

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

ANA CLARA BELTRAN RODRIGUES

**Betaláínas funcionais: semissíntese, propriedades
fotofísicas e interações intermoleculares**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

20/04/2017

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

R696b Rodrigues, Ana Clara Beltran
Betalainas funcionais: semissíntese, propriedades fotofísicas e
interações intermoleculares / Ana Clara Beltran Rodrigues. --
São Paulo, 2017.
165p.

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

1. Fotoquímica I. T. II. Bastos, Erick Leite, orientador.

541.35 CDD

ANA CLARA BELTRAN RODRIGUES

**Betaláínas funcionais: semissíntese, propriedades
fotofísicas e interações intermoleculares**

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

Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo

2017

Ao meu querido tio e padrinho André (*in memoriam*),
que sempre partilhou dos meus sonhos.

Agradecimentos

*How do I feel by the end of the day
(Are you sad because you're on your own)
No I get by with a little help from my friends*

With a little help from my friends (1967), The Beatles

Ao Erick pela orientação, paciência, confiança e por todas as oportunidades e desafios que me propôs ao longo de quase oito anos de trabalho em conjunto; sem sua ajuda e motivação, este trabalho não seria o mesmo, nem seria tão gratificante.

À minha família, meus pais e minha irmã, pelo amor incondicional e apoio, seja me acompanhando de perto, ou quando eu estava tão longe de casa.

Às minhas amigas queridas, Bruna, Camila e Mariana, que há tantos anos são minhas companhias para todas as horas e sempre torcem por mim.

Aos meus amigos da UFABC, Thalita, Pamela e Ricardão pelo apoio e amizade. Mesmo que hoje estejamos longe uns dos outros, foi com vocês que tive os melhores momentos da minha graduação.

À Prof^ª. Patrícia Dantoni que, 10 anos atrás, aceitou me orientar e me mostrar o quão fascinante poderia ser a investigação de uma reação química que emitia luz!

Aos meus amigos do IQ, Glalci, André, Mari, Tati, Victor e Cris por tornarem os dias de trabalho mais divertidos.

Aos técnicos do IQ, Luiz, Joca, César, Luciana e Jair e da Central Analítica, Janaína, Vânia, Giovana e Cristiane, pela ajuda imprescindível no desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Willi, Frank, Maurício, Omar, Cassius e Rosângela e seus respectivos alunos, pela ajuda e disponibilidade no uso dos equipamentos em seus

laboratórios.

Aos professores Martinho e Jacinto e seus respectivos alunos, pela ajuda nos ensaios, por tudo que aprendi nos seus laboratórios, e pela maravilhosa acolhida *portuguesa* que tive tanto em Lisboa, quanto em Uppsala.

Aos meus colegas e ex-colegas de BastosLab, pela convivência, companhia e muitos chocalatinhos compartilhados. À Letícia, pela ajuda experimental quando entrei no grupo e por descobrir o composto que deu origem a este trabalho.

Aos meus amigos do BastosLab cujo convívio diário me fará mais falta, Amanda, Renan, Arthur, Barbara e Karina (de quem já sinto falta), pelas discussões científicas, pelos ensinamentos, pela companhia durante as muitas horas de trabalho ou de diversão, pelos desafios que enfrentamos juntos e pelo apoio incondicional.

Às minhas amigas e *mãezinhas* científicas, Helena, Inês e Tânia, que tanto me ensinaram e contribuíram para o desenvolvimento do trabalho, quanto me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

À Sueli e à Tânia B. que me levaram, ainda adolescente, aos laboratórios do IQ e despertaram em mim o sonho de uma carreira como química e pesquisadora.

Ao CNPq e à Capes/FCT, pelas bolsas de financiamento concedidas.

*“Keep the earth below my feet
For all my sweat, my blood runs weak
Let me learn from where I have been
Keep my eyes to serve, my hands to learn
Keep my eyes to serve, my hands to learn”*

Below my feet (2012), Mumford and Sons

Resumo

RODRIGUES, A. C. B. **Betalainas funcionais: semissíntese, propriedades fotofísicas e interações intermoleculares**. 2017. 165 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Betalainas são alcalóides coloridos e com alta capacidade antioxidante que são encontrados em plantas e fungos. A biossíntese destes produtos naturais baseia-se na conversão enzimática da L-tirosina em ácido betalâmico e na condensação aldimínica deste com aminoácidos. A semissíntese de betalainas naturais para aprofundar o estudo desta classe de pigmentos estimulou o desenvolvimento de betalainas artificiais, incluindo derivados funcionais. Uma betalaina cumarínica foi criada para ser usada como sonda fluorescente para marcação de *Plasmodium falciparum* em glóbulos vermelhos. Esta Tese de Doutorado apresenta a semissíntese e estudo de três betalainas cumarínicas (cBeets) e uma carboestiril-betalaina (csBeet). Procurou-se estabelecer relações entre as estruturas destes compostos e suas propriedades físico-químicas e fotofísicas como ponto de partida no desenvolvimento de uma nova classe de betalainas funcionais. São apresentados dados sobre a lipofilicidade, estabilidade frente à hidrólise, potencial redox, absorção de um e dois fótons e fluorescência. Interações intermoleculares destes compostos foram investigadas por medidas de fluorescência em misturas binárias de solventes polares, albumina sérica bovina e micelas reversas de AOT em heptano/água.

Palavras-chave – betalainas, cumarinas, fluorescência resolvida no tempo, absorção de dois fótons, efeitos de solvente, interação com proteínas.

Abstract

RODRIGUES, A. C. B. **Functional betalains: semisynthesis, photophysical properties and intermolecular interactions**. 2017. 165 p. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Betalains are colorful alkaloids with high antioxidant capacity that are found in plants and fungi. The biosynthesis of these natural products is based on the enzymatic conversion of L-tyrosine into betalamic acid and aldimine condensation thereof with amino acids. The semisynthesis of natural betalains improved the knowledge on this class of pigments and stimulated the development of artificial betalains, including functional derivatives. A coumarinic betalain was created to be used as a fluorescent label for *Plasmodium falciparum* on red blood cells. This Doctoral Thesis presents the semisynthesis and study of three coumarin betalains (cBeets) and one carbostyryl betalain (csBeet). It was sought to establish relationships between the structures of these compounds and their physical-chemical and photophysical properties as a starting point in the development of a new class of functional betalains. Data on lipophilicity, hydrolysis stability, redox potential, one- and two-photon absorption and fluorescence are presented. Intermolecular interactions of these compounds were investigated by fluorescence measurements in binary polar solvent mixtures, bovine serum albumin and AOT reverse micelles in heptane/water.

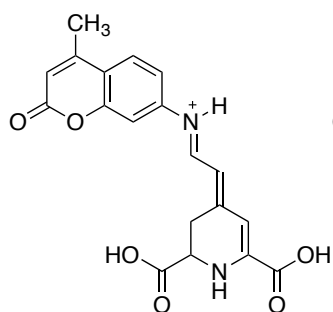
Keywords – betalains, coumarins, time-resolved fluorescence, absorption of two photons, solvent effects, interaction with proteins.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

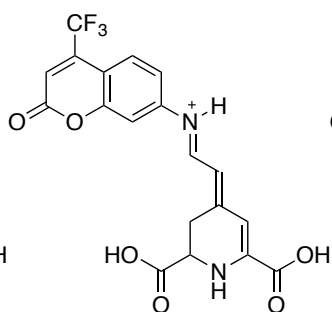
δ	Deslocamento químico, em ppm
Δf	Orientação de polarizabilidade
$\Delta \nu$	Deslocamento de Stokes ($\lambda^{\text{Abs}} - \lambda^{\text{Fl}}$)
ε	Coefficiente de atenuação molar, em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
ε_2	Sessão eficaz de absorção bifotônica ($\phi_{\text{Fl}} \times \sigma_2$)
ε_r	Permissibilidade relativa, antiga constante dielétrica
ϕ_{Fl}	Rendimento quântico de fluorescência
η	Viscosidade
λ^{Abs}	Comprimento de onda no máximo de absorção
λ^{Fl}	Comprimento de onda no máximo de emissão
λ^{ex}	Comprimento de onda de excitação
σ_2	Sessão de choque de dois fótons
τ_{Fl}	Tempo de vida de fluorescência
$\langle \tau \rangle$	Tempo de vida médio de fluorescência
$\tau_{1/2}$	Tempo de meia-vida
χ	Fração molar
1,8-ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalenosulfônico
AOT	Diocilsulfocinato de sódio
BSA	Albumina sérica bovina
C120	7-amino-4-metilcumarina, cumarina 120
C151	7-amino-4-trifluormetilcumarina, cumarina 151
Cbz	6-amino-3,4-benzocumarina
Cs124	7-Amino-4-metil-2-hidroxiquinolina, carboestiril 124
E_a^{nr}	Energia de ativação do processo de emissão não radiativa
$E_{\text{p,a}}$	Potencial de pico anódico (oxidação)
E_S	Energia singlete
ESI	Ionização por eletrospray
$E_T(30)$	fator de polaridade empírica

f^{em}	Fenda de emissão
f^{ex}	Fenda de excitação
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> , largura a meia-altura
GPC	<i>Gel permeation chromatography</i> , cromatografia de permeação em gel
HBt	Ácido betalâmico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , cromatografia de alta eficiência
MALDI	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
MS	Espectrometria de massas
$^1\text{H-RMN}$	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do hidrogênio
IRF	<i>Instrument response function</i> , resposta do instrumento
k_{nr}	Constante cinética de emissão não radiativa
k_{obs}	Constante cinética observada
k_{r}	Constante cinética de emissão radiativa
m/z	Relação massa/carga
n_{D}	Índice de refração (vapor de Na)
2PA	Absorção de dois fótons
POPC	1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
RB	Betaína de Reichardt
R_{H}	Raio hidrodinâmico da micela
TOF	Tempo de voo
t_{R}	Tempo de retenção
W_0	Razão entre $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$

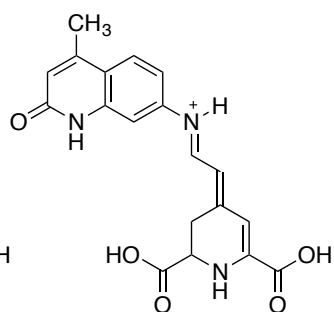
Lista de estructuras



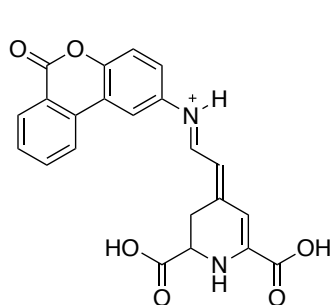
cBeet120



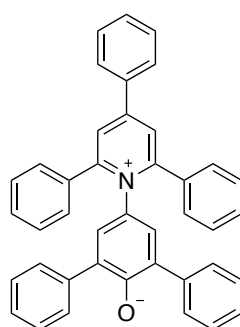
cBeet151



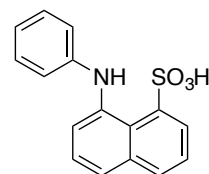
csBeet124



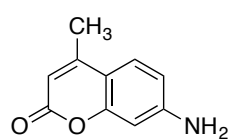
cbzBeet



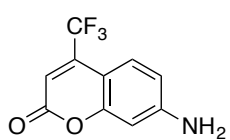
RB



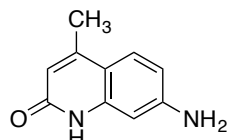
1,8-ANS



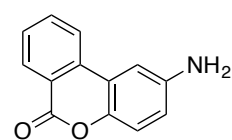
C120



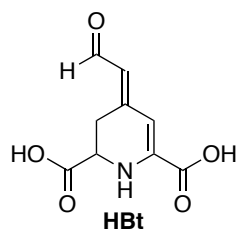
C151



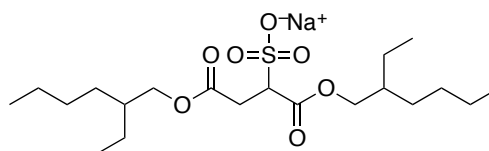
Cs124



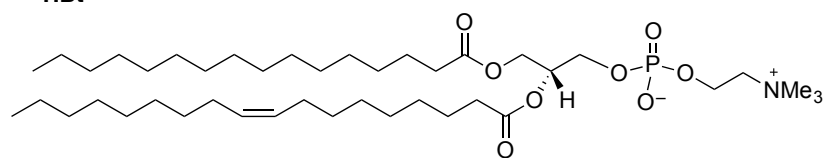
Cbz



HBt



AOT



POPC

Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	vii
Lista de estruturas.....	ix
1. Introdução	13
1.1. Absorção de luz e fluorescência: aspectos fundamentais.....	13
1.1.1. Fatores que afetam a emissão de fluorescência	24
1.2. Organismos vivos fluorescentes	30
1.2.1. Betalaínas	31
2. Objetivos	39
2.1. Objetivos específicos.....	39
3. Resultados e discussão.....	41
3.1. Betalaínas cumarínicas, cBeets: fluoróforos inspirados na natureza	41
3.1.1. Semissíntese e caracterização estrutural	43
3.1.2. Absorção e fluorescência em meio aquoso.....	47
3.1.3. Estabilidade hidrolítica, lipofilicidade e potencial de oxidação.....	62
3.2. Efeito de albumina sobre a fluorescência de cBeets e csBeet: interação intermolecular vs. ligação covalente.....	77
3.3. Efeitos do meio sobre a fluorescência da cBeet120	88
3.3.1. Efeitos da polaridade e viscosidade de misturas binárias de solvente	88
3.3.2. Efeitos de agregação em micelas reversas de AOT em heptano.....	100
3.4. Propriedades óticas não lineares de betalaínas: absorção de dois fótons	104
4. Conclusões.....	111
5. Parte Experimental	113
5.1. Materiais	113

5.2. Métodos	114
5.2.1. Soluções de trabalho	114
5.2.2. Semissíntese e purificação de cBeets e csBeet124	118
5.2.3. Caracterização estrutural	121
5.2.4. Caracterização fotofísica	122
5.2.5. Propriedades físico-químicas de cBeets e csBeet124	127
5.2.6. Interação de cBeets e csBeet124 com BSA e semissíntese de BtBSA	131
5.2.7. Efeitos do meio sobre a fotofísica de cBeet120	135
5.2.8. Absorção de dois fótons	139
6. Referências	141
7. Anexos	167

1. Introdução

1.1. Absorção de luz e fluorescência: aspectos fundamentais

A absorção de luz pela matéria é um processo quantizado e, normalmente, uma molécula que absorve um *fóton* de luz com energia adequada é promovida para o estado eletronicamente excitado. A lei de Lambert-Beer relaciona a luz absorvida em um determinado comprimento de onda por uma espécie (em solução, líquido, sólido ou gás)^[1] com a sua concentração, c (mol L⁻¹), com o caminho óptico, b (cm), e com o coeficiente de atenuação molar no mesmo comprimento de onda, $\varepsilon(\lambda)$ (L mol⁻¹ cm⁻¹), termo que se correlaciona com a seção de choque de um fóton, $\sigma(\lambda)$ (cm²), e com a força de oscilador da espécie sendo irradiada.^[2] A derivada da intensidade de luz após interação com a amostra em função do caminho ótico é definida na Eq. 1:

$$\frac{dI}{db} = -\sigma c I \quad \text{Eq. 1}$$

cuja forma integrada é:

$$I(b) = I_0 e^{-\sigma b c} \quad \text{Eq. 2}$$

onde, I_0 é a luz incidente na amostra. A relação entre o valor de seção de choque de um fóton e o coeficiente de atenuação molar é dado por:

$$\sigma = 2,303 \frac{\varepsilon c}{n} \quad \text{Eq. 3}$$

onde n corresponde ao número de moléculas por cm³ e se relaciona com o número de Avogadro (N_{AV}) por:

$$n = \frac{cN_{AV}}{10^3} \quad \text{Eq. 4}$$

levando a:

$$\sigma = 3,82 \times 10^{-21} \varepsilon \quad \text{Eq. 5}$$

Relacionando as Eqs. 2 e 3, temos:

$$I(b) = I_0 e^{-\sigma bn} = I_0 e^{-\varepsilon bc} \quad \text{Eq. 6}$$

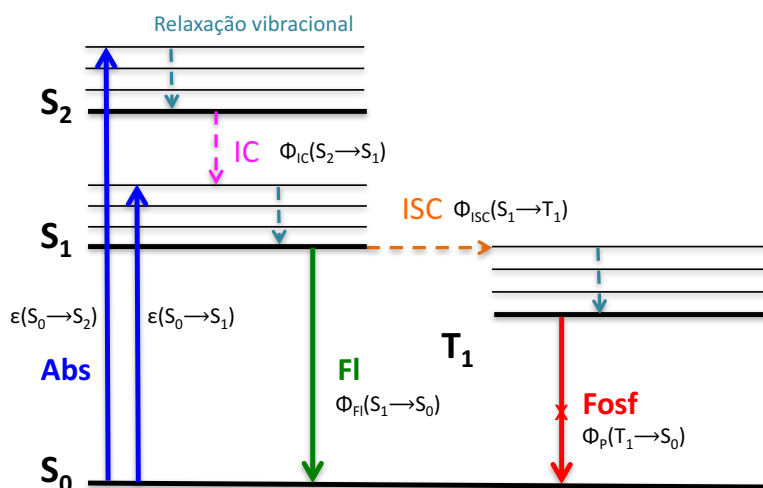
que podem ser relacionadas à absorção da amostra em um dado comprimento de onda ($A(\lambda)$) através das Eqs. 7 e 8.

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon bc \quad \text{Eq. 7}$$

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \sigma bn \quad \text{Eq. 8}$$

Após a absorção de luz, a população de espécies que foi promovida ao estado eletronicamente excitado pode liberar a energia absorvida de forma radiativa (emissão de luz) ou não-radiativa (dissipação de calor). Luminescência é a emissão de luz resultante do decaimento radiativo de uma espécie no estado eletronicamente excitado quando esta retorna ao estado fundamental^[3]. *Fluorescência* e *fosforescência* são, fenomenologicamente, formas de luminescência que diferem quanto à sua duração. Fluorescência é a emissão de luz enquanto a amostra está sendo irradiada; fosforescência tem duração mais longa do que o período de irradiação.^[4] Formalmente, tempos de vida de luminescência na faixa de *ns* a 10^{-7} s indicam fluorescência e entre *ms* e 10^2 s fosforescência.

Sob o ponto de vista mecanístico, fluorescência se origina de transições permitidas por *spin*, a mais notória sendo a transição $S_1 \rightarrow S_0$, enquanto a fosforescência depende de transições proibidas por *spin*, e.g. $T_1 \rightarrow S_0$. Conversões internas (IC, entre estados de mesma multiplicidade de spin) e cruzamentos intersistemas (ISC, entre estados de multiplicidade diferente) são transições não radiativas relevantes para a luminescência.^[3] Processos colisionais, vibracionais e rotacionais também estão envolvidos na desativação não radiativa de estados excitados, contudo, estes não serão mais discutidos no texto. O diagrama de Jablonski é comumente usado para apresentar processos fotofísicos (Esquema 1).



