Estudo cinético da hidrólise de betalaínas-modelo

LARISSA CERRATO ESTEVES

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Química

Versão corrigida da Dissertação defendida

Data do depósito na SPG:

12/02/2016

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

E79e Esteves, Larissa Cerrato
Estudo cinético da hidrólise de betalaínas-modelo / Larissa
Cerrato Esteves. -- São Paulo, 2016.
96p.

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

1. Físico-química orgânica 2. Hidrólise I. T. II. Bastos, Erick
Leite, orientador.

547.13 CDD

LARISSA CERRATO ESTEVES

Estudo cinético da hidrólise de betalaínas-modelo

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

Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo

2016

AGRADECIMENTOS

Erick, pela oportunidade, confiança e por se doar tanto a nós, seus alunos. Pela paciência com as minhas dificuldades e loucuras. Pelo carinho com que sempre me tratou. É um privilégio trabalhar com você!

Vanessa, pela amizade que vai além do que se poderia esperar: um tanto amiga, um tanto irmã, um pouco mãe. Como tantas outras coisas na minha vida, esse trabalho tem muito dela.

Lelaine, por me inspirar com sua força de vontade e suas maluquices. É tanta vida que eu não teria vivido sem ela que não dá nem para começar a escrever. Minha metade otimista, obrigada por tanto!

Carol Rockenbach, Lia, Renata, Ju Carneiro e Amanda, pela amizade que permanece apesar da distância e do tempo.

Colegas do BastosLab e Luiz, pela ajuda e apoio. Esse trabalho não seria possível sem vocês.

Prof. Dr. Cassius V. Stevani, pelas análises no HPLC, e Prof. Dr. Rômulo A. Ando, pelos experimentos no Raman.

Ana Paula, Caroline e Nathana, por deixarem a pós graduação (e a vida!) mais doces, todos os dias. As responsáveis pela minha sanidade, no meio de tanta loucura. Que sorte a minha ter vocês!

Minha família buscapé: tia Lu, madrinha, Luana e Vini. Por tanto amor.

Meus avós, Shirley e Mino, pelo exemplo e pelo apoio.

Nicholas, pelo amor de irmão.

Meu pai, pelo incentivo, apoio e insistência. E por acreditar mais em mim do que eu mesma.

Minha mãe, por me ensinar sobre as coisas que realmente importam na vida. E por ser a melhor parte de mim.

RESUMO

ESTEVEES, L. C. **Estudo cinético da hidrólise de betalaínas-modelo**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Betanina e indicaxantina foram obtidas e purificadas e a hidrólise térmica de betanina foi investigada em diferentes pHs, concentrações de tampão, temperaturas e com a adição de sais. Para a decomposição de indicaxantina, foi realizado um estudo em diferentes pHs. Tampões acetato e citrato se mostraram adequados para estudos com betanina, dentro de sua faixa de tamponamento. Os experimentos realizados com tampão fosfato indicaram a ocorrência de catálise geral pelo íon fosfato presente no tampão. O efeito dos sais sobre a hidrólise de betanina foi investigado em pHs 3 e 6,2, com a adição de sais de sódio, amônio e sais cloretos. *p*-Toluenosulfonato de sódio, cloreto de amônio e cloreto tetrabutilamônio foram os sais que apresentaram maior efeito sobre a constante cinética observada de hidrólise de betanina. A hidrólise das duas betalaínas apresentou um comportamento semelhante com a variação do pH e o ajuste multiparamétrico dos dados sugere que a catálise básica específica é a principal responsável pela hidrólise de betanina e indicaxantina. Um modelo que sugere a abertura do anel 1,2,3,4-tetrahidropiridínico das betalaínas é proposto para explicar o efeito do pH sobre a constante cinética de decomposição determinada em meio ácido.

Palavras-chave: betalaínas, hidrólise, catálise ácido-base, betanina, indicaxantina.

ABSTRACT

ESTEVEES, L. C. **Kinetic study of the hydrolysis of model betalains**. 2016. 96 p. Dissertation (Master's degree) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Betanin and indicaxanthin were obtained and purified and the thermal hydrolysis of betanin was investigated at different pH, buffer concentration, temperature and in the presence of different salts. For the decomposition of indicaxanthin, a study was conducted at different pHs. Acetate buffer and citrate buffer proved to be suitable for the study of betanin. The experiments carried out with phosphate buffer indicated the occurrence of general base catalysis by phosphate ion present in the buffer. The effect of salts on the betanin hydrolysis was investigated at pH 3 and 6.2 with the addition of sodium salts, ammonium salts and chlorides. Sodium p-toluenesulfonate, ammonium chloride and tetrabutylammonium chloride had the larger effects on the observed rate constant for the hydrolysis of betanin. The variation of pH resulted in similar hydrolysis profile for both betalains studied and multiparameter fitting of the data suggests that the specific base catalysis is primarily responsible for the hydrolysis of betanin and indicaxanthin. A model that suggests the opening of the 1,2,3,4-tetrahydropyridine ring of betalains is proposed to explain the effect of pH on the decomposition rate constant under acidic conditions.

Keywords: betalains, hydrolysis, acid-base catalysis, betanin, indicaxanthin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ε	Coeficiente de atenuação molar
$\lambda^{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorção no espectro UV-Vis
Bt	Betalaína
DAD	<i>Diode array detector</i> , detector de arranjo de diodos
ESI+	<i>Electrospray ionization</i> , ionização por elétron-spray em modo positivo
^1H -RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HBt	Ácido betalâmico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
m/z	Razão massa/carga na espectrometria de massas
TPi	Tampão fosfato

LISTA DE ESTRUTURAS

Sigla	Nome	Estrutura
Bn	Betanina
BtP	Indicaxantina
HBt	Ácido betalâmico

SUMÁRIO

Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
Lista de estruturas	xi
1. Introdução	17
1.1. Betalaínas: aspectos fundamentais	17
1.2. Estabilidade de betalaínas.....	18
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivos específicos	27
3. Resultados.....	29
3.1. Obtenção de betalaínas	29
3.1.1. Extração e purificação de betanina	29
3.1.2. Semissíntese e purificação de indicaxantina	30
3.2. Estudo da decomposição de betanina	32
3.2.1. Estudo controle em água.....	32
3.2.2. Efeito do tampão.....	33
3.2.3. Efeito da adição de sais	41
3.3. Efeito do pH sobre a hidrólise de betanina e indicaxantina	46
3.3.1. Betanina	46
3.3.2. Indicaxantina	48
4. Discussão	51
4.1. Semissíntese de indicaxantina	51
4.2. Cinéticas de hidrólise.....	52

4.2.1.	Efeito de tampões	53
4.2.2.	Efeito de sais.....	56
4.2.3.	Efeito do pH sobre a hidrólise de betalaínas	59
5.	Conclusão	67
6.	Material e métodos	69
6.1.	Reagentes e solventes	69
6.2.	Soluções.....	70
6.2.1.	Soluções tampão	70
6.2.2.	Soluções de fosfato com pH entre 2 e 11	71
6.2.3.	Soluções de sais em meio tamponado	71
6.3.	Obtenção de betanina a partir de suco de beterraba	71
6.4.	Semissíntese de indicaxantina	72
6.4.1.	Obtenção de ácido betalâmico em acetato de etila	72
6.4.2.	Semissíntese e purificação de indicaxantina	73
6.5.	Caracterização das betalaínas	73
6.5.1.	Espectroscopia de absorção	73
6.5.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	74
6.6.	Estudo cinético da decomposição de betalaínas	74
6.6.1.	Efeito da concentração do tampão.....	74
6.6.2.	Efeito da presença de sais	74
6.6.3.	Efeito do pH.....	75
6.7.	Determinação das constantes cinéticas observadas (k_{obs}).....	75
6.8.	Análise dos resultados	76
7.	Referências	77

8. Anexos	81
8.1. Curvas cinéticas de hidrólise de Bn nos tampões acetato e citrato	81
8.2. Curvas cinéticas de hidrólise de Bn em tampão fosfato	83
8.3. Curvas cinéticas de hidrólise de Bn em tampão fosfato 100 mmol L ⁻¹ , na presença de sais	85
8.4. Curvas cinéticas de hidrólise de Bn em tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ , em função do pH e da temperatura.....	89
8.5. Gráficos de Arrhenius.....	94
8.6. Curvas cinéticas de hidrólise de BtP em tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ , em função do pH	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Betalaínas: aspectos fundamentais

Betalaínas são pigmentos vegetais cuja biossíntese envolve o ácido betalâmico (**HBt**), um aldeído α,β -insaturado instável e fracamente fluorescente (Esquema 1).^{1,2} Nas células vegetais, betalaínas são formadas por meio de um acoplamento aldimínico espontâneo entre aminoácidos e o ácido betalâmico e armazenadas no vacúolo.³

As betalaínas substituem as antocianinas em algumas famílias de plantas da ordem Caryophyllales (e.g., *Bougainvillea* spp. (primavera) e *Beta vulgaris* (beterraba))⁴, e em alguns fungos basidiomicetos dos gêneros *Amanita* e *Hygrophorus*, como o ágario-das-moscas (*A. muscaria*)⁵.

As betalaínas naturais são divididas em duas classes, dependendo do aminoácido da qual se originam, sendo classificadas como betacianinas ou betaxantinas (Esquema 1). As betalaínas que se derivam da ciclo-DOPA pertencem à classe das betacianinas (*kyaneos* = azul), devido à sua intensa coloração violeta. As demais betalaínas são classificadas como betaxantinas (*xanthos* = amarelo).⁶

Betanina (**Bn**, betanidina-5-*O*-glicosídeo), é uma betacianina natural encontrada na beterraba vermelha (*Beta vulgaris*) que é responsável pela cor característica da planta (Esquema 1).⁷ A betanina tem máximo de absorção (λ^{abs}) em 536 nm, não é fluorescente e é a única betalaína aprovada para uso como corante em alimentos (código E-162).⁷

A indicaxantina (**BtP**; $\lambda^{\text{abs}} = 485$ nm) é uma betaxantina derivada da L-prolina (Esquema 1) encontrada em abundância nas frutas da opuntia (*Opuntia* spp.)⁶. A BtP também está presente na beterraba e nas variedades amarelas de flores com pétalas fluorescentes, como a maravilha e a onze-horas,⁸ apesar de ser fracamente fluorescente

(rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) de 4×10^{-3} em água)⁹. A fluorescência das flores pode estar relacionada com o processo de polinização, devido aos padrões de contrastes formados.⁸

Esquema 1. Estruturas químicas do ácido betalâmico (HBt), das duas classes de betalaínas naturais que se originam dele (betacianinas vermelhas e betaxantinas amarelas) e de betalaínas que pertencem a cada uma delas: betanina (Bn) e indicaxantina (BtP). R^1 e R^2 = H, glc; R^3 = H, alquil e R^4 = cadeia lateral de aminoácidos.

1.2. Estabilidade de betalaínas

A modificação química de alimentos está geralmente associada a mudanças na coloração, o que pode comprometer o apelo comercial, os benefícios à saúde e a segurança.¹⁰ A fim de se garantir a retenção de cor nos alimentos em que betalaínas são utilizadas como corantes, o manuseio, processamento e estocagem devem ser feitos em condições controladas. A estabilidade de betalaínas é influenciada por fatores intrínsecos, como a composição e a estrutura¹, e extrínsecos, como temperatura, pH, oxigênio, presença de luz^{6,11}, atividade de água^{12,13}, e atividades enzimáticas, sendo a temperatura fator decisivo para a decomposição de betalaínas¹¹.

