilado 20 EO	Tween [®] 20	Wako	
Óleo de soja refinado	-	Wako	
Éster ricinoléico de monolaurato de tetraglicerina	CR-310	Sakamoto	

Sigma: Sigma-Aldrich Inc; Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd; Sakamoto: Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd.

Soluções tampão

Todas as soluções aquosas usadas foram preparadas com água desmineralizada com condutividade a 25 °C de 18,2 MΩ·cm, purificada em equipamento Direct Q (milli-Q, Millipore). Tampão fosfato (TPi, 100 mmol L⁻¹, pH 6,2) foi preparado em um balão volumétrico solubilizando-se NaH₂PO₄ (21,9 mmol, 2,63 g) e Na₂HPO₄ (3,1 mmol, 0,437 g) com água até um volume final de 250 mL. O pH da solução foi aferido com um pHmetro (Metrohm, 827 pH lab) equipado com um eletrodo Primatode NTC (Metrohm).

Obtenção de betanina

Foram usadas três fontes de betanina: extrato de beterraba vermelha dissolvido em dextrina (betanina comercial, ABCR, amostra A), betanina bruta obtida de suco de beterraba (amostra B) e suco de beterraba seco por aspersão (amostra C).

Betanina bruta

Betanina foi obtida a partir do suco de beterrabas vermelhas. Beterrabas foram processadas em uma centrífuga de alimentos tipo *juicer*. O suco obtido foi centrifugado (10 min, 5 °C, 7.000 ×g) e o sobrenadante foi filtrado por uma camada de sílica gel de 2 cm em um funil de Buchner de 10 cm de diâmetro ligado a um kitassato conectado a uma trompa de vácuo. O pH do filtrado foi levado a 2 com a adição de HCl concentrado. A solução resultante foi transferida para um tubo falcon (5 mL) e adicionaram-se 10 mL de isopropanol (volume final 15 mL, proporção 2:1 v/v). A solução foi congelada a -72 °C em um banho de etanol e gelo seco e mantida por quatro dias a -20 °C na ausência de luz para garantir a ruptura de todas as células vegetais. Após esse período, os tubos foram descongelados e, quando atingiram 5 °C, as soluções

foram centrifugadas (15 min, 5 °C, 5.000 ×g). O precipitado foi ressuspenso em etanol (5 mL) e a suspensão foi submetida a centrifugação (10 min, 5 °C, 5.000 ×g). O precipitado magenta foi dissolvido em água (5 mL) e a solução foi centrifugada (5 min, 5 °C, 5.000 ×g). O sobrenadante foi separado e liofilizado, resultando em betanina bruta. Rendimento: 100 mg de betanina a cada 500 ml (aproximadamente 1,5 kg beterraba) de suco.

Suco de beterraba em pó

Suco de beterraba fresco (1 L) foi seco por aspersão em um equipamento Mini Spray Dryer B-290 (Buchi) operado com temperatura de entrada do ar: 140 °C, temperatura de saída do ar: 73 °C e velocidade de aspiração da amostra de 4,5 mL min⁻¹. O rendimento do processo é de 200 g de pó a cada litro de suco de beterraba.

Análise cromatográfica

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em condições de fase reversa em um equipamento Shimadzu 20A equipado com um detector PDA SPD20A e controlado pelo programa LCSolution. Condições experimentais: coluna C18 Ascentis[®] (250 × 4,6 mm, Supelco); gradiente de 5-95% de B em 20 min com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, detecção por absorção em 254 nm e 536 nm. Solvente A: solução de TFA em água (1% v/v), solvente B: solução de TFA em 60% v/v acetonitrila/água (1% v/v).¹¹⁹

Espectroscopia de absorção UV-vis

Os espectros de absorção de soluções contendo betalaínas foram adquiridos na faixa entre 300 e 800 nm em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio utilizando-se

cubetas de acrílico de 4,5 mL de volume total e caminho ótico de 10 mm.

Formulação de emulsões A/O, fase dispersa

Emulsões A/O com fração de volume da fase interna aquosa (ϕ_{Ai}) entre 10-30% foram preparadas a partir de 100 g de uma mistura bifásica formada por 70 a 90 g de uma solução de CR-310 (2-8% m/m) em óleo de soja e 10 a 30 g de uma solução de fonte de betanina (0,1-1,0% m/m) e D-glicose (1,0% m/m) em tampão fosfato com o auxílio de um homogeneizador rotor-estator (PolytronPT-3000, KinematicaAG, Littau, Suíça), operando a 10.000 rpm por 5 min. A mistura bifásica foi mantida em banho de gelo (0 °C) durante todo o processo.

Formulação de emulsões A/O/A através de emulsificação em microcanal

As emulsões A/O/A foram formuladas através de emulsificação em microcanal (microchannel, MC) utilizando-se uma grade de silício de 24 × 24 mm contendo 13.752 microcanais distribuídos em uma área ativa de 10 mm² (WMS11-1, EP Tech Co., Ltd., Hitachi, Japan). A placa tem 300 µm de espessura na região ao redor dos microcanais e 200 µm na área ativa. Cada microcanal tem uma configuração T, sendo constituída por um microfuro circular vertical com 10 µm de diâmetro e 160 µm de altura posicionado do centro de um microencaixe horizontal com dimensões 10 µm × 80 µm × 40 µm (profundidade/largura/altura) (Figura 4). A grade foi degaseificada por 20 min em um banho ultrassônico (100 kHz, VS-100III, As One Co., Osaka, Japan) preenchido com a fase contínua e foi posicionada em um suporte de aço de forma que os microencaixes sejam preenchidos com a fase contínua. A fase dispersa (emulsão A/O) foi inserida no sistema de microcanais empregando-se uma seringa *gas-tight* de 10 mL conectada a um injetor automático com controlador de fluxo (Model 11 Elite; Harvard Apparatus Inc., Holliston, USA) operando a 5,0 a 100 mL h⁻¹. A fase contínua é alimentada de forma a

fluir preenchendo o espaço entre a grade e uma lamínula. O sistema é acoplado a um microscópio ótico invertido (DM IRM, Leica Microsystems, Wetzler, Germany) para monitoramento da formação da emulsão A/O/A, que é armazenada em um recipiente acoplado ao módulo.

Determinação do diâmetro médio de Sauter ($d_{3,2}$) e da distribuição do tamanho das gotas das emulsões A/O/A

O diâmetro médio de Sauter das gotas ($d_{3,2}$) e a distribuição do tamanho das gotas das emulsões A/O/A foram determinados em uma faixa de 40 nm a 2 mm em um analisador de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz (LS13320, Beckman Coulter, USA).

A largura da distribuição de tamanho das gotas foi relatada como fator de distribuição relativo ("*Relative Span Factor*", RSF), definido como:

$$RSF = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad \text{Eq. 6}$$

onde, d_{90} , d_{10} e d_{50} = o diâmetro das gotas em função do volume percentual acumulado.

Acompanhamento da estabilidade física das emulsões A/O/A contendo betanina

As emulsões A/O/A contendo betanina e uma emulsão controle (*sem betanina*) foram mantidas a -4°C , 25°C e 60°C na ausência de luz durante 7 dias e monitoradas durante este período pela aquisição de imagens. No primeiro e no último dia, as emulsões foram também monitoradas pela aquisição de imagem em microscópio ótico e submetidas a análise de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz. A coloração das emulsões foi monitorada analisando as imagens obtidas considerando-se o espaço de cor CIELa*b*. Cada imagem das emulsões envasadas foi registrada com uma fonte de luz posicionada para criar uma área de

sombra no frasco. Um recorte de 40 pixels² foi feito na imagem de forma a incluir a região de sombra e a região iluminada e a cor média em uma área de 11×11 pixels foi determinada empregando-se o programa ColorGraber. Valores positivos de a^* indicam maior contribuição da cor vermelha enquanto valores positivos de b^* indicam deslocamento para o amarelo.

Análise de dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($N = 3$) e os resultados reportados como média $\pm$ desvio padrão. O gráfico de Bean foi gerado a partir dos dados brutos das três replicatas utilizando-se o programa BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/>). Análises de cor foram feitas empregando-se o programa ColorHexa (<http://www.colorhexa.com>) e medidas de cor média foram feitas em um espaço de 11 pixel² na interface luz/sombra de imagens adquiridas sob fundo preto. As análises (matemáticas e estatísticas) dos dados foram feitas com os programas Origin (OriginLab v.2016) e Prism7 (v.7.0c, GraphPad Software, Inc.).

Capítulo 2.

Interação de indicaxantina com sal de flavílio

Modelo para a mútua exclusividade de betalaínas e antocianinas na natureza

2-1. Introdução

Clorofila, carotenóides e antocianinas podem ser encontrados juntos em uma mesma planta. Entretanto, antocianinas e betalaínas são pigmentos mutuamente exclusivos.^{1, 16, 88, 120} Betalaínas e antocianinas possuem as mesmas funções *in vivo* e as razões evolutivas e ecológicas para a mútua exclusividade destes pigmentos em plantas ainda não foram esclarecidas.¹²¹ Os padrões de acumulação destes metabólitos secundários em relação ao crescimento, diferenciação, divisão celular e proliferação em plantas são diferentes. Antocianinas acumulam em células da epiderme de pétalas, frutos, pedúnculo e folhas, enquanto as betalaínas estão presentes em todos os tecidos da beterraba. Ainda, a divisão celular relaciona-se com o acúmulo de betalaínas e diminuição de antocianinas nos tecidos vegetais.^{13-14, 121} Desta forma, betalaínas e antocianinas são excelentes marcadores metabólicos para o estudo da evolução das Angiospermas e caracterização quimiotaxonomica.¹²¹⁻¹²²

A biossíntese de betalaínas depende da formação de ácido betalâmico a partir da oxidação de L-tirosina, enquanto antocianinas são obtidas a partir da L-fenilalanina. De forma simplificada, L-tirosina passa por duas etapas de oxidação enzimática que

resultam em 4,5-*seco*-DOPA que cicliza espontaneamente resultando em ácido betalâmico (Esquema 7). O acoplamento aldimínico não estereoespecífico envolvendo ácido betalâmico e aminas ou amino ácidos resulta em betacianinas e betaxantinas.

A superexpressão de DOPA-4,5-dioxigenase, enzima que cataliza a formação de 4,5-*seco*-DOPA a partir da clivagem oxidativa do anel aromático da L-DOPA, em culturas celulares de plantas produtoras de antocianinas, *i.e.*, batata (*Solanum tuberosum*) e boca-de-leão (*Antirrhinum majus*), induziu a produção de betalaínas após suplementação com L-DOPA.¹²³ Tal estudo não explica a mútua exclusividade existente na natureza, mas sugere que betalaínas e antocianinas podem, em princípio, coexistir em uma mesma espécie.

Esquema 7: Rota biossintética da formação de ácido betalâmico, precursor comum das betacianinas e betaxantinas. TOH: tirosina hidroxilase, DOD: DOPA dioxigenase. Esquema modificado da referência ¹²⁴.

Indicaxantina (BtP) é uma betaxantina amarela natural abundante em frutos do cactus *opuntia* que se origina do acoplamento entre o ácido betalâmico e a L-prolina (Esquema 8).¹²⁵ As altas atividades antioxidante e anti-inflamatória de indicaxantina em meio biológico tornaram esta betaxantina um importante micronutriente em alimentos.³⁵⁻³⁷ Três horas após a ingestão de alimentos ricos em indicaxantina, observou-se que lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDLs) se tornaram 45% mais resistentes a oxidação.³⁹ Ainda, a peroxidação lipídica, e subsequente hemólise, de eritrócitos induzida por hidroperóxido de cumeno foi reduzida na presença de BtP.¹²⁶

Sua propriedade anti-inflamatória foi observada em estudos realizados com ratos com inflamação das pleuras pulmonares (*pleurisia*) induzida por λ -carragenina, no qual BtP foi a responsável pela inibição da ativação de NF- κ B, um fator de transcrição chave na cascata de inflamação.¹²⁷ Comportamento similar foi observado em estudos realizados em cultura com células epiteliais humanas da linhagem Caco-2.¹²⁸

Esquema 8: Indicaxantina, betalaina natural resultante do acoplamento entre ácido betalâmico e L-prolina.

Antocianinas também apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória em meio biológico.¹²⁹⁻¹³³ A capacidade antioxidante de cianidina e cianidina 3-glicosídeo frente à peroxidação lipídica mostrou-se superior àquela da vitamina E, antioxidante de referência.¹³⁴ A formação de radicais livres através da metabolização de *tert*-butilidroperóxido em experimentos realizados em hematócitos primários e fígados de ratos foi inibida na presença de antocianinas provenientes do hibisco (*Hibiscus*).¹³⁵ Indivíduos que apresentam alto nível de colesterol no sangue estão propensos a desenvolver arteriosclerose, uma doença inflamatória crônica e uma das maiores causas de morte no mundo. Estudos realizados com tais indivíduos mostraram que a ingestão de antocianinas diminui os níveis de TNF- α e IL-1 β no soro humano, citocinas proinflamatórias associadas à progressão do processo de inflamação.¹³⁶

2-1.1. BtP e MMF: compostos-modelo

2-1.1.1. Efeitos do pH do meio

A purificação de antocianinas a partir de extratos vegetais é difícil e pouco eficiente, resultando em quantidades mínimas de material que são, muitas vezes, comercializados como padrões e têm alto valor agregado.²³ O estudo das antocianinas e antocianidinas se beneficiou da síntese de compostos contendo o núcleo flavílio através do acoplamento entre fenóis e β -dicetonas na presença de um fluxo de ácido clorídrico gasoso em uma reação de condensação.¹³⁷ Dependendo do seu padrão de substituição, sais de flavílio sintéticos são mais estáveis do que seus análogos naturais, em especial frente à hidrólise em meio levemente ácido ou neutro.¹³⁷ Um exemplo é o cloreto de 4-metil-7-metóxi-4-metilflavílio, MMF,¹³⁸ (Esquema 9), no qual o grupo doador metoxila na posição 7 estabiliza a carga positiva do cátion flavílio desfavorecendo a sua hidratação até, pelo menos, pH 5.⁶

Esquema 9: Estrutura química do 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF).

BtP é estável em meio aquoso neutro, sendo degradada rapidamente em meio muito ácido $\text{pH} < 2$ ou básico $\text{pH} > 11$. Os pK_a s dos grupos carboxila ligados ao anel 1,2,3,4-tetraidropiridínico da indicaxantina (*ou de nenhuma outra betalaína*) nunca foram determinados individualmente, mas foi encontrado através de titulação potenciométrica um valor de pK_a igual a 3,3.¹³⁹ Embora não se saiba exatamente o estado de protonação da indicaxantina em função do pH, pode-se inferir que em pH 5,

esta betaxantina encontra-se carregada negativamente, possivelmente na forma dianiônica, o que favoreceria a sua interação com MMF.

2-1.1.2. Propriedades fotofísicas e fotoquímicas

Em solução aquosa, BtP apresenta seu máximo de absorção e emissão em 485 nm e 510 nm, respectivamente. Esses valores sofrem pouca variação em meio alcoólico (metanol, etanol, TFE, 1-butanol e etilenoglicol) ($\lambda_{\text{abs}} = 482 - 486$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 511 - 518$ nm).¹⁴⁰ Cloreto de 4-metil-7-metóxi-flavílio apresenta seu máximo de absorção em 414 nm em solução aquosa (pH 2)¹⁴¹ e seu máximo de emissão em 480 nm (pH 1) se sobrepõe com a absorção de BtP.¹⁴² Contudo, MMF é dez vezes mais fluorescente em meio aquoso do que a indicaxantina, *i.e.*, rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}) do MMF é $4,9 \times 10^{-2}$ em pH 5 e da BtP é igual a $5,3 \times 10^{-3}$.¹⁴⁰

Estudos de absorção de espécies transientes e o aumento do valor de Φ_{FL} e do tempo de vida do estado excitado (τ) da BtP em solventes viscosos sugerem que a desativação do seu estado S_1 ocorre, principalmente, *via* processos não radiativos.¹⁴⁰ MMF apresenta um tempo de vida do estado singlete excitado em água pH 5 relativamente longo ($\tau_{\text{água, pH 5}} = 4,7$ ns).⁶ Indicaxantina apresenta dois tempos de vida de fluorescência atribuídos aos dois isômeros presentes na solução, sendo eles $\tau_{\text{fl}} = 4,8$ e 27 ps em água ($\eta = 0,89$ cP) e $\tau_{\text{fl}} = 14,1$ e 161 ps em etilenoglicol ($\eta = 16,1$ cP). Essa dependência com a variação da viscosidade indica que o processo de desativação do estado excitado S_1 ocorre com mudança na geometria da molécula. Provavelmente, o aumento da viscosidade dificulta a rotação molecular, desacelerando os decaimentos não radiativos. Estudos de absorção transiente mostraram recuperação total de indicaxantina para o estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), indicando que fotoprodutos e o estado excitado tripleto não são formados com rendimento quântico significativo. Esses

fatos corroboram com a hipótese de betaxantinas serem moléculas fotoprotetoras *in vivo*.¹⁴⁰

Por apresentar altos valores de rendimento quântico de fluorescência e tempo de vida de fluorescência, MMF vem sendo bastante utilizado em estudos de efeito da copigmentação na fotofísica de antocianinas.⁶ Em meio aquoso, a fluorescência de MMF é suprimida por copigmentos convencionais, *e.g.*, ácido ferúlico, quercetina e ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzóico, PCA). Esta supressão é predominantemente *estática*, pois ocorre a formação de um complexo entre o MMF e o copigmento no estado fundamental. Entretanto, observa-se também supressão dinâmica (controlada pela difusão) da fluorescência do MMF não complexado.⁶ A constante de formação do complexo MMF-copigmento e, portanto, a energia de Gibbs de complexação se correlacionam linearmente com o potencial de ionização do copigmento, sugerindo a formação de complexos de transferência de carga no qual MMF atua como acceptor de elétrons e os copigmentos como doadores de elétrons. A alta constante cinética de supressão estática ($k_s \geq 10^{11} \text{ s}^{-1}$) nos experimentos realizados com PCA sugere que a excitação do complexo de transferência de carga MMF-PCA resulta no processo de transferência de elétrons do copigmento para o MMF.¹³⁸ No estado S_1 , MMF é um ótimo acceptor de elétrons, apresentando potencial de redução em água igual a -49 mV vs. NHE ,¹⁴³ sendo capaz de oxidar a maioria dos polifénóis que atuam como copigmento.^{32, 138}

2-2. Objetivos

Determinar se existe interação química entre BtP e MMF como forma de inferir um fenômeno similar à *copigmentação* entre antocianinas e betalaínas.

2-2.1 Objetivos específicos

- i. Sintetizar, purificar e caracterizar indicaxantina (BtP) e cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF);
- ii. Determinar as propriedades fotofísicas de BtP e MMF em água (pH 5), solução de HCl em água pH 5/etanol 1:1 v/v e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água);
- iii. Investigar a possível interação entre BtP e MMF por espectrofotometria de absorção, supressão de fluorescência e espectrometria de ressonância nuclear magnética de hidrogênio.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

2-3. Resultados

Indicaxantina (BtP) e cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF) foram os compostos-modelo escolhidos para o estudo visto que contém as porções características de betaláinas e antocianinas e podem ser preparados convenientemente.

2-3.1. Preparações

2-3.1.1. Indicaxantina

Frutos da opuntia contém cerca de 8 mg de BtP a cada 100 g da polpa.⁸⁴ A baixa concentração desta betaláina no fruto e a oferta escassa dessa espécie de cactus no Brasil tornam pouco viável a extração deste produto natural. Assim, para esse trabalho, BtP foi semissintetizada através do acoplamento aldimínico entre ácido betalâmico (HBt) e L-prolina em meio aquoso (Esquema 10).

Esquema 10: Acoplamento aldimínico entre ácido betalâmico em meio aquoso e L-prolina.

O ácido betalâmico é o produto da hidrólise alcalina das betalaínas presentes no suco de beterraba. O suco hidrolisado é acidulado lentamente até pH 2 com ácido clorídrico concentrado, mantendo-se a temperatura inferior a 5 °C, e o HBt em sua forma protonada (neutra) é extraído com acetato de etila. Em seguida, HBt é transferido para água, o pH é levado a 11 e L-prolina é adicionada em excesso. Rapidamente a cor da solução muda de amarelo brilhante para um tom alaranjado, característico da indicaxantina. O pH do meio é levado a 5 e a BtP é submetida a pré-purificação por HPLC em escala semi-preparativa em condições de fase reversa. As frações contendo BtP são reunidas e submetidas a purificação por cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel) com Sephadex LH-20 como fase estacionária e água como eluente. O produto foi caracterizado por espectrofotometria UV-vis, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massas por injeção direta e espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H .

O cromatograma de BtP apresenta apenas um pico cromatográfico (Anexo 9), sugerindo a presença de apenas uma espécie na amostra, fato confirmado pelos experimentos de espectrometria de massas e de RMN. Na caracterização por espectrometria de massas por injeção direta com ionização por eletrospray em modo positivo (MS(ESI+)), o íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ encontrado apresenta a relação massa carga (m/z) esperada de 309,16 (Anexo 10). O espectro de RMN de ^1H de BtP em D_2O é apresentado no Anexo 11. Nas ampliações das regiões de deslocamento químico entre 8,6 e 8,0 ppm e entre 6,5 e 5,2 ppm (Figura 14), pode-se observar os sinais correspondentes a quatro isômeros, sendo dois deles majoritários (identificados em rosa e verde). De acordo com estudos de espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , os estereoisômeros *E,E*, *Z,E*, *Z,Z* e *E,E* da BtP coexistem em solução aquosa, sendo *E,E* e

Z,E os isômeros majoritários (Esquema 11).¹⁴⁴ Os sinais mais importantes para a caracterização da BtP (Esquema 11) são os átomos de hidrogênio 2 (quiral, porção iminoprolina), 7 ($^+N=CH$), 8 ($^+N=CH-CH$), 10 (*a* e *b*, diastereotópicos), 11 (quiral, porção 1,2,3,4-tetraidropiridínica) e 14 (C_{sp2} , porção 1,2,3,4-tetraidropiridínica).

Esquema 11: Quatro isômeros geométricos da BtP considerando a configuração *S* do carbono assimétrico do anel 1,2,3,4-tetraidropiridínico.

Na ampliação da região do espectro de deslocamento químico entre 4,7 e 3,5 ppm, o hidrogênio H-2 da porção da molécula correspondente a L-prolina aparece como um duplo dubleto. É possível observar os sinais correspondentes aos dois isômeros majoritários (identificados em rosa e verde) e um sinal de menor intensidade referente, provavelmente, aos isômeros minoritários. Experimentos de espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) mostram seu acoplamento vicinal com os hidrogênios H-3 a/b (Figura 15). Os deslocamentos químicos e o valor das constantes de acoplamento do sistema H-2/H-3 (4,52 ppm, $^3J_{2,3} = 3,9; 8,3$ Hz para o isômero A e 4,37 ppm, $^3J_{2,3} = 4,8; 8,7$ Hz para o isômero B) são similares aos relatados na literatura (4,63 ppm, $^3J_{2,3} = 3,5; 8,4$ Hz para o isômero A e 4,53 ppm, $^3J_{2,3} = 4,3; 8,6$ Hz para o isômero B)¹⁴⁴

Os hidrogênios do sistema 1,7-diazaheptametínico, H-7 e H-8, aparecem como dubletos. Neste caso, é possível observar os sinais correspondentes aos dois isômeros majoritários (identificados em rosa e verde) e aos dois isômeros minoritários

(identificados em azul e laranja). Seu acoplamento vicinal pode ser observado no espectro de ^1H - ^1H COSY (

Figura 16) e apresenta valores de constante de acoplamento ($^3J_{7,8} = 12,3$ Hz (isômero A), $^3J_{7,8} = 12,4$ Hz (isômero B), $^3J_{7,8} = 12,1$ Hz (isômero C) e $^3J_{7,8} = 12,0$ Hz (isômero D)) similares aos relatados na literatura ($^3J_{7,8} = 12,2$ Hz (isômero A) e $^3J_{7,8} = 12,3$ H (isômero B), $^3J_{7,8} = 12,0$ Hz (isômero C) e $^3J_{7,8} = 12,4$ Hz (isômero D)).