Esquema 1. Diagrama de Jablonski que descreve os níveis de energia vibracionais (linhas pretas mais finas) e eletrônicos (linhas pretas grossas) envolvidos nos processos de absorção (Abs), fluorescência e fosforescência. As linhas retas indicam processos de emissivos posteriores a absorção de luz, como fluorescência (Fl) e fosforescência (Fosf), enquanto que as linhas pontilhadas caracterizam processos não radiativos de mesma multiplicidade, conversão interna (IC), e de diferente multiplicidade de spin, cruzamento intersistema (ISC).^[3]

O espectro de absorção de uma espécie em solução mostra transições do nível vibracional mais baixo do estado fundamental para diversos níveis vibracionais dos estados eletronicamente excitados. Assim, a banda larga que corresponde a uma transição $S_0 \rightarrow S_1$ é composta por diversas bandas que representam os muitos estados vibracionais do nível S_1 eletronicamente excitado que foram populados. Efeitos do meio

meio e da rigidez da molécula normalmente definem a resolução da banda. Transições $S_0 \rightarrow S_2$ ou, mais genericamente, $S_0 \rightarrow S_n$ tem, na maioria dos casos, uma probabilidade menor de ocorrência e resultam em bandas com máximos deslocados para comprimentos de onda mais curtos (maior energia) comparados aos máximos observados para as transições $S_0 \rightarrow S_1$. Quando excitadas a um estado singlete superior (S_n), a maioria das moléculas está sujeita a um processo de IC até o nível vibracional mais baixo do S_1 de onde decaem para diferentes níveis vibracionais do estado fundamental, conforme proposto pela regra de Kasha^[5]. Exceções incluem o azuleno, que decai para o estado fundamental diretamente do nível S_2 .^[6] Em moléculas, o processo de IC e outros processos não radiativos de desativação do estado excitado levam a emissão com menor energia quando comparada a absorção. O deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão (λ^{Fl}) em relação ao máximo de absorção (λ^{abs}) é chamado de *deslocamento de Stokes* ($\Delta\nu$) e se relaciona à estrutura da espécie emissora (*fluoróforo*) e a efeitos do meio (Figura 1)^[7]. O comprimento de onda no qual se observa o cruzamento entre os espectros de absorção e de emissão normalizados é uma estimativa da diferença entre as energias dos estados vibracionais mais baixos do estado fundamental e excitado (E_{00}). Quando o espectro em questão é de fluorescência, este comprimento de onda corresponde a energia singlete da molécula (E_s).

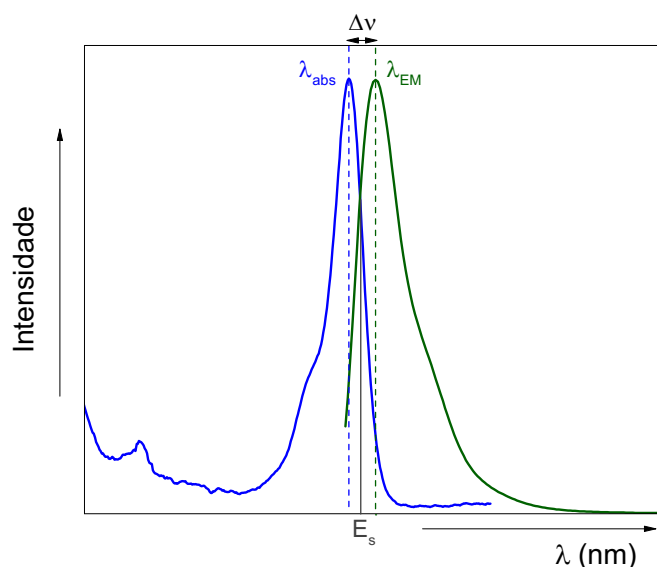


Figura 1. Exemplos de espectros de absorção, em azul, e emissão de fluorescência, verde. O comprimento de onda (λ) aumenta da esquerda para direita, enquanto a intensidade de absorção e emissão cresce de baixo pra cima. O deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) e a intersecção dos espectros, onde podemos encontrar a energia singlete (E_s), estão assinalados no gráfico.

A velocidade de desaparecimento das moléculas no estado excitado N^{S_1} , considerando-se uma cinética de primeira ordem, pode ser descrita por:

$$-\frac{dN^{S_1}}{dt} = k^S [N^{S_1}] \quad \text{Eq. 9}$$

onde k^S é a constante cinética observada para o decaimento. Na forma integrada,

$$[N^{S_1}](t) = [N^{S_1}]_0 e^{-k^S t} \quad \text{Eq. 10}$$

O tempo de vida da espécie excitada singlete (τ^S também chamado de τ_{F1}) corresponde ao inverso da constante k^S e, portanto, ao inverso da soma das constantes de todos os processos radiativos (k_r^S) e não radiativos (k_{nr}^S), que incluem a emissão, IC e ISC^[2]:

$$\tau^S = \frac{1}{k^S} = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad \text{Eq. 11}$$

cuja consequência é:

$$[N^{S_1}](t) = [N^{S_1}]_0 e^{-\frac{t}{\tau^S}} \quad \text{Eq. 12}$$

No caso da ocorrência de fluorescência, a intensidade de emissão em um dado tempo t é proporcional a constante radiativa relacionada ao estado singlete e a concentração de espécies singlete excitadas.

$$I^{Fl}(t) = k_r^S [N^{S_1}] \quad \text{Eq. 13}$$

A associação das Eqs. 12 e 13 leva a uma relação entre a intensidade de emissão e o tempo de vida do estado excitado singlete:

$$I^{Fl}(t) = I_0^{Fl} e^{-\frac{t}{\tau^S}} \quad \text{Eq. 14}$$

Para uma molécula no estado excitado S_n , a ocorrência de IC compete com diversos processos, incluindo o ISC. A ocorrência de ISC está relacionada ao *acoplamento spin-órbita* do elétron, uma interação magnética fraca entre o spin do elétron e ao seu movimento orbital ao redor do núcleo atômico que aumenta a probabilidade de ocorrência de uma transição proibida entre estados de diferente multiplicidade, *e.g.* $S_1 \rightarrow T_1$. A ISC relaciona-se, entre outros fatores, como o *efeito de átomo pesado*, um efeito relativístico que favorece o acoplamento spin-órbita.

A eficiência do processo de emissão em relação aos demais processos não radiativos é chamado de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl}). Em termos cinéticos, trata-se da razão entre a constante radiativa e a constante de decaimento

observada, Eq. 15(a) e 15(b).

$$\phi_{Fl} = \frac{k_r^S}{k^S} = \frac{\tau^S}{\tau_r^S} \quad \text{Eq. 15a}$$

$$\phi_{Fl} = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \tau^S \quad \text{Eq. 15b}$$

Portanto,

$$k_r^S = \frac{\phi_{Fl}}{\tau^S} \quad \text{Eq. 16}$$

$$k_{nr}^S = \frac{(1 - \phi_{Fl})}{\tau^S} \quad \text{Eq. 17}$$

Considerando-se apenas as contribuições radiativas, o tempo de vida de espécies excitadas que emitem fluorescência (τ_r^S) relaciona-se ao coeficiente de atenuação molar no comprimento de onda máximo de absorção ($\varepsilon(\lambda^{\max})$), conforme:

$$\tau_r^S \approx \frac{10^{-4}}{\varepsilon(\lambda^{\max})} \quad \text{Eq. 18}$$

Quando o valor de tempo de vida de luminescência determinado experimentalmente é diferente do valor calculado na Eq. 18, processos não radiativos (escuros) estão relacionados à desativação do estado excitado. Formalmente, ϕ_{Fl} pode ser calculado se o número de fótons absorvidos e o número de fótons emitidos forem conhecidos, conforme a Eq. 19.

$$\phi_{Fl} = \frac{n_{em}}{n_{abs}} \quad \text{Eq. 19}$$

Contudo, a determinação experimental destes parâmetros requer um equipamento com fonte de luz calibrada e adequado para a medida precisa de todos os fótons emitidos pela molécula em estudo. Por isso, ϕ_{Fl} é normalmente calculado utilizando-se um padrão secundário como composto de referência empregando-se a Eq. 20. Para evitar problemas relacionados à eficiência do sistema de detecção em diferentes comprimentos de onda e efeitos de filtro interno, as soluções da amostra e do padrão devem ter perfis de absorção e emissão similares e suas soluções devem ter absorção abaixo de 0,1.^[8]

$$\phi_{Fl} = \phi_{Fl}^p \frac{A^p(\lambda)}{A(\lambda)} \frac{S}{S^p} \frac{n_D^2}{n_D^{p^2}} \quad \text{Eq. 20}$$

Onde, o sobrescrito p indica o padrão secundário, S é área sobre o espectro de emissão e n_D é o índice de refração do solvente. Exemplos de padrões secundários de fluorescência, seus ϕ_{Fl} e os seus máximos de absorção e emissão são apresentados na Figura 2.

O decaimento não radiativo depende da temperatura. Em baixas temperaturas, processos de desativação não radiativa, transferência de energia envolvendo colisão e processos intramoleculares vibracionais são suprimidos, logo, o rendimento quântico de fluorescência aumenta.^[5] Por meio da relação de Arrhenius, que correlaciona o rendimento quântico de fluorescência com a temperatura, é possível determinar a energia de ativação (E_a) do processo de desativação não-radiativa^[9]. Se a constante radiativa (k_r) não varia na faixa de temperatura estudada, é possível determinar a E_a do processo não radiativo mais relevante com:

$$\ln \left(\frac{1}{\phi_{Fl}} - 1 \right) = \ln A - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad \text{Eq. 21}$$

onde, R corresponde à constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T , à temperatura absoluta, em K. Portanto, o coeficiente angular obtido no ajuste linear de um gráfico $\ln(\phi_{Fl}^{-1} - 1)$ vs. T^{-1} corresponde a $-E_a/R$.

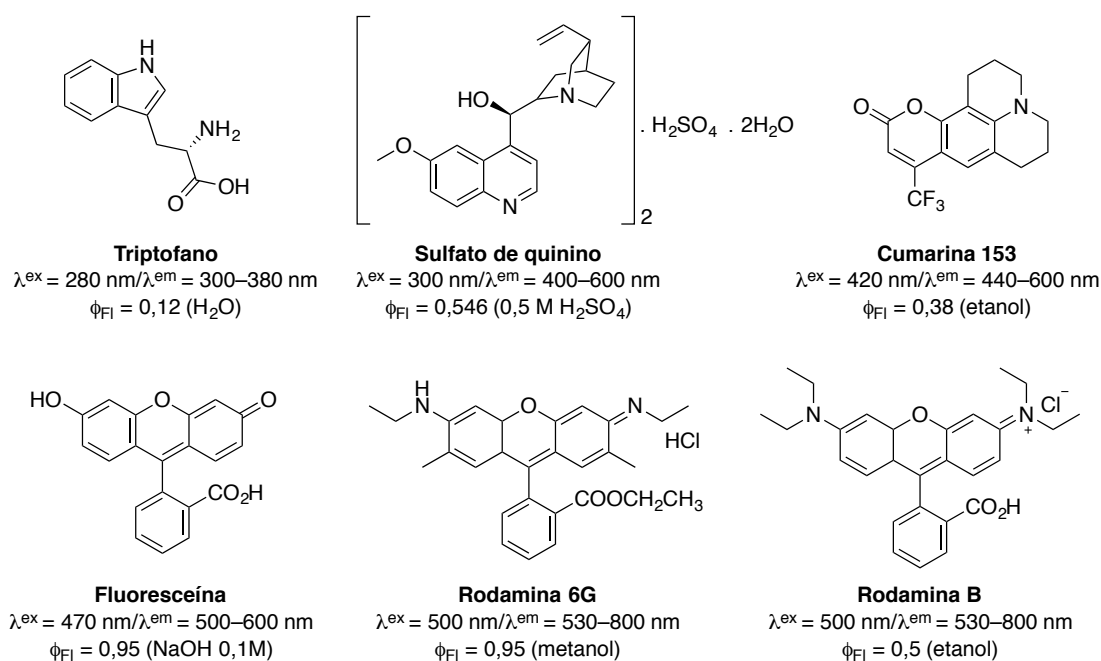
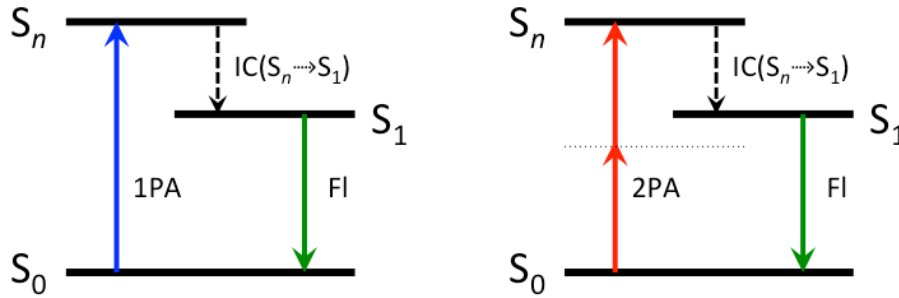


Figura 2. Estrutura de alguns compostos utilizados como padrões secundários de rendimentos quânticos de fluorescência.^[3,10,11] A faixa de absorção e emissão de cada um dos padrões de ϕ_{Fl} varia amplamente em toda faixa do UV-Vis, logo, há diversos padrões de ϕ_{Fl} que podem ser selecionados de forma a melhor correlação entre os espectros de absorção e emissão do padrão e da amostra.

No estudo de processos fotofísicos é comum referir-se à Lei de Stark-Einstein, que postula que *uma molécula* é promovida ao estado excitado pela absorção de *um fóton*. Com o desenvolvimento de novas fontes de excitação com alta intensidade de luz pode-se confirmar modelos teóricos que previam que moléculas podem absorver mais do que um fóton, em um processo chamado de absorção multifotônica^[12]. Conforme o número de fótons absorvidos simultaneamente aumenta, a probabilidade de ocorrência deste fenômeno diminui. Assim, a absorção de dois fótons (absorção bifotônica, 2PA) é

um fenômeno investigado. A absorção de dois fótons por moléculas orgânicas possui muitas aplicações tecnológicas importantes, como, por exemplo, microfabricação em três dimensões, armazenamento óptico de dados, conversores de frequência, terapia fotodinâmica, sensores de íons e pH para aplicação em sistemas biológicos e, particularmente, em microscopia de fluorescência^[13], uma vez que há redução do volume focal que resulta na diminuição do fotobranqueamento da amostra.^[14,15,16] Estas aplicações baseiam-se (i) na dependência da probabilidade de absorção de dois fótons com o quadrado da intensidade do laser incidente (propriedade ótica não linear)^[17,18], o que resulta em boa resolução espaço-temporal,^[16] e (ii) no fato da energia dos fótons utilizados ser menor do que a absorção de um fóton, o que garante uma maior penetração do feixe incidente de luz laser no material, em especial em tecidos vivos. Compostos com alta seção de choque para dois fótons em água são raros.^[19]

A absorção de dois fótons pode acontecer pela absorção simultânea ou sequencial dos fótons^[20]. Na excitação sequencial, processo que se relaciona a conversão ascendente de energia ('*upconversion*') e a processos de photooxidação, a absorção do primeiro fóton leva a um estado excitado que, então, absorve outro fóton e é convertido em um estado excitado superior. É possível também que o primeiro estado excitado decaia para um estado excitado com tempo de vida mais longo, que então absorve o segundo fóton. Na excitação simultânea, o primeiro fóton promove a molécula para um estado virtual e durante esta interação ($\sim 10^{-18}$ a 10^{-16} s) um segundo fóton é absorvido (Esquema 2).^[10] A seção de choque para absorção de dois fótons é proporcional ao quadrado do produto entre dois dipolos de transição: $S_0 \rightarrow S_{1-PA}^*$ e $S_{1-PA}^* \rightarrow S_{2-PA}^*$. Moléculas do tipo doador-aceitador (D-A, *push-pull*) e arranjos lineares simétricos (D-A-D e A-D-A) tem alta seção de choque de dois fótons.^[21]



Esquema 2. Diagrama de Jablonski simplificado que descreve a excitação com um (1PA) e dois (2PA) fótons, seguida de emissão de fluorescência.³

Como apresentado na Eq. 1, a seção de choque de um fóton (σ) depende linearmente do coeficiente de atenuação molar do composto.^[3] Para a absorção de dois fótons, a seção de choque (σ_2) varia, como dito anteriormente, com o quadrado da intensidade de luz incidente, conforme apresentado na Eq. 21.

$$\frac{dI}{db} = -\sigma_2 c I^2 \quad \text{Eq. 21}$$

Os valores de σ variam entre 10^{-15} – 10^{-17} cm^2 ^[3], enquanto σ_2 são ainda menores, na faixa de 10^{-50} $\text{cm}^4 \text{ s} \text{ fóton}^{-1}$, e, por isso, são reportada em Göppert-Mayer (GM) em homenagem a Maria Göppert-Mayer^[16], responsável pela teoria do processo de absorção simultânea de dois fótons por uma molécula^[22], *i.e.* $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s} \text{ fóton}^{-1}$.^[23] A forma integrada da Eq. 21 mostra a relação entre a luz incidente, a luz transmitida, o caminho ótico, a concentração da amostra e a seção de choque de dois fótons, em analogia à Lei de Beer-Lambert (Eq. 22).

$$I(b) = \frac{I_0}{1 + I_0 \sigma_2 c b} \quad \text{Eq. 22}$$

1.1.1. Fatores que afetam a emissão de fluorescência

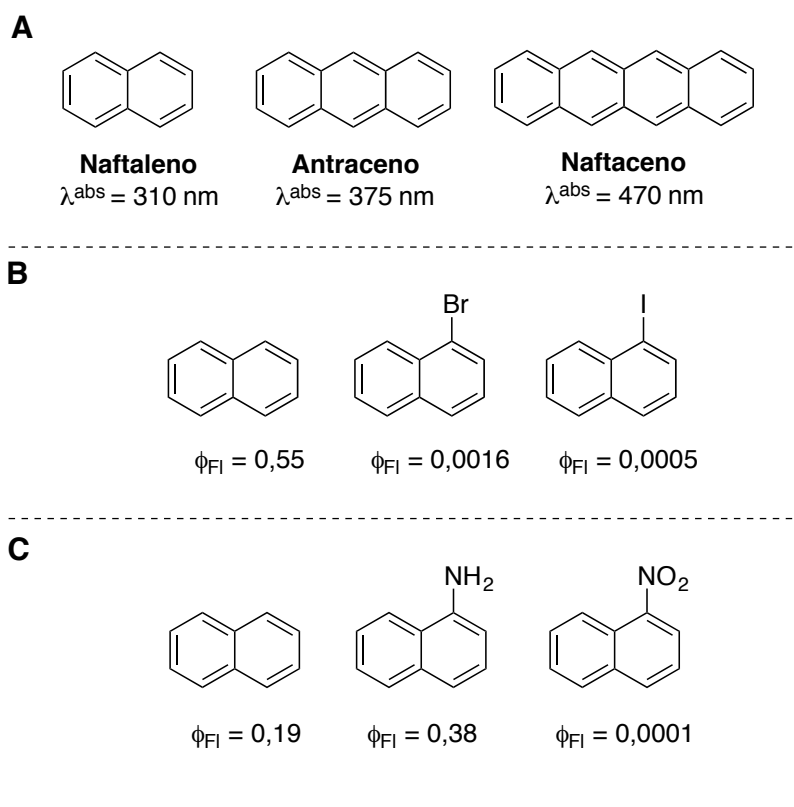
A maioria dos compostos orgânicos fluorescentes são aromáticos, apenas alguns compostos alifáticos são fluorescentes.^[21] Para a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos, a transição eletrônica mais baixa em energia ($S_0 \rightarrow S_1$) tem natureza $\pi \rightarrow \pi^*$ e é permitida por simetria (exceções notáveis são o naftaleno o pireno e o fenantreno, cuja transição $S_0 \rightarrow S_1$ é proibida). Como resultado, os valores de coeficiente de atenuação molar destes compostos são altos ($\epsilon > 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), quando comparados ao valor calculado para transições proibidas, como a transição $n \rightarrow \pi^*$ da acetona ($\epsilon^{280 \text{ nm}} = 12,4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[24] Considerando-se as Eqs. 15a e 18, o valor de ϵ é inversamente proporcional ao tempo de vida de fluorescência (τ^S) e proporcional ao tempo de vida do estado excitado singlete (τ^S). Por esta aproximação, que desconsidera a ocorrência de processos não radiativos, uma espécie com $\epsilon > 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tem tempo de vida de fluorescência teórico de 1 ns, enquanto para uma espécie com $\epsilon > 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, τ^S é 1 μs . Entretanto, tempos de vida de fluorescência tão longos não podem competir com processos não radiativos mais rápidos que, portanto, se tornam dominantes para a desativação do estado excitado singlete e resultam em um ϕ_{FI} baixo, como descrito na Eq. 15a. Em sistemas heteroaromáticos, uma transição $n \rightarrow \pi^*$ pode ser a transição de menor energia, resultando em um menor valor de ϵ e, por conseguinte, rendimentos quânticos de fluorescência mais baixos.