A temperatura pode ser considerada o fator mais importante na degradação de betalaínas. Como a conservação de alimentos geralmente inclui tratamento térmico das matérias-primas para garantir a segurança alimentar, vários estudos foram realizados para obter informação sobre a degradação térmica betalaínas presentes no suco de beterrabas e de *cactus fruits*.^{14,15,16,17,18,19} A estabilidade térmica de betalaínas depende tanto da temperatura quanto do tempo de aquecimento. Além disso, fatores como estrutura do pigmento, presença de luz, oxigênio, pH, também influenciam a velocidade de degradação térmica destes compostos. De forma geral, betacianinas tem sido consideradas mais estáveis que betaxantinas.^{18, 20} Entretanto, a hidrólise de BtP, uma betaxantina, em água pura ($k_{\text{obs}} = 6,9 \times 10^{-4} \text{ h}$, $t_{1/2} = 996 \text{ h}$) é muito mais lenta que a de Bn ($k_{\text{obs}} = 5,3 \times 10^{-3} \text{ h}$, $t_{1/2} = 130 \text{ h}$), nas mesmas condições experimentais.⁹

Betalaínas são relativamente estáveis entre os pHs 3 e 7.²¹ Abaixo de pH 3,5, o máximo de absorção é deslocado para comprimentos de onda menores e, acima de pH 7, para comprimentos de onda maiores. O pH ótimo para a estabilidade de Bn foi reportado entre 5,5 e 6, na presença de oxigênio, enquanto condições anaeróbicas favorecem a estabilidade de Bn em pHs mais baixo (entre 4 e 5).²² Betaxantinas são mais estáveis entre pH 4 e 7 e o pH ótimo para o máximo de estabilidade de betaxantinas também é 5,5.²³ Em condições alcalinas, ocorre a hidrólise da ligação aldimínica, e a acidificação induz a recondensação do ácido betalâmico tanto com aminoácidos (betaxantinas) quanto com derivados da ciclo-DOPA (betacianinas).²⁴ Em temperatura ambiente, a hidrólise de Bn ocorre instantaneamente em pH = 14.²⁵

Embora a maioria das betalaínas seja solúvel somente em água ou solventes orgânicos polares próticos (*e.g.*, metanol, etanol, 2,2,2-trifluoroetanol (TFE)), estes pigmentos são muito sensíveis a hidrólise, já que são formalmente iminas ou sais de

imínio.^{2, 6, 26} Entretanto, a degradação destes pigmentos pode ocorrer por diferentes mecanismos. Foram caracterizados diversos produtos de degradação desidrogenados, descarboxilados e de hidrólise obtidos com o tratamento térmico de Bn.^{17,27,18,10, 28}

Nas plantas, betalaínas existem como misturas de diastereoisômeros. Quando o carbono *sp*³ do sistema 2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetrapiridínico está na configuração *S*, os compostos recebem seus nomes convencionais, nomes que muitas vezes são usados para se referirem ao conjunto de isômeros presentes. Os isômeros *R* recebem o prefixo *iso*. Assim, betanina é (2*S*/15*S*) betanidina 5-*O*-glicosídeo e o seu epímero (2*S*/15*R*) é chamado de isobetanina (Esquema 2). A proporção entre os dois isômeros depende da fonte de onde a betalaína foi obtida.⁶ A isobetanina e a betanina têm propriedades de absorção e fluorescência idênticas, mas podem ser separadas por cromatografia em condições de fase reversa.^{7, 24} A epimerização de betacianinas para suas respectivas formas *iso* ocorre em meio ácido, sob aquecimento,⁶ assim como de iminas em geral.²⁹

A clivagem da ligação aldimínica de betalaínas foi reportada em pH maior que 6 e também durante tratamento térmico.²⁴ A quebra da ligação aldimínica resulta no ácido betalâmico, de coloração amarelo-brilhante. Assim, é observada tanto a perda de cor da solução de betalaína quanto uma mudança de cor para o amarelo. Além disso, a hidrólise da ligação aldimínica de betacianinas é mais pronunciada durante o tratamento térmico de soluções purificadas do que nos sucos de beterraba e pitaya roxa.²⁸

Esquema 2. Epimerização de betanina ((2S/15S)-betanidina 5-O-glicosídeo) para a isobetanina ((2S/15R)-betanidina 5-O-glicosídeo) em meio aquoso ácido.

Por se tratar de um equilíbrio, a hidrólise da ligação aldimínica de betalainas é reversível com a acidificação do meio, seguindo o mecanismo inverso da condensação aldimínica (Esquema 3). Assim, a mudança do pH do meio e da concentração dos reagentes alteram a constante de equilíbrio. Ainda, a reação se torna mais exergônica com o aumento da temperatura. Assim, a hidrólise mediada pelo aumento da basicidade do meio é revertida pela adição de ácido, *i.e.*, HBT e aminoácidos formam betalainas quando ácido é adicionado ao meio. O aquecimento leva à decomposição tanto do HBT quanto de alguns aminoácidos, em especial de derivados de ciclo-DOPA.^{6, 23} O

resultado deste efeito de concentração é uma dependência da diminuição gradual da concentração de betalainas com a temperatura. Sabe-se que o resfriamento de soluções de betalainas resulta na regeneração destes pigmentos; este resultado está relacionado ao deslocamento do equilíbrio por conta do efeito positivo do resfriamento sobre a etapa de desidratação e pelo aumento da energia de Gibbs para a hidrólise com a diminuição da temperatura.

Esquema 3. Mecanismo de hidrólise de betanina a ácido betalâmico e ciclo-DOPA 5-O-glicosilada.

Betacianinas¹⁶ e betaxantinas^{30,23} são mais estáveis *in natura* em suas matrizes naturais do que puras em solução. Biomoléculas constituintes das plantas, em especial açúcares, *e.g.*, pectinas: polissacarídeo ramificado; um dos principais componentes da parede celular das células vegetais, diminuem a atividade da água (a_w) o que resulta em uma diminuição da velocidade de hidrólise.⁶ Atividade de água é uma medida obtida da pressão de vapor da água na presença de diferentes solutos. Quanto maior o valor de a_w , menos associadas estão as moléculas de água e, portanto, mais disponíveis para o ataque

nucleofílico. Além disso, a interação intermolecular de solutos que diminuem a a_w , por exemplo açúcares ramificados, com betalainas cria um ambiente mais hidrofóbico nas imediações do pigmento, o que desfavorece a hidrólise.^{12-13, 31}

O aumento da temperatura favorece também reações de descarboxilação, que podem ocorrer nos carbonos C-2, C-15 e C-17 das betacianinas e nos carbonos C-11 e C-13 das betaxantinas.⁶ Os produtos descarboxilados apresentam máximo de absorção deslocado para o azul, quando comparados com seus compostos originais devido à concentração de carga no sistema conjugado 1,7-diazaheptametínico.⁶ Betanina pode sofrer descarboxilação nos carbonos C-2, C-15 e C-17, embora a susceptibilidade frente a descarboxilação de cada grupo seja diferente dependendo das condições experimentais (Esquema 4).²⁸ Por exemplo, a descarboxilação inicial depende do solvente: em etanol, observa-se a formação de betacianinas descarboxiladas na posição C-17 e, em meio aquoso, a descarboxilação na posição C-2 é mais rápida.²⁷ Após um prolongado período de aquecimento, todos os grupos carboxílicos são eliminados.²⁷ Sob aquecimento, observa-se também a formação de produtos de oxidação desidrogenados⁶ (Esquema 4).

Comparando-se a estabilidade de diferentes betacianinas, foi reportado que as estruturas glicosiladas são mais estáveis que as agliconas (derivados não glicosilados) quando submetidas a degradação por espécies de oxigênio ativo^{6, 32}. Isto foi atribuído ao maior potencial de oxidação dos compostos glicosilados.³² O tempo de meia-vida de Bn na presença de espécies reativas de oxigênio ($t_{1/2} = 21 \pm 2$ h) é dezessete vezes maior que a de betanidina, sua forma não glicosilada.³² Contudo, o aumento do número de resíduos de açúcar não proporciona aumento de estabilidade; por exemplo, a amarantina (betanidina 5-*O*- β -glucuronoglicosídeo) é tão estável quanto betanina na presença de oxigênio.³³ A desglicosilação de betanina ocorre em meio fortemente ácido, sob alta

temperatura e na presença da enzima β -glicosidase.⁶ Este processo é acompanhado de um deslocamento batocrômico (cerca de 4 nm) e, novamente, leva a agliconas que são mais susceptíveis a oxidação do que o material de partida.⁶ Betanina e betanidina também são oxidadas por oxigênio.^{6, 34} O tempo de vida de betalaínas aumenta sensivelmente em atmosfera de nitrogênio ou baixas concentrações de ácido ascórbico ou isoascórbico.^{6, 14, 35} Entretanto, altas concentrações de ácido ascórbico aumentam a degradação de betanina, devido ao efeito pró-oxidante do radical ascorbila, que é formado nessas condições.³⁴

Esquema 4. Reação de descarboxilação de betanina e a formação de produtos descarboxilados e oxidados.

A presença de grupos ionizáveis torna as betalaínas sensíveis à presença de espécies iônicas. A presença dos cátions metálicos Fe^{2+} , Fe^{3+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} e Cu^{2+} ,

por exemplo, aceleram a degradação de betanina. Para Cu^+ , Cu^{2+} e Hg^{2+} , é observado um deslocamento batocrômico da banda de absorção da betanina, indicando, possivelmente, a formação de complexos,³⁶ que são dissociados com adição de ácido e/ou EDTA.³⁶

2. OBJETIVOS

Entender como ocorre a decomposição de betalainas em meio aquoso tamponado na ausência e na presença de sais.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar os efeitos do pH do meio e da temperatura sobre a cinética de hidrólise de betanina e indicaxantina;
- Determinar como diferentes tampões e sais afetam a cinética de decomposição de betanina.

3. RESULTADOS

O estudo cinético da hidrólise de betalainas foi realizado com betanina (Bn) e indicaxantina (BtP), que foram obtidas a partir das metodologias estabelecidas anteriormente no grupo de pesquisa,^{7, 37} com algumas modificações. Neste texto serão apresentados e discutidos inicialmente os detalhes da obtenção destas betalainas. Em seguida, são apresentados os resultados obtidos com a variação da concentração de diferentes soluções tampão, do pH e da temperatura e com a adição de diferentes sais sobre a hidrólise de Bn. Também são apresentados os resultados obtidos com a variação do pH sobre a hidrólise de BtP.

3.1. Obtenção de betalainas

3.1.1. Extração e purificação de betanina

Betanina foi obtida a partir do suco de beterraba conforme método estabelecido anteriormente no grupo.⁷ A betanina presente em suco de beterrada é purificada por cromatografia em coluna em condições de fase reversa (sílica C-18 como fase estacionária e água como eluente).⁷ As frações magenta obtidas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), reunidas e submetidas a análise por espectrofotometria UV-Vis (Figura 1). Os dados de cromatografia analítica indicam que Bn foi obtida com um excelente grau de pureza (+98%^{HPLC, 254 nm}). Estes resultados foram comparados os dados obtidos com betanina padrão caracterizada anteriormente no grupo por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida acoplada a detectores de grade de diodo e espectrometria de massas em modo positivo de ionização *electrospray* (HPLC-DAD-MS(ESI+)).^{7, 25} Embora eficiente na obtenção de Bn pura, este método tem limitações quanto à quantidade de composto que

pode ser purificado por hora pois depende de coluna cromatográfica. Por esse método, foi possível purificar 5 mg de Bn a partir de 5 mL de suco de beterraba em, aproximadamente, 4 horas (uma coluna). Além disso, cromatografia de coluna em condições de fase reversa é uma técnica cromatográfica muito cara comparada ao uso de outras fases estacionárias como a sílica gel 60, celulose ou algumas resinas de troca iônica.

Figura 1. (A) Espectro de absorção de betanina obtida por cromatografia de coluna em C18. (B) Cromatograma de Bn acompanhado por UV-vis em 254 nm e 536 nm (coluna de fase reversa C18, 250 × 4,6 mm; sistema cromatográfico: 5 – 95% B em 20 min, sendo o solvente A: 0,1% TFA/água e solvente B: 0,1% TFA/60% MeCN/água com fluxo de 1 mL min⁻¹).

3.1.2. Semissíntese e purificação de indicaxantina

Para a semissíntese de betalainas, é necessário primeiramente obter ácido betalâmico (HBt) e purificá-lo. No método empregado pelo nosso grupo para obtenção de indicaxantina, o HBt é obtido a partir da hidrólise alcalina do suco de beterraba e purificado em uma coluna de troca iônica com Amberlite XAD 16 como fase estacionária.^{25, 37} L-prolina é, então, adicionada ao HBt em meio aquoso alcalino pH = 11, e após 30 min sob agitação, o meio é acidificado com ácido acético glacial até pH = 5.

Infelizmente, a BtP obtida por esse método contém grandes quantidades de ânion acetato, o que dificulta a realização de estudos posteriores do efeito do pH. Assim, foi utilizado um método alternativo para a semissíntese de indicaxantina, no qual HBt foi extraído em acetato de etila. O método utilizado para extração de HBt está descrito na literatura³; entretanto, foram feitas algumas modificações pelo nosso grupo para aumentar sua escala e diminuir as etapas de processamento. Suco de beterraba foi hidrolisado com NH_4OH ($\text{pH} = 11,4$), em seguida acidificado com HCl concentrado até $\text{pH} = 2$ e então, o HBt foi extraído com acetato de etila. O HBt foi obtido em concentração média próxima a $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, com um rendimento médio de, aproximadamente, 10%, em relação ao conteúdo de Bn presente no suco de beterraba ($\epsilon^{536 \text{ nm}} = 6,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A concentração de HBt foi calculada considerando-se $\epsilon^{424 \text{ nm}} = 2,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.³⁸

A reação de semissíntese foi realizada adicionando-se um excesso de L-prolina (10 equivalentes), a temperatura ambiente. Como a L-prolina não é solúvel em acetato de etila, a reação de formação de BtP ocorre de maneira heterogênea na superfície do sólido. A reação é quase instantânea, e pode ser constatada pela mudança da coloração do sólido, de branco para alaranjado. O sólido é então filtrado a vácuo, com o auxílio de um funil de *Büchner*, e solubilizado em água. O composto foi purificado por cromatografia em coluna de fase reversa ($\text{SiO}_2 - \text{C18}$), utilizando-se água como eluente.

A análise por espectrofotometria UV-vis e por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 2) indicam que o composto obtido é a BtP e que esta foi obtida com alto grau de pureza. A caracterização é feita por comparação com os espectros e cromatogramas de BtP padrão já caracterizada pelo grupo.