Na ampliação da região do espectro de deslocamento químico entre 6,5 e 5,2 ppm, o H-14 aparece como um singlete e é possível observar os sinais correspondentes aos 4 isômeros presentes na amostra. Os sinais correspondentes aos hidrogênios H-10 a/b e H-11 são observados no espectro, porém apresentam sobreposição dos sinais dos isômeros. Experimentos de espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) mostram o acoplamento entre seus spins, mas a falta de resolução do sinal no espectro de ^1H impossibilita a determinação das constantes de acoplamento. Através dos experimentos de espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) ainda é possível observar o acoplamento entre os hidrogênios H-5 a/b e H-4 a/b da porção da molécula correspondente a L-prolina (Figura 15).

Figura 14: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de BtP em D_2O , 500 MHz. (A) Região do espectro de deslocamento químico entre 8,6 e 8,0 ppm. (B) Região do espectro de deslocamento químico entre 6,5 e 5,2 ppm. (C) Região do espectro de deslocamento químico entre 4,7 e 3,5 ppm. (D) Região do espectro de deslocamento químico entre 3,3 e 2,0 ppm. Os hidrogênios apresentados em verde e rosa representam os isômeros majoritários A e B, respectivamente. Os hidrogênios apresentados em azul e laranja representam os isômeros minoritários C e D, respectivamente. Os hidrogênios indicados em preto apresentam sobreposição dos sinais dos isômeros.

Figura 15: Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY de BtP na região de 4,55 – 1,85 ppm, mostrando o acoplamento entre os hidrogênios H-2 e H-3 a/b, H-10 a/b e H-11 e H-4 a/b e H-5 a/b da indicaxantina.

Figura 16: Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY de BtP na região de 8,55 – 5,15 ppm, mostrando o acoplamento entre os hidrogênios H-7 e H-8 da indicaxantina.

2-3.1.2. Cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio

Cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF) foi obtido com rendimento de 53% através da reação de condensação entre 3-metóxfenol e benzoilacetona em ácido acético glacial saturado com HCl gasoso (Esquema 12). O HCl gasoso foi gerado pela reação entre cloreto de cálcio e ácido sulfúrico e foi borbulhado durante 4 horas.

Esquema 12: Síntese do cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF).

O sal de flavílio foi precipitado com a adição de éter etílico gelado à mistura de reação. O precipitado foi filtrado a vácuo, lavado com éter etílico gelado, colocado em um dessecador aonde o resíduo de éter foi evaporado e o sólido restante foi mantido em sob vácuo durante 24 h na presença de um agente secante para retirar traços de água. A amostra obtida foi caracterizada por espectrometria de massas por injeção direta e espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H . Na caracterização por espectrometria de massas por injeção direta com ionização por eletrospray em modo positivo (MS(ESI+)), o íon quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ encontrado apresenta relação massa carga (m/z) esperada de 251 (Anexo 13).

Os espectros de RMN de ^1H de MMF em $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$ (A), CD_3OD (B) e D_2O (C) são apresentados nos Anexos 14, 15 e 16. Os sinais da molécula estão concentrados na região de campo baixo devido sua aromaticidade. Na ampliação da região do espectro de deslocamento químico entre 8,8 e 8,3 ppm (Figura 17) encontram-se os sinais correspondentes aos hidrogênios H-3 (singleto), H-5 (dubleto), H-2' e H-6' (dubleto).

Em A e B os sinais apresentam-se bem definidos, mas em C o singlete correspondente ao H-3 aparece sobreposto ao dubleto dos hidrogênios H-2' e H-6'. Nota-se que o aumento da polaridade do solvente deuterado aumenta a blindagem dos átomos de H, *i.e.*, desloca os sinais dos ^1H na direção da região de campo alto do espectro, provavelmente devido à estabilização da carga positiva do oxigênio *via* ligação de hidrogênio. O H-3 apresenta o maior deslocamento, 0,3 ppm de A para C.

Na ampliação da região do espectro de deslocamento químico entre 8,0 e 7,55 ppm (Figura 18) encontram-se os sinais correspondentes aos hidrogênios H-8 (dubleto), H-4' (triplete), H-3' e H-5' (triplete) e H-6 (duplo dubleto). Nessa região, os sinais não apresentam uma grande mudança nos valores de deslocamento químico com a variação do solvente, com exceção do hidrogênio H-8 que apresenta um deslocamento de 0,23 ppm na direção da região de campo alto do espectro com o aumento da polaridade.

Os valores das constantes de acoplamento entre os hidrogênios das moléculas também foram determinados. O hidrogênio H-6 ($^3J_{5,6} = 9,3$ Hz (A, B, C) e $^4J_{6,8} = 2,5$ Hz (A e C) e 2,2 Hz (B)) apresenta uma forte interação com H-5 ($^3J_{5,6} = 9,3$ Hz (A, B, C)) e uma pequena interação com o hidrogênio H-8 ($^4J_{6,8} = 2,4$ Hz (A) e 1,9 Hz (B)). O hidrogênio H-4' ($^3J_{4',3'} = ^3J_{4',5'} = 7,5$ Hz (A, B, C)) apresenta um acoplamento vicinal com os hidrogênios H-3' e H-5' ($^3J_{4',3'} = ^3J_{4',5'} = 7,9$ Hz (A) e 7,8 Hz (B)). H-3' e H-5' também apresentam acoplamento vicinal com os hidrogênios H-2' e H-5' ($^3J_{2',3'} = ^3J_{5',6'} = 7,4$ Hz (A) e 7,8 Hz (B)).

Na região blindada do espectro é possível observar um singlete (4,19 ppm (A e B) e 4,15 ppm (C)) correspondente aos hidrogênios do grupo metóxi ligado ao anel A do flavílio (Anexos 14, 15 e 16). O sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metila ligado ao anel C da molécula não são observados. Provavelmente, devido à

acidez desses prótons, ocorre a troca dos átomos de H por átomos de D e não há geração de sinal.

Figura 17: Ampliação do espectro de RMN de ¹H de cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF) em C₂D₅OD, CD₃OD e D₂O, 500 MHz. Região do espectro de deslocamento químico entre 8,8 e 8,3 ppm.

Figura 18: Ampliação do espectro de RMN de ¹H de cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF) em C₂D₅OD, CD₃OD e D₂O, 500 MHz. Região do espectro de deslocamento químico entre 8,0 e 7,55 ppm.

2-3.2. Caracterização fotofísica de BtP e MMF

Espectros de absorção, excitação e emissão de BtP e MMF foram adquiridos em água (pH 5). O ajuste do pH foi realizado com solução de HCl 1,0 mol L⁻¹. Indicaxantina apresenta seu máximo de absorção em 485 nm com coeficiente de absorção molar de 48.000 L mol⁻¹ cm⁻¹.¹⁴⁵ Sua excitação entre 400 e 500 nm resulta em emissão de fluorescência verde com máximo em 517 nm, como se pode observar pelos espectros de excitação e emissão na Figura 19. MMF apresenta seu máximo de absorção e emissão em 415 e 474 nm, respectivamente. O rendimento quântico de BtP e MMF também foi determinado em meio aquoso (pH 5), sendo eles $3,8 \times 10^{-3}$ e $4,9 \times 10^{-2}$, respectivamente.

Figura 19: Espectro de absorção (linha preta), emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm) (linha vermelha) e excitação (linha azul tracejada) de indicaxantina (BtP) e cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF) em água (pH 5).

2-3.3. Estudo da interação de betalaínas com sais de flavílio

A interação entre betalaínas e sais de flavílio foi investigada através de ensaios de espectrofotometria de absorção e de supressão de fluorescência (método de Stern-Volmer) entre BtP e MMF em solução aquosa (pH 5). Supressão de fluorescência se refere a qualquer processo que diminua a fluorescência de uma determinada molécula. Através da análise dos espectros de absorção e emissão de MMF na ausência e na

presença de BtP e da construção de um gráfico contendo a relação da intensidade de fluorescência de MMF na ausência (F_0) e na presença (F) de BtP (F_0/F) no eixo y e a concentração de BtP no eixo x, é possível determinar se BtP está suprimindo a fluorescência de MMF. Foram preparadas soluções aquosas de MMF e BtP em pH 5 nas concentrações 10^{-5} mol L⁻¹ e 10^{-6} mol L⁻¹, que serão chamadas de *concentrada* e *diluída*, respectivamente. O ajuste do pH foi realizado com solução de HCl 1,0 mol L⁻¹. Os experimentos foram realizados nessas duas concentrações para observar o efeito da concentração de BtP e MMF no meio sob a interação. O pH 5 foi escolhido pois tanto a BtP quanto MMF encontram-se estáveis neste valor de pH e também porque em pH 5, a espécie de betalaína predominante no meio possui as 3 porções carboxílicas desprotonadas, possuindo assim cargas negativas. A presença de grupos aniônicos favorece a interação entre BtP e MMF, uma vez que MMF é um cátion. Neste experimento, a concentração de MMF ($3,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ou $3,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foi mantida fixa e a concentração de BtP foi variada entre 0,1 e 1,0 equiv., sendo então o MMF o fluoróforo e BtP a molécula supressora de fluorescência. Nos ensaios de fluorescência acompanhou-se a emissão de MMF em 474 nm e utilizou-se um $\lambda_{exc} = 370$ nm.

Na Figura 20A é possível observar um pequeno deslocamento batocrômico da banda de absorção do MMF com o aumento da concentração de indicaxantina no meio. Através da análise da segunda derivada dos espectros de absorção (Anexo 17) pode-se inferir que esse deslocamento é apenas um efeito aditivo dos espectros de BtP e MMF. Nos experimentos realizados com MMF concentrado (10^{-5} mol L⁻¹), a intensidade de fluorescência do MMF diminui (56%) com o aumento da concentração de BtP e a absorção da BtP provoca a supressão de parte da banda de emissão de BtP resultando

em uma *aparente* nova banda de emissão é observada em aproximadamente 510 nm. Quando a concentração da solução é 10^{-6} mol L⁻¹, a diminuição da intensidade de fluorescência do MMF com o aumento da concentração de BtP passa a ser 10% e não é observada supressão (Figura 20B).

No gráfico de Stern Volmer para as duas concentrações de MMF e BtP podemos observar comportamentos diferentes. Para o sistema *concentrado*, observa-se uma dependência linear entre F_0/F e a concentração do supressor com coeficiente linear próximo a 1, como esperado considerando-se a equação de Stern-Volmer, $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$, e K_{SV} igual a $(0,40 \pm 0,03) \times 10^5$ mol⁻¹ L (Figura 20C). Para a solução diluída, não se observa o comportamento esperado e o efeito do sequestrador, se existe, é sutil e complexo.

Figura 20: Espectros de absorção (A) e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$) (B) de solução aquosa de MMF em pH 5 na ausência e na presença de diferentes concentrações de BtP variando entre 0,1 e 1 equiv. Excitação em 370 nm. Os gráficos a esquerda são referentes aos experimentos realizados com as soluções a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e os gráficos a direita são referentes aos experimentos realizados com as soluções a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (C) Gráficos de Stern-Volmer construídos a partir dos dados da segunda derivada do espectro de emissão (Anexo 17). As linhas verdes representam as bandas de confiança com 95% de nível de confiança.

2-3.4. Efeito do solvente na interação entre BtP e MMF

Com o objetivo de verificar a influência da polaridade do meio sobre a interação entre MMF e BtP, decidiu-se prosseguir com os estudos em outros meios: solução de HCl em água pH 5/etanol 1:1 v/v e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água). Antes de

prossequirmos com os experimentos de supressão foi realizada a caracterização fotofísica de BtP e MMF nesses meios.

2-3.4.1. Caracterização fotofísica de BtP e MMF

Em solução de HCl em água pH 5/etanol 1:1 v/v e em etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água), BtP apresenta uma mudança no perfil de seu espectro de absorção em relação a solução aquosa (pH 5). Sua banda de absorção passa a ser mais estreita e a intensidade do ombro em comprimentos de onda menores diminui. O perfil de emissão de BtP é semelhante nos dois meios, apresentando um deslocamento hipsocrômico da banda de emissão partindo da solução aquosa (pH 5) em direção ao etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) (Figura 21).

MMF apresenta um sutil deslocamento batocrômico de sua banda de absorção em solução de HCl em água pH 5/etanol 1:1 v/v e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) em relação ao meio aquoso (pH 5) e seu máximo de absorção é deslocado para 420 nm e 422 nm, respectivamente. Além disso, em ambos os casos, podemos observar o aparecimento de uma banda em torno de 340 nm, a qual se apresenta mais definida em etanol absoluto (Figura 21). O surgimento dessa banda sugere que a fração molar de água presente no meio causa alguma mudança na molécula de MMF. Para constatar essa hipótese, foram realizados estudos com etanol anidro contendo diferentes frações molares de água e em diferentes valores de pH.

Em etanol anidro, MMF apresenta um perfil de absorção semelhante à solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5) e seu máximo de absorção encontra-se em 421 nm (Figura 22A). O efeito da fração molar de água (χ^w) na mistura hidroalcoólica sobre os perfis de absorção e fluorescência de MMF foi estudado adicionando-se água ao etanol anidro até que o valor de χ^w atingisse 0,4. Conforme

água é adicionada ao meio, a intensidade da banda de absorção de MMF em 421 nm diminui e a banda em 340 nm aparece. Ao atingir uma determinada fração molar de água no meio ($\chi^{\text{H}_2\text{O}} = 0,25$), a adição de água não causa mais alterações no espectro de absorção. Quando o valor do pH do meio é ajustado para 5, há um pequeno aumento na intensidade da banda de absorção. Finalmente, em pH 2, a banda de absorção característica do MMF volta a apresentar uma alta intensidade, maior do que a observada no início do experimento (Figura 22A). MMF apresenta seu máximo de emissão em 477 nm e o aumento da $\chi^{\text{H}_2\text{O}}$ causa uma diminuição na intensidade em sua banda de emissão, o que corrobora com a diminuição da intensidade da banda de absorção. Ao ajustarmos o pH do meio para 5, observa-se um aumento da intensidade de emissão e um deslocamento hipsocrômico da banda de emissão. Em pH 2, o valor da intensidade de emissão dobra e passa a ser 200 unidades maior que a intensidade de emissão em etanol anidro (Figura 22B).

Figura 21: Espectro de absorção (linha preta), emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm) (linha vermelha) e excitação (linha azul tracejada) de indicaxantina (BtP) e cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF) em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5) (superiores) e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) (inferiores).

Figura 22: Espectros de absorção (A) e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm) (B) de MMF em etanol anidro com diferentes frações molares de água ($\chi_{\text{H}_2\text{O}}$) e diferentes valores de pH.

Nos experimentos realizados em etanol anidro, as cubetas utilizadas foram tampadas com septo de borracha para evitar a entrada de água na solução. As bandas de absorção presentes nos espectros de MMF na região do UV próximo a 300 nm correspondem a substâncias do septo solúveis em etanol. O aumento do número de inversões da cubeta para incorporar água ou ácido na solução resulta em um aumento na intensidade destas bandas, demonstrando que quanto maior o contato do septo com etanol, maior a quantidade de substâncias do septo presentes em solução (Anexo 18).

2-3.4.2. Supressão de fluorescência de MMF por BtP

Como foi observado um maior efeito de supressão utilizando-se concentrações de BtP e MMF na ordem de 10^{-5} mol L⁻¹, esta foi a concentração escolhida para a realização dos experimentos. Em relação à variação da concentração de BtP, optou-se por aumentar o intervalo estudado (0,1-2 equivalentes de BtP – *vide* Parte Experimental). Os meios escolhidos para o estudo foram água (pH 5), solução de HCl em água pH 5/etanol 1:1 v/v e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água).

Nesta parte do trabalho, além dos estudos de espectrofotometria de absorção e de supressão de fluorescência, também foram registrados os tempos de vida de fluorescência de MMF para os experimentos realizados em água (pH 5) e em solução de HCl em água pH 5/etanol 1:1 v/v. Não foi possível obter resultados reprodutíveis com etanol. Os decaimentos do tempo de vida de emissão de MMF na ausência e na presença de BtP e os parâmetros dos ajustes monoexponenciais obtidos encontram-se nos Anexos 21, 22 e 23. Nos ensaios de fluorescência foi acompanhada a emissão de MMF em 474 nm e foi utilizado um $\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm.

Na caracterização fotofísica de MMF observa-se que a fração molar de água presente no etanol interfere em seus espectros de absorção e emissão. Então, antes de

iniciarmos os experimentos etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água), uma condição do experimento de supressão de fluorescência de MMF por BtP (0,5 equivalente de BtP em relação ao MMF) também foi estudada em etanol anidro. Esse experimento foi realizado para verificar se os resultados obtidos com etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) seriam os mesmos obtidos com etanol anidro. Nestas condições concentradas (10^{-5} mol L^{-1}) a adição de 0,5 equiv de BtP resulta em supressão e a quantidade de betalaína é a menor possível.

Na Figura 23 podemos observar o desaparecimento da banda de absorção de MMF quando 0,5 equivalente de indicaxantina é adicionado ao meio. Isto ocorre tanto em etanol absoluto quanto em etanol anidro. A emissão de MMF segue o mesmo comportamento, apresentando uma diminuição brusca em sua emissão na presença de BtP. Como os resultados obtidos em etanol anidro apresentam-se semelhantes aos obtidos em etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água), prosseguiu-se com os experimentos utilizando-se etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água).

Figura 23: Espectros de absorção e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$) de MMF na ausência e na presença de 0,5 equivalente de BtP em etanol anidro e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água).

Na Figura 24A é possível observar um pequeno deslocamento batocrômico da banda de absorção do MMF com o aumento da concentração de indicaxantina no meio nos experimentos realizados em água (pH 5) e em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5). Através da análise da segunda derivada dos espectros de absorção pode-se inferir que esse deslocamento é apenas um efeito aditivo dos espectros de BtP e MMF. Os gráficos da segunda derivada encontram-se no Anexo 20. Em etanol esse comportamento sofre uma mudança e podemos observar o desaparecimento da banda de absorção correspondente ao MMF a partir de 0,5 equivalentes de BtP no meio.

Nos espectros de emissão de MMF em água (pH 5) e em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH5) observa-se a diminuição da intensidade de fluorescência

de MMF conforme aumentamos a concentração de BtP no meio. Além disso, uma nova banda passa a aparecer em aproximadamente 510 nm (Figura 24B). Experimentos controle realizados apenas com BtP nas mesmas concentrações desse estudo mostram que BtP apresenta uma banda de emissão nessa mesma região, porém com intensidade de fluorescência de cem a trezentas vezes menor (Anexo 19). Nota-se ainda que a diminuição da intensidade de emissão é maior em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH5). Assim como na absorção, em etanol é possível observar a ausência de emissão a partir de 0,5 equivalentes de BtP no meio. A banda de emissão em aproximadamente 510 nm ainda aparece, mas com intensidades de fluorescência bastante baixas (Figura 24B). Experimentos controle realizados apenas com BtP nas mesmas concentrações desse estudo mostram que BtP apresenta uma banda de emissão nessa mesma região com valores de intensidade de fluorescência bastante similares (Anexo 19).

Foi observada a supressão de fluorescência de MMF por BtP em todos os meios, mas o mecanismo pelo qual ela ocorre parece ser dependente do meio em que as espécies se encontram. Nos experimentos realizados em água (pH 5) é possível observar duas regiões com comportamento distinto no gráfico de Stern-Volmer. Esta mudança ocorre a partir do ponto em que a concentração de BtP no meio é igual a de MMF. A relação entre o tempo de vida de fluorescência do MMF na ausência (τ_0) e na presença (τ) de BtP apresenta-se independente da concentração de BtP, mantendo-se constante em todas as concentrações de BtP (Figura 24C). Em solução de solução de HCl aquoso pH 5/etanol 1:1 v/v e em etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) o sistema apresenta um comportamento diferente. O gráfico de Stern-Volmer apresenta uma curva com a concavidade voltada para cima, indicando a ocorrência de supressão da fluorescência de

MMF por dois mecanismos, estático e dinâmico. Assim como nos experimentos realizados em água, o tempo de vida de fluorescência de MMF mostra-se independente da concentração de BtP no meio (Figura 24C) em solução de HCl aquoso pH 5/etanol 1:1 v/v. 1:1 v/v.

Figura 24: Espectros de absorção (A) e emissão (B) ($\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$) de MMF ($3,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em água (pH 5), solução de HCl aquoso pH 5/etanol 1:1 v/v e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) em dependência da concentração de BtP no meio. (C) Gráficos de Stern Volmer (F_0/F , quadrado preto) e tempo de vida de fluorescência (τ_0/τ , círculo vermelho) para a supressão de MMF em água (pH 5), solução de HCl aquoso pH 5/etanol 1:1 v/v e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) em dependência da concentração de BtP no meio. As intensidades de fluorescência (F e F_0) utilizadas para a construção do gráfico de Stern Volmer foram obtidas através da segunda derivada dos gráficos de emissão para os experimentos realizados em água (pH 5) e em solução de HCl aquoso pH 5/etanol 1:1 v/v. Os gráficos da segunda derivada são apresentados no Anexo 20. Esses experimentos foram feitos em quintuplicata ($N = 5$).

2-3.4.3. Tentativa de caracterização do complexo BtP-MMF por espectroscopia de RMN

Estudos de RMN de ^1H e NOESY 2D foram realizados para verificar a possível interação entre indicaxantina e MMF em meio aquoso (pH 5). Primeiramente, 0,5 mg de MMF ($1,45 \times 10^{-7}$ mol) foi solubilizado em 600 μL de D_2O (pD 5) e um espectro de ^1H foi registrado em um equipamento 500 MHz. O pD foi ajustado para 5 com a adição de DCl. Solução concentrada de BtP ($2,87 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) em D_2O (pD 5) foi adicionada ao tubo em diferentes proporções até atingir 1 equivalente em mol em relação ao MMF (Tabela 10). Para cada concentração de BtP foi registrado um espectro de ^1H . Ao atingir 1 equivalente de BtP em relação ao MMF também foi registrado um espectro bidimensional NOESY.

Comparando-se os espectros de MMF na ausência e na presença de BtP (0,1; 0,5 e 1 equivalente) é possível observar o deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênios H-7 e H-8 da indicaxantina e hidrogênio H-5 do MMF, ambos para região de campo alto. Nos experimentos de NOESY 2D é possível observar uma pequena correlação entre H-8 da BtP e H-3, H-2', H6' do MMF, assim como entre H-11 da BtP e o sinal correspondente a metoxila do MMF. O espectro de NOESY 2D completo encontra-se no Anexo 24.