A extensão do sistema de elétrons π (aumento da conjugação) leva a um deslocamento dos máximos de absorção e de emissão para comprimentos de onda mais longos (deslocamento batocrômico ou para o vermelho) e a um aumento do coeficiente de atenuação molar (Esquema 3).^[24] Substituintes podem afetar as propriedades de absorção e emissão de compostos aromáticos. Grupos como $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-$

OR, halogênios, entre outros, afetam a cor de cromóforos sendo chamados de grupos auxocrômicos.^[2,10] De forma geral, a presença de átomos pesados (e.g. Br, I) acarreta na supressão da emissão de fluorescência (*quenching*), pois aumenta a probabilidade de ocorrência de cruzamento intersistemas, via acoplamento spin-órbita, como descrito anteriormente.^[2] Substituintes doadores de elétron (e.g. -OH, -NH₂, -NR₂) levam a um deslocamento dos máximos de absorção e fluorescência, mas não afetam a natureza da natureza $\pi \rightarrow \pi^*$ da transição eletrônica. Em geral, compostos aromáticos substituídos com grupos doadores de elétrons tem espectros de emissão mais largos e menos resolvidos comparados aos compostos não substituídos, como resultado de um maior caráter de transferência intramolecular de carga das transições eletrônicas proveniente da interação do par de elétrons do heteroátomo com o sistema π aromático. Efeitos estéricos de substituintes podem ser relevantes quando afetam a coplanaridade entre o substituinte e o anel aromático.

O efeito da presença de substituintes retiradores de elétrons (-COOH, -CN, -NO₂) é complexo e difícil prever. Quando o substituinte torna a energia da transição $n \rightarrow \pi^*$ mais baixa do que a $\pi \rightarrow \pi^*$ o resultado é a diminuição do rendimento quântico de fluorescência. Este é o caso de muitos aldeídos e cetonas aromáticas, como a benzofenona, que tem um rendimento quântico de cruzamento intersistemas próximo de 1. Como consequência, quando as energias das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ são muito próximas, o solvente pode afetar de forma expressiva a eficiência de emissão. Grupos ácido carboxílico tem efeitos que dependem do pH (dado o equilíbrio entre a forma -COOH e -COO⁻) e, dependendo do seu grau de coplanaridade com o sistema π podem induzir um certo caráter de transferência de carga à transição. A fluorescência de hidrocarbonetos aromáticos com o substituinte -NO₂, em geral, não é detectável

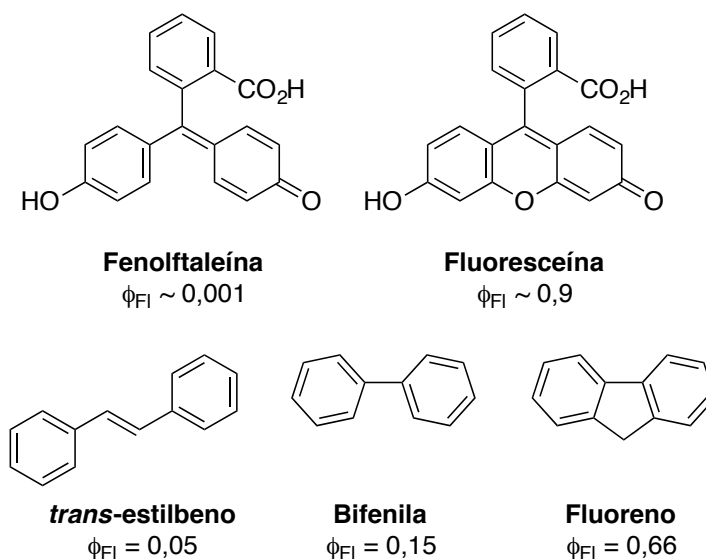
(Esquema 3).^[10] Os motivos para este efeito são a redução da energia da transição $n \rightarrow \pi^*$ que resulta em um cruzamento intersistemas eficiente. Como resultado, muitos compostos nitroaromáticos são fosforescentes. Em alguns casos, a velocidade de conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$ de nitroaromáticos é muito alta como resultado de um alto caráter de transferência de carga no estado excitado e ao acoplamento vibrônico intramolecular.^[25]



Esquema 3. Efeito da conjugação e do substituinte nas propriedades fotofísicas de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A) Efeito do aumento da conjugação no máximo de absorção; B) Efeito do substituinte de átomo pesado no rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl}) do naftaleno em sólido a 77K; C) Efeito da presença de substituintes doadores e retiradores de elétrons no ϕ_{Fl} do naftaleno em solução.^[2,10]

A livre rotação das ligações químicas no estado eletronicamente excitado causa diminuição do ϕ_{Fl} .^[24] Isso ocorre dado o aumento da k_{nr}^{S} , visto que a conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$ se relaciona com a relaxação vibracional (e conformacional) da espécie excitada. Desta forma, moléculas mais rígidas tendem a ser mais fluorescentes que análogos com

maior liberdade conformacional e vibracional. Por exemplo, a ponte de oxigênio entre os anéis da fluoresceína e a ponte metilênica do fluoreno aumentam significativamente o ϕ_{FI} em relação à fenolftaleína e ao *trans*-estilbeno e a bifenila, respectivamente (Esquema 4).^[2,26]



Esquema 4. Mudança no rendimento quântico de fluorescência de compostos com a diminuição da liberdade rotacional. Comparação entre a fenolftaleína com a fluoresceína, que apresenta uma ponte de oxigênio entre os anéis aromáticos que acarreta num aumento da rigidez estrutural e entre o *trans*-estilbeno, a bifenila e o fluoreno, que apresenta uma ponte de metileno entre os anéis aromáticos que não está presente nos demais compostos, que também aumenta a rigidez estrutural.^[2,27]

O meio afeta significativamente as propriedades fotofísicas de um fluoróforo^[28,29]. Estudos do efeito da interação soluto-solvente sobre as propriedades de absorção e fluorescência do soluto permitem que se façam inferências sobre as propriedades tanto do soluto, quanto do solvente. Nesse sentido, fluoróforos sensíveis ao meio, em particular a efeitos de polaridade e viscosidade, tornaram-se ferramentas para estudos de interações intermoleculares.^[30]

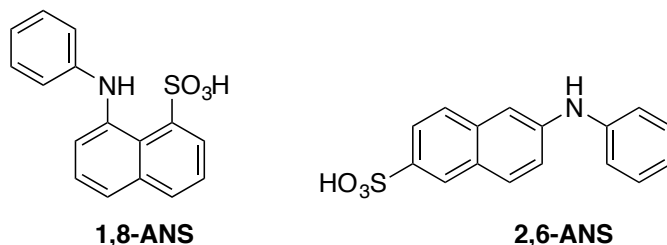
A interação entre o solvente e o fluoróforo afeta a diferença de energia entre o estado fundamental e estado excitado dada a estabilização diferencial do estado fundamental e excitado da espécie.^[31] Essa diferença de energia, em cm^{-1} , se relaciona

com propriedades não específicas do solvente (*i.e.* índice de refração (n_D) e a permissibilidade relativa, antiga constante dielétrica, ϵ_r), e com a diferença entre os momentos de dipolo do soluto no estado fundamental e excitado (μ_G e μ_E) e seu raio de Onsager (a), sendo descrita pela equação de Lippert-Mataga:

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_E = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon_r - 1}{2\epsilon_r + 1} - \frac{n_D^2 - 1}{2n_D^2 + 1} \right) \frac{(\mu_G - \mu_E)^2}{a^3} + const. \quad \text{Eq. 23}$$

onde, h ($6,6256 \times 10^{-34}$ J s) é a constante de Plank, c ($2,9979 \times 10^{10}$ cm s⁻¹) é a velocidade da luz no vácuo. ν_A e ν_E são os números de onda (cm⁻¹) da absorção e emissão, respectivamente. Assume-se por esta equação, que a relaxação do solvente é completa antes da emissão de fluorescência. Em outras palavras, a excitação de um soluto leva a um estado localmente excitado (ou estado de Franck-Condon), que relaxa até o nível vibracional mais baixo do estado eletronicamente excitado antes da emissão e, durante este período, permite que o solvente se reoriente de forma a estabilizar o soluto excitado.^[5] O termo entre parênteses, conhecido como orientação de polarizabilidade (Δf), corresponde a $(\epsilon_r - 1)/(2\epsilon_r + 1)$, que considera a mudança dos deslocamentos espectrais causada tanto pela reorientação dos dipolos do solvente quanto pela redistribuição dos elétrons nas moléculas do solvente, e pelo termo $(n_D^2 - 1)/(2n_D^2 + 1)$, que considera somente a redistribuição electrónica do solvente.^[3] A sensibilidade de um fluoróforo ao solvente pode ser estimada correlacionando-se o deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) com Δf . Os fluoróforos mais sensíveis à mudança de polaridade do meio são os que apresentam maior diferença entre os momentos de dipolo do estado fundamental e excitado. A fluorescência de derivados de ácido anilinaftalenosulfônico (ANS) é bastante sensível a efeitos do solvente.^[3]

O rendimento quântico de fluorescência e o comprimento de onda de emissão do ácido 8-anilino-1-naftalenosulfônico (1,8-ANS) e do ácido 6-anilino-2-naftalenosulfônico (2,6-ANS) são afetados pela polaridade do meio (Esquema 5). Estes compostos são pouco fluorescentes em água, mas são bastante fluorescentes em solventes orgânicos não polares ou ligados a proteínas, aonde se observa um deslocamento hipsocrômico do máximo de emissão em relação ao meio aquoso.^[31] Por isso, 1,8- e 2,6-ANS são usados como sensores de polaridade em diversos sistemas heterogêneos, como proteínas^[32,33,34], micelas^[35,36], complexos de inclusão com ciclodextrinas^[29] e também em misturas binárias de solventes^[37,38]. A fluorescência de 1,8- e 2,6-ANS também é sensível à viscosidade do meio em misturas glicerol/água, sendo aplicados como sensores de mudança de micropolaridade do meio.^[39]



Esquema 5. Estruturas do ácido 8-anilino-1-naftalenosulfônico (1,8-ANS) e 6-anilino-2-naftalenosulfônico (2,6-ANS).^[39]

A viscosidade do meio afeta a constante não radiativa de decaimento do estado excitado (τ , conseqüentemente, o tempo de vida) de fluoróforos pouco rígidos, em especial moléculas cuja transição apresenta certo caráter de transferência de carga. O ϕ_{FL} aumenta com o aumento da viscosidade do meio uma vez que meios viscosos restringem os graus de liberdade vibracionais e rotacionais do estado excitado dada a redução do volume livre da cavidade de solvente. Rotores moleculares são fluoróforos que tem a habilidade de realizar, no estado excitado, um movimento intramolecular de

rotação.^[28] Em tais fluoróforos, a emissão de fluorescência compete com a rotação intramolecular^[40]. Num ambiente mais viscoso, a rotação é desfavorecida e afeta significativamente os parâmetros de fluorescência resultando no aumento da intensidade e nas mudanças do perfil espectral e do tempo de vida de emissão. Dentre os diversos modelos disponíveis para relacionar o rendimento quântico de fluorescência com a viscosidade do meio, destaca-se o proposto por Förster e Hoffman^[41]:

$$\log \phi_{FL} = C + x \log \frac{\eta}{T} \quad \text{Eq. 24}$$

onde, o coeficiente angular x é calculado pelo gráfico de $\log \phi_{FL}$ vs. $\log \eta$, em temperatura (T), constante.

1.2. Organismos vivos fluorescentes

A fluorescência de compostos naturais presentes em sistemas biológicos, especialmente em plantas, é ligada à história do estudo desse processo fotofísico^[42]. Quinino, um alcaloide com propriedades medicinais encontrado na casca da quinina (*Cinchona officinalis*), é um composto que apresenta fluorescência natural e que vem sendo estudado desde o século XIX.^[43] Assim como o quinino, diversos compostos endógenos apresentam fluorescência mensurável.^[13] Aminoácidos como fenilalanina, tirosina e triptofano, que apresenta maior rendimento quântico de fluorescência em meio aquoso dentre todos os aminoácidos ($\phi_{FL} = 0,12$)^[44] são responsáveis pela fluorescência de proteínas na região do UV.^[45]

Diversos compostos orgânicos também são responsáveis pela emissão de luz visível de organismos vivos.^[45,46] A descoberta de animais, plantas e fungos que emitem luz visível são frequentes.^[46,47] Recentemente, foi descrita a fluorescência visível de um anfíbio originário da Argentina^[48], o sapo da espécie *Hypsiboas punctatus*. Esta espécie

possuiu compostos derivados da dihiroisoquinolina pigmentando sua pele que emitem fluorescência no verde ($\lambda^{em} = 460\text{--}580\text{ nm}$), com a excitação com luz azul ($\lambda^{ex} = 400\text{ nm}$).

Algumas angiospermas, plantas que produzem flores, também mostram fluorescência visível^[49] e folhas emitem fluorescência fraca na região do vermelho e infra-vermelho próximo devido à absorção de luz pela clorofila *a*.^[50] A fluorescência de pétalas de flores já foi descrita em diversas espécies^[51]: *Eustoma grandiflorum* e *Bellis perennis*, pigmentadas por antocianinas^[52], *Portulaca grandiflora* e *Bougainvillea spectabilis* que contém betalaínas amarelas.^[53] A fluorescência de pétalas amarelas de maravilha (*Mirabilis jalapa*) também pigmentada por uma betalaína, foi primeiramente reportada por Gandía-Herrero e colaboradores^[54]; tal processo de emissão estimulou estudos da importância da fluorescência na sinalização entre plantas e polinizadores.^[55] A descoberta da fluorescência de betalaínas também acarretou na melhoria dos métodos de identificação e extração desses pigmentos e criou um novo campo de estudo para as betalaínas^[56].

1.2.1. Betalaínas

Betalaínas são pigmentos nitrogenados vacuolares, solúveis em água e atóxicos que substituem as antocianinas na pigmentação da maioria das famílias de plantas pertencentes à ordem das Caryophyllales, exceto nas famílias Caryophyllaceae e Molluginaceae, e de alguns fungos basidiomicetos.^[57] Dentre alguns exemplos de fontes de betalaínas podemos citar as beterrabas roxas e amarelas (*Beta vulgaris*); o cogumelo com componentes psicoativos alucinógenos das moscas (*Amanita muscaria*), algumas flores como a maravilha ou onze-horas (*P. grandiflora*), o amaranto (*Amaranthus spp.*) e a primavera (*Bougainvillea spp.*, Figura 3), a pitaya rosa e acelga de talo^[57].

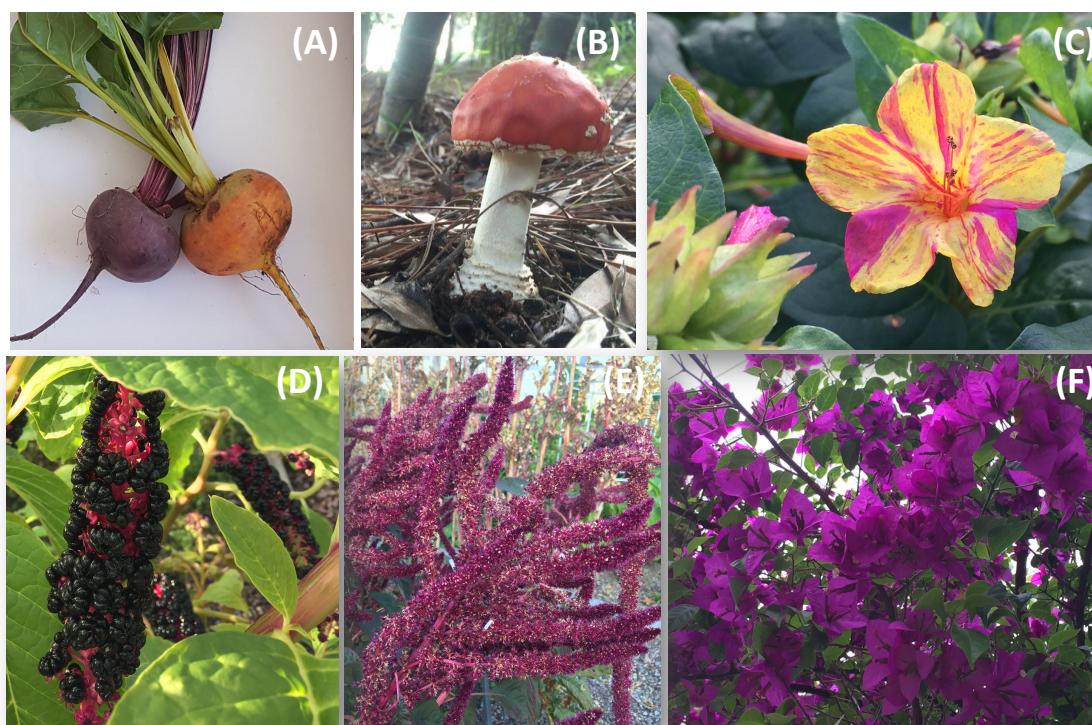
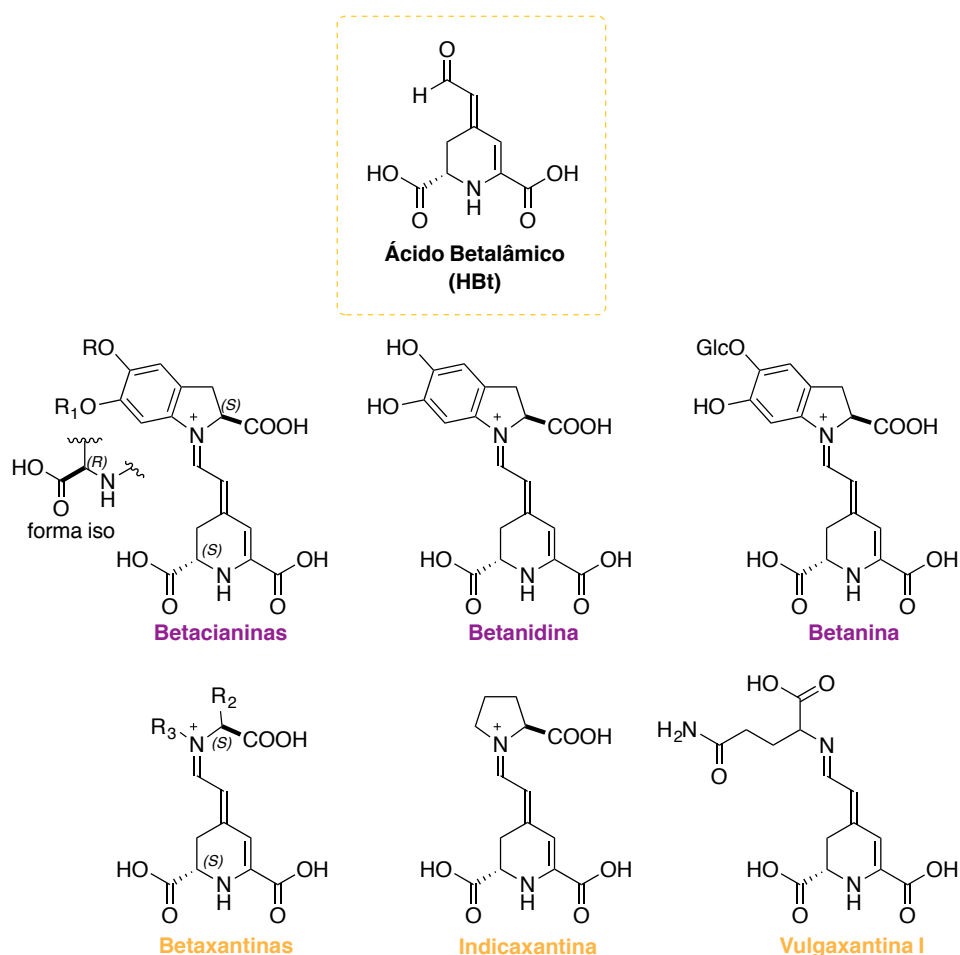


Figura 3. Algumas fontes de betalínas. A) Beterrebas vermelha e amarela, *Beta vulgaris*; B) Agário das moscas, *Amanita muscaria*; C) Maravilha, *Mirabilis jalapa*; D) *Phytolacca accinosa*; E) Amarantho, *Amaranthus spp.*; F) Primavera, *Bougainvillea spp.*.