Figura 2. (A) Espectro de absorção de indicaxantina. (B) Cromatograma de BtP acompanhado por UV-vis em 254 nm e 485 nm (coluna de fase reversa C18, 250 × 4,6 mm; sistema cromatográfico: 5 – 95% B em 20 min, sendo o solvente A: 0,1% TFA/água e solvente B: 0,1% TFA/60% MeCN/água com fluxo de 1 mL min⁻¹).

3.2. Estudo da decomposição de betanina

3.2.1. Estudo controle em água

O valor da constante cinética observada (k_{obs}) para a decomposição de Bn em água a 85 °C foi determinado a partir da variação do máximo de absorção em função do tempo. Os espectros foram adquiridos a cada 2,5 min durante 150 min (Figura 3). Dada a baixíssima condutividade de água deionizada, estima-se que o pH da água era 7 dada a sua resistividade de 18,2 MΩ · cm e uma medição semiquantitativa com fita indicadora de pH.

Figura 3. (A) Espectros de absorção de Bn em água ($[\text{Bn}] = 9 \mu\text{mol L}^{-1}$), em função do tempo, a 85 °C. (B) Cinética de decaimento da absorção de Bn em $\lambda = 535 \text{ nm}$; $k_{\text{obs}} = (5,0 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 14,5 \pm 0,6 \text{ min}$. (C) Cinética de formação e posterior decaimento de HBT em $\lambda = 427 \text{ nm}$; $k_{\text{obs},1} = (3,60 \pm 0,42) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2,1} = 19,4 \pm 2,1 \text{ min}$ e $k_{\text{obs},2} = (3,57 \pm 0,42) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2,2} = 19,6 \pm 2,2 \text{ min}$.

A análise do perfil de absorção de Bn em água indica a diminuição da banda de absorção com máximo em 535 nm (correspondente a Bn) em função do tempo, e o aparecimento, seguido de diminuição, de uma banda com máximo em 427 nm, que corresponde ao máximo de absorção do ácido betalâmico, um dos produtos de hidrólise da Bn. Os dados para a degradação de Bn ($\lambda_{\text{máx}} = 535 \text{ nm}$) foram ajustados utilizando-se uma função monoexponencial e a constante cinética observada (k_{obs}) foi calculada em $(5,0 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, correspondendo a um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de $14,5 \pm 0,6 \text{ min}$. Os dados correspondentes a formação, e posterior decomposição, de HBt foram ajustados utilizando-se uma função biexponencial. A constante cinética observada de formação de HBt ($k_{\text{obs},1}$) foi calculada em $(3,60 \pm 0,42) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e o tempo de meia-vida, $t_{1/2,1} = 19 \pm 2 \text{ min}$, e a constante cinética observada para a sua degradação ($k_{\text{obs},2}$) foi calculada em $(3,57 \pm 0,42) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ com tempo de meia-vida, $t_{1/2,2} = 19,6 \pm 2,2 \text{ min}$.

3.2.2. Efeito do tampão

Para o estudo do efeito do tampão sobre a constante cinética observada (k_{obs}) de hidrólise de Bn a 85°C , foram escolhidos três diferentes tampões: acetato ($\text{pK}_{\text{a}} = 4,8$), citrato ($\text{pK}_{\text{a}}\text{s} = 3,1, 4,8, 6,4$) e fosfato ($\text{pK}_{\text{a}}\text{s} = 2,1, 7,2, 12,3$),³⁹ nas concentrações 10, 50, 100, 250, 500 mmol L^{-1} .

3.2.2.1 Tampões acetato e citrato

O efeito dos tampões acetato e citrato sobre as constantes cinéticas observadas (k_{obs}) para a decomposição de Bn foi determinado em tampão acetato pH 4,8 e 5,8, e em tampão citrato pH 4,8. Cada um dos tampões foi preparado em cinco concentrações (10, 50, 100, 250 e 500 mmol L^{-1}). Os valores de k_{obs} foram obtidos por meio do ajuste

monoexponencial dos dados de máximos de absorção *versus* tempo. Os espectros de absorção de Bn em função do tempo estão apresentados na Figura 4.

Figura 4. Espectros de absorção de Bn em função do tempo em tampão acetato e citrato. Na horizontal, tampão acetato pH = 4,8, tampão citrato pH = 4,8 e tampão acetato pH = 5,8, e a [Bn] é 10, 7 e 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; na vertical, a concentração do tampão é 10, 50, 100, 250, 500 mmol L^{-1} . Os espectros foram obtidos a cada 5 min durante 150 min.

A Tabela 1 apresenta os valores de k_{obs} e $t_{1/2}$ determinados para a decomposição de Bn em tampão acetato pH = 4,8 e em tampão citrato pHs = 4,8 e 5,8. Observa-se que tampão acetato pH 4,8 não interfere no valor do k_{obs} , mesmo com o aumento de sua concentração. Nos demais tampões, o aumento da concentração provoca um pequeno aumento do k_{obs} . Entretanto, os valores médios calculados a partir das diferentes concentrações dos tampões ($(4,7 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $(4,9 \pm 0,5) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e $(4,5 \pm 0,4) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, respectivamente) são comparáveis com o k_{obs} do experimento controle em água ($(5,0 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$).

A cinética de degradação de Bn também pode ser acompanhada pela formação de HBt. Observa-se, na Figura 4, o aparecimento de uma banda entre 426 e 430 nm, correspondente a formação do HBt. Entretanto, o HBt também sofre degradação após determinado tempo de aquecimento. Os dados correspondentes à formação e degradação do HBt *versus* tempo foram ajustados utilizando-se uma função biexponencial. A constante cinética observada, $k_{\text{obs},1}$, corresponde a formação de HBt, enquanto $k_{\text{obs},2}$, corresponde a constante cinética observada para sua degradação (Tabela 2).

Os valores médios calculados a partir das diferentes concentrações dos tampões considerando a formação de HBt em tampão acetato pH = 4,8, citrato pH = 4,8 e acetato pH = 5,8 ($(4,5 \pm 0,6 \times 10^{-2}) \text{ min}^{-1}$, $(4,3 \pm 0,7 \times 10^{-2}) \text{ min}^{-1}$ e $(4,0 \pm 0,7 \times 10^{-2}) \text{ min}^{-1}$, respectivamente) estão muito próximos dos calculados acompanhando-se a degradação de Bn, o que confirma os resultados obtidos.

A velocidade de degradação de HBt é menor em meio tamponado do que em água. Comparando-se os valores médio calculados a partir das diferentes concentrações dos tampões ($(2,5 \pm 0,6) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e

$(1,3 \pm 0,3) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, respectivamente) com o valor obtido com a degradação de HBt em água $((3,57 \pm 0,42) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1})$, na mesma temperatura, observa-se que o HBt é mais persistente no meio tamponado do que em água deionizada. Além disso, observa-se que a degradação ocorre mais rápido em tampão acetato pH 4,8 do que nos demais tampões.

Tabela 1. Valores de k_{obs} e de tempo de meia-vida para a degradação da Bn em tampão acetato, citrato e no controle (água deionizada).

Tampão	pH	Conc. (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min ⁻¹)
Controle			0,050	14,5
Acetato	4,8	10	0,046	15
		50	0,046	15
		100	0,046	15
		250	0,047	15
		500	0,051	14
Citrato	4,8	10	0,044	16
		50	0,047	15
		100	0,047	15
		250	0,050	14
		500	0,056	12
Acetato	5,8	10	0,041	17
		50	0,042	16
		100	0,043	16
		250	0,046	15
		500	0,052	13

Tabela 2. Valores de k_{obs} de formação (k_1) e degradação (k_2) e de tempo de meia-vida para a formação e degradação de HBt em tampão acetato e citrato.

Tampão	pH	Conc. (mmol L ⁻¹)	$k_{obs,1}$ (min ⁻¹)	$t_{1/2,1}$ (min)	$k_{obs,2}$ (min ⁻¹)	$t_{1/2,2}$ (min)
Acetato	4,8	10	0,035	20	0,035	20
		50	0,045	15	0,022	32
		100	0,046	15	0,020	34
		250	0,048	14	0,022	31
		500	0,052	13	0,027	25
Citrato	4,8	10	0,041	17	0,011	60
		50	0,036	19	0,016	42
		100	0,038	18	0,015	45
		250	0,046	15	0,014	48
		500	0,053	13	0,014	48
Acetato	5,8	10	0,032	21	0,017	42
		50	0,034	20	0,015	45
		100	0,042	17	0,011	63
		250	0,046	15	0,0092	75
		500	0,048	14	0,013	54

3.2.2.2 Tampão fosfato

Foram preparadas quinze soluções de Bn em tampão fosfato, *i.e.*, três pHs (2,1, 6,2 e 8,2) em cinco concentrações (10, 50, 100, 250 e 500 mmol L⁻¹) cada. Os espectros de absorção em função do tempo em todas as condições são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Espectros de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato. Na horizontal, o pH é 2,1, 6,2 e 8,2 e a [Bn] é 13, 18 e 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; na vertical, a concentração do tampão é 10, 50, 100, 250, 500 mmol L^{-1} . pH = 2,1 e 8,2: a cada 1 min por 60 min; pH = 6,2: a cada 1 min por 30 min e a cada 3 min por 90 min (tempo total de 120 min).

Assim como para a hidrólise de Bn em água, a análise do perfil de absorção de Bn em tampão fosfato, indica uma diminuição do máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$ entre 532 e 543 nm) em função do tempo, e a formação, seguida de diminuição, de uma banda com máximo de absorção referente ao ácido betalâmico. O meio ácido provoca um pequeno deslocamento hipsocrômico do máximo de absorção da Bn, em relação à água, e o aumento da basicidade provoca um deslocamento batocrômico.

Os dados de máximo de absorção *versus* tempo foram ajustados com uma função monoexponencial de forma a determinar os valores de constante cinética observada (k_{obs}) em cada uma das condições estudadas. Quando o ajuste biexponencial foi necessário, utilizou-se o valor da maior constante. Os valores de k_{obs} e tempo de meia-vida estão apresentados na Tabela 3. Observou-se que o k_{obs} aumenta com o aumento da concentração nos tampões pHs 6,2 e 8,2, sendo mais evidenciado em meio básico. Em pH = 2,1, apesar de pequeno (quando comparado aos demais pHs), observa-se o efeito contrário: o aumento da concentração do tampão diminui o k_{obs} . Além disso, em pH = 6,2, nas concentrações mais baixas, o tampão interfere pouco no valor do k_{obs} , sendo este próximo ao valor obtido em água ($(5,0 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$).

A cinética da reação de formação do HBt, para os pHs 6,2 e 8,2, e para sua decomposição também foram investigadas. Os valores de $k_{\text{obs},1}$ (formação de HBt) e $k_{\text{obs},2}$ (degradação de HBt) e seus respectivos tempos de meia-vida estão apresentados na Tabela 4. Em pH = 2,1, observa-se o contrário do que é observado acompanhando-se a reação pela degradação de Bn: o aumento do valor de k_{obs} com o aumento da concentração do tampão. Entretanto, a variação continua sendo muito pequena (diferença entre o $t_{1/2}$ do tampão menos concentrado e do mais concentrado é menor que 1 min).

Tabela 3. Valores de k_{obs} e de tempo de meia-vida para a degradação da Bn em tampão fosfato e no controle (água deionizada).

Tampão	pH	Conc. (mmol L ⁻¹)	k_{obs} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
Controle			0,050	14,5
Fosfato	2,1	10	0,60	1,1
		50	0,57	1,2
		100	0,55	1,3
		250	0,52	1,3
		500	0,51	1,4
Fosfato	6,2	10	0,043	16
		50	0,047	15
		100	0,052	13
		250	0,060	11
		500	0,070	10
Fosfato	8,2	10	0,083	8
		50	0,13	5
		100	0,16	4
		250	0,25	3
		500	0,38	2

Tabela 4. Valores de k_{obs} de formação (k_1) e degradação (k_2) e de tempo de meia-vida para a formação e degradação de HBt em tampão fosfato.

Tampão	pH	Conc. (mmol L ⁻¹)	$k_{\text{obs},1}$ (min ⁻¹)	$t_{1/2,1}$ (min)	$k_{\text{obs},2}$ (min ⁻¹)	$t_{1/2,2}$ (min)
Fosfato	2,1	10	0,28	2,4	0,28	2,4
		50	0,28	2,4	0,10	6,7
		100	0,32	2,1	0,11	6,5
		250	0,36	2	0,095	7,3
		500	0,40	1,7	0,060	11
Fosfato	6,2	10	0,042	16	0,017	41
		50	0,047	15	0,014	49
		100	0,050	14	0,016	44
		250	0,057	12	0,016	44
		500	0,063	11	0,018	39
Fosfato	8,2	10	0,088	8	0,0081	85
		50	0,14	5	0,016	44
		100	0,17	4	0,015	46
		250	0,28	2	0,014	49
		500	0,46	1,5	0,014	49

3.2.3. Efeito da adição de sais

O efeito de adição de diferentes sais sobre a constante cinética de decomposição de betanina foi estudado, inicialmente, empregando-se diferentes sais de sódio. Foram preparadas soluções aquosas concentradas (500 mmol L⁻¹) dos sais apresentados na Tabela 5 e o pH das soluções foi aferido. Observou-se uma variação do pH do meio

entre 3,5 e 8,4 (Tabela 5). Por esse motivo, o efeito da adição de sais sobre a cinética de decomposição de Bn foi estudado em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ ($pK_{a1} = 2,1$ e $pK_{a2} = 7,2$) nos pHs 3 e 6,2.