Figura 25: Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de ^1H de MMF em D_2O (pD 5) na ausência de BtP e na presença de 0,1, 0,15 e 1 equivalente de BtP na região do espectro de deslocamento químico entre 8,36 e 8,26 ppm.

Figura 26: Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de ^1H de BtP em D_2O (pD 5) na presença de MMF na região do espectro de deslocamento químico entre 6,1 e 5,5 ppm. Destaque para o deslocamento do H-8 da BtP.

Figura 27: Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de ^1H de BtP em D_2O (pD 5) na presença de MMF na região do espectro de deslocamento químico entre 8,2 e 8,0 ppm. Destaque para o deslocamento do H-7 da BtP.

Figura 28: Ampliação do espectro de NOESY 2D de MMF na presença de 1 equivalente de BtP em D_2O (pD = 5), 500 MHz. Acoplamento dos hidrogênios H-3, H-2' e H-6' do MMF ($\delta = 8,33$ ppm) com o H-7 da BtP ($\delta = 8,15$ ppm).

Figura 29: Ampliação do espectro de NOESY 2D de MMF na presença de 1 equivalente de BtP em D₂O (pD = 5), 500 MHz. Acoplamento do grupo metoxila do MMF (δ = 4,07 ppm) com o H-11 da BtP (δ = 4,20 ppm).

2-4. Discussão

2-4.1. Caracterização estrutural de indicaxantina

Através da interpretação dos espectros de RMN de ^1H e ^1H - ^1H COSY e da comparação dos dados experimentais com dados da literatura, foi possível realizar a caracterização dos 2 isômeros majoritários (A = isômero 1*E*, 8*E* e B = isômero 1*Z*, 8*E*) e a caracterização parcial dos 2 isômeros minoritários (C = isômero 1*E*, 8*Z* e D = isômero 1*Z*, 8*Z*) presentes na solução aquosa de indicaxantina (Tabela 3). Através dos valores das integrais dos sinais do espectro foi possível determinar a proporção entre os isômeros presentes na amostra, sendo ela 46 % de A, 40% de B, 5% de C e 9% de D.

Tabela 3: Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos de RMN de ^1H de BtP em D_2O , 500 MHz. (s: singlete, d: dublete, dd: duplo duplete, m: multiplete, *: sobreposição de sinais).

Indicaxantina	Posição do ^1H	δ_{H} (ppm)
<p>Isômero A</p> <p>Isômero B</p>	7 A	8,10 (d, $^3J_{7,8} = 12,3$ Hz, 1H)
	7 B	8,21 (d, $^3J_{7,8} = 12,4$ Hz, 1H)
	8 A	5,98 (d, $^3J_{7,8} = 12,3$ Hz, 1H)
	8 B	5,68 (d, $^3J_{7,8} = 12,4$ Hz, 1H)
	2 A	4,52 (dd, $^3J_{2,3} = 3,9; 8,3$ Hz, 1H)
	2 B	4,37 (dd, $^3J_{2,3} = 4,8; 8,7$ Hz, 1H)
	14A	6,13 (s, 1H)
	14 B	6,08 (s, 1H)
	5 a/b A	3,77 – 3,59 (m)*
	5 a/b B	4,00 – 3,08 (m)*
	10 a/b A e B	3,13*
	3 a/b A e B	2,21 – 2,07 (m)*
	4 a/b A e B	2,06 – 1,96*
	11	4,21 (m)*

H7 C e D: 8,55 (d, $^3J_{7,8} = 12,0$ Hz, 1H) e 8,43 (d, $^3J_{7,8} = 12,0$ Hz, 1H), respectivamente. H8 C e D: 5,30 (d, $^3J_{7,8} = 12,1$ Hz, 1H) e 5,58 (d, $^3J_{7,8} = 12,0$ Hz, 1H), respectivamente. H14 C e D: 6,40 (s, 1H) e 6,41 (d, 1H), respectivamente. A, B, C e D referem-se aos 4 isômeros geométricos presentes na amostra, sendo A = isômero *E,E*, B = isômero *Z,E*, C = isômero *E,Z* e D = isômero *Z,Z*.

O nitrogênio carregado positivamente na posição 1 da molécula de BtP causa um efeito de desblindagem no hidrogênio H-7 devido ao efeito retirador de elétrons por conjugação, fazendo com que seu sinal esteja presente na região de campo baixo do espectro. Os hidrogênios H-8 e H-14 apresentam deslocamento químico próximo, pois

apresentam a mesma distância em relação aos átomos de nitrogênio próximos a eles. Apesar de a carga positiva estar representada no nitrogênio na posição 1, esta também está presente no N da porção 1,2,3,4-tetraidropiridínica devido a conjugação do sistema π . Como os hidrogênios H-8 e H-14 estão mais distantes dos átomos de nitrogênio comparando-se com o H-7, estão menos desblindados e deslocados para a região de campo alto do espectro.

Os hidrogênios H-2 e H-11 também apresentam valores de deslocamento químico próximo e estão blindados. Esses hidrogênios estão próximos aos nitrogênios, porém não fazem parte do sistema conjugado. Além disso, estão localizados em posição α ao carboxilato, o que poderia de alguma forma sugerir que a estabilização ou não da carga negativa do grupo CO_2^- por ligação de hidrogênio ou cátion metálico pode influenciar o seu deslocamento químico.

2-4.2. Caracterização estrutural de cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio

O mecanismo de formação do anel flavílio é apresentado na Figura 30. A reação precisa ser realizada em meio fortemente ácido ($\text{AcOH}/\text{HCl}_{(\text{g})}$) para ocorrência de ciclização e resulta no cloreto de flavílio, que é insolúvel em éter etílico e pode ser precipitado com facilidade.

Figura 30: Equilíbrio de formação do MMF no acoplamento entre fenol e benzoiacetona.

Através da interpretação dos espectros de RMN de ^1H de MMF em $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$ (A), CD_3OD (B) e D_2O (C) foi possível realizar a atribuição dos sinais do espectro aos hidrogênios da molécula (Tabela 4). De acordo com a análise dos espectros realizados nos 3 solventes deuterados, os hidrogênios H-3, H-2', H-6', H-5 e H-8 apresentam uma mudança no deslocamento químico com o aumento da polaridade do meio, sendo H-3 e H-8 os hidrogênios mais afetados. O oxigênio carregado positivamente na posição 1 do anel C causa um efeito de desblindagem nos hidrogênios citados devido ao efeito retirador de elétrons por conjugação. O aumento da polaridade do meio estabiliza esta carga positiva, diminuindo o efeito retirador de elétrons e deslocando os sinais para região de campo alto do espectro. Os hidrogênios H-3 e H-8 estão mais próximos desta carga positiva, então são mais afetados pela estabilização da carga. Apesar de apresentarem a mesma distância em relação ao oxigênio carregado positivamente, o hidrogênio H-8 apresenta valores de deslocamento químico menores que o hidrogênio H-3. Isso ocorre, pois o H-8 também sente um efeito doador de elétrons por conjugação do grupo metóxi da molécula, o que causa um efeito de blindagem nesse hidrogênio. Em D_2O , o deslocamento do sinal do H-8 causa uma sobreposição deste sinal com os sinais dos hidrogênios H-3' e H-5' e um multipeto passa a ser observado. A integração deste multipeto indica a presença de 4 hidrogênios, fato que não pôde ser explicado.

O hidrogênio H-6 é o mais blindado do sistema aromático, pois está em posição β com o grupo metóxi, doador de elétrons por conjugação. O sinal referente aos hidrogênios do grupo metila ligado ao anel C não é observado, pois ocorre a troca dos átomos de hidrogênio por átomos de deutério. Os hidrogênios do grupo metóxi são observados em região de campo alto devido ao efeito de blindagem causado pelo oxigênio.

Tabela 4: Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos de RMN de ^1H de MMF em $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$, CD_3OD e D_2O , 500 MHz. (s: singlete, d: dubleto, dd: duplo dubleto, m: multipeto).

H	δ (ppm)

	$\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$	CD_3OD	D_2O
3	8,73 (s, 1H)	8,61 (s, 1H)	8,41 – 8,38 (m, 3H) sobreposição
2' e 6'	8,59 (d, 2H) $^3J_{2',3'} = ^3J_{5',6'} = 7,4$ Hz	8,53 (d, 2H) $^3J_{2',3'} = ^3J_{5',6'} = 7,8$ Hz	8,41 – 8,38 (m, 3H) sobreposição
5	8,50 (d, 1H) $^3J_{5,6} = 9,3$ Hz	8,46 (d, 1H) $^3J_{5,6} = 9,3$ Hz	8,37 (d, 1H) $^3J_{5,6} = 9,3$ Hz
8	7,98 (d, 1H) $^4J_{6,8} = 2,4$ Hz	7,91 (d, 1H) $^4J_{6,8} = 1,9$ Hz	7,77 – 7,73 (m, 4H) sobreposição
4'	7,88 (t, 1H) $^3J_{4',5'} = ^3J_{4',3'} = 7,5$ Hz	7,88 (t, 1H) $^3J_{4',5'} = ^3J_{4',3'} = 7,5$ Hz	7,86 (t, 1H) $^3J_{4',5'} = ^3J_{4',3'} = 7,5$ Hz
3' e 5'	7,76 (t, 2H) $^3J = 7,9$ Hz	7,78 (t, 2H) $^3J = 7,8$ Hz	7,77 – 7,73 (m, 4H) sobreposição
6	7,60 (dd, 1H) $^3J_{5,6} = 9,3$ Hz $^4J_{6,8} = 2,5$ Hz	7,62 (dd, 1H) $^3J_{5,6} = 9,3$ Hz $^4J_{6,8} = 2,2$ Hz	7,58 (dd, 1H) $^3J_{5,6} = 9,3$ Hz $^4J_{6,8} = 2,5$ Hz
OCH_3	4,19 (s, 3H)	4,19 (s, 3H)	4,15 (s, 3H)

2-4.3. Estudo da interação de betalaínas com sais de flavílio

Nos experimentos iniciais realizados em água (pH 5) podemos observar no gráfico de Stern Volmer uma dependência linear entre (F_0/F) e a concentração do supressor, no caso a BtP, o que indica supressão de fluorescência. Uma variedade de interações pode dar origem à supressão, como rearranjos moleculares, reações de estado excitado, transferência de energia, formação de complexos no estado fundamental e colisões no estado excitado entre fluoróforo e supressor. Dependendo da natureza dessas interações, essa supressão pode ser estática ou dinâmica.¹⁴⁶

Supressão estática ocorre quando fluoróforo e supressor interagem no estado fundamental, formando um complexo não fluorescente. Ao absorver luz, este complexo retorna imediatamente ao estado fundamental por processos não emissivos. Este mecanismo pode ser descrito pela equação 1, onde F_0 e F se referem a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente; Q é a concentração do supressor e K_{SV} é a constante de associação do complexo. Na supressão dinâmica, o supressor colide com o fluoróforo no estado excitado, ocasionando o decaimento não emissivo de parte dos fluoróforos contidos no meio. Este mecanismo dinâmico de supressão é descrito pela equação de Stern-Volmer (Equação 2), na qual F_0 e F se referem a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente; k_q é a constante bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor, Q é a concentração do supressor e K_D é a constante de Stern Volmer. As duas equações apresentam uma relação linear entre as intensidades de fluorescência e a concentração do supressor.¹⁴⁶

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Eq. 1}$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_D[Q] \quad \text{Eq. 2}$$

A determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_{FL}) das amostras permite, em muitos casos, determinar se ocorre principalmente supressão estática ou dinâmica. Na supressão estática, o complexo formado não é fluorescente e a fluorescência observada está relacionada somente aos fluoróforos não complexados. Esta fração de fluoróforos não é perturbada, então tempo de vida de fluorescência é τ_0 e $\tau_0/\tau = 1$. Já na supressão dinâmica, parte dos fluoróforos que estava no estado excitado decai para o estado fundamental por processos não emissivos, então $\tau_0/\tau = F_0/F$ (Figura 31). Um método adicional para a distinção dos dois mecanismos é a análise do espectro de absorção do fluoróforo. A supressão dinâmica ocorre somente no estado excitado, então o espectro de absorção permanece inalterado. Já na supressão estática, ocorre a formação de um complexo no estado fundamental, podendo causar perturbações no espectro de absorção do fluoróforo. Contudo, nem todo complexo molecular leva a uma mudança dramática no espectro de absorção e os resultados devem ser avaliados com cuidado.

Em muitos os casos, a supressão de fluorescência pode ocorrer pelos dois mecanismos simultaneamente. Neste caso o gráfico de Stern-Volmer apresenta uma curvatura ascendente (Figura 31) e o processo é descrito pela equação 3, na qual K_D e K_S se referem a constante de supressão dinâmica e estática, respectivamente. Um desvio da linearidade no gráfico de Stern-Volmer também pode estar relacionado ao modelo de esfera de ação. De acordo com esse modelo, a supressão ocorre quando o supressor está perto do fluoróforo no momento da excitação, mas fluoróforo e supressor não formam um complexo e é descrito pela equação 4, onde V é o volume da esfera de ação e N é a

constante de Avogadro. A molécula supressora deve estar dentro desse volume para ocorrer a supressão.¹⁴⁶

$$\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q] \quad \text{Eq. 3}$$

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q]) \exp([Q]VN/1000) \quad \text{Eq. 4}$$

Figura 31: Mecanismos de supressão estática e dinâmica. F = fluoróforo e Q = supressor.

Em meio aquoso (pH 5), os espectros absorção de BtP e emissão de MMF são sobreponíveis (Figura 32), o que favorece a ocorrência de processos de transferência de energia. Contudo, não há evidência da ocorrência de emissão oriunda da BtP com a excitação do MMF. Nos experimentos realizados a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a diminuição da intensidade da banda de emissão do MMF com a adição de BtP no meio sem a mudança no tempo de vida sugerem a ocorrência de supressão estática. Além disso, a partir dos valores de K_{sv} e τ_0 de MMF é possível calcular a constante bimolecular de supressão (k_q). K_{sv} foi calculado e é igual a $(0,4 \pm 0,03) \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, enquanto τ_0 de MMF é 4,7 ns, resultando em $k_q = 8,5 \times 10^{12} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. Sabe-se que $k_q = 2,0 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ indica o limite para a ocorrência de supressão por um mecanismo difusional, o que

confirma a supressão da fluorescência de MMF por BtP via mecanismo estático. Nos experimentos realizados a 10^{-6} mol L⁻¹, não é observada a supressão de parte da banda de emissão do MMF e a formação de uma *aparente* nova banda de emissão em aproximadamente 510 nm. Isto ocorre, pois esta “supressão” é, na realidade, a ocorrência de reabsorção devido a concentração das espécies no meio. Nos experimentos realizados a 10^{-5} mol L⁻¹, os valores de absorção de BtP estão acima de 1, enquanto a 10^{-6} mol L⁻¹, estes valores estão abaixo de 0,2, impossibilitando a ocorrência de reabsorção.

Figura 32: Espectros de absorção (linha contínua) e emissão (linha tracejada, área preenchida) de MMF (azul) e BtP (laranja) em água (pH 5), solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5) e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água). $\lambda_{exc} = 370$ nm para MMF e $\lambda_{exc} = 474$ nm para BtP.

A Figura 25 mostra que o gráfico de Stern Volmer para os experimentos realizados em etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) não é linear, mas sim uma curva com a concavidade voltada para cima. Neste caso, o processo de supressão pode ser estudado através do modelo de Kapp (equação 3), no qual ocorre sequestro dinâmico e estático (Figura 33). Os dados resultam em uma reta que é racionalizada como $K_s K_D = 1,1 \times 10^6$ mol⁻² L² e $K_s + K_D = 2,5 \times 10^{11}$ mol⁻¹ L, que resultam em dois valores de constante; $77,9 \times 10^4$ mol⁻¹ L e $32,19 \times 10^4$ mol⁻¹ L. O cálculo das constantes bimoleculares de supressão para os dois processos resultaram em $k_q > 2,0 \times 10^{10}$ mol⁻¹ L

s^{-1} , ou seja, as duas constantes parecem estar relacionadas a um mecanismo estático. Uma possível explicação para este comportamento seria a formação de dois complexos no estado fundamental com diferentes constantes de estabilidade ou ainda a formação de um complexo ocorrendo concomitantemente com a degradação de um dos componentes do sistema.

Talvez em água/etanol, a quantidade de água no meio seja tão grande que o resultado seja parecido mais com água (vide absorção e emissão).

Figura 33: Modelo de sequestro dinâmico e estático da fluorescência de MMF por BtP.

Os espectros de absorção de MMF em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5) e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) apresentaram uma banda de absorção em torno de 340 nm, a qual não é característica da molécula. Além disso, esta banda possui uma intensidade maior em etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água). O aparecimento dessa banda sugere que a fração molar de água presente no meio causa alguma mudança na molécula de MMF. Experimentos realizados com etanol anidro mostraram que o aumento da fração molar de água no meio causa uma diminuição na intensidade da banda de absorção de MMF em 420 nm e o aparecimento da banda em 340 nm. Além disso, a mudança de pH para valores de pH mais baixos (meio ácido) resultou na regeneração da banda de absorção do MMF em pH 2 para sua forma

original.

Devido a presença do grupo doador metoxila na posição 7 da molécula de MMF, o equilíbrio prototrópico presente em antocianinas é bloqueado, impedindo a formação de bases quinoidais. Este mesmo grupo metoxila estabiliza a carga positiva do cátion flavílio desfavorecendo a sua hidratação até, pelo menos, pH 5.⁶ Uma possível explicação para uma mudança estrutural na molécula de MMF é apresentada no Esquema 13. Etanol (7,44) apresenta maior nucleofilicidade em relação à água (5,20)¹⁴⁷ e, caso o meio não esteja suficientemente ácido, pode realizar um ataque nucleofílico na posição 2 do anel C do MMF, levando a formação do acetal e posterior tautomerismo para a forma chalcona carregada positivamente. Esta reação é reversível e deslocada para a formação do cátion flavílio. Na presença de água, ocorre a formação da chalcona em sua forma neutra.

Esquema 13: Equilíbrio das espécies do sal de flavílio MMF presentes em meio hidroalcoólico.

Em outras palavras, em meio aquoso MMF persiste em pH 5 mas em meio etanólico, pequenas quantidades de água na presença de um catalisador básico geral, como um carboxilato, poderiam resultar na hidratação do MMF e consequente abertura do anel, o que corroboraria com a hipótese da formação de um complexo ocorrendo concomitantemente com a degradação de um dos componentes do sistema nos experimentos realizados em etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água). Para verificar

essa hipótese, uma solução de MMF em etanol com acetato de sódio no lugar de BtP foi realizado (Figura 34). Observa-se o desaparecimento das bandas de absorção e de emissão do MMF, exatamente como ocorre com BtP (mas não no experimento controle sem base) sugerindo que nessas condições a diminuição da emissão ocorre pela abertura do anel do fluoróforo.

Figura 34: Efeito da adição de acetato de sódio sobre os perfis de absorção e de fluorescência de MMF em etanol puro.

Os dados obtidos por espectroscopia de RMN sugerem mudanças nos sinais de hidrogênios tanto da BtP quanto do MMF que são condizentes com a interação entre essas espécies formando um complexo. Em pH 5 a interação é maior quando comparada a pH 2, visto que os pK_a s dos grupos carboxílicos da BtP são próximos a 3,3 (Esquema 13). MMF apresenta-se com carga positiva tanto em pH 5 quanto em meios mais ácidos. Indicaxantina apresenta carga negativa em pH 5 e carga positiva em uma faixa de pH entre 2 e 3,5.

Esquema 14: Estrutura química de MMF e BtP em meio aquoso em diferentes pHs.

Uma estrutura preliminar de uma possível forma de interação entre BtP e MMF é apresentada na Figura 35. A interação entre o hidrogênio ácido H-11 da BtP com a metoxila do MMF, bem como a interação entre o grupo carboxilato com a proximidade do núcleo positivo do MMF justificam os deslocamentos químicos observados nos sinais de H dos espectros de RMN. Contudo, o NOE discreto, e eventualmente inexistente, entre as moléculas torna difícil uma descrição conclusiva da interação entre MMF e BtP provavelmente devido a uma baixa constante de estabilidade do complexo formado.

Figura 35: Orbitais de fronteira de um possível complexo BtP:MMF. Otimização em nível DFT SMD(água)/M06-2x/6-31+g(d,p).

2-5. Conclusão

BtP e MMF foram sintetizados e sua interação foi estudada por espectroscopia de RMN, espectrofotometria de absorção UV-vis, espectroscopia de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo. Em água, a fluorescência de MMF é suprimida por BtP dada a sobreposição da banda de absorção de BtP com a emissão do MMF. Contudo, o gráfico de Stern-Volmer apresenta dois segmentos e uma curvatura que poderiam sugerir a ocorrência de supressão estática e dinâmica combinada ou a presença de um segundo supressor cuja concentração aumenta com o aumento da concentração de BtP, *e.g.*, supressão da fluorescência de MMF por um complexo BtP:MMF. A ausência de efeito da presença de BtP sobre o tempo de vida do MMF sugere que a supressão estática seja mais relevante, o que é confirmado pelos dados de espectroscopia de RMN, os quais indicam que a presença dos dois compostos em solução resulta em alterações dos deslocamentos químicos de átomos de hidrogênio específicos em relação aos experimentos controle. Em etanol, a adição de BtP favorece a decomposição de MMF, provavelmente via hidratação com catálise básica geral. Fato relevante para a eventual decomposição de antocianinas em meio hidrofóbico, visto que estes pigmentos naturais são ainda menos estáveis que o MMF. Assim, os dados apresentados mostram que a interação entre BtP e MMF provoca alterações na fluorescência e sugerem a ocorrência de formação de complexo entre as espécies. Em etanol a interação entre estas espécies e água leva a decomposição do MMF, o que pode ser relevante no contexto da interação de antocianinas e betalaínas *in vivo*.

2-6. Parte experimental

Reagentes e solventes

As substâncias químicas utilizadas nesta parte do trabalho estão listadas na tabela Tabela 5.

Tabela 5: Reagentes e solventes utilizados no trabalho.