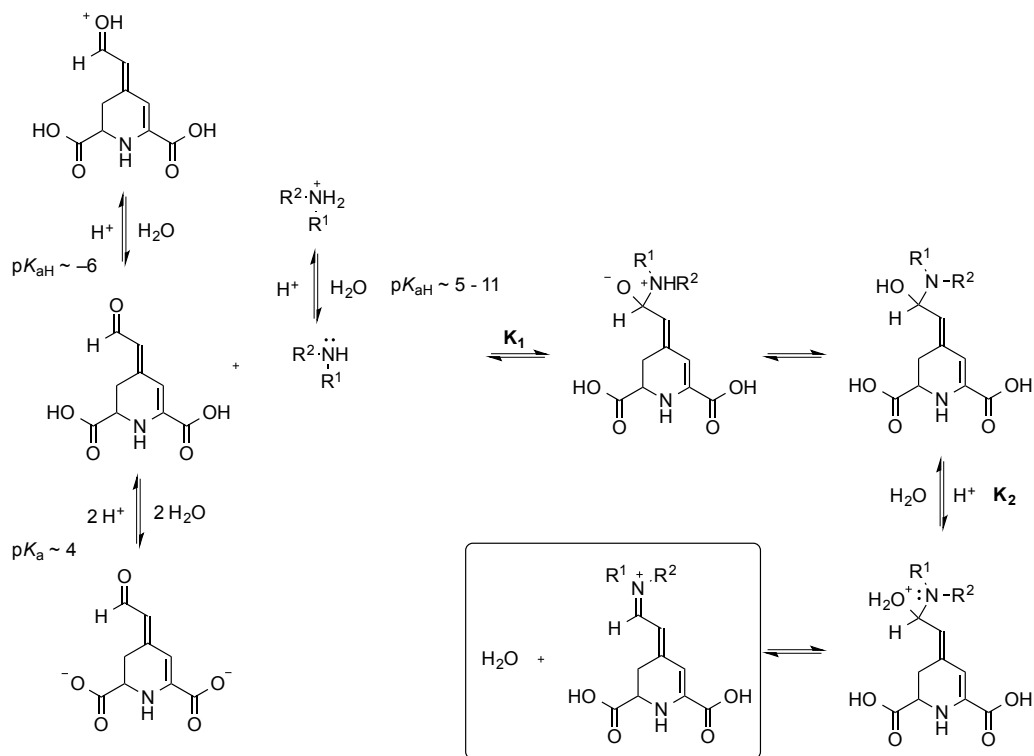
Betaláínas naturais são divididas em duas classes, betacianinas e betaxantinas, que possuem um cromóforo comum, o ácido betalâmico (**HBt**). Betaxantinas (*xanthos*, amarelo, $\lambda_{\text{abs}} = 460\text{--}480$ nm) são iminas ou sais de imínio os derivados de do acoplamento aldímico de **HBt** com aminoácidos, enquanto as betacianinas (*kyaneos*, azul, ($\lambda_{\text{abs}} \approx 540$ nm) são iminas betaláínicas formadas a partir da reação de ciclo-DOPA, com diferentes graus de glicosilação, com o **HBt** (Esquema 6).^[58] As duas classes de betaláínas apresentam propriedades distintas: enquanto as flores pigmentadas por betaxantinas são fluorescentes, as pigmentadas por betacianinas não apresentam fluorescência visível quando irradiadas com luz azul.^[54]



Esquema 6. Estruturas básicas das duas classes betalainas, betacianinas e betaxantinas, seu precursor comum, o ácido betalâmico (**HBt**), e exemplos de betacianinas (betanidina e betanina) e betaxantinas (indicaxantina e vulgaxantina I); Glc = glicose.^[59]

A biossíntese de betalainas envolve a oxidação da L-tirosina ao ácido **HBt**, que ocorre em duas etapas enzimáticas^[60,6162,63]. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que, após a formação do **HBt**, a formação de betaxantinas é espontânea, não é catalisada por enzimas e não é estereosseletiva, uma vez que é formada uma mistura dos estereoisômeros *E/Z*.^[64] Dessa forma, é possível semissintetizar betalainas *in vitro*, via acoplamento aldimínico a partir do ácido betalâmico^[65] obtido da hidrólise alcalina de betalainas naturais^[66]. O acoplamento aldimínico entre **HBt** e aminas primárias leva à formação de iminas (bases de Schiff)^[67] solúveis em água e com máximo de absorção e fluorescência deslocados para o vermelho em relação a amina precursora^[68,69]. A

formação de iminas ocorre pelo mecanismo inverso ao da hidrólise (Esquema 7), e, portanto, é sujeita a catálise ácida.



Esquema 7. Esquema simplificado para a formação de aldiminas a partir de reação de aminoácidos com o ácido betalâmico. ^[70]

A hidrólise de betalaínas em meio aquoso é um dos fatores que limitam sua aplicação. Ironicamente, a maioria das betalaínas é pouco solúvel ou reage com solventes orgânicos polares, como DMSO, DMF, MeCN, MeOH e EtOH. De forma geral, betalaínas são mais estáveis entre pH 3 e 7. ^[53,71] Contudo, além do pH do meio, diversos fatores afetam a estabilidade das betalaínas ^[72,73]. A presença de luz, oxigênio, íons metálicos ^[74], a atividade de água ^[75] e enzimática ^[76] e o aumento da temperatura ^[77], assim como a mudança estrutural dos pigmentos ^[72,78], também influenciam na estabilidade de betalaínas, acarretando na sua degradação e descoloração. ^[79]

Betalaínas naturais como betanina podem ser extraídas diretamente de suco de beterraba ^[80], contudo a semissíntese de novas betalaínas passa pela obtenção de ácido

betalâmico, precursor das betalaínas. Existem algumas metodologias de semissíntese de betaxantinas descritas na literatura^[64,65,69,81], a abordagem mais comum é a hidrólise de betanina a ácido betalâmico, na presença de excesso de amina, em meio aquoso^[65]; tal metodologia, origina uma mistura de betanina e de betalaína preparada, o que pode dificultar sua purificação, além de diminuir o rendimento global, que é de cerca de 20%^[68]. O mesmo grupo propôs a semissíntese *one-pot* de betaxantinas derivadas da tiramina, dopamina, pirrolidina, com ácido betalâmico imobilizado em fase sólida, a partir de suco de beterraba^[81]. Contudo, a remoção do aduto da resina foi apenas otimizada para a semissíntese de betaxantinas e betacianinas derivadas desses aminoácidos. Ainda, é possível extrair o **HBt** em com acetato de etila, a partir do suco de beterraba hidrolisado, apesar dos baixos rendimentos de extração.^[64] Na literatura são descritos diversos métodos de purificação de betalaínas. Foram usadas cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa, sob condições de fase reversa em meio ácido^[82,83], em cromatografia de coluna flash, também sob condições de fase reversa^[80,84], cromatografia de troca iônica em Q-sepharose^[65] e cromatografia de permeação em gel (CPG) com Sephadex G-25^[57,80] ou Sephadex LH20^[68], utilizando-se água como eluente.

Há diversos relatos na literatura das propriedades antioxidantes^[69,85,86] e anti-inflamatórias^[87,88] de betalaínas naturais, como betanina e indicaxantina. O potencial antioxidante das betanina e indicaxantina tem sido a base de diversos estudos clínicos quanto ao seu uso terapêutico em doenças vinculadas ao estresse oxidativo^[89-93]. Sabe-se também que essas betalaínas são capazes de interagir com lipoproteínas^[94] e membranas biológicas^[66,95,96]. As propriedade de interação com biomoléculas, aliada à fluorescência de betalaínas^[56], foram o ponto de partida para o nosso grupo desenvolver

uma sonda fluorescente, a partir do acoplamento entre **HBt** e 7-amino-4-metilcumarina (**C120**), a **cBeet120** (Figura 4)^[97]. Ensaios de microscopia de fluorescência com indicaxantina, betalaína natural fluorescente ($\phi_{FI} = 0,5\%$ em água)^[78], e com **cBeet120** mostraram que o derivado cumarínico é capaz de acumular em *P. falciparum*, apresentando marcação seletiva dos eritrócitos infectados (Figura 4), enquanto a betalaína natural não apresenta marcação nem no parasita, nem no eritrócito.^[68] A **cBeet120** originou a perspectiva de desenvolvimento de novas betalaínas artificiais fluorescentes, com aplicação como sonda em microscopia de fluorescência de células vivas.

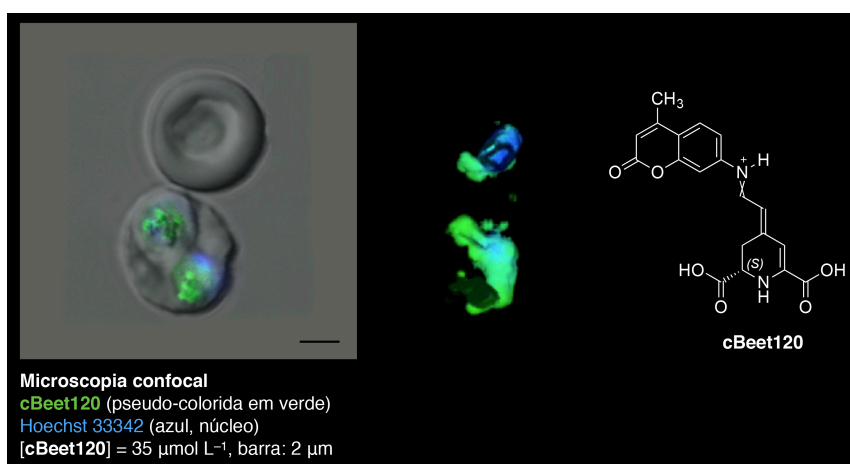


Figura 4. Marcação seletiva por betalaína cumarínica (**cBeet120**) de eritrócito vivo duplamente infectado por *P. falciparum*, com sobreposição parcial da marcação dos núcleos dos parasitas com Hoechst e a **cBeet120**.

A descoberta da fluorescência de flores pigmentadas por betalaínas foi relatada em 2005^[54]. Desde então, nosso grupo^[78,98] e um grupo na Polônia^[84,99–101] procuram descrevem as propriedades fotofísicas de betalaínas naturais, como rendimentos quânticos e tempo de vida de fluorescência. Os ϕ_{FI} determinados em meio aquoso descritos na literatura variam de 0,07% para betanina^[99] a 0,7% para vulgaxantina I^[100], indicando que o substituinte acoplado ao sistema 1,7-diazaeptamético influencia a ϕ_{FI} .

Foi verificado também que o aumento da viscosidade do meio aumenta drasticamente o ϕ_{FI} , *e.g.* passa de 0,5% em água (0,89 cP) para 3% em etilenoglicol (16,1 cP) para indicaxantina, indicando que a fluorescência visível em flores pode ser explicada pelo aumento a microviscosidade no vacúolo da planta, que também acarretaria num aumento do ϕ_{FI} ^[84]. Valores de ϕ_{FI} tão baixos em solução, mesmo em solventes mais viscosos, inferiores ao descrito para o triptofano^[44], não explicam a ocorrência de fluorescência visível em flores pigmentadas por betaxantinas. Assim, pode-se inferir que a compartimentalização dos pigmentos no vacúolo da planta deve ser fundamental para emissão visível. Ensaio de absorção transiente nas betalaínas naturais mostraram que a principal via de desativação não radiativa é a conversão interna via transição $S_1 \rightarrow S_0$, não sendo observada ocorrência de cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$ para nenhum dos compostos estudados.^[101]

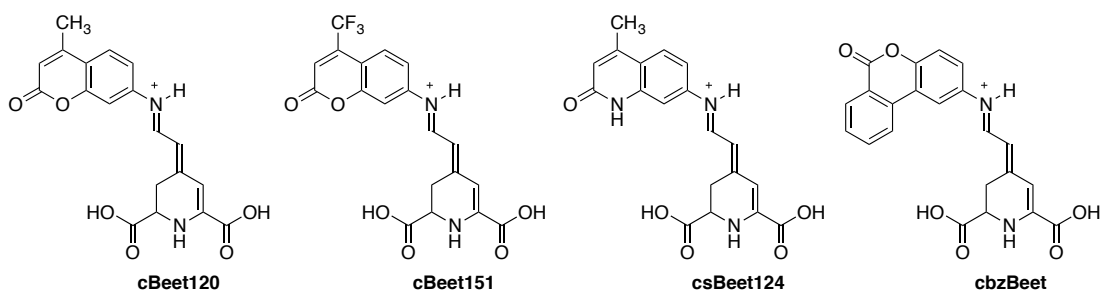
Estudos sistemáticos com o objetivo de estabelecer relações estrutura-propriedade de betalaínas são escassos^[83,79]. Alguns autores já estudaram implicações da estrutura sobre a cor, fluorescência e atividade antirradicalar de betalaínas derivadas de 15 aminas diferentes^[69]. Contudo, um estudo sistemático de mudanças do substituinte das aminas precursoras na estabilidade e nas propriedades fotofísicas, como rendimento quântico de fluorescência e tempo de vida de fluorescência, de forma a compreender a interação de betalaínas com o meio e com biomoléculas não foi anteriormente realizado. Ainda, o desenvolvimento de novos derivados fluorescentes, com propriedades físico-químicas distintas, pode originar novas aplicações de betalaínas artificiais.

2. Objetivos

Preparar quatro betalainas artificiais e estabelecer relações estrutura/propriedades físico-químicas e fotofísicas para viabilizar o desenvolvimento de uma nova classe de fluoróforos para aplicações biológicas.

2.1. Objetivos específicos

- i. Semissintetizar, purificar e caracterizar quatro betalainas, três delas inéditas;



- ii. medir as suas constantes cinéticas de hidrólise, os seus parâmetros de lipofilicidade em função do pH e os seus potenciais redox;
- iii. caracterizar as suas propriedades de absorção e fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo (ordem de fs) em meio aquoso;
- iv. determinar a seção de choque para a absorção de dois fótons destes compostos em meio aquoso;
- v. entender o efeito de interações intermoleculares sobre as propriedades fotofísicas destes compostos empregando-se misturas binárias de solventes polares, albumina sérica bovina e micelas reversas de AOT em heptano/água.

3. Resultados e discussão

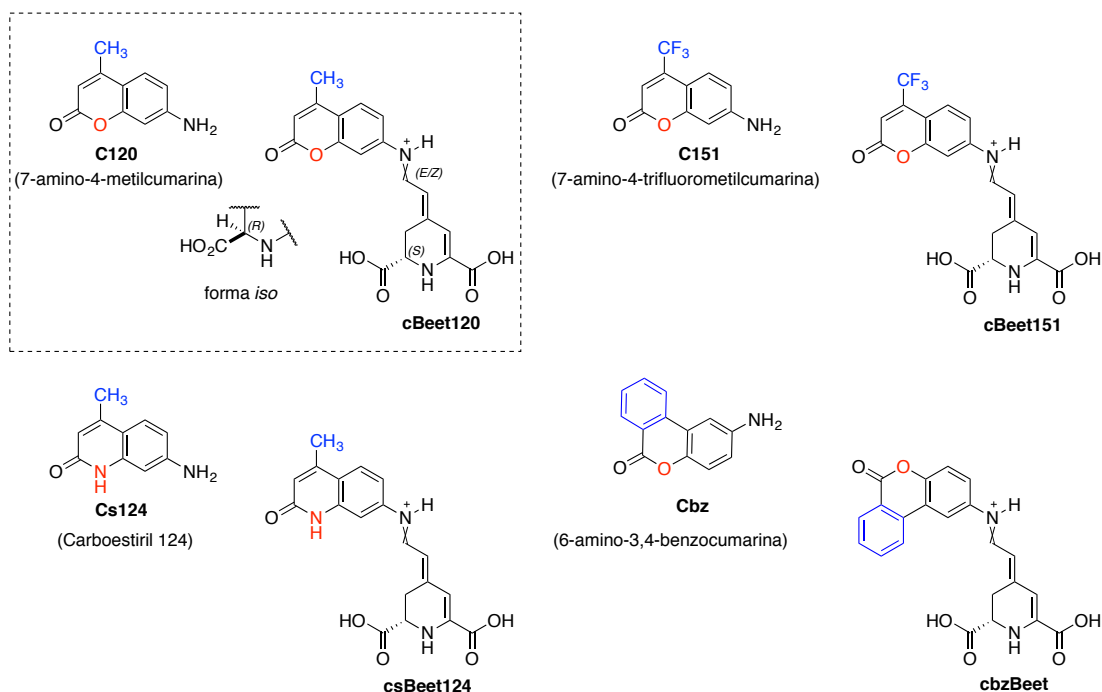
O texto foi organizado em quatro tópicos: síntese e caracterização das propriedades de cBeets e csBeet (3.1), efeito de albumina sobre a fluorescência de cBeets (3.2), efeitos do meio sobre as propriedades fotofísicas de **cBeet120** (3.3) e, finalmente, a caracterização da absorção de dois fótons destas betalaínas cumarínicas (3.4).