Tabela 5. pH de soluções aquosas de diferentes sais de sódio (500 mmol L⁻¹), ácido precursor do sal e seu valor de pK_a .

Sal	pH	Ácido precursor	pK_a
NaCl	5,1	HCl	-7
NaBr	5,1	HBr	-9
NaF	8,4	HF	3,2
NaI	5,3	HI	-10
Na ₂ SO ₄	6,8	H ₂ SO ₄	-3; 1,9
NaOAc	8,2	CH ₃ COOH (HOAc)	4,8
NaBF ₄	3,5	HBf ₄	-0,4

O uso de tampão fosfato evitou a variação do pH com a adição de sal na maioria dos casos. Contudo, em alguns casos o tampão não foi suficiente para manter o pH da solução constante. Nesses casos, adicionou-se um volume mínimo de solução de NaOH ou HCl (1,0 mol L⁻¹) até o pH atingir o valor adequado. Os espectros e curvas cinéticas correspondentes a cada sal são apresentados no Anexo 8.3. Como descrito anteriormente, a hidrólise é mais rápida em pH = 3 do que em pH = 6,2, independente do sal adicionado. A cinética de degradação de Bn foi acompanhada a 60 °C.

3.2.3.1 Cátion sódio

Exceto para sulfato de sódio e p-toluenosulfonato de sódio, observa-se uma variação discreta do valor de k_{obs} com a adição de sais (500 mmol L⁻¹) nos dois pHs estudados (Tabela 6 e Figura 6). A adição de acetato de sódio ao tampão em pH = 3

alterou o pH do meio e a adição de um volume mínimo de HCl ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) não foi suficiente para corrigi-lo. Como a mudança da concentração da solução aquosa poderia interferir no resultado do experimento, o efeito da adição de acetato de sódio sobre a cinética de decomposição de Bn em $\text{pH} = 3$ não foi investigado.

Tabela 6. Valores de constante cinética observada (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a decomposição de Bn em meio aquoso tamponado (tampão fosfato 100 mmol L^{-1} $\text{pH} = 3$ ou $6,2$) na presença de diferentes sais de sódio.

pH = 3,0	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	pH = 6,2	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
TPi	$0,025 \pm 0,001$	28 ± 1	TPi	$0,0042 \pm 0,0001$	165 ± 2
NaCl	$0,028 \pm 0,001$	$24,9 \pm 0,4$	NaCl	$0,0048 \pm 0,0001$	145 ± 4
NaBr	$0,030 \pm 0,001$	$23,1 \pm 0,4$	NaBr	$0,0046 \pm 0,0001$	150 ± 2
NaI	$0,022 \pm 0,001$	31 ± 2	NaI	$0,0058 \pm 0,0001$	120 ± 2
Na_2SO_4	$0,043 \pm 0,001$	$16 \pm 0,3$	Na_2SO_4	$0,0057 \pm 0,0000$	123 ± 1
<i>p</i> -TsONa	$0,040 \pm 0,001$	$17,3 \pm 0,5$	<i>p</i> -TsONa	$0,0061 \pm 0,0001$	113 ± 1
			AcONa	$0,0060 \pm 0,0000$	115 ± 1

Figura 6. Efeito de diferentes sais de sódio sobre a constante cinética de hidrólise de Bn em tampão fosfato 100 mmol L^{-1} em (A) $\text{pH} 3$ e (B) $\text{pH} 6,2$.

3.2.3.2 Cátion amônio

A adição de cátions amônio ao meio tamponado aumentou a velocidade de degradação de Bn em todos os casos em pH = 6,2 e em apenas uma das condições estudadas em pH = 3 (Tabela 7 e Figura 7). O tempo de meia-vida de Bn diminuiu cerca de duas vezes com a adição dos sais ao meio em pH = 6,2. Em pH 3, a adição de NH_4Cl ao meio aumenta em quase três vezes o valor do k_{obs} de degradação de Bn, enquanto para NH_4I e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ observa-se nenhum ou um efeito muito discreto sobre o k_{obs} . O efeito da adição de fluoreto de amônio e acetato de amônio sobre a cinética de decomposição de Bn em pH = 3 não foi investigado. A adição destes sais ao tampão alterou o pH do meio e a adição de quantidades mínimas de HCl/NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) não foi suficiente para corrigi-los.

Tabela 7. Valores de constante cinética observada (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a decomposição de Bn em meio aquoso tamponado (tampão fosfato 100 mmol L^{-1} pH = 3 ou 6,2) na presença de diferentes sais de amônio.

pH = 3,0	$k_{\text{obs}} (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$	pH = 6,2	$k_{\text{obs}} (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$
TPi	$0,025 \pm 0,001$	28 ± 1	TPi	$0,0042 \pm 0,0001$	165 ± 2
NH_4Cl	$0,072 \pm 0,014$	10 ± 2	NH_4Cl	$0,0074 \pm 0,0001$	93 ± 2
NH_4I	$0,026 \pm 0,002$	27 ± 2	NH_4I	$0,0080 \pm 0,0001$	86 ± 1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$0,029 \pm 0,001$	$23,8 \pm 0,3$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$0,0084 \pm 0,0001$	83 ± 1
			NH_4F	$0,0087 \pm 0,0003$	80 ± 2
			AcONH_4	$0,0088 \pm 0,0001$	$79,0 \pm 0,2$

Figura 7. Efeito de diferentes sais de amônio sobre a constante cinética observada (k_{obs}) de hidrólise de Bn em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ em (A) pH = 3 e (B) pH = 6,2.

3.2.3.3 Ânion cloreto

Em pH = 3, além do efeito da adição de NH₄Cl, descrito no item anterior, o efeito da adição dos sais cloretos sobre o k_{obs} de degradação de Bn é discreto. Em pH = 6,2, a adição de Bu₄NCl diminuiu em pouco mais de três vezes o tempo de meia-vida para a degradação de Bn (Tabela 8 e Figura 8).

Tabela 8. Valores de constante cinética observada (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a decomposição de Bn em meio aquoso tamponado (tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH = 3 ou 6,2) na presença de diferentes sais cloretos.

pH = 3,0	k_{obs} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	pH 6,2	k_{obs} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
TPi	0,025 ± 0,001	28 ± 1	TPi	0,0042 ± 0,0001	165 ± 2
LiCl	0,026 ± 0,001	27 ± 1	LiCl	0,0048 ± 0,0001	143 ± 4
NaCl	0,028 ± 0,001	24,9 ± 0,4	NaCl	0,0048 ± 0,0001	145 ± 4
KCl	0,017 ± 0,001	40 ± 1	KCl	0,0045 ± 0,0001	153 ± 5
NH ₄ Cl	0,072 ± 0,014	10 ± 2	NH ₄ Cl	0,0074 ± 0,0001	93 ± 2
Bu ₄ NCl	0,042 ± 0,001	16,4 ± 0,2	Bu ₄ NCl	0,014 ± 0,001	50,9 ± 0,2
MgCl ₂	0,039 ± 0,001	17,6 ± 0,5

Figura 8. Efeito de diferentes sais cloretos sobre a constante cinética observada (k_{obs}) de hidrólise de Bn em tampão fosfato 100 mmol L^{-1} em (A) pH = 3 e (B) pH = 6,2.

A adição de cloreto de magnésio ao tampão fosfato pH = 6,2 alterou o pH do tampão de modo que a adição de quantidades mínimas de HCl ou NaOH (1,0 mol L^{-1}) não foi suficiente para corrigi-lo.

3.3. Efeito do pH sobre a hidrólise de betanina e indicaxantina

Para o estudo da decomposição de Bn e BtP em diferentes pHs, foi utilizado tampão fosfato 10 mmol L^{-1} com pH entre 2 e 11. Os espectros de absorção foram registrados ao longo de duas meias-vidas, quando possível. Os máximos de absorção versus tempo foram ajustados com uma função monoexponencial para determinar os valores de k_{obs} . Quando apropriado, foi feito um ajuste com uma função biexponencial e o valor da constante mais alta é apresentado. Com a Bn, o efeito do pH foi estudado em cinco temperaturas (65, 70, 75, 80 e 85 $^{\circ}\text{C}$); com a BtP apenas a 60 $^{\circ}\text{C}$.

3.3.1. Betanina

A constante cinética observada (k_{obs}) para a decomposição de Bn em meio aquoso tamponado (tampão fosfato 10 mmol L^{-1}) foi determinada em função da temperatura em diferentes pHs. Os valores de k_{obs} obtidos estão apresentados na

Tabela 9 e a dependência de k_{obs} com o pH em diferentes temperaturas é apresentada na Figura 9.

Figura 9. Logaritmo das constantes de decaimento exponencial de absorção de Bn em diferentes temperaturas, em função do pH.

Tabela 9. Valores de constante cinética observada (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a decomposição de Bn em meio aquoso tamponado em função do pH e da temperatura.

k_{obs} (min^{-1})					
pH	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C
2	$0,15 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,01$
3	$0,039 \pm 0,012$	$0,060 \pm 0,008$	$0,075 \pm 0,006$	$0,11 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$
4	$0,012 \pm 0,003$	$0,024 \pm 0,008$	$0,042 \pm 0,017$	$0,042 \pm 0,007$	$0,048 \pm 0,004$
5	$0,0071 \pm 0,0001$	$0,014 \pm 0,001$	$0,019 \pm 0,002$	$0,028 \pm 0,001$	$0,034 \pm 0,001$
6	$0,0069 \pm 0,0001$	$0,012 \pm 0,001$	$0,017 \pm 0,001$	$0,027 \pm 0,001$	$0,033 \pm 0,001$
7	$0,0098 \pm 0,0004$	$0,018 \pm 0,001$	$0,025 \pm 0,001$	$0,038 \pm 0,001$	$0,048 \pm 0,001$
8	$0,018 \pm 0,000$	$0,032 \pm 0,001$	$0,044 \pm 0,001$	$0,066 \pm 0,001$	$0,082 \pm 0,002$
9	$0,030 \pm 0,006$	$0,043 \pm 0,001$	$0,071 \pm 0,011$	$0,095 \pm 0,018$	$0,11 \pm 0,02$
10	$0,058 \pm 0,007$	$0,080 \pm 0,009$	$0,11 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,02$
11	$0,25 \pm 0,00$	$0,38 \pm 0,07$	$0,37 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,02$

Observou-se que a curva de k_{obs} de hidrólise em função do pH segue o mesmo perfil para todas as temperaturas: concavidade para cima, com mínimo entre pHs 5 e 6. Além disso, nas extremidades, meio muito ácido e muito básico, os valores de k_{obs} são mais próximos do que nos pHs intermediários.

3.3.2. Indicaxantina

3.3.2.1 Estudo controle em água

O valor da constante cinética observada (k_{obs}) para a decomposição de BtP em água a 60 °C foi determinado a partir da variação do máximo de absorção em função do tempo. Os espectros foram adquiridos a cada 2 ou 5 min durante 480 min (Figura 10). Dada a baixíssima condutividade de água deionizada, estima-se que o pH da água era 7 dada a sua resistividade de 18,2 MΩ · cm e uma medição semiquantitativa com fita indicadora de pH.

Figura 10. (A) Espectros de absorção de BtP em água ($[\text{BtP}] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função do tempo a 60 °C. (B) Cinética de decaimento da absorção de BtP em $\lambda = 485 \text{ nm}$. O valores de k_{obs} $(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 594 \pm 57 \text{ min}$, 60 °C.

A análise do perfil de absorção de BtP em água indica a diminuição da banda de absorção com máximo em 485 nm (correspondente a BtP) em função do tempo. Os dados para a degradação de BtP ($\lambda = 485 \text{ nm}$) foram ajustados utilizando-se uma função

monoexponencial e a constante cinética observada (k_{obs}) foi calculada em $(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, correspondendo a um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de $594 \pm 57 \text{ min}$. A cinética de decomposição de BtP a 60°C é muito lenta e, por isso, mesmo acompanhando sua degradação por 8 h, a meia-vida não foi atingida.

3.3.2.2 Efeito do pH em tampão fosfato

O valor de k_{obs} para a decomposição de BtP meio aquoso tamponado (TPi 10 mmol L^{-1}) foi determinado em diferentes pHs (Figura 11). Observa-se um perfil semelhante ao observado com o estudo de Bn. Contudo, há uma diferença notável: uma tendência linear na diminuição do log de k_{obs} com o pH até $\text{pH} = 6$, ponto mínimo da curva. A constante de velocidade de degradação de BtP aumenta com o aumento do pH a partir de $\text{pH} = 6$. Os valores de k_{obs} e tempo de meia-vida para BtP estão apresentados na Tabela 10.