Reagente/Solvente	Fórmula/Abreviatura	Fornecedor	Obs.
3-metóxfenol	-	S.A.	96%
Acetato de etila	AcOEt	Synth	99,5%
Acetonitrila	MeCN	Tedia	HPLC
Ácido acético glacial	HAc _(glacial)	S.A.	99%
Ácido clorídrico concentrado	HCl	Synth	36,5-38%
Ácido fórmico	HCOOH	Fluka	>98%
Ácido L-ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	S.A.	>99%
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Synth	98%
Ácido clorídrico deuterado	DCl	S.A.	35 wt% em D ₂ O
Água deuterada	D ₂ O	S.A.	≥99,9% átomos D
Benzoilacetona	-	S.A.	99%
Cloreto de cálcio granulado	CaCl ₂	Anidrol	
Etanol	EtOH	Synth	99,5%
Éter etílico	(C ₂ H ₅) ₂ O	Synth	
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH	Vetec	30-32%
Isopropanol	i-PrOH	Synth	99,5%

S.A.: Sigma Aldrich

Semissíntese e purificação de indicaxantina (BtP)

Extração de ácido betalâmico em acetato de etila

Ácido betalâmico foi obtido em acetato de etila utilizando-se procedimento padrão do grupo, adaptado da literatura¹⁴⁸. Primeiramente, cerca de 2 kg de beterrabas frescas (*Beta vulgaris*) foram cortadas e processadas em uma centrífuga de alimentos tipo juicer (Phillips-Walita, modelo PI1855) para obtenção de suco de beterraba. 500 mL de suco foi filtrado em filtro de pano e transferido para um béquer de 1 L e resfriado a 10 °C. Sob agitação mecânica, foi adicionado hidróxido de amônio 32%, até que a solução atingisse valor de pH 11,4, acompanhado com o auxílio de um eletrodo de pH. Após aproximadamente 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 (HBt, Esquema 15). O béquer foi mergulhado em banho de gelo seco com etanol, de forma que a temperatura da solução ficasse próxima a 0 °C, em seguida, foi adicionado HCl 37% em pequenas porções, de forma que a temperatura da solução não fosse superior a 5 °C, até que o valor de pH da solução fosse aproximadamente 2. Duas extrações com acetato de etila (50 mL, ou 10% do volume inicial de suco) foram realizadas. Cerca de 90 mL da suspensão contendo fase orgânica (HBt em acetato de etila), e suco foi centrifugada a 7.000xg, 2 min, 0 °C. O sobrenadante amarelo foi congelado em banho de etanol e gelo seco (−80 °C), de forma que cristais brancos de gelo contendo sais e água se formassem. O precipitado foi filtrado e a concentração da solução de HBt em acetato de etila foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon^{\text{AcOEt}}_{378\text{nm}} = 30.000$).

Esquema 15: Hidrólise das betalaínas presentes no suco de beterraba, originando HBt.

Acoplamento aldimínico

BtP foi semissintetizada através do acoplamento aldimínico entre ácido betalâmico e L-prolina em água, uma vez que a amina não é solúvel em acetato de etila. Cerca de 50 mL de HBt em acetato de etila foi reduzido a 1/3 de seu volume sob pressão reduzida (20 mmHg, 25 °C), resultando em aproximadamente 17 mL de ácido betalâmico. HBt foi extraído para água em funil de separação e a fase superior (acetato de etila) foi descartada. Ao ácido betalâmico em água foi adicionado NH_4OH 32% até que a solução atingisse pH 11. Então L-prolina (10 eq.) foi adicionada e a reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. Após este período observou-se a mudança de coloração da solução de um amarelo brilhante para um amarelo ouro, característico da BtP. Neste momento, a reação foi resfriada em banho de gelo e o pH foi ajustado para 5 pela adição lenta de HCl 37% para garantir a desidratação da BtP formada. A reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por mais 30 minutos (Esquema 10). A solução de BtP obtida foi armazenada sob refrigeração (-20 °C) para posterior purificação.

Purificação de indicaxantina

A BtP bruta foi purificada em duas etapas. Primeiramente, L-prolina em excesso foi removida por HPLC em condições de fase reversa e escala semi-preparativa em um equipamento Shimadzu 20A equipado com detector PDA SPD20A, nas condições: coluna de Sílica C-18 Luna (5 μ m, 250 x 10 mm, Phenomenex), em condição isocrática de 10% de B em 40 minutos com fluxo de 3 mL min⁻¹. A mistura de solvente utilizada foi solvente A: 0,05% ácido fórmico em água e solvente B: 0,05% TFA em acetonitrila e a corrida foi acompanhada em 254 nm. As frações correspondentes a BtP foram coletadas entre 18,6 min e 19,6 min. Após esta etapa, traços de ácido betalâmico ainda presentes na amostra foram removidos por cromatografia de exclusão de tamanho, utilizando-se coluna de Sephadex LH-20 e água como eluente. As frações coletadas foram analisadas por espectrofotometria UV-vis e HPLC analítico.

Análise cromatográfica

BtP purificada foi analisada por HPLC analítico em um equipamento Shimadzu 20A equipado com detector PDA SPD20A em fase reversa, nas condições: C18 Ascentis ® (250 x 4,6 mm, Supelco), em condição isocrática de 20% de B em 15 minutos, com fluxo de 1 mL min⁻¹ detecção em $\lambda_{\text{max}} = 254$ nm e 485 nm. A mistura de solvente utilizada foi solvente A: 0,05% ácido fórmico em água e solvente B: 0,05% TFA em acetonitrila. Os dados foram obtidos utilizando o programa de aquisição LCSolution.

Síntese do cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio (MMF)

Cloreto de 7-metóxi-4-metilflavílio foi sintetizado e purificado utilizando-se procedimento descrito previamente na literatura.¹³⁷ 2 mmol de 3-metóxi-fenol e 2 mmol

de benzoilacetona foram adicionados a um balão de fundo redondo contendo aproximadamente 20 mL de ácido acético glacial. $\text{HCl}_{(\text{g})}$ gerado *in situ* ($\text{CaCl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$) foi borbulhado no meio reacional durante 4 horas (Esquema 12). Ao final da reação, o sal de flavílio (sólido amarelo) foi precipitado com a adição de éter etílico gelado. O precipitado foi filtrado a vácuo, lavado com éter etílico gelado e mantido em dessecador sob vácuo durante 24 horas. A massa obtida foi de 267 mg, obtendo-se um rendimento de 53 %.

Caracterização estrutural

A caracterização estrutural da indicaxantina semissintetizada e do MMF sintetizado foi realizada por espectrometria de massas por injeção direta com ionização por eletrospray em modo positivo (MS(ESI+)), realizada no laboratório do Professor Doutor Thiago Carita Correra e espectroscopia de ressonância magnética (RMN), realizada na Central Analítica do IQ-USP.

Espectroscopia de ressonância nuclear magnética

Os experimentos de RMN de ^1H e ^1H , ^1H -COSY de BtP foram obtidos a 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500,13 MHz, equipado com uma sonda de tripla ressonância (TXI) de 5mm com detecção inversa. Para a análise, cerca de 5 mg de BtP foi solubilizada em 700 μL de D_2O . Os ensaios de ^1H foi realizado com a solução em tubos de 5mm, com ns = 256, td = 64K, ds = 0 e o ensaio de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY com pulseprog = cosyprqf, ns = 32, td = 2048, ds = 16.

Os experimentos de ^1H -RMN de MMF foram obtidos a 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500,13 MHz, equipado com uma sonda de tripla ressonância (TXI) de 5mm com detecção inversa. Para a análise, cerca de 5 mg de

MMF foi solubilizada em 700 μL de $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$, CD_3OD e D_2O . Os ensaios de ^1H foram realizados com as soluções em tubos de 5mm, com $n_s = 256$, $t_d = 64\text{K}$, $d_s = 0$.

Espectrometria de massas por injeção direta

A análise por espectrometria de massas foi realizada em modo positivo em um espectrômetro de massas do tipo ion trap (Amazon SL - Bruker) modificado para realização de espectroscopia de íons (IRMPD). As amostras foram analisadas por injeção direta (180 $\mu\text{L/h}$) e a fonte de íons mantida a 4500 V em relação ao terra, o gás de nebulização em 7.24 psi e o gás de secagem 4 L/min. A unidade de dessolvatação foi mantida a 180 $^{\circ}\text{C}$. Os espectros foram adquiridos no modo de alta resolução (Δm à largura total do pico na metade de sua altura máxima - FWHM $< 0,2$) com 50 varreduras.

Caracterização fotofísica

Espectrometria de absorção, emissão e excitação.

Os espectros de absorção foram realizados em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50 e os espectros de emissão e excitação foram realizados em um espectrofotômetro Varian Cary Eclipse. Os espectros foram adquiridos em solução aquosa pH 5, solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 50:50 v/v (pH 5) e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) em cubeta de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 1 cm. Para investigar a influência da fração molar de água presente em etanol nos perfis de absorção e emissão de MMF, espectros de absorção e emissão foram registrados em etanol anidro na ausência e na presença de água ($\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,02; 0,14; 0,25$ e $0,40$). Quando $\chi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,40$ verificou-se ainda a influência do pH. pH 5 e pH 2 foram

estudados. Os espectros foram adquiridos em cubeta de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 1 cm.

Os parâmetros utilizados para os espectros de emissão e excitação de BtP foram, respectivamente, $\lambda_{exc} = 474$ nm, $f_{ex} = f_{em} = 10$ nm, tensão = 600 V e $\lambda_{em} = 515$ nm, $f_{ex} = f_{em} = 10$ nm, tensão = 600 V. Os parâmetros utilizados para os espectros de emissão e excitação de MMF foram, respectivamente, $\lambda_{exc} = 370$ nm, $f_{ex} = 2,5$ nm, $f_{em} = 5$ nm, tensão = 600 V e $\lambda_{em} = 474$ nm, $f_{ex} = 2,5$ nm, $f_{em} = 10$ nm, tensão = 600 V.

Determinação de rendimento quântico de fluorescência

Rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}) é definido como a razão entre o número de fótons emitidos e absorvidos por uma molécula. Esta propriedade pode ser determinada indiretamente por comparação do rendimento quântico de fluorescência de um padrão secundário utilizando-se a Equação 2. Para a resolução desta equação os seguintes parâmetros são necessários; a absorção da amostra em estudo (A^X) e do padrão (A^P) no comprimento de onda de excitação, as áreas sobre as curvas de emissão (S), os índices de refração dos solventes utilizados (n) e o rendimento quântico de fluorescência do padrão (Φ_{FI}).

$$\Phi_{FI}^X = \Phi_{FI}^P \frac{A^P}{A^X} \frac{S_{FI}^X}{S_{FI}^P} \left(\frac{n^X}{n^P} \right)^2 \quad \text{Eq. 2}$$

Para evitar problemas relacionados à eficiência do sistema de detecção em diferentes comprimentos de onda, o padrão utilizado deve ter perfil de absorção e emissão similar à amostra¹⁴⁹. Para a determinação do rendimento quântico de BtP e MMF em água (pH 5), fluoresceína e perileno foram utilizados como padrão, respectivamente (Tabela 6). Os espectros de absorção e emissão das amostras e dos

padrões utilizados foram adquiridos em cubetas de quartzo de 1,5 mL com caminho ótico de 10 mm. A absorção das soluções foi mantida abaixo de 0,1 para evitar efeitos de filtro interno¹⁴⁶ e os experimentos foram realizados em triplicata. Os espectros de emissão de BtP e fluoresceína foram adquiridos nas mesmas condições ($\lambda_{\text{exc}} = 475$ nm, $f_{\text{exc}} = f_{\text{em}} = 20$ nm, tensão = 600V), assim como os espectros de emissão de MMF e perileno ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm, $f_{\text{exc}} = 5$, $f_{\text{em}} = 10$ nm, tensão = 600V).

Tabela 6: Padrões utilizados na determinação do Φ_{FL} de BtP e MMF e parâmetros relevantes.

Composto	Solvente	Φ_{FL}	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Ref.
Fluoresceína	NaOH _(aq) 0,1 mol L ⁻¹	0,79	470 - 500	500 - 600	¹⁵⁰
Perileno	Ciclohexano	0,92	350 - 430	400 - 600	¹⁵¹

Estudo da interação de betalaínas com sais de flavílio

Espectroscopia de absorção e emissão de MMF na presença de BtP

Para a determinação do efeito da adição de BtP nos espectros de emissão e absorção de MMF, a concentração de MMF foi mantida fixa na cubeta ($V_f = 2$ mL) em $3,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ou $3,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, a partir de uma solução estoque $7,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ou $7,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A concentração de BtP foi variada de $0,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ou $0,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $3,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ou $3,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (Tabela 7), a partir de uma solução estoque de indicaxantina ($7,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ou $7,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). Os experimentos foram realizados em água em pH 5. O ajuste do pH foi realizado com a adição de solução de HCl 1 mol L⁻¹. As medidas de absorção e emissão foram realizadas em cubetas de plástico de 3 mL com caminho ótico de 10 mm em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50 e um espectrofotômetro Varian Cary Eclipse, respectivamente. Para cada concentração de BtP foram registrados um espectro de absorção em uma faixa de varredura de 300 – 600 nm e espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370$

nm, $f_{\text{exc}} = 2,5$ nm, $f_{\text{em}} = 5$ nm, tensão = 600 V). Para os experimentos realizados com concentração de MMF e BtP 10^{-6} mol L⁻¹, as fendas utilizadas foram $f_{\text{exc}} = 5$ nm, $f_{\text{em}} = 5$ nm.

Tabela 7: Concentrações de BtP utilizadas nos estudos de supressão de fluorescência de MMF.

Nº de equivalentes	Concentração final (mol L ⁻¹)
0,1	$0,4 \times 10^{-5}/10^{-6}$
0,3	$1,1 \times 10^{-5}/10^{-6}$
0,5	$1,8 \times 10^{-5}/10^{-6}$
0,8	$2,9 \times 10^{-5}/10^{-6}$
1	$3,6 \times 10^{-5}/10^{-6}$

Efeito do solvente na interação de BtP com MMF

Espectroscopia de absorção e emissão de MMF na presença de BtP

Para a determinação do efeito da adição de BtP nos espectros de emissão e absorção de MMF, a concentração de MMF foi mantida fixa na cubeta ($V_f = 2$ mL) em $3,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, a partir de uma solução estoque $7,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A concentração de BtP foi variada de $0,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ a $7,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (Tabela 8 e Tabela 9), a partir de uma solução estoque de indicaxantina (5×10^{-4} mol L⁻¹). Os experimentos foram realizados em água em pH 5, em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 50:50 v/v (pH 5) e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água). O ajuste do pH foi realizado com a adição de solução de HCl 1 mol L⁻¹. As medidas de absorção e emissão foram

realizadas em cubetas de plástico (experimentos realizados em água) e quartzo (experimentos realizados em solução de etanol/água e em etanol) de 3 mL com caminho ótico de 1 cm em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50 e um espectrofotômetro Varian Cary Eclipse, respectivamente. Para cada concentração de BtP foram registrados um espectro de absorção em uma faixa de varredura de 300 – 600 nm e espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm, $f_{\text{exc}} = 2,5$ nm, $f_{\text{em}} = 5$ nm, tensão = 600 V) na ausência e na presença de MMF.

Tabela 8: Variação das concentrações de BtP utilizadas no estudo realizado em água

Nº de equivalentes	Concentração na cubeta (mol L ⁻¹)
0,1	$0,4 \times 10^{-5}$
0,3	$1,1 \times 10^{-5}$
0,5	$1,8 \times 10^{-5}$
0,8	$2,9 \times 10^{-5}$
1	$3,6 \times 10^{-5}$
1,2	$4,5 \times 10^{-5}$
1,5	$5,5 \times 10^{-5}$
1,7	$6,3 \times 10^{-5}$
2	$7,2 \times 10^{-5}$

Tabela 9: Variação das concentrações de BtP utilizadas nos estudos realizados em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 50:50 v/v (pH 5) e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água).

Nº de equivalentes	Concentração na cubeta (mol L ⁻¹)
0,1	$0,4 \times 10^{-5}$

0,5	$1,8 \times 10^{-5}$
1	$3,6 \times 10^{-5}$
1,5	$5,5 \times 10^{-5}$
2	$7,2 \times 10^{-5}$

Determinação do tempo de vida de fluorescência de MMF na presença de BtP

O tempo de vida de fluorescência de MMF foi adquirido em equipamento Edinburgh FL980, com sistema Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC), acoplado a laser EPLED-340 ($\lambda_{\text{exc}} = 335,6$ nm, amplitude do pulso = 649,8 ps, largura da banda = 13,8 nm), de 40 kHz. As condições do equipamento foram: $\lambda_{\text{exc}} = 335,6$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 474$ nm; $f_{\text{ex}} = 5$ nm, $f_{\text{em}} = 10$ a 20 nm, 3.000counts, 2048 canais, numa janela temporal de 50 ns. A função da resposta instrumental (IRF) foi coletada com Ludox, com $\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{em}} = 335,6$ nm. Os ajustes das curvas de decaimento de fluorescência foram realizados por meio da deconvolução do IRF, pelo software Fast (Edinburgh Fotonics).

As amostras a serem analisadas foram preparadas como citado no item anterior e as medidas foram realizadas em cubetas de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 10 mm.

Tentativa de caracterização do complexo BtP-MMF por espectroscopia de RMN

Para o estudo da interação entre BtP e MMF em água (pH 5) por espectrometria de ressonância magnética nuclear foram realizados experimentos de RMN de ^1H e NOESY 2D. Os espectros foram obtidos a 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500,13 MHz, equipado com uma sonda de tripla ressonância (TXI) de 5mm com detecção inversa. Os ensaios de ^1H foram realizados com as soluções em tubos de 5mm, com ns = 256, td = 64K, ds = 0.

Primeiramente, 0,5 mg de MMF ($1,45 \times 10^{-7}$ mol) foi solubilizado em 600 μL de D_2O (pD 5) e um espectro de ^1H foi registrado. O pD foi ajustado para 5 com a adição de DCl. Solução concentrada de BtP ($2,87 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) em D_2O (pD 5) foi adicionada ao tubo em diferentes proporções até atingir 1 equivalente em mol em

relação ao MMF (Tabela 10). Para cada concentração de BtP foi registrado um espectro de ^1H . Ao atingir 1 equivalente de BtP em relação ao MMF também foi registrado um espectro bidimensional NOESY (noesygpghpr) com ns = 32, ds = 32, td = 2048 x 512.

Tabela 10: Variação das proporções de BtP utilizadas nos estudos de RMN.

Equivalentes de BtP	Número de mols de BtP (10^{-7})
0,1	0,15
0,3	0,43
0,5	0,72
0,8	1,15
1	1,45

Capítulo 3.

Interação de betanina com paraquat

Modelo para processos de transferência de elétron via complexos de transferência de carga

3-1. Introdução

Paraquat, metil viologênio (MV^{2+}) ou dicloreto de *N,N'*-dimetil-4,4'-bipiridínio, é um herbicida não seletivo que age inibindo a fotossíntese.¹⁵² Paraquat retira elétrons do fotossistema I comprometendo, assim, a redução de $NADP^+$ a NADPH ($E^\circ(NADP^+/NADPH) = -320 \text{ mV vs. NHE}$)¹⁵³ e, conseqüentemente, o ciclo de Calvin, que promove a fixação de carbono pela planta a partir de dióxido de carbono e água.¹⁵⁴

¹⁵⁶ Paraquat é um dímero de *N*-metilpiridina e, desta forma, é um sal formado por um cátion com carga formal 2+ e dois íons cloreto. Nesta forma oxidada, MV^{2+} é incolor em solução aquosa ($\epsilon^{257 \text{ nm}} = 14.000 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁵⁷ e pode ser reduzido em um elétron ($E^\circ(MV^{2+}/MV^{+\bullet}) = -446 \text{ mV vs. NHE}$ e que se mantém constante na faixa de pH entre 5 e 13) resultando em um cátion radical $MV^{+\bullet}$ de cor azul ($\epsilon^{396 \text{ nm}} = 41.100 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon^{606 \text{ nm}} = 13.800 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹⁵⁸ A reversibilidade desta reação redox torna o paraquat um composto bastante usado em dispositivos eletrocrômicos, como janelas com luminosidade controlada pela corrente, como transportador de elétrons na otimização de processos biológicos e energéticos e em processos de biorremediação.¹⁵⁹⁻

^{160,161} Na ausência de oxigênio, $MV^{+\bullet}$ em solução aquosa persiste por horas a temperatura ambiente e seu espectro de absorção não sofre alterações na faixa de pH

entre 0 e 7.¹⁶² Na presença de oxigênio, $MV^{+\bullet}$ é oxidado a MV^{2+} produzindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$, $E^{\ominus'}(O_2/O_2^{\bullet-}) = -155 \text{ mV vs. NHE}$)¹⁵³ com uma constante de velocidade de $7,7 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹⁶³ A ocorrência desta reação *in vivo* acarreta na formação de peróxido de hidrogênio e radical hidroxila,¹⁶³ o que explica a alta toxicidade do paraquat também para animais e torna controverso o uso deste composto como herbicida.¹⁶⁴ O cátion-radical de metil viologênio pode ser reduzido em um elétron em solução aquosa pH 7 levando ao metil viologênio neutro ($E^{\ominus'}(MV^{+\bullet}/MV^0) = -880 \text{ mV vs. NHE}$).^{158, 165} A solução aquosa de MV^0 é amarela e pode dar origem ao dímero catiônico ($E^{\ominus'}(MV^0/(MV)_2^{2+}) = -930 \text{ mV vs. NHE}$, comprometendo a oxidação de MV^0 a $MV^{+\bullet}$.¹⁵⁹

A fotorredução de MV^{2+} levando à formação de $MV^{+\bullet}$ é um processo fotoquímico de grande interesse na área de conversão de energia solar.¹⁶² O potencial de redução do paraquat excitado para a formação do respectivo cátion radical ($E^{\ominus'}([MV^{2+}]^*/MV^{+\bullet})$) é 3,65 V vs. NHE, indicando que $[MV^{2+}]^*$ é um oxidante muito forte.^{162, 166-167} Em solução aquosa, paraquat é fotorreduzido por doadores de elétrons como EDTA, Cl^- e SCN^- quando irradiado com luz UVA. A formação de $MV^{+\bullet}$ se relaciona com a formação de complexos de transferência de carga no estado fundamental entre MV^{2+} e as espécies doadoras de elétron.

Esquema 16: Estados de oxidação de Paraquat em meio aquoso.

Em células de combustível para a geração de H_2 baseadas em um fotoeletrodo de silício, paraquat em sua forma oxidada MV^{2+} é fotorreduzido a $MV^{+\bullet}$, gerando um

produto de redução capaz de decompor H₂O, gerando H₂ (Equações 4 e 5).¹⁶¹

Betanina (Bn, Esquema 18), o principal pigmento da beterraba vermelha, é um importante antioxidante natural, que pode ser oxidado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.^{128, 168} Sua estrutura química contém tanto um anel catecol 5-*O*-glicosilado quanto o sistema 1,7-diazaheptametínico característico das betalainas, estruturas que ao serem oxidadas individualmente em um elétron podem estabilizar o radical formado por ressonância. Os potenciais de pico anódico medidos por voltametria diferencial de pulso em pH 7,4 são $E_{p(a)1} = 620 \text{ mV}$, $E_{p(a)2} = 840 \text{ mV}$ e $E_{p(a)3} = 1,22 \text{ V vs. NHE}$.¹⁶⁹⁻¹⁷⁰ Os segundo e terceiro potenciais de betanina são muito semelhantes aos dois potenciais determinados para indicaxantina ($E_{p(a)1} = 830 \text{ mV}$ e $E_{p(a)2} = 1,12 \text{ V vs. NHE}$), sugerindo que a primeira oxidação de betanina ocorre na porção catecol que é ausente na indicaxantina.¹⁷⁰ O processo de oxidação de betanina envolve dois elétrons e dois prótons e dá origem a 2-descarbóxi-2,3-dehidrobetanina (dhBt). A primeira oxidação da betalaína dá origem ao radical semiquinona, o qual é posteriormente oxidado a quinona.¹⁷¹⁻¹⁷⁴ Esta sofre uma descarboxilação, dando origem a dhBt. Outro possível produto de oxidação é a neobetanina. O potencial de pico anódico da betanina depende do pH do meio, variando entre 450 mV vs. NHE em pH = 3 a 670 mV vs. NHE em pH = 6.^{169, 175}

Betalainas, especialmente as betacianinas, apresentam um alto potencial como antioxidantes naturais, sendo a base de estudos clínicos de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.^{168, 176-178} Uma possível explicação para tal comportamento é que a

presença de duplas conjugadas e grupos aromáticos nas betalaínas estabilizam por ressonância os radicais formados quando estas atuam como doadoras de elétron ou hidrogênio para radicais livres (Esquema 17).³⁸

Esquema 17: Exemplo de possíveis interações de uma betalaína com um radical genérico RO. No caso (A) vê-se como o grupo ciclo-DOPA da betanidina poderia atuar estabilizando radicais por transferência de hidrogênios¹⁷⁹ formando a semiquinona e no caso de R1 = H a quinona; (B) observa-se como a indicaxantina poderia estabilizar o radical por transferência de elétrons (caminho *i*) ou transferência de hidrogênio (caminho *ii*). Note que ambos os caminhos levam após nova oxidação ao derivado neobetalâmico que contém uma porção 2,6-dicarboxipiridínica. A piridina é apresentada protonada para viabilizar a representação estequiométrica das reações.