3.1. Betalaínas cumarínicas, cBeets: fluoróforos inspirados na natureza

Com o estudo da **cBeet120** e sua aplicação^[68], houve o interesse em investigar betalaínas análogas. Foram selecionados três compostos comerciais: a cumarina 151, a carboestiril 124 e uma aminobenzocumarina que foram usadas na semissíntese da **cBeet151**, da **csBeet124** e da **cbzBeet**, respectivamente (Esquema 8). **cBeet151** difere da **cBeet120** apenas pela presença de um grupo CF_3 no lugar de CH_3 na posição 4 da porção cumarínica. A **csBeet124** tem uma quinolin-2-ona no lugar da porção cromo-2-ona característica da **cBeet120**. Na **cbzBeet**, um anel aromático se encontra ligado à porção cromo-2-ona, com o substituinte amina na posição 6 do anel aromático.

Tais mudanças estruturais das aminas precursoras acarretam mudanças nas suas propriedades fotofísicas em comparação com a **C120**, como descrito na literatura^[102-106]. Derivados da 1,2-benzopirona (cumarina) substituídas na posição 7 por um grupo amina, como **C120** e **C151**, são importantes corantes de lasers na região azul-verde^[107]. As propriedades fotofísicas de **C120** e **C151** são sensíveis a polaridade do meio^[108]; enquanto os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{FI}) são baixos ($\phi_{\text{FI}}^{\text{C120}} = 0,09$ ^[104] e $\phi_{\text{FI}}^{\text{C151}} = 0,19$ ^[103], em hexano) em solvente não polares, em solventes polares como metanol, etanol e acetonitrila, os ϕ_{FI} podem ser superiores a 50%^[102,104,109], contudo tais cumarinas são pouco solúveis em água^[107], o que dificulta sua aplicação em meio

biológico. Além de sua importância como molécula antena^[110], responsável pelo aumento da emissão de fluorescência de lantanídeos, **Cs124** também é utilizada como corante de lasers^[105]; a mudança do oxigênio do anel por um grupo NH não acarreta grandes mudanças nos espectros de absorção e emissão de **Cs124** em relação a **C120**, contudo os ϕ_{FI} de **Cs124** são inferiores aos de **C120** no mesmo solvente, *e.g.* $\phi_{FI}^{C120} = 0,63^{[104]}$ vs $\phi_{FI}^{Cs124} = 0,30^{[105]}$, determinados em acetonitrila. A mudança do substituinte amino da posição 7 para a posição 6 afeta drasticamente o rendimento quântico de fluorescência: da 6-aminocumarina, **Cbz** na ausência do substituinte aromático, é cerca de 10 x menor que o da **C120**.^[111] Dessa forma, espera-se que as betalainas derivadas desse conjunto de aminas (Esquema 8) apresentem propriedades fotofísicas distintas, que serão investigadas nas próximas sessões da tese.



Esquema 8. Betalainas cBeets e csBeet124 e suas respectivas aminas precursoras. Em destaque, **cBeet120**, betalaina cumarinica derivada da 7-amino-4-metilcumarina (**C120**), desenvolvida previamente pelo grupo^[97] e cBeet modelo para relação de estrutura atividade do conjunto de cBeets semissintetizadas. As quatro cBeets apresentam carbono quiral de configuração absoluta (S) e isômeros geométricos E/Z, formados no acoplamento aldimínico entre o **Hbt** e a amina precursora.

3.1.1. Semissíntese e caracterização estrutural

Algumas metodologias de semissíntese de betaxantinas descritas na literatura^[64,65,81] baseiam-se no acoplamento entre ácido betalâmico e aminas em meio aquoso^[65]. Como a solubilidade de aminocumarinas em meio aquoso é baixa, optou-se por otimizar a metodologia descrita por Schliemann^[64], em que a reação é feita em acetato de etila. Embora seja um solvente orgânico, acetato de etila impacta menos a saúde humana e o meio ambiente comparado a outros solventes convencionais como, por exemplo, o diclorometano, o hexano e o tolueno^[112]. Neste procedimento otimizado^[83] (*vide parte experimental, seção 5.2.2.1*), foi possível obter cerca de 6 mg de ácido betalâmico (**HBt**) em acetato de etila partindo-se de 500 mL de suco bruto de beterraba, ou 2kg de beterraba. A comparação do espectro de suco de beterra diluído em água e do ácido betalâmico em acetato de etila mostra um grande deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda mais curtos (hipsocrômico) do ácido betalâmico em relação às betalainas presentes no suco (Figura 5). Além disso, o espectro do ácido betalâmico em água mostra que o **HBt** é fracamente solvatocrômico e sugere que a diminuição da polaridade do meio leva a um aumento da concentração de carga deste composto. O espectro de ressonância do **HBt** foi obtido^[113,114], mas tem sido questionado, dada a instabilidade deste composto^[57].

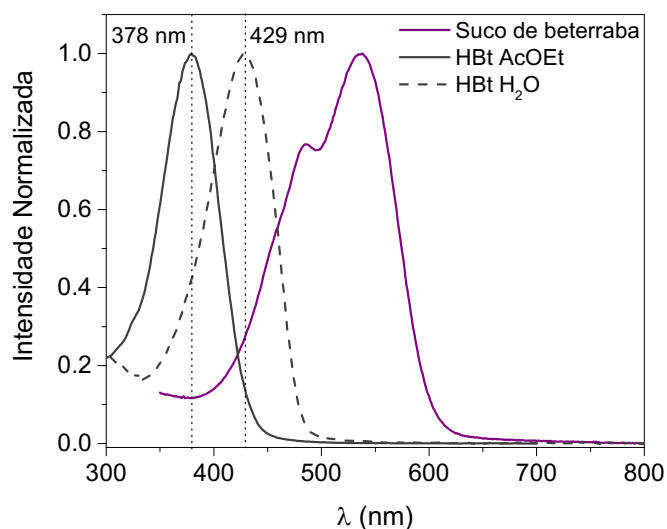


Figura 5. Comparação entre os espectros de absorção de suco de beterraba (filtrado) em meio aquoso, ácido betalâmico (**HBt**) extraído em AcOEt e **HBt** em meio água. Suco diluído 101× em água, **HBt** diluído 10× em AcOEt e em água.

HBt em acetato de etila é conveniente para a síntese de betalainas derivadas de aminas insolúveis em água. **cBeets** e **csBeets** são menos solúveis em acetato de etila do que as aminas precursoras e, portanto, precipitam deslocando o equilíbrio no sentido da formação de produto. A **cBeet120**, betalaina artificial derivada da 7-amino-4-metilcumarina, desenvolvida pelo grupo^[68,78], era semissintetizada em água^[68] com rendimento de 20% e foi obtida em acetato de etila, na presença de ácido *para*-toluenossulfônico como catalisador ácido, com rendimento de 12% após purificação. De forma análoga, foram preparadas as demais **cBeets**, com adição de ácido *p*-toluenossulfônico ao meio, para que ocorra o acoplamento admínico. **cBeet120**, **csBeet124** e **cbzBeet** precipitam quando a reação é feita em acetato de etila. **cBeet151** precipita somente quando a concentração de **HBt** é cerca de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. É possível precipitar a **cBeet151** adicionando-se heptano até atingir uma proporção AcOEt:heptano 8:2 v/v. Porém, o uso de heptano requer a evaporação completa deste solvente antes do uso da **cBeet151** em ensaios com célula visto a citotoxicidade do solvente. Logo, as betalainas foram semissintetizadas com **HBt**, excesso de amina precursora e ácido *p*-

toluenossulfônico, em acetato de etila. A lavagem do produto sólido com acetato de etila gelado elimina grande parte do excesso de amina, o que facilita a purificação dos compostos. As quatro betalainas foram purificadas por cromatografia em coluna flash a média pressão (20 psi) com Sephadex LH20 como fase estacionária e água como eluente. As soluções obtidas foram imediatamente liofilizadas e posteriormente armazenadas sob abrigo da luz a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A análise cromatográfica das amostras por HPLC-DAD-MS(ESI+) sugere que os compostos foram purificados com sucesso pela metodologia, visto que há somente um pico cromatográfico (cromatogramas nos anexos 7.1, 7.3, 7.5 e 7.7). Na caracterização por espectrometria de massas, os íons quasi-moleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ encontrados apresentam relação massa carga (m/z) esperada para os quatro compostos, sendo que a maior diferença entre a relação m/z calculada e encontrada nas análises é de $-2,96\text{ ppm}$ (Tabela 1). Antes de todos os ensaios realizados para esta Tese, a pureza das betalainas foi verificada por análise cromatográfica.

Tabela 1. Detalhes da caracterização estrutural das betalainas artificiais semissintetizadas por HPLC-MS(ESI+) de alta resolução.

	cBeet120	cBeet151	csBeet124	cbzBeet
Gradiente ^a	30–95% B em 30 min	30–95% B em 30 min	30–45% B em 15 min	55–70% B em 15 min
t_R^{cBeet} (min)	8,7	15,1	8,0	7,1
t_R^{cumarina} (min) ^b	13,5	27,7	8,8	8,0
FM	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6^+$	$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6^+$	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5^+$
$[\text{M}+\text{H}]^+$ calc.	369,1081 m/z	423,0798 m/z	368,1241 m/z	405,1081 m/z
$[\text{M}+\text{H}]^+$ enc.	369,1084 m/z	423,0798 m/z	368,1247 m/z	405,1093 m/z
Dif. (ppm)	-0,81	0	-1,63	-2,96

^aCondições da corrida: coluna Acentis C_{18} (25 cm x 4,6 mm, 5 μm , Supelco) em condições de fase reversa, Solvente A: 0,05% de HCO_2H em H_2O ; e solvente B: 0,05% de HCO_2H em 60%MeCN/ H_2O , fluxo 1 mL min^{-1} ; ^bObtido quando as amostras brutas foram analisadas, nas mesmas condições de corrida descritas.

Há grande dificuldade de aquisição de RMN de betalaínas. Há dados escassos de ^1H -RMN e um número ainda menor de espectros de ^{13}C -RMN^[115,116] disponíveis na literatura. A escolha do solvente dos ensaios de ressonância magnética é difícil, uma vez que as betalaínas são insolúveis (e.g., em CDCl_3) ou reagem com solventes orgânicos (e.g., com DMSO-d_6), são sensíveis à hidrólise e têm solubilidade limitada mesmo em água^[78]. Os espectros de ^1H -NMR (500 MHz) das *cBeets* e *csBeet* foram obtidos com soluções em D_2O (2 mg de amostra em 500 μL de solvente). A supressão do sinal de H_2O (4,7 ppm) presente em D_2O foi realizada com a sequência de pulsos *zgpr*, de forma que nenhum dos sinais presentes na faixa entre 4–5 ppm fosse perdida. A aquisição dos espectros de ^1H -RMN em D_2O com um número de varreduras relativamente alto ($ns = 512$) permitiu caracterizar as amostras parcialmente sem a ocorrência de hidrólise ou isomerização.

Os três átomos de hidrogênio mais relevantes do sistema 1,7-diazaheptametílico são os H-3, H-7 e H-8 (Figura 6). Estes átomos apresentam mudanças no δ ao compararmos as betalaínas: **cBeet151** apresenta hidrogênios mais desblindados que **cBeet120** e **csBeet124**, enquanto que **cbzBeet** possui hidrogênios mais blindados que **cBeet120** e **csBeet124**. O sistema aromático de **cbzBeet** causa um efeito de blindagem dos hidrogênios vizinhos ao anel, deslocando para região de campo mais alto comparado a **cBeet120** e **csBeet124**. Já o efeito indutivo atraente de elétrons do flúor do $-\text{CF}_3$ da **cBeet151**, leva a um aumento de 0,7 ppm do deslocamento químico dos hidrogênios do sistema 1,7-diazaeptmetílico. H-7 e H-8 aparecem como dubletos, com acoplamento vicinal de $^3J_{\text{H-7/H-8}} = 12,8$ Hz para **cBeet120/151** e **csBeet124**, contudo em **cbzBeet** o sinal não é bem resolvido, aparecendo com um multipeto, em que não foi possível determinar o 3J . Os espectros de ^1H -RMN em D_2O expandidos para as quatro

betalaínas são apresentados nos anexos 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 e 7.9. Foram realizadas diversas tentativas de aquisição dos sinais de ^{13}C por espectros de correlação $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC e $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC em D_2O , também em espectrômetro de 500 MHz, sem sucesso.

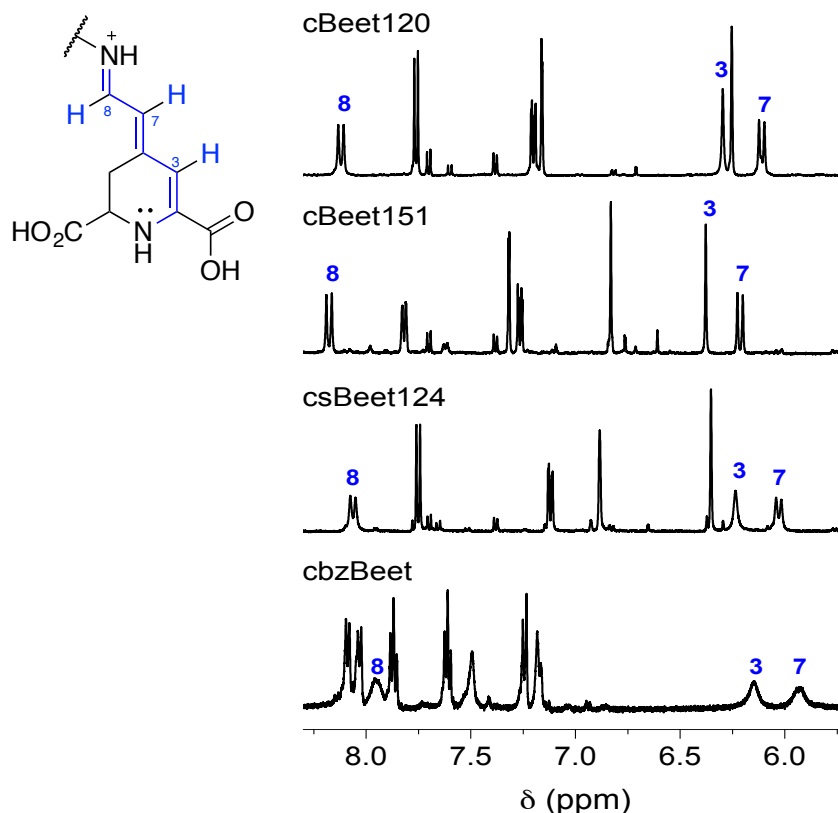


Figura 6. Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de ^1H do sistema 1,-diazepatinico de cBeets e csBeet124 em D_2O . Destaque para os δ de H-3, H-7 e H-8.

3.1.2. Absorção e fluorescência em meio aquoso

A caracterização do perfil de absorção das betalaínas artificiais em água deve permitir a medida de dois parâmetros principais: o comprimento de onda com máximo de absorção (λ^{abs}) e o correspondente coeficiente de atenuação molar (ϵ). Na forma sólida, as betalaínas são sais higroscópicos, o que torna difícil a sua pesagem. Além disso, por conta da metodologia de síntese, a identidade dos contra-íons (cátions, possivelmente uma mistura de NH_4^+ e Na^+) é desconhecida, não sendo possível determinar a massa molar da betalaína de forma precisa. Estes fatores impedem que o

coeficiente de atenuação molar das betalaínas possa ser medido empregando-se soluções preparadas com o material sólido. Dessa forma, o ϵ das betalaínas é determinado utilizando o método do ponto final (*endpoint*)^[69], baseado na cinética de hidrólise alcalina (pH 8,5) de betalaínas produzindo o ácido betalâmico. Neste método, a cinética de consumo da betalaína é comparada com o aparecimento de **HBt**, reação que ocorre com estequiometria 1:1, cujo valor de ϵ é 26.270 L mol⁻¹ cm⁻¹ em 424 nm^[97]. Detalhes do procedimento são descritos na parte experimental (item 5.2.4.2).

A hidrólise alcalina dos pigmentos foi acompanhada por 4 a 6 h, com a aquisição dos espectros de absorção a cada 5 min, de forma que toda betalaína fosse hidrolisada a **HBt** e amina precursora. O ϵ de betalaínas varia com o pH. Assim, como desejamos a obtenção do coeficiente de atenuação molar da betalaína em pH 7, espectros são adquiridos com a mesma concentração de betalaína em pH 7 e 8,5 e o valor determinado é corrigido (Figura 7 e Tabela 2). Para os quatro compostos, observa-se um ponto isobéstico próximo a 450 nm que associa a diminuição da banda de absorção da betalaína com a formação de ácido betalâmico. Além disso, as constantes cinéticas observadas para o desaparecimento da betalaína e para a formação de **HBt** são similares em todos os casos, o que reforça a conclusão que estes processos estão relacionados (Figura 7). A Figura 8 compara os espectros de absorção das betalaínas em água, em função do coeficiente de atenuação molar em pH 7. Nota-se que apenas o espectro de absorção de **cbzBeet** apresenta um sutil deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda mais curtos em relação às demais betalaínas semissintetizadas, *i.e.* máximo de absorção em 512 nm para **cbzBeet** vs. Ca. 520 nm para as demais. Há ainda a presença de banda de absorção entre 300–350 nm nos espectros dos quatro compostos, que pode tanto corresponder à transição S₂→S₀, ou à

presença de resíduos de amina precursora no meio ou ambos, uma vez que em meio aquoso, há uma reação de equilíbrio entre a betalaína, e a respectiva correspondente amina e o **HBt**.