Figura 11. Logaritmo das constantes de decaimento exponencial de absorção de BtP em função do pH a 60°C .

Tabela 10. Valores de constante cinética observada (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a decomposição de BtP em diferentes pHs, a 60 °C.

pH	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
2	$0,061 \pm 0,013$	12 ± 3
2,5	$0,026 \pm 0,001$	26 ± 1
3	$0,030 \pm 0,001$	23 ± 1
3,5	$0,0064 \pm 0,0002$	108 ± 4
4	$0,0027 \pm 0,0003$	261 ± 29
4,5	$0,0054 \pm 0,0010$	133 ± 25
5	$0,0015 \pm 0,0003$	468 ± 88
6	$0,00047 \pm 0,00003$	1490 ± 106
7	$0,0034 \pm 0,0015$	227 ± 81
8	$0,021 \pm 0,011$	38 ± 15
9	$0,055 \pm 0,024$	14 ± 5
10	$0,19 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,2$
11	$1,3 \pm 0,2$	$0,55 \pm 0,10$

4. DISCUSSÃO

4.1. Semissíntese de indicaxantina

Betanina (Bn) foi obtida pelo método desenvolvido anteriormente no grupo, cuja principal limitação é a escala de obtenção de betalaína. Entretanto, observa-se no cromatograma da Figura 1 que somente betanina é obtida, não sendo observada a presença de isobetanina.

Indicaxantina (BtP) foi inicialmente produzida em meio aquoso alcalino, conforme descrito em trabalho anterior do grupo³⁷. Ao adicionar a BtP obtida por este método nas soluções tampão utilizadas no estudo do efeito do pH sobre a decomposição desta betalaína, observou-se que o pH de todos os tampões era alterado para pH = 5. Este resultado pode ser interpretado considerando-se que a semissíntese depende da adição de ácido acético glacial, o que torna a solução de BtP uma solução tampão acetato (AcOH/AcONa, $pK_a = 4,8$). Desta forma, optou-se por preparar a BtP de uma forma alternativa que evitasse a adição de ácido acético.

Ácido betalâmico é solúvel em acetato de etila em meio ácido.^{3, 37} Embora L-prolina seja insolúvel neste solvente orgânico, observa-se a reação em meio heterogêneo, ou seja, a adição de prolina ao HBt em AcOEt/H⁺ resulta na formação de BtP na superfície do aminoácido sólido. Como se trata de um equilíbrio (Esquema 5), a reação exige um excesso de L-pro de cerca de 100 equiv.. Nestas condições, BtP é formada quantitativamente, mas sua hidrólise durante a etapa de purificação por cromatografia de coluna em condições de fase reversa compromete o rendimento global do processo que foi calculado em cerca de 70%. Com esse método foi possível obter BtP sem acetato, o que viabilizou os estudos posteriores de efeito de pH.

Esquema 5. Formação de BtP a partir da reação de HBt e L-pro.

4.2. Cinéticas de hidrólise

A decomposição de betanina em temperatura ambiente é muito lenta para ser monitorada por mais de uma meia-vida antes que sinais de contaminação microbiológica sejam observados na solução. Estudos realizados nestas condições (25 °C), apresentam valores conflitantes de constante cinética de degradação (k_{obs}) de Bn.^{9, 16, 20} Os valores de k_{obs} e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) reportados na literatura estão na Tabela 11. A variação nos valores do k_{obs} pode ser resultado da dificuldade em acompanhar a degradação de Bn por tempo suficiente para a realização de um bom ajuste não linear (*i.e.*, pelo menos duas meias-vidas). Além disso, no caso de estudos com Bn não purificada, o valor obtido pode ser resultado da presença de compostos que aumentam a estabilidade desta betalaína em solução.

Tabela 11. Valores da literatura para a constante de decomposição e tempo de meia-vida para betanina pura e misturas brutas.

	Cond ^a	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	Ref
Bn bruta	pH = 5	0,0027	252	²⁰
Bn	pH = 5	0,036	19	¹⁶
Bn	em água	0,0053	130	⁹
Bn	pH = 5,5; 86 °C	2,8 (0,046 min ⁻¹)	0,25 (15 min)	⁴⁰
Bn	em água, 85 °C	2,9 (0,048 min ⁻¹)	0,24 (14,5 min)	<i>este trabalho</i>

^a Condições experimentais.

Os dados da variação da absorção em 536 nm em função do tempo indicam uma diminuição monoexponencial da absorção de Bn, de acordo com o reportado para a decomposição térmica de Bn purificada e em suco de beterraba¹⁶. Além disso, os valores determinados estão de acordo com aqueles reportados para a decomposição de Bn em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5, a 86 °C ($k_{\text{obs}} = 4,6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 15 \text{ min}$, Tabela 11).⁴⁰ Este resultado é o controle negativo para analisar os efeitos de diferentes tampões e sais. O fato do HBt ser formado com constante cinética similar ao desaparecimento de Bn e da ocorrência de ponto isosbético (Figura 3) sugere que os dois eventos estão diretamente relacionados. Um dado importante é a ocorrência de decomposição do HBt, que compromete o tempo de vida das betalainas em solução, visto que a formação e hidrólise de betalainas estão em equilíbrio e que o consumo de HBt desloca este equilíbrio na direção da hidrólise (Esquema 5).

4.2.1. Efeito de tampões

Tampões acetato e citrato, embora capazes de atuar como bases gerais, não afetam a constante cinética de decomposição de Bn a 85 °C. Além disso, para o tampão acetato, tanto a variação de pH entre 4,8 e 5,8 quanto a variação da concentração de tampão entre 10 e 500 mmol L⁻¹ não provocam efeito significativo sobre o valor médio de k_{obs} ($(4,7 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e $(4,5 \pm 0,4) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, respectivamente). Novamente, o HBt apresenta valores de k_{obs} para sua formação compatíveis com a decomposição de Bn. Com isso, os dois tampões, acetato e citrato, podem ser usados no estudo do efeito dos sais sobre a degradação de Bn. O fator limitante para o uso destes tampões é a sua faixa de tamponamento.

Para o tampão fosfato, entretanto, os resultados são mais complexos. Em meio ácido (pH = 2,1) o aumento da concentração do tampão resulta em diminuição sutil do

valor de k_{obs} ; entretanto, o valor de k_{obs} para a formação de HBt aumenta com o aumento da concentração. Além disso, o valor de k_{obs} para o desaparecimento de Bn são duas vezes maior do que a formação de HBt em concentrações baixas de TPi (10 mmol L^{-1}), mas ligeiramente diferentes em TPi 500 mmol L^{-1} . Este resultado poderia ser explicando se o aumento da concentração de TPi neste pH favorecesse a hidrólise de betanina em detrimento de um outro processo de decomposição que ocorra em paralelo. Em $\text{pH} = 6,2$, este efeito não é observado e os valores de k_{obs} para a decomposição de Bn e formação de HBt são similares e praticamente duplicam com o aumento da concentração do tampão de 10 para 500 mmol L^{-1} , sugerindo catálise básica geral ou catálise nucleofílica. Em $\text{pH} = 8,2$ os valores das constantes aumentam quase cinco vezes, corroborando a hipótese de catálise pelo fosfato.

Estes resultados poderiam ser racionalizados considerando-se que a hidrólise direta concorre com uma via de hidrólise que passa por intermediários cujo anel 1,2,3,4-tetrahidropiridínico (tHpy) foi hidrolisado anteriormente (Esquema 6). Em meio ácido $\text{pH} = 2,1$, betanina poderia ser protonada no anel tHpy, resultando em um aumento de eletrofilicidade nos carbonos vizinhos, mas principalmente no carbono sp^2 . O ataque nucleofílico da água a esse carbono (uma das possíveis etapas lentas da reação, junto ao ataque que leva a hidrólise direta) leva ao intermediário op-Bn, que está sujeito a uma série de reações, incluindo a hidrólise, que levaria ao aldeído op-HBt que cicliza espontaneamente ao ácido betalâmico. Este mecanismos poderia explicar como a cinética de decomposição de Bn ocorre mais rapidamente do que a formação de ácido betalâmico em meio ácido se a via que passa pelos intermediários abertos ganhar importância, ou seja, dependendo das constantes de equilíbrio. O efeito da diminuição do valor de k_{obs} com o aumento da concentração do tampão em meio ácido $\text{pH} = 2,1$

poderia ser explicado se o íon fosfato tiver algum papel de assistência nucleofílica na hidrólise direta de Bn.

Esquema 6. Formação de HBt a partir de betanina: hidrólise direta e hidrólise via intermediários abertos.

O tampão fosfato (100 mmol L^{-1}) em $\text{pH} = 6,2$ foi escolhido para estudos posteriores com a adição de sais pois o valor determinado para k_{obs} é similar àquele obtido com o controle em água. Além disso, tampão fosfato permite uma maior faixa de tamponamento comparada a tampão acetato ou citrato, incluindo $\text{pH} = 3$ no qual as porções carboxílicas das betalainas estão supostamente protonadas.⁴¹ Os resultados nos pHs 2,1, 6,2 e 8,2 também nos levaram a realizar um estudo sistemático do efeito de pH sobre a cinética de decomposição de Bn e BtP em TPi.

4.2.2. Efeito de sais

O caráter ácido-base de diferentes sais torna impossível que soluções aquosas de um conjunto dessas substâncias tenha o mesmo pH, embora soluções de sais de Na⁺ tenham sido relatadas⁴² como tendo impacto mínimo sobre o pH da água. Nossos resultados com alguns dos sais empregados no trabalho de Mooi e Heyne⁴² indicam que o pH sofre uma variação enorme, entre 3,5 e 8,4 (Tabela 5). Isso nos levou a realizar todo o estudo para encontrar um sistema tamponado que não afetasse as características de hidrólise de betalaínas, discutido no item anterior.

O sistema tampão escolhido deve manter o pH do meio constante na presença de diferentes concentrações de sal. Porém, a adição de sal resultou, em alguns casos, em alteração no pH do meio, o que levou à necessidade de ajuste do pH com volumes mínimos de HCl ou NaOH (1,0 mol L⁻¹). Desta forma, somente o efeito dos sais deve ter influência sobre a cinética de decomposição de betalaínas em pH fixo.

Os estudos foram conduzidos em TPi (100 mmol L⁻¹) pHs = 3,0 e 6,2 com a adição de sais em concentração final de 500 mmol L⁻¹ para garantir que o efeito do sal adicionado fosse mais importante do que o fosfato de sódio presente no tampão. Tanto em pH = 3 quanto 6,2, o efeito de sais de sódio sobre o k_{obs} de hidrólise de Bn é sutil (Tabela 6 e Figura 6). Os maiores efeitos notados reduzem o valor de k_{obs} em pouco mais do que a metade (fator entre 1,4 e 1,7) e foram provocados principalmente pelo *p*-TsONa nos dois pHs. Sulfonatos são aplicados em cromatografia de íons dada a sua capacidade de formar pares iônicos e o ânion *p*-TsO⁻ é conhecido pela sua capacidade de formar pares iônicos em solução.⁴³ Em meio ácido, a Bn totalmente protonada tem carga +2, o que a torna propícia para formar pares iônicos com ânions adequados (Esquema 7). A formação estabiliza a carga positiva, o que deveria em princípio

aumentar a estabilidade da betalaína frente à hidrólise resultou no aumento do valor de k_{obs} , o que poderia ser explicado eventualmente por um efeito de catálise nucleofílica ou por um efeito da força iônica sobre o pK_a da betanina (diminuição do pK_a das porções tHpyH⁺ e/ou COOH com o aumento da força iônica), como observado para diversos ácidos como, por exemplo, o ácido acético.⁴⁴

No caso de sais de amônio, em TPi pH = 6,2 o equilíbrio entre amônio e amina em solução deve ser o fator mais importante para explicar o efeito catalítico destes sais sobre a decomposição de Bn (aumento de 2 vezes na magnitude de k_{obs}). O resultado com cloreto de amônio em meio ácido não pode ser explicado com facilidade, visto que entre os cloretos, somente o cátion amônio e tetrabutilamônio apresentaram atividade catalítica importante para a decomposição. O efeito do cátion tetrabutilamônio também pode estar ligado à formação de par iônico.^{43b} Em pH = 6,2, Bn está desprotonada, supostamente com carga -2; a formação de par iônico estabiliza a carga negativa (Esquema 7), o que provocaria um aumento da susceptibilidade da molécula a hidrólise.

Esquema 7. Possíveis pares iônicos formados com Bn em diferentes estados de protonação e os íons p-TsO⁻ e Bu₄N⁺. Dada a incerteza na desprotonação do anel tHpy ou de uma porção carboxílica (representada aqui pela porção carboxílica da 5-O-glicosil ciclo-DOPA), ambas as possibilidades são apresentadas.