Devido sua habilidade de doar elétrons e seu alto coeficiente de atenuação molar

(ϵ), betalaínas são bons candidatos para utilização em processos que envolvem transferência de elétrons induzida por fótons, como em células solares sensibilizadas por corante (DSSCs).¹⁸⁰ As porções carboxílicas presentes em sua estrutura favorecem a ligação na superfície do TiO_2 , utilizado como óxido condutor.¹⁷⁴ Betacianinas apresentam-se promissoras na conversão de energia fotovoltaica em relação a betaxantinas devido maior sobreposição de seu espectro com o espectro de energia solar.¹⁸¹ Um estudo recente de Sandquist e McHale mostra a confecção de uma célula solar fotossensibilizada por betanina com eficiência de conversão de energia maior que 2,7%, o maior rendimento registrado para um fotossensibilizador natural.¹⁸² Apesar do baixo rendimento em relação às células solares sensibilizadas por corantes sintéticos (11%), o uso de pigmentos naturais apresenta menor custo e maior apelo ambiental.

Betanina também vêm sendo utilizada em células de combustível que produzem H_2 . O desenvolvimento de catalisadores para transferência de elétrons fotoinduzida possibilita a produção de H_2 e O_2 a partir da redução de H^+ e oxidação da água. Entretanto, a produção de oxigênio resulta em um produto de baixo valor econômico, difícil de separar que, se produzido em escala global e em grandes quantidades, pode impactar as formas de vida no planeta, como fez há cerca de 2 bilhões de anos.¹⁸³ Esses dispositivos, assim como as DSSCs, são constituídos de um semicondutor e um fotossensibilizador que é responsável pela captação da energia solar e transferência de elétrons para a banda de condução do semicondutor.¹⁸⁴ Em um dispositivo contendo nanocristal de óxido de zinco como semicondutor e $[\text{FeFe}(\text{mcbdt})(\text{CO})_6]$ como catalisador, betanina foi utilizada como sensibilizador e aumentou a eficiência de produção de H_2 em *ca.* 5 vezes comparado ao dispositivo na ausência do sensibilizador.¹⁸⁵ Recentemente foi desenvolvido um dispositivo fotovoltaico nano-

híbrido que permite a produção de H₂ com eficiência de até 20%, maior eficiência registrada para este tipo de dispositivos. Além disso, as etapas de produção fotocatalítica de H₂ e a oxidação do poluente formado ocorrem simultaneamente. Neste trabalho, nanopartículas de prata (AgNPs) estabilizadas com betanina e derivados foram utilizadas como sensibilizadores. Betanina e seus produtos de decomposição, ácido betalâmico, cyclo-DOPA 5-*O*-glicosídeo e neobetanina foram utilizados como regeneradores, retardando a recombinação entre elétron e o orbital vazio, aumentando assim a eficiência na transferência de elétrons.¹⁸⁴

A interação entre betanina e paraquat em meio aquoso pode levar a um sistema redox reversível que pode ter utilidade no desenvolvimento de dispositivos fotovoltaicos. Desta forma, é importante investigar a interação entre estes compostos no estado fundamental na presença e na ausência de irradiação com luz ultravioleta.

3-2. Objetivos

Determinar se existe interação química entre betanina e paraquat considerando seus potenciais redox.

3-2.1 Objetivos específicos

- i. Verificar a formação de um complexo entre betanina e paraquat;
- ii. Determinar se betanina é um doador de elétron eficiente para paraquat excitado;
- iii. Determinar se o grau de pureza da betanina afeta a interação com paraquat.

3-3. Resultados e discussão

Os estudos de interação entre betanina e paraquat foram feitos utilizando-se três amostras de betanina: suco de beterraba em pó diluído com dextrina (amostra A), betanina precipitada de suco de beterraba (amostra B) e betanina purificada por HPLC (amostra C). Estes experimentos foram feitos para determinar o efeito do grau de pureza da betanina sobre a sua interação com o herbicida.

3-3.1. Obtenção e análise de amostras de betanina

A amostra A é comercial e foi usada como recebida. Betanina foi precipitada a partir do suco fresco de beterraba acidulado usando isopropanol como antissolvente, resultando na amostra B. Embora esta amostra seja composta praticamente só por betanina, ela foi submetida a uma etapa de purificação por HPLC em condições de fase reversa e escala semi-preparativa que produziu a amostra C. A análise cromatográfica analítica revelou que a amostra A contém duas betalaínas, enquanto as amostras B e C apresentam somente um pico cromatográfico cada, que foi identificado como betanina por comparação do tempo de retenção com amostra submetida a análise de HPLC/MS (ESI(+)) m/z 551).

Soluções das três amostras em D₂O foram comparadas qualitativamente por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) (Figura 36, Anexos 5 – 7). Pode-se observar que a amostra A contém uma quantidade pequena de betalaínas, que impedem a visualização de seus sinais característicos em torno de 7 ppm (H4 (C_{sp2}, porção catecol), H7 (C_{sp2}, porção catecol)), e uma grande quantidade de dextrina, como evidenciado pelos sinais intensos na região entre 4 e 3 ppm. A amostra B de betanina obtida por precipitação mostra que o material obtido contém outras betacianinas como é possível inferir pelos sinais intensos na região entre 4 e 3 ppm e

pela comparação com os sinais da amostra A (betanina purificada por HPLC) que estão de acordo com uma amostra mais pura.

Esquema 18: Estrutura química da betanina (Bn), betacianina natural resulsitante do acoplamento aldímínico entre ácido betalâmico e ciclo-DOPA 5-O-glicosilada.

Figura 36. Espectros de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) para as amostras A, B e C e maltodextrina. O sinal de H_2O em 4.79 ppm foi suprimido para favorecer a visualização.

Espectros de RMN de ^1H , $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMQC da

betanina em D₂O são descritos na literatura,¹⁸⁶ assim como RMN de ¹H em solventes orgânicos acidificados como ACN-*d*₃/TFA-*d*¹⁸⁷. Os sinais mais importantes para a caracterização da betanina (Esquema 19) são os átomos de hidrogênio 4 (C_{sp2}, porção catecol), 7 (C_{sp2}, porção catecol), 2 (quiral, porção ciclo-DOPA), 11 (⁺N=CH), 12 (⁺N=CH-CH), 14 (*a* e *b*, diastereotópicos), 15 (quiral, porção 1,2,3,4-tetraidropiridínica) e 18 (C_{sp2}, porção 1,2,3,4-tetraidropiridínica) (Esquema 18).

Na ampliação da região de deslocamento químico entre 7,2 e 6,9 ppm (Figura 37), pode-se observar os singletos correspondentes aos hidrogênios 4 e 7 de betanina pura e precipitada. Na ampliação da região de deslocamento químico entre 5,1 e 4,9 ppm (Figura 37) pode-se observar o duplo dubleto referente ao H-2 e o dubleto referente ao H-1'. O valor das constantes de acoplamento referentes aos H-2 (4,94 ppm, $J^3_{2,3} = 10.2, 3.0$ Hz) e H-1' (4,98 ppm, $J^3_{1',2'} = 7.6$ Hz) de betanina pura e H-2 (5,03 ppm, $J^3_{2,3} = 10.2, 2.3$ Hz) e H-1' (4,98 ppm, $J^3_{1',2'} = 7.5$ Hz) de betanina precipitada são similares aos valores relatados na literatura (H-2 (4,92 ppm, $J^3_{2,3} = 10.3, 3.1$ Hz), H-1' (4,98 ppm, $J^3_{1',2'} = 7.4$ Hz)).^{186, 188} Nota-se ainda que no espectro de Bn precipitada, o sinal correspondente ao H-2 apresenta um deslocamento para campo baixo em relação a betanina pura possivelmente pela presença de ácido residual na amostra. No espectro da betanina comercial não conseguimos observar os sinais correspondentes a esses hidrogênios. Na ampliação da região entre os deslocamentos químicos 7,2 e 6,9 ppm observamos um sinal que pode estar associado ao H-4.

Figura 37: Ampliação da região de deslocamento químico entre 7.2 e 6.9 ppm e da região entre 5.1 e 4.9 ppm do espectro de RMN de ^1H de betanina pura, betanina precipitada e betanina comercial em dextrina em D_2O , 500 MHz.

Na ampliação da região de deslocamento químico entre 4,2 e 3,0 ppm (Figura 38) observa-se que é possível atribuir os sinais obtidos com a amostra C (betanina pura). O multiplete em 3,55 ppm se refere à β -D-glicose ligada na posição 5 da ciclo-DOPA. Para Bn purificada por HPLC também foi possível atribuir os sinais referentes aos $\text{H6}'a$ (3,84 ppm, $J^{3_{5',6'a}} = 12.5$, $J^{4_{4',6'a}} = 2.2$ Hz) e $\text{H6}'b$ (3,69 ppm, $J^{3_{5',6'b}} = 12.5$, $J^{4_{4',6'b}} = 5.4$ Hz), cujas constantes de acoplamento são similares aos valores da literatura (3,85 ppm, $J^{3_{5',6'a}} = 12.3$, $J^{4_{4',6'a}} = 1,6$ Hz, 3,7ppm, $J^{3_{5',6'b}} = 12.3$, $J^{4_{4',6'b}} = 5.3$ Hz).¹⁸⁸

Figura 38: Ampliação da região de deslocamento químico entre 4,2 e 3,0 ppm do espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) de betanina pura, betanina precipitada, betanina comercial em dextrina e maltodextrina.

As Tabelas 11 e 12 apresentam a atribuição dos sinais de RMN de ^1H para betanina pura e betanina precipitada.

Tabela 11: Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos de RMN de ^1H de betanina pura em D_2O em 500 MHz.(s: singlete, d: dublete, t: tripleto dd: duplo duplete, m: multiplete, b: broad).

Betanina pura	Posição do ^1H	δ_{H} (ppm)
2	4.94 (dd, $J_{2,3}^3 = 10.2, 3.0$ Hz, 2H)
	4	7.07 (s, 1H)
	6' a	3.84 (dd, $J_{5',6'}^3 = 12.5, J_{4',6'}^4 = 2.2$ Hz, 1H)
	6' b	3.69 (dd, $J_{5,6}^3 = 12.5, J_{4',6'}^4 = 5.4$ Hz, 1H)
	7	7.01 (s, 1H)
	11	8.23 (bd)
	12	5.86 (bd)
	14 a/b	3.14 (dd, $J_{14a,14b}^2 = 16.8, J_{14a,15}^3 = 3.0$ Hz, 2H)
	15	4.42 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H)
	18	6.22 (bs)
	1'	4.98 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H)
	3', 4', 5'	3.62 - 3.49 (m, 6H)
	2'	3.47 - 3.42 (m, 2H)

Tabela 12: Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos de RMN de ^1H de betanina precipitada em D_2O em 500 MHz.(s: singlete, d: dublete, t: tripleto dd: duplo duplete, m: multiplete, b: broad).

Betanina precipitada	Posição do ^1H	δ_{H} (ppm)
2	5.03 (dd, $J_{2,3}^3 = 10.2, 2.3 \text{ Hz}$, 2H)
	4	7.07 (s, 1H)
	7	7.02 (s, 1H)
	11	8.27 (bd)
	12	5.91 (bd)
	14 a/b	3.14 (dd, $J_{14a,14b}^2 = 16.8, J_{14a,15}^3 3.0 \text{ Hz}$, 2H)
	15	4.42 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 1H)
	18	6.23 (bs)
	1'	4.98 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H)

Os perfis espectrofotométricos de soluções aquosas das três amostras foram comparados. Betanina pura apresenta seu máximo de absorção em 536 nm com coeficiente de absorção molar de $65.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ¹¹⁶. Apesar de pouco fluorescente ($\Phi_{\text{FL}} < 10^{-4}$)¹⁸⁹, a excitação entre 500 e 600 nm resulta em emissão de fluorescência laranja com máximo em 615 nm, como se pode observar pelos espectros de excitação e emissão na Figura 39A. Betanina precipitada também apresenta seu máximo de absorção em 536 nm e uma banda com largura semelhante à betanina pura, porém apresenta uma região de alta absorção no UV referente, possivelmente, a açúcares presentes na amostra. A excitação em 530 nm resulta em emissão de fluorescência laranja com máximo em 615 nm. Em seu perfil de excitação é possível verificar um ombro em torno de 490 nm, região do espectro característica de betaxantinas (Figura 39B). Betanina comercial apresenta uma banda de absorção mais larga em comparação a betanina pura e precipitada com máximo em 531 nm. Nota-se ainda uma alta absorção na região UV do espectro, o que é esperado, uma vez que além dos açúcares presentes na beterraba, esta amostra contém dextrina. Sua excitação em torno de 480 nm resulta em emissão de fluorescência verde com máximo em 545 nm como se pode observar pelos espectros de excitação e emissão apresentados na Figura 39C. Seu espectro de excitação mostra um perfil bem definido de betaxantinas com máximo em 483 nm.

Figura 39: Espectros normalizados de absorção (linha preta), emissão (linha vermelha) e excitação (linha azul tracejada) de betanina pura (A), betanina precipitada (B) e betanina comercial em dextrina em água. $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$ para as amostras A e B. $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$ para a amostra C.

3-3.2. Interação entre betanina e paraquat

Metilviologênio em sua forma dicatiônica (MV^{2+}) apresenta um máximo de absorção em 258 nm com um coeficiente de atenuação molar de $14.000 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ referente a transições $\pi\text{-}\pi^*$. Apesar de pouco fluorescente, apresenta um máximo de

emissão em 345 nm.¹⁹⁰ Seu baixo rendimento quântico de fluorescência se deve a desativação favorável por processos não radiativos como a rotação dos anéis piridínicos em torno da ligação σ C-C e a fotorreação existente entre MV^{2+} e água.¹⁹¹⁻¹⁹² A excitação de metilviologênio em água em 280 nm dá origem ao espalhamento Raman da água (310 nm), porém se o $\lambda_{exc} > 310$ nm, observa-se uma fluorescência verde com máximo de emissão em 520 nm. O mesmo comportamento foi observado para outros compostos bipiridínicos e esta banda de emissão foi atribuída não ao MV^{2+} , mas a traços de oxo-viologênios (Esquema 19) presentes na amostra. Esses compostos podem ser formados a partir da incidência de luz e/ou calor na amostra e são altamente fluorescentes.¹⁹³

Esquema 19: Estruturas químicas do oxo – metil viologênio, composto formado a partir MV^{2+} por incidência de luz e/ou calor.

Para verificar a possível interação entre betanina (Bn) e metilviologênio (MV) foram realizados experimentos de espectrofotometria de absorção e fluorescência pelo método da variação contínua e experimentos de supressão de fluorescência. Os experimentos foram realizados em água com as três fontes de betanina. Nos experimentos de supressão de fluorescência, a concentração de Bn foi mantida fixa em 5×10^{-6} mol L⁻¹ e a concentração de MV^{2+} (supressor) foi variada entre 0 e 500×10^{-6} mol L⁻¹. Como não há sobreposição entre o espectro de absorção de MV^{2+} com o espectro de emissão da Bn a ocorrência de supressão deveria estar relacionada à formação de um complexo não fluorescente entre Bn e MV^{2+} .

Nos ensaios de fluorescência acompanhou-se a emissão em 615 nm ($\lambda_{exc} = 530$

nm) para betanina pura e precipitada e 545 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm) para betanina comercial. A intensidade da banda de emissão de betanina não diminui com o aumento da concentração de metilviologênio no meio. Também não são observadas alterações no perfil de absorção de betanina (Figura 40).

Figura 40: Gráficos de absorção e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm (Bn pura e precipitada) e $\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm (Bn comercial) de betanina pura, betanina precipitada e betanina comercial em maltodextrina em dependência da concentração de metilviologênio (MV^{2+}) no meio.

Nos experimentos de espectrofotometria de absorção e fluorescência pelo método da variação contínua foram utilizadas soluções de betanina pura, betanina precipitada, betanina comercial e metilviologênio com a mesma concentração (5×10^{-6} mol L^{-1}). No método da variação contínua, também conhecido como método do gráfico de Job,¹⁹⁴ a soma das concentrações de Bn e MV^{2+} são mantidas constantes na solução e a proporção relativa entre elas é variada. A propriedade mais utilizada nesses estudos é a absorção, mas qualquer propriedade que apresente uma correlação linear com as concentrações de Bn e MV^{2+} pode ser utilizada. A partir da construção de um gráfico contendo ΔAbs (diferença entre absorção de Bn na ausência e na presença de MV^{2+}) em

um determinado comprimento de onda (λ_x) no eixo y e fração molar no eixo x, pode-se determinar qualitativamente a estequiometria do complexo formado pelo máximo da curva obtida.¹⁹⁵

Para os experimentos de absorção, o comprimento de onda acompanhado foi 536 nm para betanina pura e precipitada e 531 nm para betanina comercial. Para os experimentos de fluorescência, o comprimento de onda acompanhado foi 615 nm para betanina pura e precipitada e 545 nm para betanina comercial. Os gráficos de Job para a absorção de betanina precipitada e betanina comercial resultaram em uma dispersão de pontos, indicando que não há a formação de complexo no estado fundamental. Os gráficos de Job para a emissão apresentam-se em forma de uma parábola com a concavidade voltada para baixo, sugerindo a formação de um complexo. Além disso, o ponto máximo da parábola encontra-se fixado em $\chi_{MV} = 0,5$, mostrando que o complexo formado possui estequiometria 1:1 (Figura 42). Os gráficos de absorção e emissão de betanina precipitada e betanina comercial utilizados para a construção dos gráficos de Job encontram-se no Anexo 9.

É importante ressaltar que para o monitoramento por fluorescência, a equação que descreve a formação de um complexo 1:1 entre duas espécies é idêntica à equação de Stern-Volmer, sendo, portanto, impossível determinar, a priori, a constante de estabilidade do complexo. Contudo, a análise do gráfico de Job para a fluorescência mostra que a adição de MV^{2+} aumenta a emissão de Bn ao invés de resultar em supressão.

Figura 41. Espectros de absorção e emissão de betanina na presença de paraquat.

Figura 42: Gráficos de Job de absorção e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$ (Bn pura e precipitada) e $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ (Bn comercial)) de betanina pura, betanina precipitada e betanina comercial em dextrina. A absorção foi acompanhada em 536 nm (Bn pura e precipitada) e 531 nm (Bn comercial). A fluorescência foi acompanhada em 615 nm (Bn pura e precipitada) e 545 (Bn comercial).

A adição de paraquat provoca o aumento da fluorescência de Bn, o que está de acordo com um eventual aumento da rigidez desta betalaína pela sua interação com paraquat. O tratamento para obtenção do gráfico de Job foi aplicado para toda a curva

de emissão, de forma a obter o espectro diferencial da espécie formada quando paraquat e Bn estão na proporção 1:1 (Figura 43). Em cada espectro foi realizado tratamento que dá origem à análise do método de variação contínua, ou seja, as intensidades em 615 nm do último gráfico correspondem aos valores do gráfico de Job da figura anterior. A partir dessa análise é possível observar a presença de uma banda de emissão com intensidade baixa no último gráfico, o que corrobora com a possível formação de um complexo fracamente fluorescente entre Bn e MV^{2+} .

Figura 43: Espectros de emissão de Bn nas condições do experimento para obtenção do Job Plot em água.

3-3.2.1. Efeito do oxigênio sobre a cinética de fotodecomposição de Bn e MV^{2+}

Em solução aquosa, metilviologênio em sua forma oxidada (MV^{2+}) pode ser reduzido ao cátion radicalar ($MV^{\bullet+}$) através da incidência de luz na região do ultravioleta. Na presença de oxigênio, essa reação é deslocada para a formação de

MV^{2+} , porém, em atmosfera inerte, $MV^{•+}$ apresenta-se estável durante horas. Estudos de absorção e fluorescência foram realizados na presença e na ausência de O_2 para verificar a formação de $MV^{•+}$ e sua interação com Bn. Foram utilizadas soluções aquosas de betanina pura ($5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), metilviologênio ($5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e Bn na presença de MV^{2+} na proporção 1:1 (v/v) ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Foram registrados os espectros de absorção, emissão ($\lambda_{\text{exc(Bn)}} = 530 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{\text{em(Bn)}} = 615 \text{ nm}$) das amostras. Pode-se observar o deslocamento batocrômico de 4 nm da banda de absorção de metilviologênio na presença de betanina, o que demonstra um aumento de deslocalização de carga no sistema, o que sugere a presença de interação entre Bn e MV^{2+} . Os espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$) da solução de betanina na presença de metilviologênio são a soma dos espectros individuais de cada um dos compostos.

Após a caracterização do sistema, as soluções aquosas de Bn, MV^{2+} e Bn na presença de MV^{2+} foram irradiadas com luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) na presença de O_2 durante 31 min e a cinética da reação foi acompanhada por espectrofotometria UV-vis. A cinética de degradação de betanina pura foi acompanhada por 18 min, pois nesse tempo houve degradação total da betalaína. Na Figura 44 pode-se observar o deslocamento hipsocrômico de 16 nm da banda de absorção com máximo em 536 nm nas soluções de Bn na ausência e na presença de MV^{2+} ao decorrer da cinética. Também é possível observar o surgimento de uma banda de absorção em torno de 400 nm que pode estar relacionada à formação de neobetanina por um processo de fotooxidação. A banda de absorção de MV^{2+} com máximo em 258 nm sofre um deslocamento batocrômico de 4 nm na presença de betanina. Além disso, os espectros de absorção de MV^{2+} na ausência e na presença de betanina apresentam um ponto isosbéstico em

aproximadamente 300 nm.

Na ausência de O_2 , o perfil de absorção de betanina e metilviologênio durante a cinética com irradiação de luz na região do UV é semelhante ao observado na presença de O_2 . Neste caso, as soluções aquosas de Bn, MV^{2+} e Bn na presença de MV^{2+} foram irradiadas com luz UV ($\lambda = 254$ nm) durante 43 minutos. Na Figura 44 pode-se observar o deslocamento hipsocrômico de 13 nm da banda de absorção com máximo em 536 nm nas soluções de Bn na ausência e na presença de MV^{2+} ao decorrer da cinética. Também é possível observar o surgimento de uma banda de absorção em torno de 400 nm que pode estar relacionada à formação de neobetanina por um processo de fotooxidação. A banda de absorção de MV^{2+} com máximo em 258 nm sofre um deslocamento batocrômico de 2 nm na presença de betanina. Além disso, os espectros de absorção de MV^{2+} na ausência e na presença de betanina apresentam um ponto isobéstico em aproximadamente 300 nm.