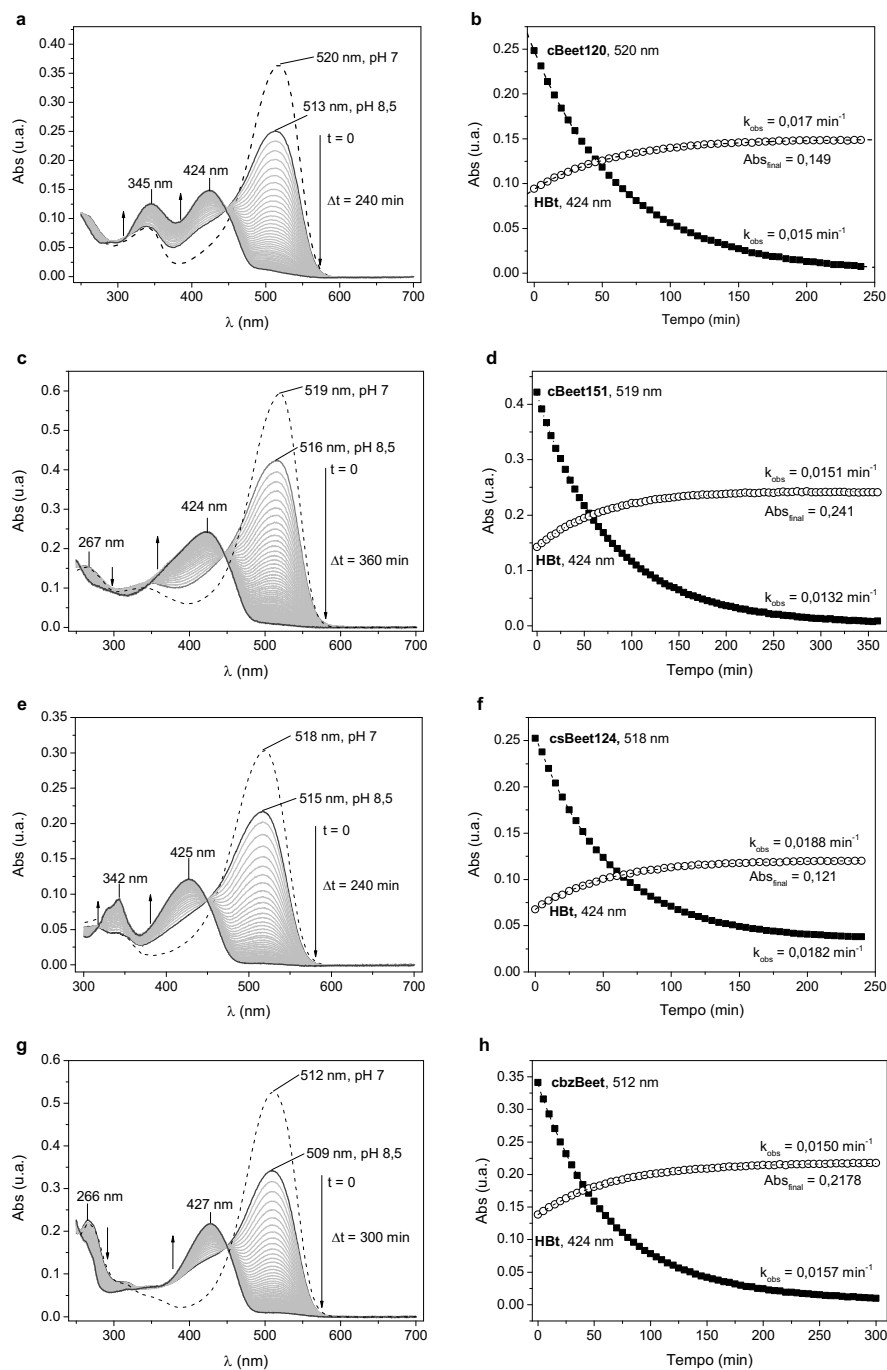


Figura 7. Mudança do perfil de absorção de cBeets e csBeet124 (a, c, e, g) e perfil cinético usados para a determinação do valor de ϵ (b, d, f, h). Condições: 25 °C, TpBR, 40 mmol L⁻¹, pH 8,5).

Tabela 2. Valores de coeficiente de atenuação molar calculados a partir da análise dos dados da Figura 7.

	λ^{abs}	Abs _{inicial} ^a	Abs _{final} ^b	$\epsilon^{calc,a}$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
cBeet120	520	0,36289	0,14846	64.214 ^c	65.000
cBeet151	519	0,5923	0,24136	64.467	65.000
csBeet124	518	0,30339	0,11988	66.483	66.000
cbzBeet	512	0,52593	0,21775	63.450	64.000

^a em pH = 7, no λ^{abs} , ^b em pH = 8,5, em $\lambda^{abs} = 424$ nm; ^c valor determinado anteriormente em pH = 6: $\epsilon^{520nm} = 66.000$ L mol⁻¹ cm⁻¹ [68,78]

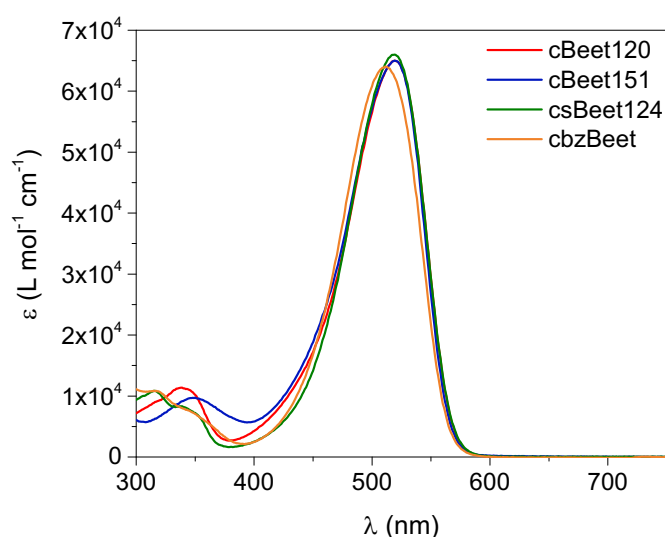


Figura 8. Espectros de absorção de cBeets e **csBeet124**, em função do coeficiente de atenuação molar (ϵ). [betalaína] = 1×10^{-5} mol L⁻¹. Tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹, pH 7.

Com a caracterização das propriedades de absorção concluída, foram adquiridos espectros de fluorescência e excitação das betalaínas em meio aquoso à temperatura ambiente (Figura 9). O perfil de emissão dos quatro compostos é semelhante e os espectros de absorção e excitação se sobrepõem, sugerindo que a espécie emissora é a mesma que foi excitada. O aumento da intensidade relativa da banda na região entre 300–350 nm dos espectros de excitação de **cBeet120**, **cBeet151** e **csBeet124** sugere novamente a presença de amina residual em meio aquoso; o mesmo não ocorre com a **cbzBeet** pois, a **Cbz** é bem menos fluorescente que as demais aminas, dessa forma,

mesmo que esteja presente no meio, não é observada no espectro de excitação. Os valores de E_s determinados para as betalainas a partir dos espectros de absorção e fluorescência normalizados (Figura 9) variam muito pouco: 220 kJ mol^{-1} para **cBeet120** e **cbzBeet**, 219 kJ mol^{-1} para **cBeet151** e 218 kJ mol^{-1} para **csBeet124**; logo, a energia da transição $S_0 \rightarrow S_1$ para as quatro betalainas é semelhante.

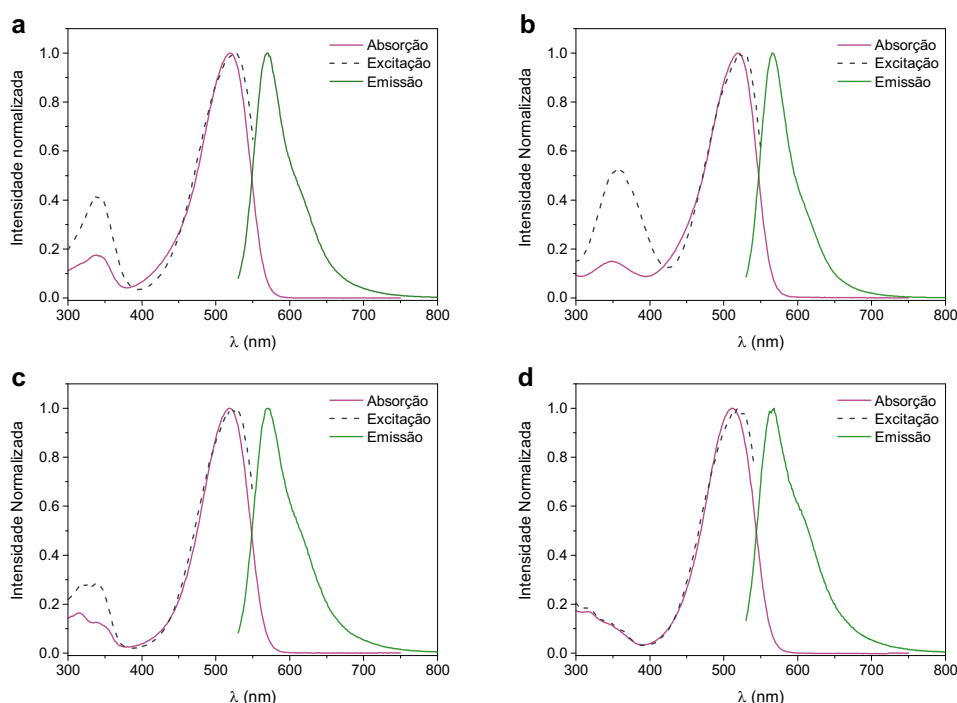


Figura 9. Espectros de absorção, excitação e fluorescência normalizados de cBeets e **csBeet124** em meio aquoso a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A) **cBeet120**, b) **cBeet151**, c) **csBeet124** e d) **cbzBeet**. $[\text{betalaina}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{EX}} = 510 \text{ nm}$, nos espectros de emissão e $\lambda_{\text{EM}} = 570 \text{ nm}$, nos espectros de excitação.

Espectros de absorção e emissão de soluções aquosas de betalainas e das aminas precursoras foram comparados (Figura 10). Em todos os casos, observa-se que os espectros de absorção e fluorescência das betalainas são deslocados para comprimentos de onda mais longos quando comparado àqueles das aminas precursoras. Este resultado permite inferir que nas cBeets e **csBeet124** ocorre uma diminuição da energia de transição em relação às aminas precursoras que resulta da extensão da conjugação no sistema 1,7-diazaheptametílico.

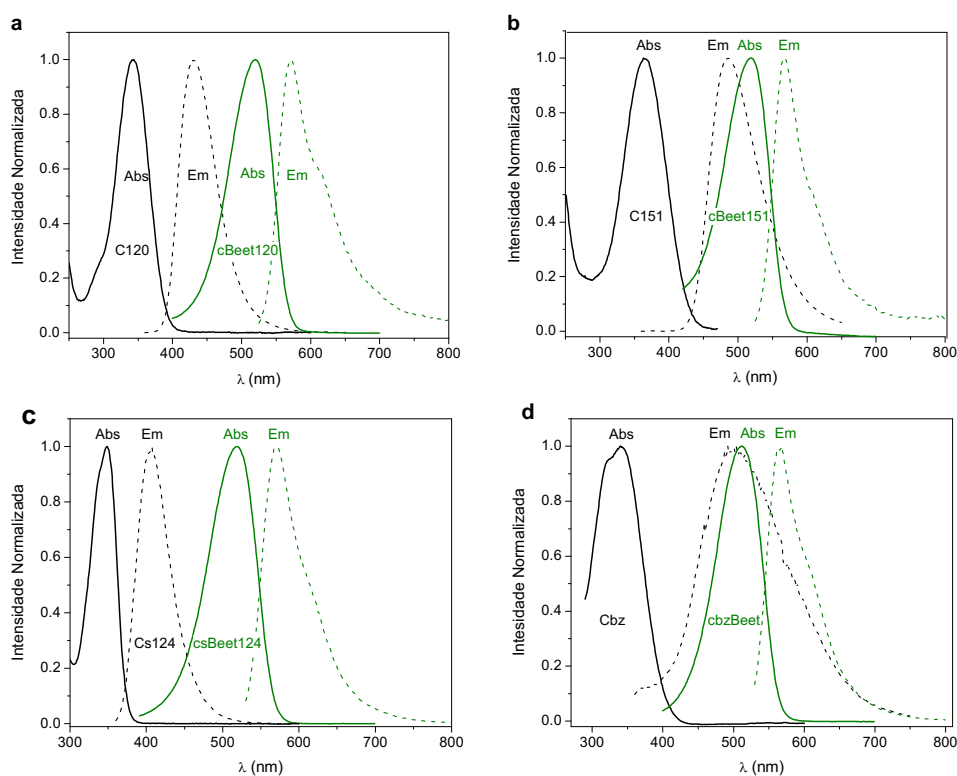


Figura 10. Comparação entre os espectros de absorção e emissão das betalainas em meio aquoso, e das respectivas aminas precursoras em metanol.

Tanto os valores de λ^{abs} quanto de deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) são similares para as quatro betalainas estudadas (Tabela 3). Entretanto, este comportamento não é observado para as cumarinas precursoras, para as quais os máximos de fluorescência e $\Delta\nu$ variam bastante com a mudança da estrutura do composto.

Os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{FI}) das *cBeets* e da **csBeet124** foram medidos utilizando-se uma solução de rodamina 6G em metanol ($\phi_{\text{FI}} = 0,94$; $\lambda_{\text{EX}} = 500$, $\lambda_{\text{EM}} = 520\text{--}800$ nm)^[3] como padrão secundário. A rodamina 6G tem perfis de absorção e fluorescência similares às amostras, o que evita a necessidade do uso de espectros corrigidos para a sensibilidade da fotomultiplicadora^[8].

Tabela 3. Máximos de fluorescência e deslocamento de Stokes das betalaínas e das suas respectivas aminas precursoras.

	λ^{Fl}	$\lambda^{Fl}-\lambda^{Abs}$ (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)
cBeet120	570	50	1687
C120	430	86	5814
cBeet151	570	51	1724
C151	485	122	6930
csBeet124	570	52	1761
CS124	406	58	4105
cbzBeet	564	52	1800
CBZ	495	155	9209

Foram adquiridos espectros de absorção e emissão em pelo menos cinco diferentes concentrações de betalaína e do padrão nas mesmas condições experimentais. Os coeficientes angulares calculados a partir da correlação linear entre a área de sob a curva de fluorescência e a absorção em cada uma das concentrações do padrão e das amostras (Figura 11) foram usados para calcular os valores de ϕ_{Fl} . (*vide parte experimental, seção 5.2.4.3*)^[8]. Os rendimentos quânticos determinados para as betalaínas em meio aquoso são: $\phi_{Fl}^{cBeet120} = 6,3 \times 10^{-3}$; $\phi_{Fl}^{cBeet151} = 2,1 \times 10^{-2}$; $\phi_{Fl}^{csBeet124} = 3,2 \times 10^{-3}$ e $\phi_{Fl}^{cbzBeet} = 3,4 \times 10^{-3}$ (Tabela 6). Os valores obtidos para as betalaínas são bem menores que os determinados em metanol para as cumarinas: $\phi_{Fl}^{C120} = 0,51$ ^[104]; $\phi_{Fl}^{C151} = 0,37$ ^[103]; $\phi_{Fl}^{Cs124} = 0,68$ ^[105], mas comparáveis ao determinado para betaxantinas naturais em meio aquoso, que chega a $\phi_{Fl} = 7,0 \times 10^{-3}$ para vulgaxantina I^[100]; : $\phi_{Fl}^{cBeet120}$ calculado é um pouco maior do que foi previamente determinado para **cBeet120** ($\phi_{Fl} = 4,3 \times 10^{-3}$ em água vs fluoresceína)^[68].

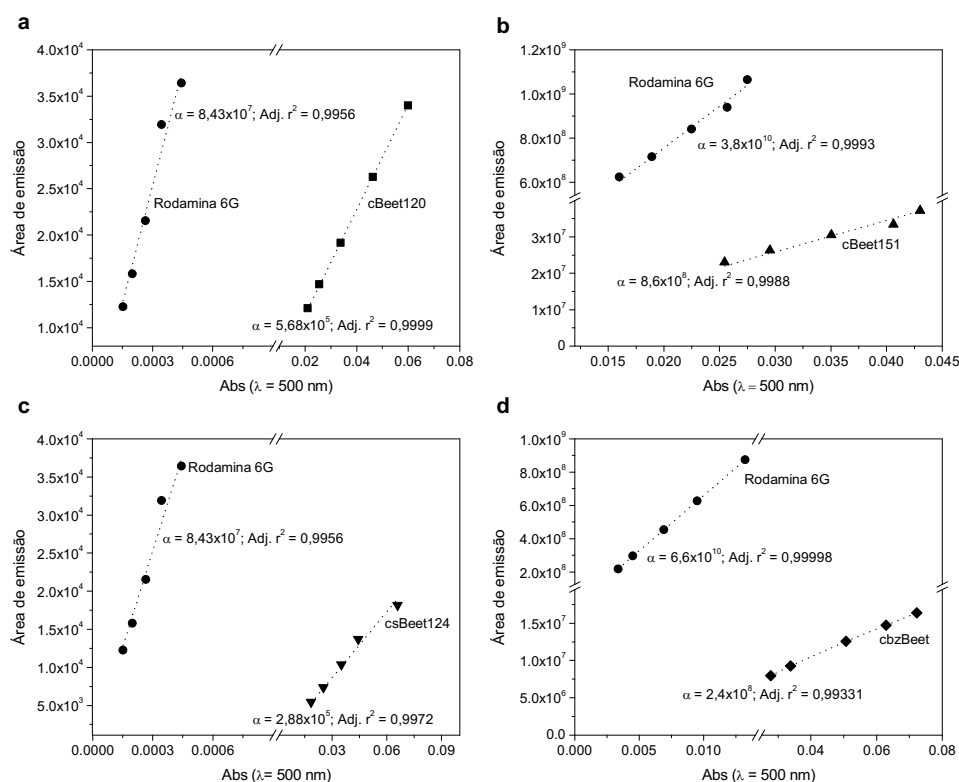


Figura 11. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl}) em água de cBeets e **csBeet124**. A) **cBeet120**; b) **cBeet151**, c) **csBeet124** e d) **cbzBeet**; em relação ao padrão, rodamina 6G em metanol.

De forma a melhor comparar as propriedades de emissão betalaínas cumarínicas com as betaxantinas naturais e também com suas respectivas aminas, determinamos o *Brilho* dos compostos com dados obtidos da literatura (Tabela 4). O *brilho* (do inglês, *brightness*) corresponde ao produto do rendimento quântico de fluorescência e do coeficiente de atenuação molar ($\phi_{Fl} \times \epsilon$) do composto. Esta figura de mérito permite comparar diferentes fluoróforos, visto que representa numericamente tanto a quantidade de luz absorvida pelo fluoróforo, quanto sua eficiência no processo de emissão^[13,117].

Ao compararmos as cBeets e a **csBeet 124** com as betaxantinas naturais, notamos que os **cBeet120** e **cBeet151** apresentam maior eficiência nos processos de absorção e emissão (maior brilho) que as betaxantinas. Em relação às aminas precursoras, as cBeets e a **csBeet124** apresentam menor *brilho*, uma vez que, apesar do coeficiente de

atenuação molar das aminas ser menor que o das betalainas, estas são muito mais fluorescentes que as betalainas. Além do deslocamento para comprimentos de onda de menor energia, a principal vantagem das betalainas semissintetizadas em relação às aminas é sua solubilidade em água, o que as torna mais atraentes em aplicações biológicas, por exemplo.

Tabela 4. Comparação entre as propriedades de absorção e emissão de betalainas cumarínicas, suas respectivas aminas e betalainas naturais.