Estes supostos efeitos de formação de par iônico deveriam ser, em princípio, observáveis por espectroscopia de absorção dado o efeito da estabilização das cargas sobre as propriedades eletrônicas de betalaínas. O pH não afeta o máximo de absorção de Bn quando variado entre 3 e 6 em TPi 100 mmol L⁻¹, mas a adição de *p*-TsONa ou Bu₄NCl provoca o mesmo deslocamento de 2 nm do máximo de absorção (Figura 12). Sabe-se que betalaínas são pouco sensíveis a efeitos da polaridade do meio ou presença de cátions metálicos,²⁵ e a análise dos espectros não foi conclusiva.

Figura 12. Espectros de absorção de Bn em tampão fosfato (100 mmol L⁻¹) pHs 3 e 6 e na presença de *p*-toluenosulfonato de sódio ou cloreto de tetrabutilamônio (500 mmol L⁻¹).

4.2.3. Efeito do pH sobre a hidrólise de betalaínas

O estudo da estabilidade térmica de Bn permitiu o cálculo da energia de ativação (E_a) para cada pH estudado, por meio da equação de Arrhenius. Os valores de E_a (Tabela 12) estão de acordo com o observado anteriormente: maior energia de ativação nos pHs intermediários. Estes dados reafirmam que tanto o pH quanto a temperatura são fatores críticos para a decomposição de betanina, embora a variação do tempo de meia vida com o pH seja mais pronunciada (cerca de 20×) do que a variação com a temperatura (4×).

Os experimentos de efeito do pH (usando TPi) com BtP foi realizado a 60 °C e o estudo da hidrólise de Bn a 65 °C por conta de uma complicação experimental ligada a troca do banho termostático. Contudo, quando os valores de k_{obs} obtidos para as duas betalaínas nestas condições são comparados, é possível observar que BtP é um pouco mais estável que Bn somente entre pHs 4 e 7, tendo k_{obs} semelhante aos da Bn em meio fortemente ácido ou alcalino (Figura 13).

O gráfico de $\log k_{obs}$ versus o pH mostra catálise ácida e básica nas extremidades (Figura 13, regiões 1 e 3/4, respectivamente), separados por uma faixa pH-independente (Figura 13, região 2). Este perfil é relatado na literatura para diversos processos de hidrólise, sendo o exemplo mais conhecido o da hidrólise da aspirina.⁴⁵ O dado pode ser considerado como uma sequência de catálise ácida específica (CAE), catálise básica geral (CBG) e catálise básica específica (CBE).

Dado que não há praticamente variação dos valores de k_{obs} com o aumento da concentração de fosfato, pode-se inferir que em pH = 2 ocorre CAE. Considerando-se que a adição de água tanto para a abertura do anel tHpy quanto para a hidrólise da porção imínio poderiam ser a etapa lenta desta reação (Esquema 8) e que esta reação

concorre com uma via não catalisada por ácido (Esquema 6), cujo passo limitante é o ataque nucleofílico da água ao carbono imínico são formuladas duas hipóteses para explicar esses resultados.

Tabela 12. Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) em função do pH e temperatura e valores dos parâmetros de Arrhenius em função do pH.

$t_{1/2}$ (min)						A	E_a (kJ mol ⁻¹)
pH	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C		
2	4,5 ± 0,4	2,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,38 ± 0,03	$3,6 \times 10^7$	53,8
3	19 ± 5	12 ± 2	9 ± 1	7 ± 1	5 ± 1	$4,0 \times 10^7$	58,1
4	63 ± 17	31 ± 9	19 ± 9	17 ± 3	14 ± 1	$5,4 \times 10^7$	62,0
5	97 ± 1	50 ± 3	37 ± 3	25 ± 1	20 ± 1	$7,8 \times 10^{10}$	84,4
6	100 ± 1	56 ± 1	40 ± 1	25,8 ± 0,3	20,7 ± 0,1	$1,1 \times 10^{10}$	78,9
7	71 ± 3	39 ± 1	28 ± 1	18,4 ± 0,4	14,6 ± 0,4	$7,0 \times 10^9$	76,3
8	37,7 ± 0,1	22 ± 1	15,6 ± 0,5	10,5 ± 0,2	8,4 ± 0,2	$7,3 \times 10^{10}$	81,6
9	24 ± 4	16,2 ± 0,3	10 ± 1	7 ± 1	6 ± 1	$2,4 \times 10^9$	70,6
10	12 ± 1	9 ± 1	7 ± 1	5 ± 1	4 ± 1	$1,1 \times 10^7$	53,5
11	2,81 ± 0,03	1,9 ± 0,4	2 ± 0,05	1,8 ± 0,2	1,25 ± 0,04	$3,3 \times 10^5$	39,7

Figura 13. Dependência do valor de $\log k_{\text{obs}}$ com o pH do meio para betanina (Bn) a 65 °C e indicaxantina (BtP) a 60 °C e projeções de quatro regiões distintas.

A hipótese 1 (Esquema 8) é que a protonação do anel tHpy catalisa a reação via intermediários abertos, que se torna mais rápida do que a via não catalisada. A hipótese 2 se baseia na betalaína com a porção tHpy desprotonada mesmo em meio fortemente ácido. O aumento do pH do meio leva a uma desprotonação das porções carboxílicas, deixando o carbono imínico menos susceptível ao ataque dado a carga geral negativa da betalaína em pH neutro. Ou seja, a protonação das porções carboxílicas teria efeito catalítico sobre a hidrólise.

Esquema 8. Proposta 1 para o efeito catalítico de ácido sobre a hidrólise de betanina. As setas indicam os possíveis passos lentos da reação.

Esquema 9. Proposta 2 para o efeito de catálise. Para simplicidade é apresentada uma betalaína mais simples do que a Bn e a BtP.

Na região de pH entre 4 e 8 (Figura 13, região 2) observa-se que a hidrólise se torna independente do pH que poderia resultar da soma dos efeitos de CAE com CBG. Para que essa suposição faça sentido é necessário que se caracterize CBG pela ocorrência de um perfil de saturação (subida e *plateau*) que pode ser observado se as regiões 2 e 3 (Figura 13) são analisadas em conjunto e se em pH = 9 considera-se que a ocorrência de CBE se torna relevante. Para a CBG pode-se considerar a ocorrência de um processo intermolecular catalisado por bases gerais presentes em solução (*e.g.*, fosfato) ou um processo intramolecular catalisado pela porção carboxílica desprotonada (Esquema 10).

Esquema 10. Possíveis vias de catálise básica geral para a hidrólise de betalaínas.

O aumento na velocidade da reação de degradação em pH acima de 9 pode ser explicado considerando-se a ocorrência de CBE (*i.e.*, ataque direto da hidroxila, Esquema 11).

Esquema 11. Possível via de catálise básica específica para a hidrólise de betalaínas.

A maior dificuldade para a racionalização dos resultados é a falta de dados precisos a respeito dos pK_a s de betalaínas. O motivo da quase inexistência de informações na literatura está ligado à baixa quantidade de composto que normalmente é obtido, o que dificulta titulações potenciométricas (que exigem soluções com concentração na faixa de 10 mmol L^{-1} em volumes mínimos de cerca de 10 mL),⁴⁶ e à sobreposição de bandas de absorção dos ácidos e bases conjugadas durante a titulação espectrofotométrica, o que impede a localização de um comprimento de onda de monitoramento ideal.⁴⁶

Os pK_a s de Bn foram relatados como sendo entre 2,9 e 3,4 para as porções carboxílicas e 8,5 e 8,7 para a hidroxila fenólica.^{41, 47} Foi também relatado que o ponto isoelétrico (ponto de neutralidade de carga) de Bn está na faixa de pH entre 1,5 e 2,0.⁴¹ Indicaxantina (BtP) teve seus pK_a s relatados como 3,3,⁴⁸ não sendo possível diferenciar entre os grupos carboxílicos.

Betalaínas neutras poderiam indicar que a porção tHpy estaria protonada e que dois grupos COOH estão desprotonados (há duas cargas positivas e duas cargas negativas na betalaína) ou que somente um grupo carboxílico foi desprotonado.

A primeira hipótese não é absurda considerando-se que o pK_{aH} de iminas é, em geral, 2 – 4 unidades abaixo da amina correspondente,⁴⁹ ou seja, os valores de pK_{aH} para imino ácidos seriam entre 6 e 8 visto que aminoácidos tem pK_{aH} da porção amina próximo de 10. Um cálculo simples de distribuição média de carga foi feito com o programa MarvinSketch e contraria o resultado experimental de 1970 de Nilsson quanto ao valor de ponto isoelétrico (PI) da Bn ao determinar $PI = 3,5$ para Bn e 3,9 para BtP. Entretanto, o cálculo mostra uma tendência que parece ir de encontro com os resultados de hidrólise: a diminuição da densidade positiva é acompanhada pela estabilização das betalaínas que, com carga -1 são menos susceptíveis à hidrólise. O aumento da concentração de HO^- provoca a hidrólise, independente da carga negativa das betalaínas; desta forma, a estabilização da carga pela formação de pares iônicos poderia favorecer a hidrólise ao invés de preveni-la.

Figura 14. Distribuição de carga média para Bn e BtP em função do pH calculado pelo programa MarvinSketch através de método aditivo.

Foi realizado um ajuste não linear multiparamétrico para determinar os valores das constantes de proporcionalidade para os diferentes processos catalíticos (Eq. (1),

Figura 15). As concentrações de H_3O^+ , HO^- , dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$) e monohidrogenosulfato (HPO_4^{2-}) foram determinadas em cada pH e o ajuste foi realizado para as decomposições de Bn e BtP a 65 °C e 60 °C respectivamente .

$$k_{obs} = k_0 + k_{CAE} [H_3O^+] + k_1 [H_2PO_4^-] + k_2 [HPO_4^{2-}] + k_{CBE} [HO^-] \quad (1)$$

Figura 15. Concentração de H_3O^+ versus k_{obs} , ambos em escala log₁₀. O ajuste multiparamétrico gerou os demais gráficos, mas somente este é apresentado para facilitar a análise. Adj-R² = 0,998 para Bn e 0,915 para BtP.

Os valores calculados para as constantes são apresentados na Tabela 3. Observa-se que a constante referente à CBE tem valores mais altos, seguidas pelas constantes de

CAE. Os íons fosfato tem importância muito menor do que as catálises específicas, assim como a hidrólise pela água somada à possíveis processos de CBG intramoleculares (k_0). O comportamento de Bn e BtP é similar, mas BtP embora mais estável na faixa de pH entre 4 e 8 parece ser mais sensível ao ataque do íons HO^- do que Bn.

Tabela 13. Valores para as constantes obtidos com o ajuste não linear dos dados de k_{obs} vs. pH com a Eq. 1.

	Bn	dp	BtP	dp
k_{CAE}	-12.7 min^{-1}	11.7	-7.6 min^{-1}	6.3
k_0	0.5 min^{-1}	0.2	0.2 min^{-1}	0.1
k_1	$-4.7 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$	1.8	$-2.3 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$	0.9
k_2	$-4.6 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$	1.8	$-2.3 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$	0.8
k_{CBE}	208.7 min^{-1}	10.0	1720.3 min^{-1}	207.3

5. CONCLUSÃO

O estudo da hidrólise de betanina em função do pH na presença e na ausência de sais revelou que tampões acetato e citrato em pH entre 4,8 e 5,8 não afetam as constantes cinéticas de hidrólise. Entretanto, a variação da concentração de tampão fosfato sugere a ocorrência de catálise básica geral, embora a ocorrência de catálise nucleofílica não possa ser descartada.

Soluções de sais de sódio, cloretos e amônio alteram o pH do meio. Desta forma, as soluções preparadas em tampão fosfato pHs 3 e 6,2 com concentração 100 mmol L^{-1} permitiram o estudo do efeito de diferentes íons sobre a cinética de decomposição de Bn. Nestas condições o tampão não afeta a hidrólise e os resultados obtidos sugerem a formação de pares iônicos, em diferentes pHs, entre Bn e $p\text{-TsO}^-$ e entre Bn e Bu_4N^+ . A formação dos pares iônicos compromete a estabilidade de betanina em solução provavelmente pela diminuição dos valores de pKa ou pela estabilização das cargas negativas da Bn em meio alcalino.

O efeito do pH sobre a hidrólise de Bn e BtP indica a ocorrência de CAE na região de pH entre 2 e 4, seguida por CBG entre 4 e 8. Acima de $\text{pH} = 8$, observa-se ocorrência de CBE pela HO^- . Embora BtP seja mais estável frente à hidrólise na região independente do pH, ela é mais sensível à presença de HO^- em $\text{pH} > 8$, conforme determinado pelo ajuste não linear dos dados com uma função multiparamétrica, que relaciona k_{obs} com as concentrações de espécies com potencial catalítico, suas constantes de proporcionalidade e com uma constante que reflete a atividade de água somada a catálise intramolecular.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes apresentados na Tabela 14 foram adquiridos em alto grau de pureza e utilizados sem tratamento prévio.

Tabela 14. Reagentes usados no trabalho e seus respectivos fornecedores.