Figura 44: Espectros de absorção de betanina, metil viologênio e betanina na presença de metil viologênio na proporção 1:1(v/v) em água em função do tempo de irradiação de luz ($\lambda = 254$ nm) na ausência e na presença de luz. $t_{irr} = 18$ minutos para Bn e 31 minutos para MV^{2+} e a mistura de Bn e MV^{2+} na presença de O_2 . $t_{irr} = 43$ minutos na ausência de O_2 .

Dado o alto grau de sobreposição e complexidade de alguns espectros, decidiu-se por realizar o tratamento cinético com os valores de intensidade obtidos por espectroscopia de segunda derivada. Esta abordagem diminui efeitos de linha base e

sobreposição de bandas. Os espectros de segunda derivada são apresentados na Figura 45.

Figura 45: Segunda derivada dos espectros de absorção UV-Vis para Bn, MV^{2+} e Bn+ MV^{2+} em função do tempo.

Os perfis cinéticos na presença e ausência de O_2 são apresentados na Figura 46. Para a reação de degradação de betanina em água, os máximos de absorção versus

tempo foram ajustados com uma função monoexponencial para determinar o valor da constante cinética observada, k_{obs} . A reação segue uma cinética de primeira ordem com k_{obs} de $0,8 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$, correspondendo a um tempo de vida ($t_{1/2} = 8,2 \text{ min}$). Na presença de metilviologênio, betanina apresenta um comportamento diferente. Até 14 minutos de irradiação, o sistema parece seguir uma cinética de ordem zero e, a partir desse tempo, passa a seguir uma cinética de primeira ordem com k_{obs} de $1,5 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ e $t_{1/2} = 4,6 \text{ min}$. Esse perfil de decaimento sugere a ocorrência de uma reação de ordem zero catalisada, por exemplo, por metilviologênio.

O perfil de degradação de metilviologênio em água parece seguir uma cinética de ordem zero, mas na presença de betanina são observadas mudanças nesse perfil. Até 11 min de irradiação, os valores de absorção em 258 nm são constantes e, a partir desse ponto, o sistema passa a seguir uma cinética de ordem zero.

Apesar de possuírem perfis de absorção semelhantes, os experimentos realizados em atmosfera inerte apresentam decaimentos e valores de constante cinética diferentes dos obtidos na presença de O_2 . Para a reação de degradação de betanina em água e betanina na presença de metilviologênio, os máximos de absorção versus tempo foram ajustados com uma função monoexponencial para determinar o valor da constante cinética observada, k_{obs} . As reações seguem uma cinética de primeira ordem com k_{obs} de $0,55 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$, correspondendo a um tempo de vida ($t_{1/2} = 12,4 \text{ min}$) para betanina pura e k_{obs} de $0,64 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2} = 10,8 \text{ min}$) para betanina na presença de metilviologênio.

O perfil de degradação de metilviologênio em água segue uma cinética de ordem zero até 26 min. Após esse tempo, a absorção parece ficar constante. Na presença de betanina, os valores de absorção em 258 nm são constantes até aproximadamente 6

minutos e, a partir desse ponto, o sistema passa a seguir uma cinética de ordem zero.

Os resultados sugerem que na ausência de O_2 , a fotodegradação de betanina não é afetada por paraquat. Contudo, após 20 min de reação paraquat atinge o equilíbrio enquanto na presença de Bn este herbicida continua se degradando, sugerindo que o produto de degradação da Bn possa reagir de alguma forma com paraquat. Na presença de oxigênio ocorre um processo mais complexo no qual MV^{2+} ou um produto de fotodegradação catalisa a decomposição de Bn, mas o paraquat tem um certo período de latência para sua decomposição. Esse resultado poderia ser racionalizado considerando-se o equilíbrio entre a forma oxidada MV^{2+} e o radical cátion de MV, que é deslocado para esquerda pelo O_2 , que é convertido em ânion superóxido (que pode destruir Bn). Da mesma forma como na ausência de O_2 , o produto de degradação da Bn parece catalisar a decomposição de MV após 15 min de reação.

Figura 46: Monitoramento da variação da absorção nos comprimentos de onda máximo da Bn (542 nm após segunda derivada) e MV^{2+} (259 nm depois da segunda derivada) em função do tempo para Bn pura, MV^{2+} puro e misturas entre os dois.

3-3.2.2. Tentativa de caracterização do complexo Bn-MV²⁺ por espectroscopia de RMN

Como os experimentos realizados com betanina pura sugeriram a formação de um complexo no estado fundamental, estudos de ressonância magnética nuclear foram realizados para verificar possíveis mudanças ou deslocamentos de sinais nos espectros de ¹H de betanina e metilviologênio.

Também foram realizados experimentos de NOESY para verificar uma possível interação entre os hidrogênios dos dois compostos. Primeiramente, 0,88 mg de betanina pura ($0,86 \times 10^{-6}$ mol) foi solubilizado em 600 µL de D₂O e um espectro de ¹H-RMN foi registrado em um equipamento operando em uma frequência de 500 MHz. Solução concentrada de MV²⁺ ($6,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em D₂O foi adicionada ao tubo em diferentes proporções até os sinais correspondentes ao MV²⁺ apresentarem intensidade semelhante aos sinais da betanina. Ao atingir 0.3 equiv. de MV²⁺ em relação à Bn, as intensidades dos sinais tornaram-se equivalentes. Para cada concentração de MV²⁺ foi registrado um espectro de ¹H.

Na Figura 47 pode-se observar ampliações do espectro de Bn na ausência de MV²⁺ e na presença de 0,15 e 0,30 equiv. de MV²⁺. O aumento da concentração de metilviologênio resulta no deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênios H-1', H-2, H-4, H-7, H-14 a/b e H-15 da betanina. Em todos os casos, os picos deslocaram para região de campo alto, sendo que o H-2 apresentou o maior deslocamento; 0,01 ppm. O pico referente ao H-15 se sobrepõe com um singlete referente aos hidrogênios do grupo metila do MV²⁺. Os sinais do MV²⁺ não apresentaram deslocamento.

Figura 47: Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de ^1H de betanina pura em água na ausência de MV^{2+} e na presença de 0,15 e 0,30 equivalentes de MV^{2+} . Destaque para os hidrogênios 4, 7, 2, 1', 14 a/b e 15.

Para verificar a formação do complexo, o sistema foi irradiado com luz visível durante 5 minutos. Não foi verificada mudança nos deslocamentos químicos do espectro de ^1H . Para verificar uma possível interação entre os hidrogênios de betanina e os hidrogênios de metilviologênio foi realizado um experimento de NOESY (Figura 48). Não foi possível observar no espectro alguma correlação entre os sinais das duas moléculas. As correlações apresentadas no mapa correspondem apenas aos hidrogênios de cada molécula interagindo entre si separadamente.

Figura 48: Espectro de NOESY 2D de Bn na presença de 0,3 equivalente de MV^{2+} em D_2O após irradiação de luz visível durante 5 minutos, 500 MHz.

3-5. Conclusão

Betanina e paraquat são compostos com grande diferença em seus potenciais redox, sendo amplamente doadores (no estado fundamental) e aceptores de elétron (no estado excitado). O estudo do efeito da concentração de paraquat sobre a fluorescência de betanina sugere a formação de um complexo fracamente fluorescente, que possivelmente tem características de transferência de carga. Na presença de irradiação com luz ultravioleta, observa-se a decomposição tanto da betanina quanto do paraquat, com constantes cinéticas que dependem da presença ou ausência de oxigênio. Contudo, a decomposição de Bn se torna mais lenta na presença de paraquat quando O_2 está dissolvido em solução. Experimentos de espectroscopia de RMN foram realizados para caracterizar a interação entre os compostos. Embora ocorra deslocamento dos sinais de H específicos, não há NOE entre Bn e MV^{2+} , eventualmente pela baixa concentração de complexo formado nas condições do experimento. Desta forma, embora não sejam conclusivos, os resultados sugerem que betanina, ou algum produto de sua decomposição, catalisa a transformação de MV^{2+} , conforme monitorado por espectroscopia de absorção. Este resultado oferece as bases para estudos mais elaborados para a aplicação do par betanina/paraquat em células a combustível.

3-6. Parte experimental

As substâncias químicas utilizadas nesta parte do trabalho estão listadas na Tabela 13.

Tabela 13: Reagentes e solventes utilizados no trabalho.

Reagente/Solvente	Fórmula/Abreviatura	Fornecedor	Obs.
Acetonitrila	MeCN	Tedia	HPLC
Ácido clorídrico concentrado	HCl	Synth	36,5-38%
Ácido fórmico	HCOOH	Fluka	>98%
Água deuterada	D ₂ O	S.A.	≥99.9% átomos D
Betanina comercial em dextrina		abcr GmbH	
Dicloreto de metilviologênio hidratado	MV ²⁺	S.A.	98%
Etanol	EtOH	Synth	99,5%
Isopropanol	i-PrOH	Synth	99,5%

S.A.: Sigma Aldrich

Obtenção e purificação de betanina

Foram usadas três fontes de betanina: suco de beterraba em pó diluído com dextrina (amostra A), betanina precipitada de suco de beterraba (amostra B) e betanina purificada por HPLC (amostra C).

Betanina precipitada de suco de beterraba

Betanina foi obtida a partir do suco de beterrabas vermelhas. Beterrabas foram processadas em uma centrífuga de alimentos tipo *juicer*. O suco obtido foi centrifugado

(10 min, 5 °C, 7.000 ×g) e o sobrenadante foi filtrado por uma camada de sílica gel de 2 cm em um funil de Buchner de 10 cm de diâmetro ligado a um kitassato conectado a uma trompa de vácuo. O pH do filtrado foi levado a 2 com a adição de HCl concentrado. A solução resultante foi transferida para um tubo falcon (5 mL) e adicionaram-se 10 mL de isopropanol (volume final 15 mL, proporção 2:1 v/v). A solução foi congelada a -72 °C em um banho de etanol e gelo seco e mantida por quatro dias a -20 °C na ausência de luz para garantir a ruptura de todas as células vegetais. Após esse período, os tubos foram descongelados e, quando atingiram 5 °C, as soluções foram centrifugadas (15 min, 5 °C, 5.000 ×g). O precipitado foi ressuspenso em etanol (5 mL) e a suspensão foi submetida a centrifugação (10 min, 5 °C, 5.000 ×g). O precipitado magenta foi dissolvido em água (5 mL) e a solução foi centrifugada (5 min, 5 °C, 5.000 ×g). O sobrenadante foi separado e liofilizado, resultando em betanina bruta. Rendimento: 100 mg de betanina a cada 500 ml (aproximadamente 1,5 kg beterraba) de suco.

Betanina purificada por HPLC

Betanina obtida pelo processo de precipitação foi purificada por HPLC em condições de fase reversa e escala semi-preparativa em um equipamento Shimadzu 20A equipado com detector PDA SPD20A, nas condições: coluna de Sílica C-18 Luna (5µm, 250 x 10 mm, Phenomenex), em condição isocrática de 10% de B em 40 minutos com fluxo de 3 mL min⁻¹. A mistura de solvente utilizada foi solvente A: 0,05% ácido fórmico em água e solvente B: 0,05% TFA em acetonitrila e a corrida foi acompanhada em 254 nm. As frações correspondentes a BtP foram coletadas entre 19,7 min e 20,7 min. As frações coletadas foram analisadas por espectrofotometria UV-vis e HPLC analítico.

Análise cromatográfica

Betanina purificada foi analisada por HPLC analítico em um equipamento Shimadzu 20A equipado com detector PDA SPD20A em fase reversa, nas condições: C18 Ascentis® (250 x 4,6 mm, Supelco), em modo isocrático 20% de B e 15 minutos, com fluxo de 1 mL min⁻¹ detecção em $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ e 536 nm. A mistura de solventes utilizada foi solvente A: 0,05% ácido fórmico em água e solvente B: 0,05% ácido fórmico em acetonitrila. Os dados foram obtidos utilizando o programa de aquisição LCSolution.

Caracterização estrutural

A caracterização estrutural da betanina pura foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética (RMN), realizada na Central Analítica do IQ-USP e por espectrometria de massas por injeção direta com ionização por eletrospray em modo positivo (MS(ESI+)), realizada no laboratório do Professor Doutor Thiago Carita Correra.

Espectrometria de ressonância nuclear magnética

O experimento de RMN de ¹H foi obtido a 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500,13 MHz, equipado com uma sonda de tripla ressonância (TXI) de 5mm com detecção inversa. Para a análise de betanina, cerca de 5 mg de Bn foi solubilizada em 700 µL de D₂O. Os ensaios de ¹H foi realizado com as soluções em tubos de 5mm, com ns = 256, td = 64K, ds = 0.

Espectrometria de massas por injeção direta

A análise por espectrometria de massas foi realizada em modo positivo em um

espectrômetro de massas do tipo ion trap (Amazon SL - Bruker) modificado para realização de espectroscopia de íons (IRMPD). As amostras foram analisadas por injeção direta (180 uL/h) e a fonte de íons mantida a 4500 V em relação ao terra, o gás de nebulização em 7.24 psi e o gás de secagem 4 L/min. A unidade de dessolvatação foi mantida a 180 °C. Os espectros foram adquiridos no modo de alta resolução (Δm à largura total do pico na metade de sua altura máxima - FWHM < 0,2) com 50 varreduras.

Caracterização fotofísica de betanina

Espectrometria de absorção, emissão e excitação.

Os espectros de absorção foram realizados em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50 e os espectros de emissão e excitação foram realizados em um espectrofotômetro Varian Cary Eclipse. Os espectros foram adquiridos em água em cubeta de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 1 cm. Os parâmetros utilizados para os espectros de emissão e excitação de betanina precipitada e betanina pura foram, respectivamente, $\lambda_{exc} = 530$ nm, $f_{ex} = f_{em} = 20$ nm, tensão = 600 V e $\lambda_{em} = 615$ nm, $f_{ex} = f_{em} = 20$ nm, tensão = 600 V. Os parâmetros utilizados para os espectros de emissão e excitação de betanina comercial em dextrina foram, respectivamente, $\lambda_{exc} = 480$ nm, $f_{ex} = f_{em} = 20$ nm, tensão = 600 V e $\lambda_{em} = 545$ nm, $f_{ex} = f_{em} = 20$ nm, tensão = 600 V.

Interação entre betanina e metilviologênio

Espectroscopia de absorção e emissão de betanina na presença de paraquat

O estudo de interação entre betanina e metilviologênio foi dividido em duas partes; supressão de fluorescência da betanina pelo metilviologênio e estudos de

absorção e emissão pelo método da variação contínua. Para os estudos de supressão de fluorescência, a concentração de Bn foi mantida fixa na cubeta ($V_f = 2 \text{ mL}$) em $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a partir de uma solução estoque $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de MV foi variada de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a 500 mol L^{-1} (Tabela 14), a partir de uma solução estoque de metilviologênio ($5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Nos estudos pelo método da variação contínua, as concentrações de Bn e MV na cubeta foram mantidas fixas em $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ e a fração molar de cada um deles foi variada (Tabela 15 e Tabela 16). Os experimentos foram realizados em água. As medidas de absorção e emissão foram realizadas em cubetas de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 10 mm em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50 e um espectrofotômetro Varian Cary Eclipse, respectivamente. Para cada concentração de MV foram registrados um espectro de absorção em uma faixa de varredura de 200 – 700 nm e espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$ (betanina pura e betanina precipitada) e 480 nm (betanina comercial), $f_{\text{exc}} = 10 \text{ nm}$, $f_{\text{em}} = 20 \text{ nm}$, tensão = 600 V).

Tabela 14: Variação da concentração de metilviologênio utilizada nos estudos de supressão de fluorescência de betanina.

Nº de equivalentes	Concentração na cubeta (mol L^{-1})
0,2	1×10^{-6}
0,6	3×10^{-6}
1	5×10^{-6}
1,4	7×10^{-6}
1,8	9×10^{-6}
2,2	11×10^{-6}
2,6	13×10^{-6}

3	15×10^{-6}
100	500×10^{-6}

Tabela 15: Variação da fração molar de Bn e MV^{2+} nos experimentos de absorção e emissão pelo método da variação contínua realizados com betanina pura e betanina precipitada.

Fração molar Bn	Volume de Bn (μL)	Fração molar MV^{2+}	Volume de MV^{2+} (μL)
1	2000	0	0
0,75	1500	0,25	500
0,5	1000	0,5	1000
0,25	500	0,75	1500
0	0	1	2000

Tabela 16: Variação da fração molar de Bn e MV^{2+} nos experimentos de absorção e emissão pelo método da variação contínua realizados com betanina comercial em dextrina.

Fração molar Bn	Volume de Bn (μL)	Fração molar MV^{2+}	Volume de MV^{2+} (μL)
1	2000	0	0
0,875	1750	0,125	250
0,75	1500	0,25	500
0,625	1250	0,375	750
0,5	1000	0,5	1000
0,375	750	0,625	1250
0,25	500	0,75	1500
0,125	250	0,875	1750
0	0	1	2000

Efeito do oxigênio sobre a cinética de fotodecomposição de Bn e MV^{2+}

Soluções aquosas de betanina pura (5×10^{-6} M), metil viologênio (5×10^{-6} M) e Bn na presença de MV^{2+} na proporção 1:1 (v/v) ($2,5 \times 10^{-6}$ M) foram irradiadas com luz na região do ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) na ausência e na presença de oxigênio. As soluções utilizadas para realizar os experimentos na ausência de O_2 foram purgadas com

N_{2(g)}, transferidas para a cubeta de quartzo e tampadas logo em seguida. Espectros de absorção foram registrados durante 31 minutos para os experimentos realizados na presença de O₂ e 43 minutos na ausência de O₂. Foram registrados os espectros de absorção, emissão ($\lambda_{\text{exc(Bn)}} = 530 \text{ nm}$), excitação ($\lambda_{\text{em(Bn)}} = 615 \text{ nm}$) e sincronizado ($\Delta = 50 \text{ nm}$) das amostras antes e após a irradiação das soluções. As medidas de absorção, emissão e excitação foram realizadas em cubetas de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 10 mm em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50 e um espectrofotômetro Varian Cary Eclipse, respectivamente. Os espectros de absorção foram adquiridos em uma faixa de varredura de 200 – 700 nm e espectros de emissão, excitação e sincronizado foram adquiridos nas seguintes condições; $f_{\text{exc}} = 20 \text{ nm}$, $f_{\text{em}} = 20 \text{ nm}$, tensão = 600 V.

Tentativa de caracterização do complexo Bn-MV²⁺ por espectroscopia de RMN

Para o estudo da interação entre Bn e MV²⁺ por espectrometria de ressonância magnética nuclear foram realizados experimentos de RMN de ¹H e NOESY 2D. Os experimentos de RMN de ¹H foram obtidos a 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500,13 MHz, equipado com uma sonda de tripla ressonância (TXI) de 5mm com detecção inversa. Os ensaios de ¹H foram realizados com as soluções em tubos de 5mm, com ns = 256, td = 64K, ds = 0.

Primeiramente, 0,88 mg de Bn ($0,86 \times 10^{-6} \text{ mol}$) foi solubilizado em 600 μL de D₂O e um espectro de ¹H foi registrado. Solução concentrada de MV²⁺ ($6,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em D₂O foi adicionada ao tubo em diferentes proporções até que a intensidade dos sinais de MV²⁺ fossem semelhantes às observadas para Bn e algum deslocamento dos sinais fosse observado, no caso 0,30 equivalentes. Para cada concentração de MV²⁺ foi registrado um espectro de ¹H. Ao atingir 0,3 equivalentes de MV²⁺ em relação a Bn,

também foi registrado um espectro bidimensional NOESY (noesygp-phpr) com $ns = 32$, $ds = 32$, $td = 2048 \times 512$.

Conclusão Geral

Nesta tese foram realizados estudos da interação de betalaínas naturais com diferentes classes de compostos químicos. As consequências destas interações foram interpretadas de forma a entender as funções de betalaínas *em plantas* e para desenvolver aplicações que dependam de processos fotoredox e da estabilização destas betalaínas.

No Capítulo 1, betanina foi encapsulada em emulsões A/O/A usando a técnica de emulsificação por microcanais (MCE). As emulsões formuladas apresentaram-se monodispersas e podem ser utilizadas na preparação de alimentos funcionais mantidos sob refrigeração por, pelo menos, 7 dias. Além disso, essas emulsões possibilitam a utilização de betanina em formulações hidrofílicas.

No Capítulo 2 observou-se a supressão de fluorescência de MMF na presença de BtP. O mecanismo pelo qual essa supressão ocorre mostrou-se dependente do meio e os experimentos sugerem que a supressão estática seja mais relevante, ocorrendo a formação de um complexo entre as espécies. Em etanol, a interação entre estas espécies e água leva a decomposição do MMF, o que pode ser relevante no contexto da interação de antocianinas e betalaínas *in vivo*.

No Capítulo 3, o estudo do efeito da concentração de paraquat sobre a fluorescência de betanina sugere a formação de um complexo com características de transferência de carga. Além disso, estudo cinético de fotodecomposição de betanina e paraquat sugere que betanina interfere na regeneração da forma oxidada do paraquat por oxigênio. Este resultado oferece as bases para estudos mais elaborados para a aplicação do par betanina/paraquat em células a combustível.

Referências

1. Delgado-Vargas, F.; Jimenez, A. R.; Paredes-Lopez, O., Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2000**, *40* (3), 173-289.
2. Tanaka, Y.; Sasaki, N.; Ohmiya, A., Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* **2008**, *54* (4), 733-749.
3. Abdel-Hameed, E. S. S.; Nagaty, M. A.; Salman, M. S.; Bazaid, S. A., Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chemistry* **2014**, *160*, 31-38.
4. Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Cipak, A.; Duburs, G.; Horáková, L. U.; Luczaj, W.; Majekova, M.; Odysseos, A. D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E. b.; Stefek, M.; Strosová, M.; Tirzitis, G.; Venskutonis, P. R.; Viskupicova, J.; Vranka, P. S.; Zarkovic, N., Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radical Research* **2010**, *44* (10), 1216-1262.
5. Gonçalves, L. C. P.; Di Genova, B. M.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Bastos, E. L., Effect of dielectric microwave heating on color and antiradical capacity of betanin. *Journal of Food Engineering* **2013**, *118*, 49-55.
6. Quina, F. H.; Moreira, P. F.; Vautier-Giongo, C.; Rettori, D.; Rodrigues, R. F.; Freitas, A. A.; Silva, P. F.; Macanita, A. L., Photochemistry of anthocyanins and their biological role in plant tissues. *Pure Applied Chemistry* **2009**, *81* (9), 1687-1694.
7. Kaimainen, M. Stability of Natural Colorants of Plant Origin. University of Turku, Finland, 2014.
8. Grotewold, E., The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review Plant Biology* **2006**, *57*, 761-780.
9. Gonçalves, L. C. P.; Marcato, A. C.; Rodrigues, A. C. B.; Pagano, A. P. E.; De Freitas, B. C.; De Machado, C. O.; Nakashima, K. K.; Esteves, L. C.; Lopes, N. B.;

Bastos, E. L., Betalains: From the colors of beetroots to the fluorescence of flowers. *Revista Virtual de Quimica* **2015**, 7 (1), 292-309.