	λ^{abs} (nm)	λ^{em} (nm)	ϕ_{FI}	Brilho ($\phi_{FI} \times \epsilon$) $\times 10^{-3}$
cBeet120	520	570	0,0063	0,41
cBeet151	519	570	0,0214	1,4
csBeet124	518	570	0,0032	0,21
cbzBeet	512	564	0,0034	0,22
Indicaxantina ^{a [68]}	485	518	0,0043	0,22
Vulgaxantina I ^{a [100]}	475	513	0,0073	0,35
Miraxantina I ^{a [101]}	474	511	0,0030	0,14
C120 ^{b [104]}	354	434	0,51	8,7
C151 ^{b [103]}	378	478	0,37	6,3
Cs124 ^{b [105]}	345	408	0,68	11,6
Cy3 ^{c [13]}	554	568	0,14	18,2
TMR ^{d [118]}	540	565	0,68	64,6
Resorufina ^{e [119]}	572	585	0,74	41,4

^a em água, $\epsilon = 4,8 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [120]; ^b em metanol, $\epsilon = 1,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; ^c em água, $\epsilon = 1,3 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; ^d em metanol, $\epsilon = 9,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; ^e em água (pH 9,5) $\epsilon = 5,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ao compararmos o *brilho* das betalainas artificiais a fluoróforos sintéticos derivados de cianinas (**Cy3**)^[13], rodamina (tetrametilrodamina, **TMR**)^[118] e de oxazinas (**resorufina**)^[119], que possuem emissão na mesma região que a **cBeet120** e **cBeet151**, os derivados betalainicos possuem menor *brilho* que os fluoróforos utilizados como sonda. Contudo, betalainas são pouco citotóxicas e tem baixo rendimento de cruzamento entre

sistemas e, conseqüentemente, baixa eficiência de geração de oxigênio singlete. Na verdade, betanina já foi relacionada ao sequestro de $^1\text{O}_2$ ^[121,122], levando à formação de produtos de oxidação da betalaína^[122].

A caracterização fotofísica das betalaínas cumarínicas em meio aquoso prosseguiu com a determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_{Fl}). Os ensaios foram realizados em dois conjuntos ópticos distintos, descrito na *parte experimental* (seção 5.2.4.4). A aquisição de dados com a streak câmera é vantajoso em relação em relação ao uso de fotomultiplicadora pelo método de TCSPC (*time-correlated single-photon counting*, ou simplesmente contagem de fótons) pois permite o acesso ao decaimento do tempo de vida em todo o intervalo de comprimento de onda e a aquisição mais rápida dos dados de emissão. Os valores de τ_{Fl} em água obtidos nos dois equipamentos são semelhantes, ao selecionarmos o λ^{em} no máximo correspondente a cada betalaína; de forma que cada decaimento foi realizado ao menos uma vez em cada sistema. Os decaimentos e ajustes em água são descritos na Figura 12, na Tabela 5 e no anexo 7.10, também com os decaimentos registrados pelo método TCSPC.

Também foram adquiridos os decaimentos de emissão em solução tampão em pH igual a 3, 5 e 7 para as betalaínas (anexos 7.11–7.14). Os decaimentos da emissão das betalaínas artificiais em meio aquoso podem ser ajustados com funções mono-exponenciais e são da faixa de *ps* (Tabela 5). Apesar das mudanças no estado de protonação das betalaínas na faixa de pH estudada ($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{COOH}} = 3\text{--}4$ e $\text{p}K_{\text{aH}}^{\text{NH}} = 5$, para **cBeet120**)^[68], os τ_{Fl} mudam muito pouco com o pH, a mudança nunca é superior a $\pm 15\%$ do valor determinado em água nos pHs estudados. De forma geral, em pH 3, o τ_{Fl} é pouco menor que nos demais pHs, mas a mudança no estado de protonação da betalaína não afeta no tempo de vida de emissão.

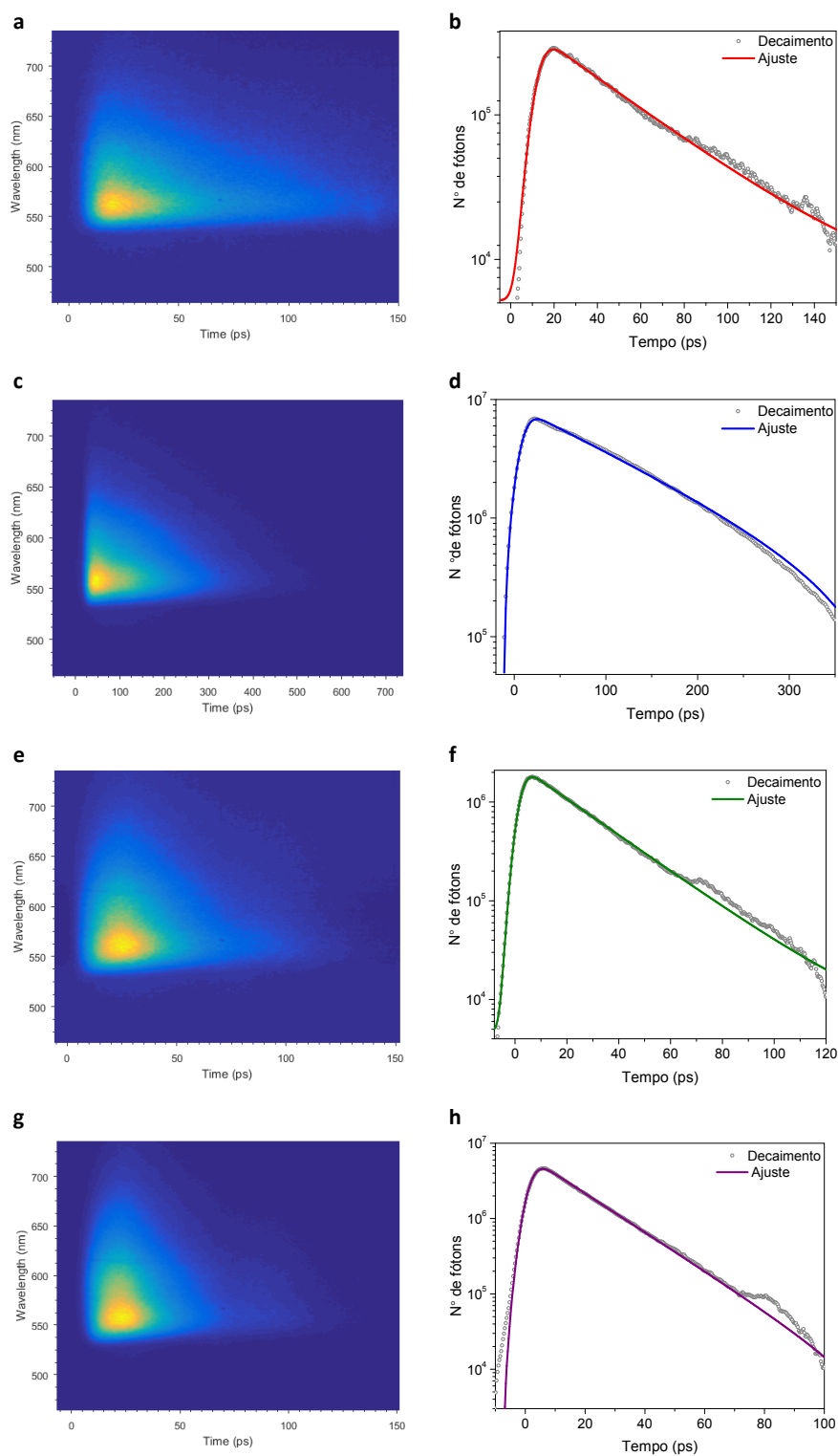
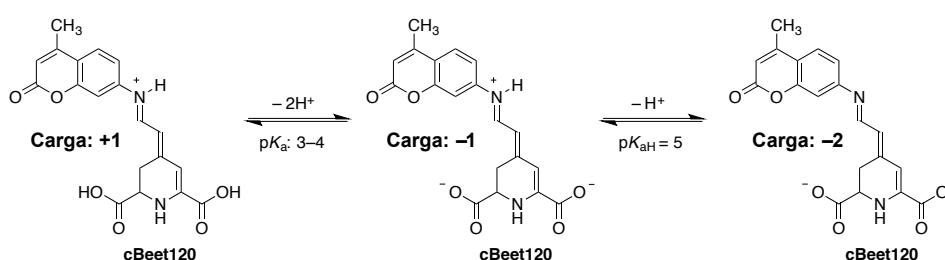


Figura 12. Decaimentos dos tempos de vida de emissão de fluorescência (τ_{Fl}) de cBeets e csBeet124 em água. Imagem obtida na streak câmera e decaimento, com ajuste monoexponencial (IRF), respectivamente: a) e b) cBeet120 (6 ps) $\lambda^{em} = 570$ nm, c) e d) cBeet151 (23 ps) $\lambda^{em} = 570$ nm, e) e f) csBeet124 (6 ps) $\lambda^{em} = 570$ nm e g) e h) cbzBeet (6 ps) $\lambda^{em} = 564$ nm.

Tabela 5. Tempo de vida de fluorescência (τ_{FI}) de cBeets e csBeet124 em meio aquoso e resposta do instrumento (IRF), em *ps*.

Composto	$\tau_{FI}^{\text{água}}$ (IRF)	$\tau_{FI}^{\text{pH } 3}$ (IRF)	$\tau_{FI}^{\text{pH } 5}$ (IRF)	$\tau_{FI}^{\text{pH } 7}$ (IRF)
cBeet120	38 (6,2)	39 (21,8)	41 (22,5)	43 (22,7)
cBeet151	110 (22,7)	100 (22,1)	110 (23,3)	110 (22,7)
csBeet124	24 (6,4)	21 (7,6)	24 (8,8)	24 (6,0)
cbzBeet	17 (6,5)	16 (8,2)	17 (6,6)	17 (6,4)



Esquema 9. Equilíbrio ácido-base em função do pH da **cBeet120**^[97].

Da mesma forma que os valores obtidos para o rendimento quântico, as constantes do decaimento do tempo de vida de fluorescência determinadas para as betalaínas artificiais corroboram com estudos recentes realizados com as betaxantinas naturais, em que o ϕ_{FI} reportados são da ordem de 10^{-3} e os decaimentos na faixa de dezenas de *ps*, em meio aquoso^[84,100,101]. Como já apontado na Tabela 4, as betalaínas artificiais apresentam vantagens como fluoróforos em relação às betaxantinas naturais; **cBeet151** além de possuir o maior ϕ_{FI} descrito para uma betalaína, também possui τ_{FI} bastante superior a qualquer uma das betalaínas cuja emissão foi caracterizada. Os decaimentos das betalaínas naturais descritos na literatura^[84,99-101], determinados por absorção transiente em água, são descritos por funções biexponenciais, com τ_1 inferior a 5 *ps*, e τ_2 variando entre 20 e 37 *ps* para betaxantinas^[84,100,101] foram atribuídos à emissão de dois isômeros, possivelmente *E/Z*, presentes em solução. Como na metodologia empregada na determinação do τ_{FI} das cBeets e **csBeet124** a resposta do

laser (IRF) é de ao menos 6 ps, não é possível afirmar inequivocamente se há ou não um processo mais rápido ocorrendo. Com a determinação dos valores de ϕ_{Fl} e τ_{Fl} das quatro betalaínas, foi possível calcular as constantes cinéticas (radiativa e não radiativa) para a desativação do estado eletronicamente excitado singlete das cBeets e da **csBeet124** em meio aquoso (Tabela 6).

Tabela 6. Correlação entre ϕ_{Fl} , τ_{Fl} e as constantes radiativa (k_r) e não radiativa (k_{nr}) das betalaínas

	ϕ_{Fl} (%)	τ_{Fl} (ps)	k_r (s^{-1})	k_{nr} (s^{-1})
cBeet120	$0,63 \pm 0,01$	38	$1,7 \times 10^8$	$2,6 \times 10^{10}$
cBeet151	$2,14 \pm 0,01$	110	$1,9 \times 10^8$	$0,9 \times 10^{10}$
csBeet124	$0,32 \pm 0,01$	24	$1,3 \times 10^8$	$4,2 \times 10^{10}$
cbzBeet	$0,34 \pm 0,02$	17	$2,0 \times 10^8$	$5,9 \times 10^{10}$

O ϕ_{Fl} das cBeets e **csBeet124** em meio aquoso também varia cerca de uma ordem de grandeza com o substituinte. A mudança de substituinte de CH_3 para CF_3 entre a **cBeet120** e a **cBeet151** aumenta o rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência em cerca de $3\times$. Já a mudança do substituinte CH_3 para um anel aromático não resultou em aumento da conjugação e diminuiu pela metade o rendimento quântico de fluorescência da **cbzBeet**, e conseqüentemente o tempo de vida de emissão, em relação a **cbzBeet**. Contudo, tal mudança pode ser atribuída a mudança da posição do grupo amino na cumarina, uma vez que 6-aminocumarinas são menos fluorescentes que 7-aminocumarinas^[111]. A modificação do anel cumarínico, da **cBeet120**, para quinolona, na **csBeet124** também ocasionou da diminuição pela metade no rendimento quântico e do tempo de vida de fluorescência; comportamento distinto do observado para as amins em solventes polares.^[105]

As k_{nr} das cBeets e da **csBeet124** são cerca de duas ordens de grandeza maiores

que as respectivas k_r ; *i.e.* a energia proveniente do processo de excitação é principalmente perdida em processos não emissivos. Na literatura^[101] apenas as k_r e k_{nr} de miraxantina I em meio aquoso são reportadas; $k_r = 2,0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ é semelhante aos valores encontrados para as betalaínas artificiais, contudo, a $k_{nr} = 6,6 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ é ainda maior que do que a determinada para os quatro derivados artificiais.

Como descrito por Kirby para o L-triptofano,^[9] quando a constante radiativa (k_r) não varia na faixa de temperatura estudada e o processo de desativação não radiativa é relevante, podemos determinar a barreira energética para a desativação não radiativa de cBeets, representada pela E_a^{nr} , por meio da construção de um gráfico de Arrhenius (Eq. 21, Figura 13).

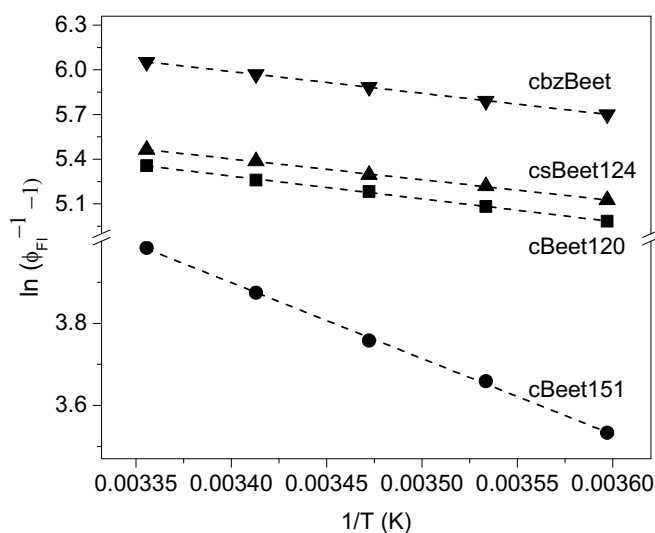


Figura 13. Gráfico de Arrhenius da energia de ativação para a desativação não radiativa (E_a^{nr}) das betalaínas artificiais em água. **cBeet120**: $\ln(\phi_{FI}^{-1} - 1) = 10,49 - 1530,5T^{-1}$, $\text{Adj-R}^2 = 0,9987$; **cBeet151**: $\ln(\phi_{FI}^{-1} - 1) = 10,19 - 1850,9T^{-1}$, $\text{Adj-R}^2 = 0,9988$; **csBeet124**: $\ln(\phi_{FI}^{-1} - 1) = 10,15 - 1397,7T^{-1}$, $\text{Adj-R}^2 = 0,9990$; **cbzBeet**: $\ln(\phi_{FI}^{-1} - 1) = 10,96 - 1461,4T^{-1}$, $\text{Adj-R}^2 = 0,9983$.

Além do ϕ_{FI} , o τ_{FI} também foi determinado na mesma faixa e intervalo de temperatura (5 – 25 °C, anexos 7.15 e 7.16), a fim de verificar que somente k_{nr} varia na faixa estudada, enquanto k_r permanece constante, premissa que foi confirmada (Tabela 7). Os valores de E_a^{nr} das cBeets em meio aquoso são: 12,7 kJ mol⁻¹ (**cBeet120**), 15,4

kJ mol^{-1} (**cBeet151**), $11,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (**csBeet124**) e $12,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ (**cbzBeet**). De forma geral, os valores de E_a^{nr} aumentam com o aumento do ϕ_{F1} das betalainas cumarínicas, mas ainda são muito inferiores ao determinado para os indóis em meio aquoso, $E_a^{nr} = 27,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ para o triptofano e $E_a^{nr} = 52,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ para o indol^[9]. A partir dos dados reportados de variação de tempo de vida de fluorescência e k_r de miraxantina I em metanol^[101], determinamos que a barreira do processo não radiativo é ainda menor para a betaxantina que para as betalainas artificiais em água ($E_a^{nr} = 9,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ miraxantina I, em metanol, anexo 7.17). A E_a^{nr} determinada para as cBeets e csBeet124, contudo, é tão pequena quanto a barreira rotacional do etano, que é de cerca de 12 kJ mol^{-1} .^[70] Valores tão baixos de E_a para o processo não radiativo reforçam a hipótese que a principal via de desativação das betalainas artificiais estudadas corresponde à conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$, de forma que o aumento da rigidez do meio ou da betalaína acarretaria num aumento da intensidade de emissão.

Tabela 7. Dependência dos valores das constantes radiativa (k_r) e não radiativa (k_{nr}) de cBeets e csBeet124 com a temperatura.

Temperatura (°C)	cBeet120 ($\times 10^8 \text{ s}^{-1}$)		cBeet151 ($\times 10^8 \text{ s}^{-1}$)		csBeet124 ($\times 10^8 \text{ s}^{-1}$)		cbzBeet ($\times 10^8 \text{ s}^{-1}$)	
	k_r	k_{nr}	k_r	k_{nr}	k_r	k_{nr}	k_r	k_{nr}
5	1,2	175	1,5	52	1,7	284	1,3	393
10	1,2	192	1,5	57	1,7	308	1,3	431
15	1,2	210	1,5	65	1,7	341	1,3	477
20	1,2	228	1,5	71	1,7	369	1,3	511
25	1,2	251	1,4	77	1,7	400	1,3	563

3.1.3. Estabilidade hidrolítica, lipofilicidade e potencial de oxidação

A racionalização da relação entre a estrutura das betalaínas e suas propriedades fotofísicas bem como a aplicação destes compostos depende, entre outros fatores, do conhecimento de algumas das suas propriedades físico-químicas. No contexto deste estudo, as propriedades mais relevantes são: a estabilidade das betalaínas frente à hidrólise, o seu coeficiente de partição e os potenciais de oxidação.

As betalaínas sintetizadas no trabalho são sais de imínio sendo, portanto, suscetíveis à hidrólise. Portanto, para a aplicação destes compostos em ensaios em meio aquoso é necessário avaliar sua estabilidade. As hidrólises de **cBeets** e da **csBeet124** em meio aquoso foram monitoradas por espectroscopia de absorção na região UV-Vis por 12 h a 25 °C (Figura 14). A constante cinética observada (k_{obs}) e o tempo de meia-vida ($\tau_{1/2}$) para a hidrólise foram determinados a partir da variação da absorção em função do tempo (Figura 14).