Reagente	Fórmula	Fornecedor
acetato de amônio	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	Sigma-Aldrich
acetato de etila	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	Vetec
acetato de sódio tri-hidratado	CH_3COONa	Sigma-Aldrich
ácido acético glacial	CH_3COOH	Sigma-Aldrich, 99%
ácido cítrico	$\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$	Sigma-Aldrich, 99%
ácido clorídrico	HCl	Vetec, 37%
ácido fosfórico	H_3PO_4	Synth, 85%
brometo de sódio	NaBr	Sigma-Aldrich
citrato de sódio tribásico di-hidratado	$\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2$	Sigma-Aldrich
cloreto de amônio	NH_4Cl	Sigma-Aldrich
cloreto de lítio	LiCl	Sigma-Aldrich
cloreto de magnésio	MgCl_2	Sigma-Aldrich
cloreto de potássio	KCl	Sigma-Aldrich
cloreto de sódio	NaCl	Sigma-Aldrich
cloreto de tetrabutilamônio	Bu_4NCl	Sigma-Aldrich
fluoreto de amônio	NH_4F	Sigma-Aldrich
fluoreto de sódio	NaF	Vetec
fosfato de sódio monobásico	NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich

fosfato de sódio dibásico	Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich
hidróxido de amônio	NH_4OH	Sigma-Aldrich
hidróxido de sódio	NaOH	Sigma-Aldrich
iodeto de amônio	NH_4I	Sigma-Aldrich
iodeto de sódio	NaI	Sigma-Aldrich
L-prolina		Sigma-Aldrich
metanol	CH_3OH	Vetec, 99,8%
<i>p</i> -toluenosulfonato de sódio	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$ (<i>p</i> -TsONa)	Sigma-Aldrich
sulfato de amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma-Aldrich
sulfato de sódio	NaSO_4	Sigma-Aldrich
tetrafluorborato de sódio	NaBF_4	Sigma-Aldrich

6.2. Soluções

Todas as soluções estoque de sais e soluções tampão foram preparadas com água deionizada com resistividade em temperatura ambiente $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ (Milli-Q, Millipore, Direct-Q 3). O pH das soluções foi aferido empregando-se um pHmetro (Metrohm, 827 pH lab) com eletrodo de vidro (Metrohm, Primatode NTC, 6.0203.100).

6.2.1. Soluções tampão

Soluções tampão-estoque foram preparadas pela mistura de volumes adequados de soluções de mesma concentração de um ácido fraco e da sua base conjugada, de forma a atingir os pHs desejados (Tabela 15).

Tabela 15. Ácidos e bases usados para a preparação das soluções tampão-estoque e suas concentrações.

Tampão	pH	c ^a	V ^b	HA	c ^a	V ^b	n	A ⁻	c ^a	V ^b	n
Acetato	4,8	500	100	HOAc	500	39	0,019	NaOAc	500	61	0,030
	5,8	500	100	HOAc	500	6,5	0,0032	NaOAc	500	93,5	0,047
Citrato	4,8	500	100	ácido cítrico	500	25	0,012	citrato de sódio	500	75	0,037
Fosfato	2,1	500	100	H ₃ PO ₄	500	44	0,022	NaH ₂ PO ₄	500	56	0,028
	3,0	100	100	H ₃ PO ₄	100	10	0,0009	NaH ₂ PO ₄	100	90	0,009
	6,2	500	100	NaH ₂ PO ₄	500	76,5	0,038	Na ₂ HPO ₄	500	23,5	0,012
	8,2	500	100	NaH ₂ PO ₄	500	4	0,0019	Na ₂ HPO ₄	500	96	0,048

^a concentração em mmol L⁻¹; ^b volume em mL.

As soluções tampão de trabalho (10, 50, 100, e 250 mmol L⁻¹) foram preparadas pela diluição seriada das soluções-estoque, aferindo-se o pH após a diluição. O tampão fosfato pH = 3 foi utilizado apenas na concentração 100 mmol L⁻¹.

6.2.2. Soluções de fosfato com pH entre 2 e 11

Foram preparadas soluções tampão de 10 mmol L⁻¹ de fosfato dibásico e 200 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio, utilizando-se de HCl ou NaOH (1,0 mol L⁻¹) para se atingir o pH desejado, no intervalo entre pH 2 – 11.⁵⁰

6.2.3. Soluções de sais em meio tamponado

As soluções de diferentes sais ($[sal]_{\text{final}} = 500 \text{ mmol L}^{-1}$) foram preparadas em balão volumétrico (25 mL) pela dissolução da massa adequada dos sólidos em tampão fosfato (100 mmol L⁻¹, pH = 3,0 ou 6,2).

6.3. Obtenção de betanina a partir de suco de beterraba

Betanina foi obtida a partir de suco de beterraba bruto por purificação por cromatografia de coluna em condições de fase reversa.⁷ O preparo e a filtração do suco

foram feitos da seguinte forma: beterrabas frescas (*Beta vulgaris*, subsp. *vulgaris*) foram processadas em uma centrífuga tipo *juicer* (Phillips-Wallita RI1855/01) e o suco resultante foi centrifugado (10 min, 7500 ×g, -10 °C), filtrado com papel de filtro e, posteriormente, submetido a filtração em coluna de sílica gel (20 mm) a pressão reduzida (50 mmHg).

O filtrado foi refrigerado (-20 °C) e centrifugado (10 min, -10 °C, 7500 ×g) e filtrado em papel de filtro pregueado antes do uso. Após este processo, o suco foi submetido a cromatografia de coluna em condições de fase reversa (SiO₂-C18), utilizando-se água como eluente (20 g SiO₂-C18 para 5 mg de amostra). As frações de cor magenta ($\lambda_{\text{abs}} = 536 \text{ nm}$) foram analisadas por HPLC e as frações contendo betanina pura foram reunidas e armazenadas a -20 °C.⁷

6.4. Semissíntese de indicaxantina

6.4.1. Obtenção de ácido betalâmico em acetato de etila

Suco de beterraba (500 mL) em um béquer (1 L) munido de agitação mecânica foi refrigerado (~10 °C) e o pH do meio foi levado a 11,4 com a adição de NH₄OH 30% (70 a 90 mL). A reação foi mantida sob agitação até que a solução atingisse uma coloração esverdeada com filme amarelo brilhante, característico do ácido betalâmico (cerca de 60 min). A solução foi então resfriada a 5 °C e, em seguida, o pH foi levado a um valor entre 1,5 e 2 com a adição de HCl_(aq) 37% v/v (ca. 100 mL). Em seguida, a agitação foi interrompida e o macaco abaixado. A solução foi transferida para um funil de separação de 1,0 L e foram adicionados 50 mL de acetato de etila (10% do volume inicial de suco). O funil foi agitado com movimento precessional e foi observado um pequeno volume na fase superior. A fase inferior (aquosa) foi reservada para segunda extração e cerca de 90 mL restantes (contendo a fase orgânica) foram transferidos,

vertendo pela boca de cima do funil, para tubos *falcon* de 50 mL e centrifugados a 5000 xg durante 2 minutos. A fase orgânica amarela foi separada com o auxílio de uma pipeta *pasteur*. O procedimento de extração foi repetido com a fase aquosa separada anteriormente para a segunda extração. O ácido betalâmico obtido com as duas extrações foi reunido e congelado em um banho de CO₂(s)/EtOH. Ocorre a formação de uma suspensão que foi filtrada rapidamente a vácuo, com o auxílio de um funil de *Büchner*, para eliminar a água e o sal em suspensão.

6.4.2. Semissíntese e purificação de indicaxantina

Indicaxantina foi preparada a partir do acoplamento aldimínico entre o ácido betalâmico em acetato de etila e L-prolina. A L-prolina (10 equiv.) foi adicionada ao ácido betalâmico e a reação foi mantida em um banho de ultrassom a temperatura ambiente por cerca de 10 min. A L-prolina não é solúvel em acetato de etila e, portanto, a reação de formação da indicaxantina ocorre na superfície do sólido. Após este período, observou-se a mudança na coloração do sólido, de branco para amarelo alaranjado. Neste momento, o sólido foi filtrado a vácuo, com o auxílio de um funil de *Büchner*, e em seguida, solubilizado em água. A purificação de indicaxantina foi feita por cromatografia de coluna em condições de fase reversa (SiO₂-C18), utilizando água como eluente.

6.5. Caracterização das betalainas

6.5.1. Espectroscopia de absorção

Espectros de absorção foram obtidos em meio aquoso empregando-se celas de acrílico (caminho ótico: 1 cm, volume total: 1,5 mL), com o auxílio de um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio.

6.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

Para análise cromatográfica das betalaínas foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica em um equipamento Shimadzu 20A equipado com detector PDA SPD20A com coluna de fase reversa C18 Ascentis® (250 x 4,6 mm, Supelco). Os dados foram obtidos utilizando o programa de aquisição LCSolution. A mistura de solventes utilizada foi: 5 – 95% B em 20 min, sendo o solvente A: 0,1% TFA/água e solvente B: 0,1% TFA/60% MeCN/água com fluxo de 1 mL min⁻¹.

6.6. Estudo cinético da decomposição de betalaínas

6.6.1. Efeito da concentração do tampão

A decomposição de betanina em meio aquoso foi monitorada a 85 °C utilizando-se um espectrofotômetro de absorção Varian Cary 50 Bio com porta cubeta termostatizada com um banho termostático Lauda RP845, e cubeta de quartzo de 4 mL de volume total. Espectros de absorção (200 a 700 nm) foram registrados a cada 1, 3 ou 5 min por, no mínimo duas meia-vidas da betanina. Para os ensaios cinéticos, foram utilizadas soluções tampão acetato (pHs = 4,8 e 5,8), citrato (pH = 4,8) e fosfato (pHs = 2,1, 6,2 e 8,2), nas concentrações 10, 50, 100, 250 e 500 mmol L⁻¹.

6.6.2. Efeito da presença de sais

A decomposição de betanina na presença de sais foi monitorada a 60°C utilizando-se um espectrofotômetro de absorção Varian Cary 50 Bio, com um porta cubetas para 18 cubetas, termostatizado com um banho termostático Lauda RP845, e cubetas de acrílico de 3,5 mL de volume total. Os espectros de absorção (300 a 700 nm) foram obtidos a cada 1,5 ou 2,5 min durante 360 min. Para estes ensaios foram utilizadas solução de sais na concentração de 500 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, pHs = 3 e 6,2. Os sais utilizados foram: cloreto de sódio, brometo de sódio,

iodeto de sódio, sulfato de sódio, acetato de sódio, *p*-toluenosulfonato de sódio, cloreto de lítio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, cloreto de tetrabutilamônio, cloreto de amônio, iodeto de amônio, fluoreto de amônio, sulfato de amônio e acetato de amônio.

6.6.3. Efeito do pH

A decomposição de betanina em meio tamponado foi monitorada a 65, 70, 75, 80 e 85 °C e a decomposição de indicaxantina em meio tamponado foi monitorada a 60 °C. Em ambos os casos utilizou-se um espectrofotômetro de absorção Varian Cary 50 Bio, com um porta cubetas para 18 cubetas, termostatizado com um banho termostático Lauda RP845, e cubetas de acrílico de 3,5 mL de volume total. Para Bn, os espectros de absorção (300 a 700 nm) foram obtidos a cada 1,5 min durante 150 min. Para estes ensaios foram utilizadas solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, variando o pH entre 2 – 11. No caso de BtP, os espectros de absorção (300 a 700 nm) foram obtidos a cada 2 ou 5 min durante 480 min. Para estes ensaios foram utilizadas solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, variando o pH entre 2 – 11.

6.7. Determinação das constantes cinéticas observadas (k_{obs})

Os dados de variação da absorção em diferentes comprimentos de onda vs. o tempo foram ajustados a um modelo cinético de primeira ordem, empregando-se funções mono (Eq. (2)) ou biexponenciais (Eq. (3)), conforme necessário. Assim, foram determinados os valores das constantes cinéticas observadas (k_{obs}).

$$Abs = Abs_0 + A_1 e^{-k_{obs1}t} \quad (2)$$

$$Abs = Abs_0 + A_1 e^{-k_{obs1}t} + A_2 e^{-k_{obs2}t} \quad (3)$$

Cálculo das constantes cinéticas bimoleculares (k_{bi})

a constante bimolecular (k_{bi}) é obtida de acordo com:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{bi}[A][B] \quad (5)$$

mas, para A em excesso (> 10 equiv. em relação a B, condição de pseudo-primeira ordem), tem-se um valor de constante observada (k_{obs}) determinado por:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{obs}[B] \quad (6)$$

onde $k_{obs} = k_{bi}[A]$. Assim, as constantes bimoleculares para a decomposição de betanina na presença de excesso de sal foram determinadas correlacionando-se as constantes cinéticas observadas com a concentração do sal e calculando-se o coeficiente angular.

6.8. Análise dos resultados

Os ajustes matemáticos e análises estatísticas foram feitos empregando-se o programa Origin (v.9.1, OriginLab, 2013).