10. Viswanathan, R.; Prabhakaran, E. N.; Plotkin, M. A.; Johnston, J. N., Free Radical-Mediated Aryl Amination and Its Use in a Convergent [3 + 2] Strategy for Enantioselective Indoline α -Amino Acid Synthesis. *Journal of American Chemical Society* **2002**, 125 (1), 163-168.

11. Davies, K. M.; Albert, N. W.; Schwinn, K. E., From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning. *Functional Plant Biology* **2012**, 39 (8), 619-638.

12. Nadia, M.; Marzia, I., Anthocyanins and Betalains. In *Food Analysis by HPLC, Third Edition*, CRC Press: 2012; pp 757-776.

13. Stintzing, F. C.; Carle, R., Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* **2004**, 15 (1), 19-38.

14. Stafford, H. A., Anthocyanins and Betalains - Evolution of the Mutually Exclusive Pathways. *Plant Science* **1994**, 101 (2), 91-98.

15. Ferreira da Silva, P.; Lima, J. C.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L., Excited-State Electron Transfer in Anthocyanins and Related Flavylum Salts. *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, 108 (46), 10133-10140.

16. Carletti, G.; Nervo, G.; Cattivelli, L., Flavonoids and Melanins: a common strategy across two kingdoms. *Internacional Journal of Biological Science* **2014**, 10 (10), 1159-70.

17. Zhang, J. F.; Hou, X.; Ahmad, H.; Zhang, H.; Zhang, L. L.; Wang, T., Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chemistry* **2014**, 145, 57-65.

18. Hoshino, T.; Goto, T., Anthocyanin self-aggregates. 5. Effects of pH and concentration on the self-association of Malvin quinonoidal base - electronic and circular dichroic studies. *Tetrahedron Letters* **1990**, 31 (11), 1593-6.

19. Brouillard, R.; Lang, J., The hemiacetal–cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Canadian Journal of Chemistry* **1990**, *68* (5), 755-761.
20. Roque, A.; Lima, J. C.; Parola, A. J.; Pina, F., Substitution and solvent effects in the chalcones isomerization barrier of flavylum photochromic systems. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, *6* (4), 381-385.
21. Iwata, S.; Nishino, T.; Inoue, H.; Nagata, N.; Satomi, Y.; Nishino, H.; Shibata, S., Antitumorigenic Activities of Chalcones (II). Photo-isomerization of Chalcones and the Correlation with Their Biological Activities. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **1997**, *20* (12), 1266-1270.
22. Norikane, Y.; Itoh, H.; Arai, T., Photochemistry of 2'-Hydroxychalcone. One-Way Cis–Trans Photoisomerization Induced by Adiabatic Intramolecular Hydrogen Atom Transfer. *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106* (11), 2766-2776.
23. Castañeda-Ovando et al, A., Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 859-871.
24. Asen, S.; Stewart, R. N.; Norris, K. H., Anthocyanin, flavonol copigments, and pH responsible for larkspur flower color. *Phytochemistry* **1975**, *14* (12), 2677-82.
25. Ellestad, G. A., Structure and chiroptical properties of supramolecular flower pigments. *Chirality* **2006**, *18* (2), 134-144.
26. Gonnet, J.-F., Origin of the color of cv. Rhapsody in Blue rose and some other so-called "blue" roses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (17), 4990-4994.
27. Kondo, T.; Oyama, K.-I.; Yoshida, K., Chiral molecular recognition on formation of a metalloanthocyanin: a supramolecular metal complex pigment from blue flowers of *Salvia patens*. *Angewandte Chemie, Int. Ed.* **2001**, *40* (5), 894-897.
28. Kondo, T.; Ueda, M.; Isobe, M.; Goto, T., A new molecular mechanism of blue color development with protocyanin, a supramolecular pigment from cornflower, *Centaurea cyanus*. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (45), 8307-8310.

29. Kondo, T.; Yoshida, K.; Nakagawa, A.; Kawai, T.; Tamura, H.; Goto, T., Structural basis of blue-color development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature (London)* **1992**, 358 (6386), 515-18.
30. Moncada, M. C.; Moura, S.; Melo, M. J.; Roque, A.; Lodeiro, C.; Pina, F., Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts - A source for blue and purple color. *Inorganica Chimica Acta* **2003**, 356, 51-61.
31. Newsome, A. G.; Culver, C. A.; van Breemen, R. B., Nature's palette: the search for natural blue colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62 (28), 6498-511.
32. da Silva, P. F.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Macanita, A. L.; Quina, F. H., Charge-transfer complexation as a general phenomenon in the copigmentation of anthocyanins. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, 109 (32), 7329-7338.
33. Bartoloni, F. H.; Gonçalves, L. C. P.; Rodrigues, A. C. B.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Bastos, E. L., Photophysics and hydrolytic stability of betalains in aqueous trifluoroethanol. *Monatshefte für Chemie* **2013**, 144, 567-571.
34. Gonçalves, L. C. P.; Tonelli, R. R.; Bagnaresi, P.; Mortara, R. A.; Ferreira, A. G.; Bastos, E. L., A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell Imaging of *Plasmodium*-Infected Erythrocytes. *Plos One* **2013**, 8 (1), e53874.
35. Tesoriere, L.; Attanzio, A.; Allegra, M.; Livrea, M. A., Dietary indicaxanthin from cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) fruit prevents eryptosis induced by oxysterols in a hypercholesterolaemia-relevant proportion and adhesion of human erythrocytes to endothelial cell layers. *British Journal of Nutrition* **2015**, 1-8.
36. Tesoriere, L.; Butera, D.; D_Arpa, D.; Di_Gaudio, F.; Allegra, M.; Gentile, C.; Livrea, M. A., Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radical Research* **2003**, 37 (6), 689-96.
37. Tesoriere, L.; Allegra, M.; Butera, D.; Gentile, C.; Livrea, M. A., Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells. *Free Radical Research* **2006**, 40 (7), 753-761.
38. Kanner, J.; Harel, S.; Granit, R., Betalains - a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chemistry* **2001**, 49 (11), 5178-5185.

39. Tesoriere, L.; Allegra, M.; Butera, D.; Livrea, M. A., Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, 80 (4), 941-945.
40. Attoe, E. L.; Von Elbe, J. H., Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *Journal of Food Science* **1981**, 46 (6), 1934-1937.
41. Pasch, J. H.; Vonelbe, J. H., Betanine Degradation as Influenced by Water Activity. *Journal of Food Science* **1975**, 40 (6), 1145-1146.
42. Cohen, E.; Saguy, I., Effect of water activity and moisture content on the stability of beet powder pigments. *Journal of Food Science* **1983**, 48, 703-707.
43. Huang, A. S.; Vonelbe, J. H., Effect of Ph on the Degradation and Regeneration of Betanine. *Journal of Food Science* **1987**, 52 (6), 1689-1693.
44. Von Elbe, J. H.; Maing, I. H.; Amundson, C. H., Colour stability of betanin. *Journal of Food Science* **1974**, 39, 334-337.
45. Saguy, I., Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-I): influence of pH and temperature. *Journal of Food Science* **1979**, 44, 1554-1555.
46. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science* **2004**, 69 (6), C491-C498.
47. Wybraniec, S.; Mizrahi, Y., Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53 (17), 6704-6712.
48. Bastos, E. L.; Gonçalves, L. C. P., Microwave-assisted extraction of betalains. In *Water extraction of bioactive compounds: from plants to drug development*, González, H. D.; Muñoz, M. J. G., Eds. Elsevier Inc.: Cambridge, 2017; pp 245-268.
49. Girod, P. A.; Zryd, J. P., Clonal Variability and Light Induction of Betalain Synthesis in Red Beet Cell-Cultures. *Plant Cell Reports* **1987**, 6 (1), 27-30.
50. Giudici De Nicola, M.; Amico, V.; Piattelli, M., Effect of White and Far-Red Light on Betalain Formation. *Phytochemistry* **1974**, 13 (2), 439-442.

51. Shin, K. S.; Murthy, H. N.; Heo, J. W.; Paek, K. Y., Induction of betalain pigmentation in hairy roots of red beet under different radiation sources. *Biologia Plantarum* **2003**, *47* (1), 149-152.
52. Wohlpart, A.; Mabry, T. J., On Light Requirement for Betalain Biogenesis. *Plant Physiology* **1968**, *43* (3), 457-459.
53. Attoe, E. L.; Von Elbe, J. H., Oxygen involvement in betanine degradation: effect of antioxidants. *Journal of Food Science* **1985**, *50* (1), 106-110.
54. Cai, Y. Z.; Sun, M.; Corke, H., Colorant properties and stability of Amaranthus betacyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (11), 4491-4495.
55. Huang, A. S.; Von Elbe, J. H., Stability comparison of two betacyanine pigments - Amaranthine and betanine. *Journal of Food Science* **1986**, *51*, 670-674.
56. von Elbe, J. H.; Maing, I.-Y.; Amundson, C. H., Color stability of betanin. *Journal of Food Science* **1974**, *39* (2), 334-7.
57. Stintzing, F. C.; Carle, R., Betalains - emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science and Technoogyl*. **2007**, *18* (10), 514-525.
58. Sapers, G. M.; Hornstein, J. S., Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science* **1979**, *49*, 99-101.
59. Steglich, W.; Strack, D., Betalains. In *The Alkaloids*, Brossi, A., Ed. Academic Press: London, 1990; pp 1-62.
60. Singer, J. W.; Von Elbe, J. H., Degradation rates of vulgaxanthine I. *Journal of Food Science* **1980**, *45*, 489-491.
61. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science* **2006**, *71* (4), R41-R50.
62. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. *European Food Research and Technology* **2004**, *219* (4), 377-385.

63. Wybraniec, S., Formation of decarboxylated betacyanins in heated purified betacyanin fractions from red beet root (*Beta vulgaris* L.) monitored by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53 (9), 3483-3487.
64. Schwartz, S. J.; von Elbe, J. H., Identification of betanin degradation products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **1983**, 176 (6), 448-453.
65. Czapski, J., The Effect of Heating Conditions on Losses and Regeneration of Betacyanins. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **1985**, 180 (1), 21-25.
66. von Elbe, J. H.; Schwartz, S. J.; Hildenbrand, B. E., Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *Journal of Food Science* **1981**, 46 (6), 1713-1715.
67. Cai, Y. Z.; Corke, H., Effect of postharvest treatments on *Amaranthus* betacyanin degradation evaluated by visible/near-infrared spectroscopy. *Journal of Food Science* **2001**, 66 (8), 1112-1118.
68. Blandamer, M. J.; Engberts, J. B. F. N.; Gleeson, P. T.; Reis, J. C. R., Activity of water in aqueous systems; A frequently neglected property. *Chemical Society Reviews* **2005**, 34 (5).
69. A atividade de água (aW) é definida como a razão entre as pressões de vapor de um líquido (e.g., uma solução) e da água pura na mesma temperatura, i.e., $aW = 1$ indica água pura e $aW = 0$ indica ausência de água "livre".
70. Persistência se refere a uma espécie com tempo de vida longo e está associada com a cinética de reação, i.e., a barreira de ativação para qualquer reação é alta. Desta forma, a persistência é bastante dependente do contexto (meio) no qual a substância está submetida. Estabilidade por outro lado é um conceito termodinâmico intrínseco de uma dada substância em relação a um referencial. Portanto, dizer que uma substância é estável não significa dizer que seu tempo de vida é longo em termos absolutos, mas que a variação de energia livre para sua transformação em um composto referência instável é maior que zero.

71. Pellerin, P.; O'Neill, M. A., The interaction of the pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II with metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analisis Mag* **1998**, *26*, 32-36.
72. Kearsley, M. W.; Katsaboxakis, K. Z., Stability and use of natural colours in foods. *Journal of Food Technology* **1980**, *15*, 501-514.
73. Khan, M. I., Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry* **2016**, *197*, 1280-1285.
74. Gandia-Herrero, F.; Jimenez-Atienzar, M.; Cabanes, J.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J., Stabilization of the Bioactive Pigment of Opuntia Fruits through Maltodextrin Encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, *58*, 10646–10652.
75. Saenz, C.; Tapia, S.; Chavez, J.; Robert, P., Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. **2009**, *114* (2), 616-622.
76. Gandia-Herrero, F.; Cabanes, J.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F.; Jimenez-Atienzar, M., Encapsulation of the Most Potent Antioxidant Betalains in Edible Matrixes as Powders of Different Colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, *61* (18), 4294-4302.
77. Kaimainen, M.; Marze, S.; Jarvenpaa, E.; Anton, M.; Huopalahti, R., Encapsulation of betalain into w/o/w double emulsion and release during in vitro intestinal lipid digestion. *Lwt-Food Science Technology* **2015**, *60* (2), 899-904.
78. Bomgardner, M. M., The New Naturals. *Chemical & Engineering News* **2014**, *92* (6), 10-+.
79. Kaimainen, M. <Diss2014Kaimainen.pdf>. University of Turku, Finland, 2014.
80. Asioli, D.; Aschemann-Witzel, J.; Caputo, V.; Vecchio, R.; Annunziata, A.; Naes, T.; Varela, P., Making sense of the "clean label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International* **2017**, *99* (Pt 1), 58-71.

81. Oplatowska-Stachowiak, M.; Elliott, C. T., Food colors: Existing and emerging food safety concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, 57 (3), 524-548.
82. Scotter, M. J., Emerging and persistent issues with artificial food colours: natural colour additives as alternatives to synthetic colours in food and drink. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* **2011**, 3 (1), 28-39.
83. Burton, G.; Hughes, L.; Ingold, K., Antioxidant activity of phenols related to vitamin E. Are there chain-breaking antioxidants better than. alpha.-tocopherol? *Journal of American Chemical Society* **1983**, 105 (18), 5950-5951.
84. Butera, D.; Tesoriere, L.; Di Gaudio, F.; Bongiorno, A.; Allegra, M.; Pintaudi, A. M.; Kohen, R.; Livrea, M. A., Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50 (23), 6895-6901.
85. Ninfali, P.; Angelino, D., Nutritional and functional potential of Beta vulgaris cicla and rubra. *Fitoterapia* **2013**, 89 (0), 188-199.
86. Kapadia, G. J.; Tokuda, H.; Konoshima, T.; Nishino, H., Chemoprevention of lung and skin cancer by Beta vulgaris (beet) root extract. *Cancer Letters* **1996**, 100 (1-2), 211-4.
87. Downham, A.; Collins, P., Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology* **2000**, 35 (1), 5-22.
88. Dawson, T. L., Biosynthesis and synthesis of natural colours. *Coloration Technology* **2009**, 125 (2), 61-73.
89. Attoe, E. L.; Von Elbe, J. H., Oxygen involvement in betanin degradation. Oxygen uptake and influence of metal ions. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **1984**, 179 (3), 232-6.
90. Saguy, I.; Goldman, M.; Bord, A.; Cohen, E., Effect of oxygen retained on beet powder on the stability of betanin and vulgaxanthine I. *Journal of Food Science* **1984**, 49 (1), 99-101.

91. Pasch, J. H.; Von Elbe, J. H., Betanine degradation as influenced by water activity. *Journal of Food Science* **1975**, 40 (6), 1145-1147.
92. Huang, A. S.; von Elbe, J. H., Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science* **1987**, 52 (6), 1689-1693.
93. Saguy, I., Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-I): influence of pH and temperature. *Journal of Food Science* **1979**, 44 (5), 1554-1555.
94. Azeredo, H. M. C.; Pereira, A. C.; Rodrigues de Souza, A. C.; Gouveia, S. T.; Mendes, K. C. B., Study on efficiency of betacyanin extraction from red beetroots. *Int. Journal of Food Science and Technology* **2009**, 44 (12), 2464-2469.
95. Lamba, H.; Sathish, K.; Sabikhi, L., Double Emulsions: Emerging Delivery System for Plant Bioactives. *Food and Bioprocess Technology* **2015**, 8 (4), 709-728.
96. Dias, M. I.; Ferreira, I. C.; Barreiro, M. F., Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food and Function* **2015**, 6 (4), 1035-52.
97. Ré, M. I., Santana, M. H. A. , D'Ávila, M.A., Encapsulation Technologies for Modifying Food Performance. In *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*, Mishra, M., Ed. CRC Press: 2015; pp 643-684.
98. Tadros, T., Emulsification. In *Encyclopedia of Colloid and Interface*, Tadros, T., Ed. Springer: Berlin, 2013; pp 364-366.
99. Tadros, T., Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In *Emulsion Formation and Stability*, 1 ed.; Tadros, T., Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2013; pp 1-75.
100. Griffin, W. C., Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **1949**, 1 (5), 311-26.
101. Griffin, W. C., Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **1954**, 5 (4), 249-56.
102. Ruckenstein, E., Microemulsions, Macroemulsions, and the Bancroft Rule. *Langmuir* **1996**, 12 (26), 6351-6353.
103. Taylor, P., Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* **1998**, 75, 107-163.

104. Khalid, N.; Kobayashi, I.; Neves, M. A.; Uemura, K.; Nakajima, M.; Nabetani, H., Monodisperse W/O/W emulsions encapsulating l-ascorbic acid: Insights on their formulation using microchannel emulsification and stability studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2014**, 458, 69-77.
105. Souilem, S.; Kobayashi, I.; Neves, M. A.; Sayadi, S.; Ichikawa, S.; Nakajima, M., Preparation of Monodisperse Food-Grade Oleuropein-Loaded W/O/W Emulsions Using Microchannel Emulsification and Evaluation of Their Storage Stability. *Food and Bioprocess Technology* **2014**, 7 (7), 2014-2027.
106. Kawakatsu, T.; Kikuchi, Y.; Nakajima, M., Regular-sized cell creation in microchannel emulsification by visual microprocessing method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1997**, 74 (3), 317-321.
107. Kawakatsu T., K. I., Nakajima M., Regular-Sized Cell Creation in Microchannel Emulsification by Visual Microprocessing Method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1997**, 74 (3), 317-321.
108. Kobayashi, I.; Nakajima, M., Effect of emulsifiers on the preparation of food-grade oil-in-water emulsions using a straight-through extrusion filter. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2002**, 104 (11), 720-727.
109. Kobayashi, I.; Lou, X. F.; Mukataka, S.; Nakajima, M., Preparation of monodisperse water-in-oil-in-water emulsions using microfluidization and straight-through microchannel emulsification. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2005**, 82 (1), 65-71.
110. Sugiura, S. N., M.; Iwamoto, S., Interfacial Tension Driven Monodispersed Droplet Formation from Microfabricated Channel Array. *Langmuir* **2001**, 17 (18), 5562-5566.
111. Kobayashi, I. N., M., Generation and Multiphase Flow of emulsions in Microchannels. In *Advanced Micro and Nanosystem*, Kockmann, N., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2006; Vol. 5, pp 149-171.
112. Khalid, N.; Shu, G.; Kobayashi, I.; Nakajima, M.; Barrow, C. J., Formulation and characterization of monodisperse O/W emulsions encapsulating astaxanthin extracts

using microchannel emulsification: Insights of formulation and stability evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2017**, *157* (Supplement C), 355-365.

113. Kobayashi, I.; Nakajima, M.; Mukataka, S., Preparation characteristics of oil-in-water emulsions using differently charged surfactants in straight-through microchannel emulsification. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, *229* (1-3), 33-41.

114. Sugiura, S.; Nakajima, M.; Kumazawa, N.; Iwamoto, S.; Seki, M., Characterization of Spontaneous Transformation-Based Droplet Formation during Microchannel Emulsification. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (36), 9405-9409.

115. Sugiura, S.; Nakajima, M.; Tong, J.; Nabetani, H.; Seki, M., Preparation of Monodispersed Solid Lipid Microspheres Using a Microchannel Emulsification Technique. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *227* (1), 95-103.

116. Schwartz, S. J.; von Elbe, J. H., Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1980**, *28* (3), 540-543.

117. Nilsson, T., Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbrukshoeagskolans Annaler* **1970**, *36* (2), 179-219.

118. Israelachvili, J. N.; McGuiggan, P. M., Forces Between Surfaces in Liquids. *Science* **1988**, *241* (4867), 795.

119. Gonçalves, L. C. P.; Trassi, M. A. D.; Lopes, N. B.; Dörr, F. A.; Santos, M. T.; Baader, W. J.; Oliveira, V. X.; Bastos, E. L., A comparative study of the purification of betanin. *Food Chemistry*. **2012**, *131* (1), 231-238.

120. Kremer, B. P., The anthocyanin-betalain alternative: an experimental approach. *Biochemical Education* **1982**, *10* (4), 137-41.

121. Sakuta, M., Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. *Plant Biotechnology Reports* **2014**, *8* (1), 37-48.

122. Jain, G.; Gould, K. S., Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants? *Environmental and Experimental Botany* **2015**, *119*, 48-53.

123. Harris, N.; Javellana, J.; Davies, K.; Lewis, D.; Jameson, P.; Derolles, S.; Calcott, K.; Gould, K.; Schwinn, K., Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *BMC Plant Biology* **2012**, *12* (1), 34.
124. Khan, M. I.; Giridhar, P., Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry* **2015**, *117*, 267-295.
125. Impellizzeri, G.; Piattelli, M., Biosynthesis of Indicaxanthin in *Opuntia Ficus-Indica* Fruits. *Phytochemistry*. **1972**, *11*, 2499-2502.
126. Tesoriere, L.; Butera, D.; Allegra, M.; Fazzari, M.; Livrea, M. A., Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53* (4), 1266-70.
127. Allegra, M.; Ianaro, A.; Tersigni, M.; Panza, E.; Tesoriere, L.; Livrea, M. A., Indicaxanthin from Cactus Pear Fruit Exerts Anti-Inflammatory Effects in Carrageenin-Induced Rat Pleurisy. *Journal of Nutrition* **2014**, *144* (2), 185-192.
128. Tesoriere, L.; Attanzio, A.; Allegra, M.; Gentile, C.; Livrea, M. A., Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF-kB- dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 beta-exposed Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition* **2014**, *111* (3), 415-423.
129. Nichols, J. A.; Katiyar, S. K., Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research* **2010**, *302* (2), 71-83.
130. Bagchi, D.; Sen, C. K.; Bagchi, M.; Atalay, M., Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anti-carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula. *Biochemistry (Moscow)* **2004**, *69* (1), 75-80.
131. Miguel, M. G., Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2011**, *1* (6), 7-15.
132. Wang, L. S.; Stoner, G. D., Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters* **2008**, *269* (2), 281-90.

133. Karlsen, A.; Retterstøl, L.; Laake, P.; Paur, I.; Kjølrsrud-Bøhn, S.; Sandvik, L.; Blomhoff, R., Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor- κ B Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults. *The Journal of Nutrition* **2007**, *137* (8), 1951-1954.
134. Horbowicz, M. K., R.; Grzesiuk, A.; Debski, H., Anthocyanins of fruits and vegetables - their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Vegetable Crops Reserach Bulletin* **2008**, *68*, 5-22.
135. Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O., Chemicals and Colorants as Nutraceuticals. In *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, CRC Press: Boca Raton, 2002.
136. Yang, Y., Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **2013**, *23*, 843-849.
137. Dionisio, A. L. Dispositivos Moleculares com base em Sistemas Fotocromaticos. Universidade de Nova Lisboa, 2001.
138. da Silva, P. F.; Lima, J. C.; Quina, F. H.; Macanita, A. L., Excited-state electron transfer in anthocyanins and related flavylum salts. *Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108* (46), 10133-10140.
139. Piattelli, M.; Minale, L.; Prota, G., Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron* **1964**, *20* (10), 2325-2329.
140. Wendel, M.; Szot, D.; Starzak, K.; Tuwalska, D.; Prukala, D.; Pedzinski, T.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G., Photophysical properties of indicaxanthin in aqueous and alcoholic solutions. *Dyes and Pigments* **2015**, *113* (0), 634-639.
141. Rodrigues, R. F.; da Silva, P. F.; Shimizu, K.; Freitas, A. A.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P.; Quina, F. H.; Macanita, A., Ultrafast Internal Conversion in a Model Anthocyanin-Polyphenol Complex: Implications for the Biological Role of Anthocyanins in Vegetative Tissues of Plants. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15* (6), 1397-1402.
142. Moreira, P. F.; Giestas, L.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C.; Quina, F. H.; Macanita, A. L.; Lima, J. C., Ground- and excited-state proton transfer in anthocyanins:

From weak acids to superphotoacids. *Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107* (21), 4203-4210.

143. Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Dias, L. G.; Quina, F. H., A computational study of substituted flavylium salts and their quinonoidal conjugate-bases: S-0 -> S-1 electronic transition, absolute pK(a) and reduction potential calculations by DFT and semiempirical methods. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2007**, *18* (8), 1537-1546.

144. Stintzing, F. C.; Kugler, F.; Carle, R.; Conrad, J., First C-13-NMR assignments of betaxanthins. *Helvetica Chimica Acta* **2006**, *89* (5), 1008-1016.

145. Stintzing, F. C.; Herbach, K. M.; Mosshammer, M. R.; Carle, R.; Yi, W. G.; Sellappan, S.; Akoh, C. C.; Bunch, R.; Felker, P., Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53* (2), 442-451.

146. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer: Singapore, 2006.

147. Minegishi, S.; Kobayashi, S.; Mayr, H., Solvent Nucleophilicity. *Journal of American Chemical Society* **2004**, *126* (16), 5174-5181.

148. Steiner, U.; Schliemann, W.; Bohm, H.; Strack, D., Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* **1999**, *208* (1), 114-124.

149. Fery-Forgues, S.; Lavabre, D., Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationery products. *Journal of Chemical Education* **1999**, *76* (9), 1260-1264.

150. Martin, M. M.; Lindqvist, L., The pH dependence of fluorescein fluorescence. *Journal of Luminescence* **1975**, *10* (6), 381-390.

151. Berlman, I. B., *Handbook of Fluorescence spectra of Aromatic Molecules*. Academic Press: 1965; Vol. 2.

152. Dan Hess, F., Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* **2000**, *48* (2), 160-170.

153. Livertoux, M.; Lagrange, P.; Minn, A., The superoxide production mediated by the redox cycling of xenobiotics in

rat brain microsomes is dependent on their reduction potential. *Brain Research* **1996**, 725, 207-216.

154. Fuerst, E. P.; Norman, M. A., Interactions of Herbicides with Photosynthetic Electron-Transport. *Weed Science* **1991**, 39 (3), 458-464.

155. Forman, H. J. A., T. K.; Posner, M. A.; Fisher, A. B., Differential Paraquat Uptake and Redox Kinetics of Rat Granular Pneumocytes and Alveolar Macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1982**, 221 (2), 428.

156. Bonneh-Barkay, D.; Reaney, S. H.; Langston, W. J.; Di Monte, D. A., Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Research. Molecular Brain Research* **2005**, 134 (1), 52-6.

157. Méndez, E. C.-H., C.; Figueroa, R.; Arce, R.; Quñones, E., Mechanism of formation of the MV.+ radical during the UV excitation of methylviologen. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2001**, 142, 19-24.

158. Ito, M.; Kuwana, T., Spectroelectrochemical Study of Indirect Reduction of Triphosphopyridine Nucleotide .1. Methyl Viologen, Ferredoxin-Tpn-Reductase and Tpn. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1971**, 32 (3), 415-&.

159. Aristov, N.; Habekost, A., Electrochromism of Methylviologen (Paraquat). *World Journal of Chemical Education* **2015**, 3 (4), 82-86.

160. Orgill, J. J.; Chen, C.; Schirmer, C. R.; Anderson, J. L.; Lewis, R. S., Prediction of methyl viologen redox states for biological applications. *Biochemical Engineering Journal* **2015**, 94, 15-21.

161. Wrighton, M. e. a., Photoreduction at Illuminated p-Type Semiconducting silicon Photoelectrodes. Evidence for Fermi Level Pinning. *Journal of American Chemical Society* **1980**, 102 (11), 3683.

162. Peon, J.; Tan, X.; Hoerner, J. D.; Xia, C. G.; Luk, Y. F.; Kohler, B., Excited state dynamics of methyl viologen. Ultrafast photoreduction in methanol and fluorescence in acetonitrile. *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, 105 (24), 5768-5777.

163. Farrington, J. A.; Ebert, M.; Land, E. J.; Fletcher, K., Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1973**, 314 (3), 372-381.
164. Levey, G.; Ebbesen, T. W., Methyl Viologen Radical Reactions with Several Oxidizing-Agents. *Journal of Physical Chemistry* **1983**, 87 (5), 829-832.
165. Bird, C. L. K., A. T., Electrochemistry of the Viologens. *Chemical Society Reviews* **1980**, 10, 49.
166. Bellin, J. S.; Alexander, R.; Mahoney, R. D., Dye-Sensitized Photoreduction of Methyl Viologen. *Photochemistry and Photobiology* **1973**, 17 (1), 17-24.
167. Ebbesen, T. W.; Ferraudi, G., Photochemistry of Methyl Viologen in Aqueous and Methanolic Solutions. *Journal of Physical Chemistry* **1983**, 87 (19), 3717-3721.
168. Zielinska-Przyjemska, M.; Olejnik, A.; Kostrzewa, A.; Luczak, M.; Jagodzinski, P. P.; Baer-Dubowska, W., The Beetroot Component Betanin Modulates ROS Production, DNA Damage and Apoptosis in Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Phytotherapeutic Research* **2012**, 26 (6), 845-852.
169. Legon, S., The binding of ribosomes to polyoma virus RNA. Possible role of the leader region in initiation site recognition. *Journal of Molecular Biology* **1979**, 134 (2), 219-40.
170. Dyson, C., [Malignant glaucoma (author's transl)]. *Klin Monbl Augenheilkd* **1978**, 173 (4), 536-8.
171. Banerji, N.; Hayes, S. C.; Silva, C.; Knorr, F. J.; Malamen, D. J.; McHale, J. L.; Marchioro, A.; Moser, J. E., Two-electron photo-oxidation of betanin on titanium dioxide and potential for improved dye-sensitized solar energy conversion. In *Physical Chemistry of Interfaces and Nanomaterials XIII*, 2014.
172. Knorr, F. J.; McHale, J. L.; Clark, A. E.; Marchioro, A.; Moser, J.-E., Dynamics of Interfacial Electron Transfer from Betanin to Nanocrystalline TiO₂: The Pursuit of Two-Electron Injection. *The Journal of Physical Chemistry C* **2015**, 119 (33), 19030-19041.

173. Treat, N. A.; Knorr, F. J.; McHale, J. L., Templated Assembly of Betanin Chromophore on TiO₂: Aggregation-Enhanced Light-Harvesting and Efficient Electron Injection in a Natural Dye-Sensitized Solar Cell. *Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120* (17), 9122-9131.
174. Zhang, D.; Lanier, S. M.; Downing, J. A.; Avent, J. L.; Lum, J.; McHale, J. L., Betalain pigments for dye-sensitized solar cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* **2008**, *195* (1), 72-80.
175. von Elbe, J. H.; Attoe, E. L., Oxygen involvement in betalain degradation - Measurement of active oxygen species and oxidation reduction potentials. *Food Chemistry*. **1985**, *16*, 49-67.
176. Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **2010**, *232* (2), 449-460.
177. Zielinska-Przyjemska, M.; Olejnik, A.; Dobrowolska-Zachwieja, A.; Grajek, W., In vitro Effects of Beetroot Juice and Chips on Oxidative Metabolism and Apoptosis Neutrophils from Obese Individuals. *Phytotherapeutic Research* **2009**, *23* (1), 49-55.
178. Kelsey, N. A.; Wilkins, H. M.; Linseman, D. A., Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* **2010**, *15* (11), 7792-814.
179. Land, E. J.; Ito, S.; Wakamatsu, K.; Riley, P. A., Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis. *Pigment Cell Research* **2003**, *16* (5), 487-493.
180. Calogero, G.; Bartolotta, A.; Di Marco, G.; Di Carlo, A.; Bonaccorso, F., Vegetable-based dye-sensitized solar cells. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (10), 3244-3294.
181. Oprea, C. I.; Dumbrava, A.; Enache, I.; Georgescu, A.; Girtu, M. A., A combined experimental and theoretical study of natural betalain pigments used in dye-sensitized solar cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* **2012**, *240*, 5-13.
182. Sandquist, C.; McHale, J. L., Improved efficiency of betanin-based dye-sensitized solar cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2011**, *221* (1), 90-97.

183. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. ed.; Oxford University Press: Oxford, United Kingdom ;, 2015; p xxxviii, 905 pages.
184. Pavliuk, M. V.; Fernandes, A. B.; Abdellah, M.; Fernandes, D. L. A.; Machado, C. O.; Rocha, I.; Hattori, Y.; Paun, C.; Bastos, E. L.; Sá, J., Nano-hybrid plasmonic photocatalyst for hydrogen production at 20% efficiency. *Scientific Reports* **2017**, 7 (1).
185. Pavliuk, M. V. C., A. M.; Abdellah, M.; Budinská, A.; Pulle, S.; Sokolowski, K.; Fernandes, D. L. A.; Szlachetko, J., Bastos, E. L.; Ott, S.; Hammarström, L.; Edvinsson, T.; Lewiński, J.; Sá, J., Hydrogen evolution with nanoengineered ZnO interfaces decorated using a beetroot extract and a hydrogenase mimic. *Sustainable energy & Fuels* **2017**, (1), 69-73.
186. Wybraniec, S.; Nowak-Wydra, B.; Mizrahi, Y., H-1 and C-13 NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47 (11), 1725-1728.
187. Cieciora, L.; Klitonczyk, W.; Rydzynski, K., Stereological analysis of mitochondria of the liver of fasted rats in the course of digestion. *Acta Medica Polona* **1979**, 20 (1), 9-10.
188. Stintzing, F. C.; Conrad, J.; Klaiber, I.; Beifuss, U.; Carle, R., Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **2004**, 65 (4), 415-22.
189. Wendel, M.; Nizinski, S.; Tuwalska, D.; Starzak, K.; Szot, D.; Prukala, D.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G., Time-resolved spectroscopy of the singlet excited state of betanin in aqueous and alcoholic solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, 17 (27), 18152-8.
190. Villemure, G.; Detellier, C.; Szabo, A. G., Fluorescence of Clay-Intercalated Methylviologen. *Journal of american Chemical Society* **1986**, 108 (15), 4658-4659.
191. Villemure, G.; Detellier, C.; Szabo, A. G., Fluorescence of Methylviologen Intercalated into Montmorillonite and Hectorite Aqueous Suspensions. *Langmuir* **1991**, 7 (6), 1215-1221.

192. Martí, A. P., G., Maldonado, L., Colón, J., Photophysical characterization of methyl viologen ion-exchanged within a zirconium phosphate framework. *Inorganica Chimica Acta* **2007**, 360, 1535-1542.
193. Mau, A. W.-H.; Overbeek, J. M.; Loder, J. W.; Sasse, W. H. F., On the Fluorescence and Photoreduction of Methyl Viologens. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans. 2* **1986**, 32, 869-876.
194. Job, P., Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. *Annali Di Chimica* **1928**, 9, 113-203.
195. Renny, J. S., ; Tomasevich, L. L.; Tallmadge, E. H.; Collum, D. B., Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. *Angewandte Chemie International* **2013**, 52, 2-18.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Súmula Curricular

I DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Paula Eskildsen Pagano

Local e data de nascimento: São Paulo – SP, 01 de maio de 1989

II EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo, SP, 2012, Bacharel em química com atribuições tecnológicas e biotecnológicas

III FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Não possui

IV ATIVIDADES ACADÊMICAS

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

Período	1º semestre de 2014 (bolsista PAE)
Disciplina	QFL 0350 - Química Orgânica
Curso de graduação	Bacharelado em Ciências Biomédicas
Supervisor	Prof. Dr. Erick Leite Bastos
Período	2º semestre de 2013
Disciplina	QFL 2343 - Química Orgânica Experimental
Curso de graduação	Bacharelado em Química
Supervisor	Prof. Dr. Josef W. Baader

V. PUBLICAÇÕES

V. I. Artigos completos publicados em periódicos

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

Bartoloni, F. H.; Ciscato, L. F. M. L.; Peixoto, M. M. M.; Santos, A. P. F.; Santos, C. S.; Oliveira, S.; Augusto, F. A., Pagano, A. P. E.; Baader, W. J.; Bastos, E. L. Luz: um raro produto de reação. *Química Nova* **2011**, 34, p. 544–554.

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

PAGANO, A. P.; MACHADO, C. O.; SILVA, C. P.; QUINA, F. H.; BASTOS, E.L. A chemical model for the mutually exclusive occurrence of anthocyanins and betalains in plants. In: XII Encontro latino-americano de fotoquímica e fotobiologia, 2015, Maresias. **ELAFOT**, 2015.

PAGANO, A. P.; ESTEVES, L. C.; MACHADO, C. O.; RODRIGUES, A. C. B.; WATTS, C.; BASTOS, E.L. Semisynthesis and theoretical study of betalains. In: 49th International Union of Pure and Applied Chemistry, 2017, São Paulo. **IUPAC**, 2017.

PAGANO, A. P.; BASTOS, E.L. Estabilização de indicaxantina em hidrogel de polivinilpirrolidina. In: 37^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. **SBQ**, 2014. p.FOT-011.

VI OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

VI I. Estágios de pesquisa realizados durante o doutorado

Maio/2015 a Julho/2015: *Faculty of Life and Environmental Sciences*, Universidade de Tsukuba sob orientação do Prof. Marcos Neves e *The Food Research Institute (NFRI)*, Tsukuba, sob supervisão do aluno de doutorado Nauman Khalid.

Anexos

Anexo 1: Imagens registradas com câmera digital das emulsões A/O formuladas com emulsificante hidrofóbico CR-310 nas concentrações 2, 4 e 8 % (m/m).

Anexo 2: Medidas de diâmetro médio das gotas (A) e distribuição do tamanho das gotas geradas (B) em dependência do fluxo da fase dispersa da microemulsão A/O/A contendo betanina extraída de beterraba. (C) Imagens de geração de gotas por microcanais das microemulsões A/O/A da amostra de betanina comercial em dextrina em dependência do fluxo da fase dispersa.

Anexo 3: Imagens registradas com câmera digital das emulsões A/O (esquerda) e A/O/A (direita) das amostras de betanina comercial (A), betanina pura (B) e suco de beterraba em pó (C).

Anexo 4: Imagens de geração de gotas por microcanais das microemulsões A/O/A contendo betanina comercial em maltodextrina (A), betanina pura (B) e suco de beterraba em pó (C).

Anexo 5: Medidas de diâmetro médio das gotas (A) e distribuição do tamanho das gotas geradas (B) variando-se o fluxo da fase dispersa da microemulsão A/O/A contendo betanina pura.

Anexo 6: Medidas de diâmetro médio das gotas e valores de RSF (entre parênteses) da emulsão A/O/A controle e das emulsões A/O/A contendo betanina comercial, betanina extraída de beterraba e suco de beterraba a 4 °C, 25 °C e 60 °C ao longo dos 7 dias de ensaio de estabilidade.

4 °C	Dia 1	51,7 ± 0,59 (0,29 ± 0,01)	43,4 ± 0,26 (0,22 ± 0,01)	45,8 ± 0,29 (0,21 ± 0,01)	72,4 ± 0,40 (0,58 ± 0,01)
	Dia 7	53,9 ± 0,24 (1,73 ± 0,05)	47,6 ± 0,14 (0,21 ± 0,00)	49,40 ± 0,38 (0,23 ± 0,00)	75,6 ± 1,65 (0,72 ± 0,01)
25 °C	Dia 1	46,1 ± 0,05 (0,38 ± 0,05)	41,6 ± 0,1 (0,21 ± 0,0)	44,4 ± 0,09 (0,22 ± 0,00)	75,2 ± 2,57 (0,77 ± 0,04)
	Dia 7	30,5 ± 0,21 (0,26 ± 0,01)	33,1 ± 0,11 (0,24 ± 0,00)	31,1 ± 0,77 (0,21 ± 0,07)	27,0 ± 9,6 (0,74 ± 0,07)
60 °C	Dia 1	32,2 ± 0,18 (0,22 ± 0,04)	27,8 ± 0,72 (0,37 ± 0,22)	32,9 ± 0,78 (0,27 ± 0,02)	35,1 ± 1,7 (0,65 ± 0,01)
	Dia 7	3,09 ± 0,02 (2,55 ± 0,04)	1,84 ± 0,01 (0,26 ± 0,01)	34,9 ± 0,41 (0,52 ± 0,01)	1,10 ± 0,01 (2,81 ± 0,34)

Anexo 7: Variação dos valores dos parâmetros de cor a* e b* correspondentes ao espaço de cor CIELAB de acordo com a variação de temperatura das emulsões A/O e A/O/A contendo betanina comercial, betanina pura e suco de beterraba em pó.

		4 °C	25 °C	60 °C	4 °C	25 °C	60 °C
Betanina comercial	Controle	31 ± 0	28.7 ± 0.6	0 ± 0	9 ± 1.7	6 ± 1	11 ± 1
	A/O	5 ± 0	4.7 ± 0.6	1.3 ± 0.6	0 ± 0	2.7 ± 0.6	5.3 ± 0.6
	A/O/A	- 0.7 ± 1.2	-3.7 ± 0.6	-2 ± 2	-2 ± 0	0 ± 1	5.7 ± 0.6
Betanina pura	Controle	2 ± 0	2.7 ± 0.6	11 ± 2.6	-0.3 ± 0.6	-0.3 ± 0.6	2.3 ± 0.6
	A/O	68 ± 0	73.3 ± 0.6	20.7 ± 0.6	-41 ± 1	-34 ± 0	20 ± 0
	A/O/A	31.3 ± 1	32 ± 0	0.7 ± 0	-10 ± 0	-8.3 ± 0.6	6.3 ± 0.6
Suco de beterraba	Controle	28.7 ± 0.6	30.3 ± 0.6	2 ± 1.7	13.7 ± 1.5	17.7 ± 1.5	21.3 ± 0.6
	A/O	21.7 ± 0.6	20 ± 0	2 ± 1	-1.3 ± 0.6	2.7 ± 0.6	11.3 ± 1.1
	A/O/A	1.3 ± 0.6	-1.3 ± 0.6	0.7 ± 1.2	1 ± 0	3 ± 0	4 ± 0

Anexo 8: Recorte das fotos das emulsões A/O e A/O/A contendo betanina comercial, suco de beterraba e betanina mantidas a 4 °C, 25 °C ou 60 °C por 7 dias. As imagens foram adquiridas sob fundo preto e retratam o fundo dos frascos nos quais as emulsões foram mantidas durante os 7 dias.

Anexo 9: Cromatograma de BtP acompanhado por UV-vis em 254 nm e 480 nm (coluna de fase reversa C18, 250 x4,6 mm; sistema cromatográfico: 0 – 20% B em 15 min, sendo o solvente A: 0,05% H₃COOH/água e solvente B: 0,05% H₃COOH /acetonitrila com fluxo de 1 mL min⁻¹).

Anexo 10: Espectro de massas de baixa resolução de indicaxantina em água.

Anexo 11: Espectro de ^1H -RMN de indicaxantina em D_2O , 500 MHz.

Anexo 12: Espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY) de indicaxantina em D_2O , 500 MHz.

Anexo 13: Espectro de massas de baixa resolução de MMF em água.

Anexo 14: Espectro de ^1H -RMN de MMF em $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$, 500 MHz.

Anexo 15: Espectro de ^1H -RMN de MMF em CD_3OD , 500 MHz. O sinal com deslocamento químico 1,99 ppm refere-se a acetato presente na amostra.

Anexo 16: Espectro de ^1H -RMN de MMF em D_2O , 500 MHz. O sinal com deslocamento químico 2,09 ppm refere-se a acetato presente na amostra.

Anexo 17: Segunda derivada dos espectros de absorção (A) e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm) (B) de solução aquosa de MMF em pH 5 na ausência e na presença de diferentes concentrações de BtP. Os gráficos a esquerda são referentes aos experimentos realizados com as soluções a 10^{-5} mol L $^{-1}$ e os gráficos a direita são referentes aos experimentos realizados com as soluções a 10^{-6} mol L $^{-1}$.

Anexo 18: Espectro de absorção de etanol anidro antes (linha preta) e após contato com o septo de borracha utilizado para tampar a cubeta.

Anexo 19: Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm) de BtP na ausência e na presença de MMF em diferentes concentrações em água (pH 5) (A), solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5) (B) e etanol absoluto $\geq 99.8\%$ ($\leq 0.2\%$ de água) (C).

Anexo 20: Segunda derivada dos espectros de absorção (A) e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm) (B) de solução de MMF em pH 5 na ausência e na presença de diferentes concentrações de BtP. Os gráficos a esquerda são referentes aos experimentos realizados em solução aquosa e os gráficos a direita são referentes aos experimentos realizados em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5).

Anexo 21: Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de MMF na ausência e

na presença de BtP em meio aquoso (pH 5) e solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5).

Anexo 22: Parâmetros dos ajustes mono-exponenciais dos decaimentos de emissão de MMF na ausência e na presença de BtP em solução de água/etanol absoluto $\geq 99.8\%$ 1:1 v/v (pH 5).

Amostra	τ_{FL} (ns)	χ^2
MMF	3,92	1,24
MMF + 0,1 eq. BtP	3,89	1,26
MMF + 0,5 eq. BtP	3,86	1,30
MMF + 1,0 eq. BtP	3,82	1,24
MMF + 1,5 eq. BtP	3,79	1,33
MMF + 2,0 eq. BtP	3,80	1,24

Anexo 23: Parâmetros dos ajustes mono-exponenciais dos decaimentos de emissão de MMF na ausência e na presença de BtP em meio aquoso (pH 5).

Amostra	τ_{FL} (ns)	χ^2
MMF	4,61	1,30
MMF + 0,1 eq. BtP	4,59	1,23
MMF + 0,5 eq. BtP	4,47	1,29
MMF + 1,0 eq. BtP	4,37	1,35
MMF + 1,5 eq. BtP	4,30	1,30
MMF + 2,0 eq. BtP	4,22	1,43

Anexo 24: Espectro de NOESY 2D de MMF na presença de 1 equivalente de BtP em D_2O (pD = 5), 500 MHz.

Anexo 25: Cromatogramas de betanina pura, betanina precipitada e betanina comercial obtidos em condições de fase reversa. C18 Ascentis ® (250 x 4,6 mm, Supelco), em modo isocrático 20% de B em 15 minutos (Bn pura) e modo gradiente 5-60%B em 20 minutos (betanina precipitada e betanina comercial), com fluxo de 1 mL min^{-1} detecção em $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ e 536 nm . A mistura de solvente utilizada foi solvente A: 0,05% ácido fórmico em água e solvente B: 0,05% ácido fórmico em acetonitrila.