7. REFERÊNCIAS

1. Azeredo, H. M. C., Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44* (12), 2365-2376.
2. Steglich, W.; Strack, D., Betalains. In *The Alkaloids*, Brossi, A., Ed. Academic Press: London, 1990; pp 1-62.
3. Schliemann, W.; Kobayashi, N.; Strack, D., The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol.* **1999**, *119* (4), 1217-1232.
4. 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 Química* **2015**, *7* (1), 292-309.
5. Stintzing, F.; Schliemann, W., Pigments of fly agaric (*Amanita muscaria*). *Z Naturforsch C* **2007**, *62* (11-12), 779-85.
6. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.* **2006**, *71* (4), R41-R50.
7. 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 Chem.* **2012**, *131* (1), 231-238.
8. Gandia-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J., Floral fluorescence effect. *Nature* **2005**, *437* (7057), 334-334.
9. 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. *Monatsh. Chem.* **2013**, *144*, 567-571.
10. 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. *J. Food. Eng.* **2013**, *118*, 49-55.
11. Esatbeyoglu, T.; Wagner, A. E.; Schini-Kerth, V. B.; Rimbach, G., Betanin-A food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* **2015**, *59* (1), 36-47.
12. Pasch, J. H.; Von Elbe, J. H., Betanine degradation as influenced by water activity. *J. Food Sci.* **1975**, *40* (6), 1145-1147.
13. Cohen, E.; Saguy, I., Effect of water activity and moisture content on the stability of beet powder pigments. *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 703-707.
14. Huang, A. S.; von Elbe, J. H., Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 1115-1120.
15. von Elbe, J. H.; Schwartz, S. J.; Hildenbrand, B. E., Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *J. Food Sci.* **1981**, *46* (6), 1713-1715.

16. von Elbe, J. H.; Maing, I.-Y.; Amundson, C. H., Color stability of betanin. *J. Food Sci.* **1974**, *39* (2), 334-7.
17. 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. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219* (4), 377-385.
18. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J. Food Sci.* **2004**, *69* (6), C491-C498.
19. Saguy, I., Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-I): influence of pH and temperature. *J. Food Sci.* **1979**, *44* (5), 1554-1555.
20. Sapers, G. M.; Hornstein, J. S., Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *J. Food Sci.* **1979**, *49*, 99-101.
21. Stintzing, F. C.; Carle, R., Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15* (1), 19-38.
22. Huang, A. S.; von Elbe, J. H., Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.* **1987**, *52* (6), 1689-1693.
23. Cai, Y.; Sun, M.; Schliemann, W.; Corke, H., Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (9), 4429-35.
24. Schwartz, S. J.; von Elbe, J. H., Identification of betanin degradation products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **1983**, *176* (6), 448-453.
25. Goncalves, L. C. P. Betalainas: semissíntese, capacidade antirradicalar e aplicação como sondas em sistemas biológicos. Doctorate, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2012.
26. (a) Sollenberger, P. Y.; Martin, R. B., Carbon-nitrogen and nitrogen-nitrogen double bond condensation reactions. In *The Chemistry of the Amino Group*, Patai, S., Ed. Wiley: London, 1968; pp 349-406; (b) Saggiomo, V.; Lüning, U., On the formation of imines in water--a comparison. *Tetrahedron Lett.* **2009**; (c) Godoy-Alcantar, C.; Yatsimirsky, A. K.; Lehn, J. M., Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18* (10), 979-985.
27. Wybraniec, S., Formation of decarboxylated betacyanins in heated purified betacyanin fractions from red beet root (*Beta vulgaris* L.) monitored by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (9), 3483-3487.
28. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phyllocactin and hylocerenin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (18), 2603-2616.
29. Johnson, J.; Morales, N.; Gorczyca, A.; Dolliver, D.; McAllister, M., Mechanisms of acid-catalyzed Z/E isomerization of imines. *J. Org. Chem* **2001**, *66* (24), 7979-7985.

30. Singer, J. W.; Von Elbe, J. H., Degradation rates of vulgaxanthine I. *J. Food Sci.* **1980**, *45*, 489-491.
31. (a) Simon, P.; Drdák, M.; Altamirano, R. C., Influence of water activity on the stability of betanin in various water/alcohol model systems. *Food Chem.* **1993**, *46* (2), 155-158; (b) Savolainen, K.; Pyysalo, H.; Kallio, H., The influence of water activity on the stability of vulgaxanthin I. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1978**, *167* (4), 250-1; (c) Blandamer, M. J.; Engberts, J. B. F. N.; Gleeson, P. T.; Reis, J. C. R., Activity of water in aqueous systems; A frequently neglected property. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (5).
32. von Elbe, J. H.; Attoe, E. L., Oxygen involvement in betalain degradation - Measurement of active oxygen species and oxidation reduction potentials. *Food Chem.* **1985**, *16*, 49-67.
33. Huang, A. S.; Von Elbe, J. H., Stability comparison of two betacyanine pigments—amaranthine and betanine. *J. Food Sci.* **1986**, *51* (3), 670-674.
34. Pasch, J. H.; Von Elbe, J. H., Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. *J. Food Sci.* **1979**, *44* (1), 72-75.
35. (a) Attoe, E. L.; Von Elbe, J. H., Oxygen involvement in betanine degradation: effect of antioxidants. *J. Food Sci.* **1985**, *50* (1), 106-110; (b) Bilyk, A.; Kolodij, M. A.; Sapers, G. M., Stabilization of red beet pigments with isoascorbic acid. *J. Food Sci.* **1981**, *46* (5), 1616-1617; (c) Bilyk, A.; Howard, M., Reversibility of Thermal-Degradation of Betacyanines under the Influence of Isoascorbic Acid. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30* (5), 906-908.
36. Attoe, E. L.; Von Elbe, J. H., Oxygen involvement in betanin degradation. Oxygen uptake and influence of metal ions. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1984**, *179* (3), 232-6.
37. 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.
38. Trezzini, G. F.; Zryd, J. P., Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. *Phytochem.* **1991**, *30* (6), 1901-3.
39. CRC Handbook of Chemistry and Physics. <http://www.hbcpnetbase.com/> (acessado em 02/12/2015).
40. Saguy, I.; Kopelman, I. J.; Mizrahi, S., Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26* (2), 360-362.
41. Nilsson, T., Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbruks-Hoegsk. Ann.* **1970**, *36* (2), 179-219.
42. Mooi, S. M.; Heyne, B., Size Does Matter: How To Control Organization of Organic Dyes in Aqueous Environment Using Specific Ion Effects. *Langmuir* **2012**, *28* (48), 16524-16530.
43. (a) Fainberg, A. H.; Winstein, S., Salt Effects and Ion Pairs in Solvolysis and Related Reactions. VII. Salt Effects in Acetolysis of some Secondary Arylsulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (12), 2780-2784; (b) Fritz, J. S., Factors affecting selectivity in ion chromatography. *J. Chrom A* **2005**, *1085* (1), 8-17.

44. Rossotti, F. J. C.; Rossotti, H., *The determination of stability constants, and other equilibrium constants in solution*. McGraw-Hill: New York,, 1961; p 425 p.
45. (a) Marrs, P. S., Class projects in physical organic chemistry: The hydrolysis of aspirin. *J. Chem. Educ.* **2004**, *81* (6), 870-873; (b) Fersht, A. R.; Kirby, A. J., Intramolecular Nucleophilic Catalysis in Hydrolysis of Substituted Aspirin Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (21), 5826-5832; (c) Fersht, A. R.; Kirby, A. J., Hydrolysis of Aspirin . Intramolecular General Base Catalysis of Ester Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (19), 4857-4863; (d) Edwards, L. J., The Hydrolysis of Aspirin .2. *Trans. Faraday Soc.* **1952**, *48* (8), 696-699; (e) Edwards, L. J., The Hydrolysis of Aspirin - a Determination of the Thermodynamic Dissociation Constant and a Study of the Reaction Kinetics by Ultra-Violet Spectrophotometry. *Trans. Faraday Soc.* **1950**, *46* (9), 723-735; (f) Blanch, J.; Finch, A., Student Experiment in Chemical Kinetics - Hydrolysis of Aspirin. *Am J Pharm Educ* **1971**, *35* (2), 191-202; (g) Aarons, L.; Clifton, P.; Fleming, G.; Rowland, M., Aspirin Binding and the Effect of Albumin on Spontaneous and Enzyme-Catalyzed Hydrolysis. *J. Pharm. Pharmacol.* **1980**, *32* (8), 537-543.
46. Albert, A.; Serjeant, E. P., *The determination of ionization constants : a laboratory manual*. 3rd ed.; Chapman and Hall: London ; New York, 1984; p x, 218 p.
47. Schmidt, O. T.; Becher, P.; Hübner, M., Zur Kenntnis der Farbstoffe der Roten Rübe, III. *Chem. Ber.* **1960**, *93* (6), 1296-1304.
48. Piattelli, M.; Minale, L.; Prota, G., Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron* **1964**, *20* (10), 2325-2329.
49. Novak, M.; Bonham, G. A.; Mulero, J. J.; Pelecanou, M.; Zemis, J. N.; Buccigross, J. M.; Wilson, T. C., Hydrolysis of N-acetyl-p-benzoquinone imines: pH dependence of the partitioning of a tetrahedral intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (12), 4447-4456.
50. Nara, S. J.; Valgimigli, L.; Pedulli, G. F.; Pratt, D. A., Tyrosine Analogues for Probing Proton-Coupled Electron Transfer Processes in Peptides and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *132* (2), 863-872.

8. ANEXOS

8.1. Curvas cinéticas de hidrólise de Bn nos tampões acetato e citrato

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão acetato e citrato, a 85 °C. Na horizontal, tampão acetato pH = 4,8, tampão citrato pH = 4,8 e tampão acetato pH = 5,8; na vertical, a concentração do tampão é 10, 50, 100, 250, 500 mmol L⁻¹. Os espectros foram obtidos a cada 5 min durante 150 min.

Formação e degradação de HBt em função do tempo em tampão acetato e citrato, a 85 °C. Na horizontal, tampão acetato pH = 4,8, tampão citrato pH = 4,8, e tampão acetato pH = 5,8; na vertical a concentração do tampão é 10, 50, 100, 250, 500 mmol L⁻¹.

8.2. Curvas cinéticas de hidrólise de Bn em tampão fosfato

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato, a 85 °C. Na horizontal o pH é 2,1, 6,2 e 8,2; na vertical, a concentração do tampão é 10, 50, 100, 250, 500 mmol L⁻¹.

Formação e degradação de HBt em função do tempo em tampão fosfato, a 85 °C. Na horizontal o pH é 2,1, 6,2 e 8,2; na vertical, a concentração do tampão é 10, 50, 100, 250, 500 mmol L⁻¹.

8.3. Curvas cinéticas de hidrólise de Bn em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, na presença de sais

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ (A) pH 3 e (B) pH 6,2, a 60 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3, na presença de diferentes sais de sódio, a 60 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH = 6,2, na presença de diferentes sais de sódio, 60 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH = 3, na presença de diferentes sais de amônio, a 60 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH = 6,2, na presença de diferentes sais de amônio, a 60 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH = 3, na presença de diferentes sais cloretos, 60 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH = 6,2, na presença de diferentes sais cloretos, a 60 °C.

8.4. Curvas cinéticas de hidrólise de Bn em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, em função do pH e da temperatura

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em diferentes pHs, a 65 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em diferentes pHs, a 70 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} em diferentes pHs, a 75 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em diferentes pHs, a 80 °C.

Decaimento de absorção de Bn em função do tempo em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em diferentes pHs, a 85 °C.

8.5. Gráficos de Arrhenius

Gráficos de $\ln k_{\text{obs}}$ em função de T^{-1} . k_{obs} é a constante cinética observada de hidrólise de Bn em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , obtida pelo ajuste exponencial dos dados de decaimento da banda da Bn.

Coefficiente angular da regressão linear (α), coeficiente linear (β) e coeficiente de determinação ajustado (Adj-R^2) das curvas. pH 2 ($\alpha = -6471$; $\beta = 17$; $\text{Adj-R}^2 = 0,98$), pH 3 ($\alpha = -6992$; $\beta = 17$; $\text{Adj-R}^2 = 0,98$), pH 4 ($\alpha = -7454$; $\beta = 18$; $\text{Adj-R}^2 = 0,88$), pH 5 ($\alpha = -10148$; $\beta = 25$; $\text{Adj-R}^2 = 0,98$), pH 6 ($\alpha = -9487$; $\beta = 23$; $\text{Adj-R}^2 = 0,98$), pH 7 ($\alpha = -9181$; $\beta = 23$; $\text{Adj-R}^2 = 0,97$), pH 8 ($\alpha = -9810$; $\beta = 25$; $\text{Adj-R}^2 = 0,99$), pH 9 ($\alpha = -8498$; $\beta = 22$; $\text{Adj-R}^2 = 0,97$), pH 10 ($\alpha = -6433$; $\beta = 16$; $\text{Adj-R}^2 = 0,98$), pH 11 ($\alpha = -4773$; $\beta = 13$; $\text{Adj-R}^2 = 0,99$).

8.6. Curvas cinéticas de hidrólise de BtP em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, em função do pH

Decaimento de absorção de BtP em função do tempo em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em diferentes pHs, a 60 °C.