O $\tau_{1/2}$ determinado para **cBeet120**, **cBeet151** e **csBeet124** é similar, entre 2 h e 2,5 h, já o encontrado para **cbzBeet** é cerca de duas vezes maior que o da **cBeet120** (Tabela 8). Contudo, ao compararmos o $\tau_{1/2}$ das betalaínas artificiais estudadas com betanina e indicaxantina, que apresentam $\tau_{1/2}$ de 130 h e 996 h, respectivamente, em meio aquoso, a 25 °C^[78], notamos que as betalaínas artificiais são mais suscetíveis a hidrólise que as betalaínas naturais. Betalaínas naturais são relativamente estáveis entre pHs 3 e 7, mas degradam rapidamente em pH inferior a 2, ou superior a pH 9^[53]. Os valores de k_{obs} determinados em tampão pH = 8,5 para o cálculo do coeficiente de atenuação molar (Figura 7) chegam a ser quase 5× maiores do que os determinados em água pura (Tabela 9).

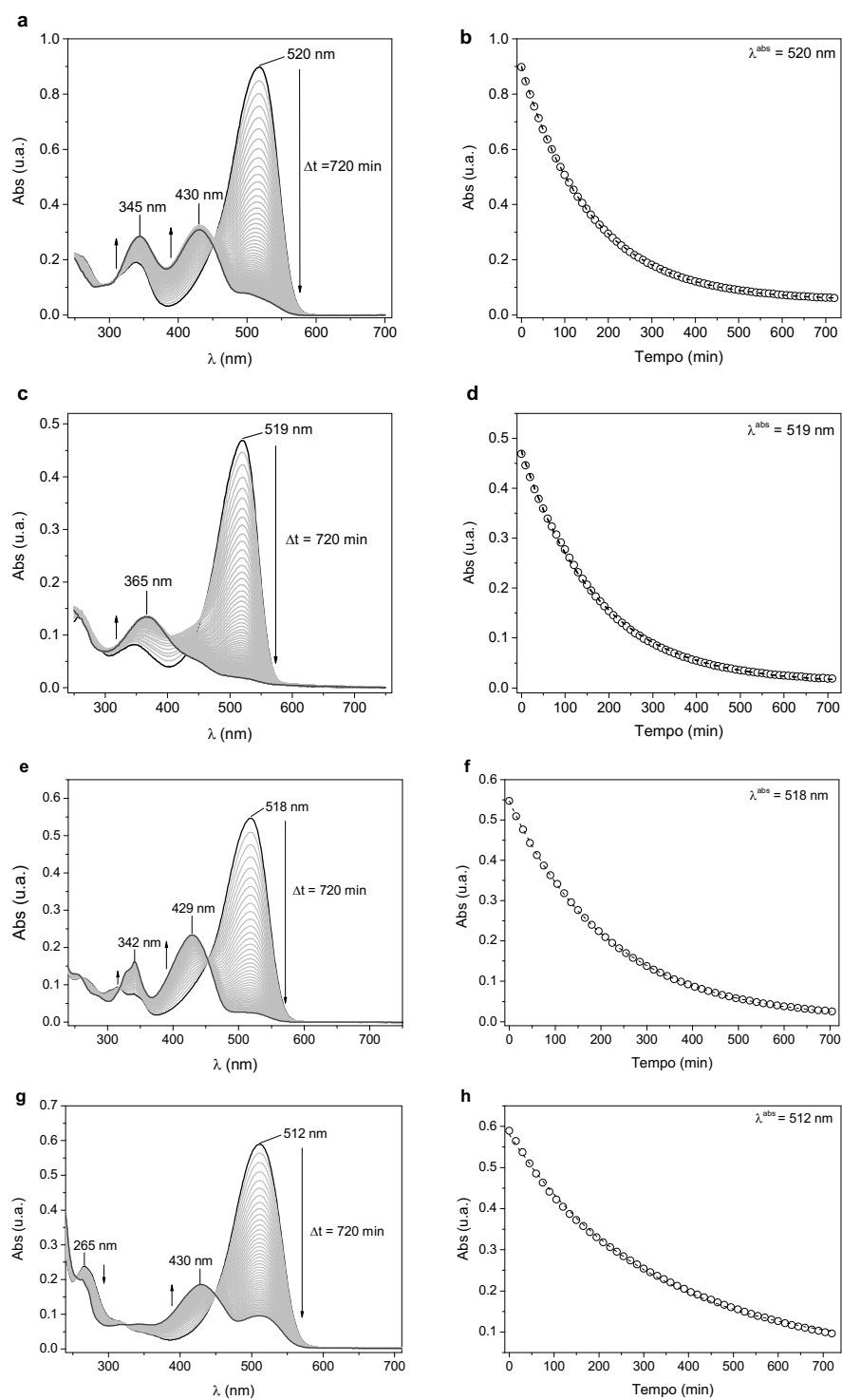


Figura 14. Cinéticas de decomposição das cBeets e da csBeet124 em água, a 25 °C : (a) e (b) cBeet120; (c) e (d) cBeet151; (e) e (f) csBeet124; (g) e (h) cbzBeet.

Tabela 8. Comparação das constantes observadas (k_{obs}) para a hidrólise das betalainas a 25 °C, em água, e seus respectivos $\tau_{1/2}$

	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$	$\tau_{1/2} (\text{min})$
cBeet120	$1,0 \times 10^{-4}$	110
cBeet151	$9,7 \times 10^{-5}$	119
csBeet124	$7,7 \times 10^{-5}$	149
cbzBeet	$5,4 \times 10^{-5}$	216

Tabela 9. Comparação das constantes observadas (k_{obs}) para a hidrólise de cBeets e csBeet124 em água e em meio tamponado, pH 8,5.

	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1}), \text{H}_2\text{O}$	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1}), \text{TpBR pH } 8,5$
cBeet120	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$
cBeet151	$9,7 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-4}$
csBeet124	$7,7 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-4}$
cbzBeet	$5,4 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-4}$

Apenas coeficientes de partição teóricos são reportados para betalainas^[68,123]. Foram realizadas diversas tentativas de determinar experimentalmente o coeficiente de partição octanol/água (o/w) de betalainas em função do pH (log D), utilizando o método de equilíbrio e agitação da betalaina no sistema bifásico, seguido de aquisição de espectros de absorção da fase orgânica e aquosa. A betalaina utilizada nos testes para desenvolvimento de metodologia foi a betanina, adquirida em grandes quantidades a partir do suco de beterraba e com maior estabilidade frente à hidrólise^[78] que cBeets.

O tempo necessário para a partição entre as fases orgânica e aquosa ocasionava a degradação da betanina. O valor de log D₀ em pH 5 é -2,8, o que corresponde a uma diferença de absorção de 0,007 entre as duas fases medidas e, portanto, instrinicamente impreciso dadas as flutuações na linha base. O log D teórico da betanina em pH 6 é -15,63,^[123] valor fora da faixa dinâmica da técnica (log P = -2 a 4). Mesmo a

indicaxantina, uma betalaína natural que cruza a barreira hematoencefálica^[124] e que é considerada menos polar que betanina apresenta log D calculado igual a $-7,25$ em pH 6^[123], indicando que a limitação da técnica não permite que os valores sejam determinados inequivocamente.

Ensaio de diálise evidenciaram que tanto betanina^[125], quanto indicaxantina^[126] são capazes de interagir com membranas biológicas^[125] e também com vesículas unilamelares constituídas de lipídeos saturados (DPPC) ou insaturados (fosfatidilcolina de soja)^[126]. Ainda, estudos acompanhando espectrofotometricamente a cinética de betanina e indicaxantina, numa faixa de temperatura entre $25-48$ °C^[95,96], na presença de diferentes concentrações dos lipídeos saturados DPPC e DMPC (que apresenta cadeia hidrofóbica com 14 carbonos, enquanto DPPC possui cadeia mais longa, com 16 carbonos) mostraram que betanina particiona na cadeia hidrofóbica de DPPC^[96] e que indicaxantina localiza-se entre a região hidrofóbica e a cabeça polar do DPPC^[95]; contudo, nenhuma das duas betalainas particionaram na bicamada constituída por DMPC, indicando que o comprimento da cadeia hidrofóbica, ao menos de fosfolipídeos saturados, parece ser crucial na partição das betalainas^[95,96]. Contudo, os autores não realizaram a comparação quantitativa, pela determinação do coeficiente de partição em membrana de DPPC, de betanina e indicaxantina.

Dessa forma, tentamos determinar o coeficiente de partição das betalainas entre membrana lipídica de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina) e água^[127], que permitiria uma relação quantitativa da interação das betalainas artificiais com a membrana. O fosfolipídeo escolhido para os ensaios, POPC, tem caráter zwitteriônico, e apresenta uma instauração na sua cadeia hidrofóbica; é considerado um dos lipídeos modelo em estudos de sistemas modelo de membrana, uma vez que

fosfatidilcolinas são glicerofosfolipídeos responsáveis por mais de 50% da constituição lipídica da membrana plasmática de células eucariontes^[128]. A partição de cBeets e da **csBeet124** na suspensão de lipossomas de POPC ($\log D_{m/w}$) foi acompanhada por espectroscopia de absorção, em ensaios de triplicata. Espectros de absorção do sobrenadante foram adquiridos após centrifugação de três alíquotas diferentes da suspensão de lipossomas de POPC contendo cBeets e csBeet124 em solução; a partição foi determinada em relação a absorção do controle (sem interação com a suspensão), em soluções tamponadas em pH 3, 5 e 7 (anexos 7.18 – 7.20). A mudança do pH do meio nessa faixa acarretaria numa mudança do estados de protonação e da carga da betalaína, que apresenta caráter anfifílico, uma vez que, pelos valores de pK_a determinados anteriormente para **cBeet120**^[68], estima-se que em pH 3, haja o equilíbrio da forma positiva e neutra (zwitteriônica) de **cBeet120** em solução, enquanto que em pH 5, apresente carga -1 e em pH 7, -2 (Esquema 9). O $\log D_{m/w}$ determinado experimentalmente é comparado ao determinado teoricamente pelo software Marvin Scketch (Clog D) na Tabela 10.

Tabela 10. Determinação do coeficiente de partição na membrana lipídica de POPC, $\log D_{m/w}$, em função do pH, em relação ao calculado pelo software Marvin Scketch, apresentado entre parênteses

$\log D_{m/w}$ (Clog D)	pH		
	3	5	7
cBeet120	$-1,7 \pm 0,1$ (0,0)	$-1,8 \pm 0,1$ (-1,0)	$-2,4 \pm 0,2$ (-4,0)
cBeet151	$-1,3 \pm 0,1$ (+ 0,3)	$-1,6 \pm 0,1$ (-1,1)	$-1,6 \pm 0,1$ (-3,8)
csBeet124	$-1,4 \pm 0,2$ (- 0,4)	$-1,9^a$ (-1,2)	$-1,9 \pm 0,1$ (-4,0)
cbzBeet	$-1,1 \pm 0,1$ (+ 0,8)	$-1,7 \pm 0,3$ (-0,3)	$-1,5 \pm 0,2$ (-3,2)

^asomente uma das replicatas obteve absorção na suspensão lipídica menor que do controle

Os valores reportados em pH 3 são maiores para as quatro betalaínas, que apresentam valores semelhantes, dentro do desvio padrão das medidas, em pH 5 e 7. O

$\log D_{o/w}$ predito teoricamente em pH 5 para **cBeet120**^[68] é semelhante ao valor reportado de $\log D_{m/w}$ no mesmo pH (-1,8). Dessa forma, o maior $\log D_{m/w}$ em pH 3, seria correlacionado ao caráter zwitteriônico da betalaína. Ao compararmos os compostos, a **cbzBeet** apresenta maior lipofilicidade dentre as betalaínas estudadas, nos 3 pHs estudados, possivelmente relacionado a porção aromática presente na estrutura.

Apesar de quase todos os valores de $\log D_{m/w}$ determinados experimentalmente estarem na faixa dinâmica da técnica, entre -2 e 4, com exceção apenas para o $\log D_{m/w}$ de **cBeet120** em pH 7, a diferença de absorção entre as duas fases medidas ainda é pequena: enquanto que para $\log D_{m/w} = -1$ a diferença de absorção entre as fases é de 0,013, para $\log D_{m/w} = -2$ essa diferença é de apenas 0,002. Dessa forma, os valores determinados podem ser imprecisos. A falta de valores empíricos para as betalaínas naturais na literatura pode estar correlacionada a limitação da técnica, que simplesmente não permite a determinação por diferença entre a absorção das fases orgânica e aquosa do coeficiente de partição de compostos tão polares como as betalainas.

Finalmente, a medida do potencial redox de betalaínas é importante para prever o seu comportamento em meio contendo redutores e oxidantes, como o interior de células vivas. Além dos ensaios eletroquímicos realizados pelo grupo^[83,97], dados sobre os potenciais redox de betalaínas são escassos, sendo relatados apenas alguns exemplos na literatura^[129,130,131]. Neste estudo, foi usado um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, em ensaios de voltametria cíclica, como já descrito em estudos eletroquímicos de betanidina^[130].

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados com uma cela voltamétrica para pequenos volumes (< 10 mL) composta por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um contra-eletrodo de platina e um eletrodo de referência de

Ag/AgCl. Inicialmente foram realizadas varreduras numa janela de potencial entre $-1,0$ e $1,0$ V variando-se a concentração de soluções de cBeets e **csBeet124** em $\text{KCl}_{(\text{aq})}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em ensaios de voltametria de onda quadrada realizados pelo grupo^[97] com eletrodo de diamante dopado com boro, que possui uma maior janela eletroquímica que o eletrodo de carbono vítreo^[132], nenhum pico voltamétrico foi observado para betalaínas fora dessa faixa de potencial. Observou-se a diminuição da corrente dos voltamogramas após o primeiro ciclo voltamétrico, sugerindo que o produto de oxidação das betalaínas artificiais adsorve no eletrodo. Por isso, todas as medidas foram feitas após limpeza exaustiva do eletrodo de trabalho e medida controle do perfil voltamétrico de uma solução de ferricianeto de potássio. As condições experimentais para obter uma relação sinal-ruído satisfatória e que reduzem o consumo de betalaína são: concentração de betalaína: $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, volume de 4 mL na cela eletroquímica e janela de potencial entre 0,3 a 0,9 V, para **cBeet120** e **csBeet124**, ou entre 0,3 a 1,0 V para **cBeet151** e **cbzBeet**, de forma que o perfil do pico de oxidação fosse facilmente encontrado nos voltamogramas (Figura 15).

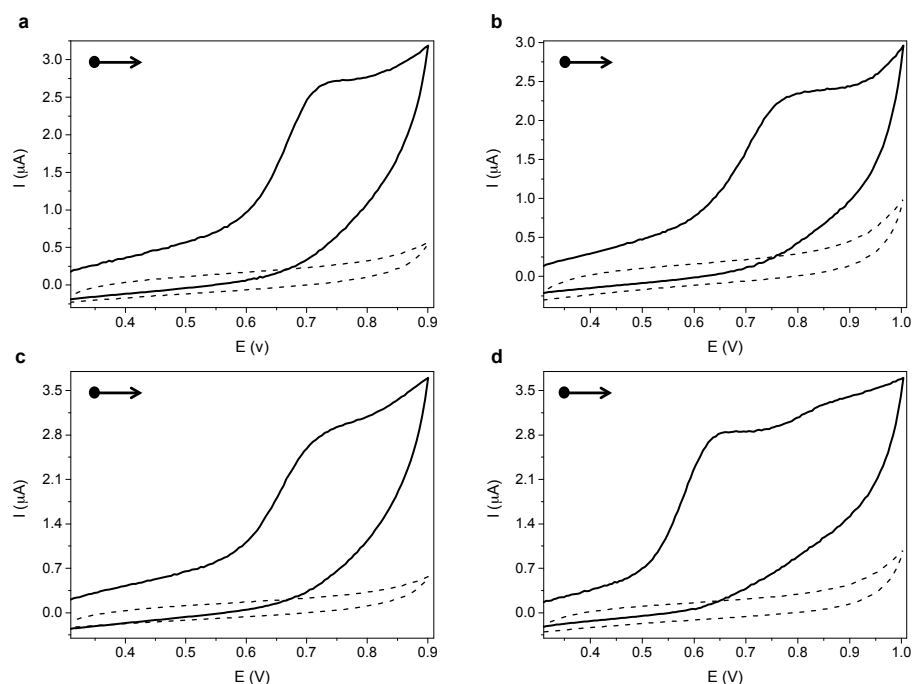


Figura 15. Voltametria cíclica em KCl 0,1 mol L⁻¹ vs Ag/AgCl na ausência (linha pontilhada) e presença (linha preta) de $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de betalaina, utilizando eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho: a) **cBeet120**, b) **cBeet151**, c) **csBeet124** e b) **cbzBeet**. Apresentados os primeiros ciclos voltamétricos com intervalo de varredura: 0,3 a 0,9 V (**cBeet120/csBeet124**) ou 0,3 a 1,0 V (**cBeet151/cbzBeet**) e de velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

Há somente processos irreversíveis ocorrendo com as quatro betalainas. **cbzBeet** apresenta dois picos anódicos, enquanto que as demais betalainas apresentam apenas um (Figura 15). Os voltamogramas foram submetidos a um tratamento matemático para medida dos potenciais de pico. Foi subtraída uma linha base obtida pelo ajuste polinomial da área de interesse do voltamograma resultando na definição de bandas com perfil gaussiano, seguido de derivação para cálculo do $E_{p,a}$ (Figura 16).

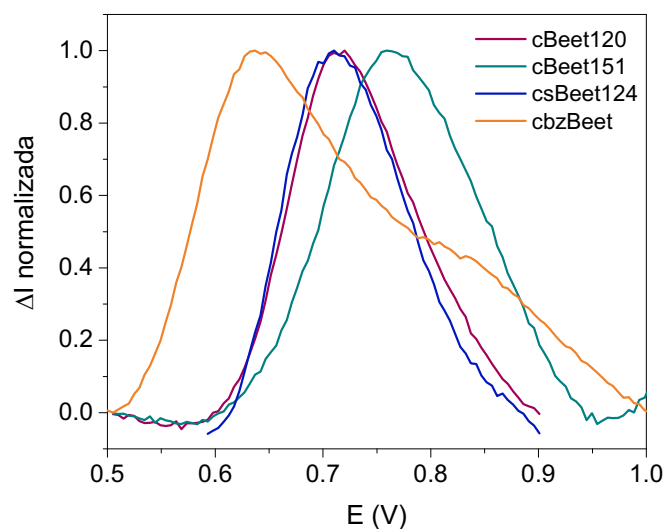


Figura 16. Comparação dos $E_{p,a}$ de cBeets e **csBeet124** em meio aquoso, obtidos no primeiro ciclo do voltamograma cíclico das betalaínas em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $[\text{betalaína}] = 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Os valores de potencial de pico anódico ($E_{p,a}$, oxidação) determinados no primeiro ciclo de varredura dos voltamogramas cíclicos das cBeets são apresentados na Tabela 11. Os valores de $E_{p,a}$ para **cBeet120**, **cBeet151** e **csBeet124** são semelhantes e encontram-se na faixa de 710–760 mV, enquanto que ambos os valores de $E_{p,a}$ para **cbzBeet** encontram-se numa faixa de potencial menor (631 mV) ou maior (812 mV) que o encontrado para as demais betalaínas estudadas (Figura 16).

Tabela 11. Potenciais de pico anódico ($E_{p,a}$, em mV, contra eletrodo de referência Ag/AgCl, KCl sat) extraídos dos voltamogramas cíclicos das betalaínas em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

	$E_{p,a}$ (mV)
cBeet120	714
cBeet151	762
csBeet124	711
cbzBeet	631/812

Não foram encontrados na literatura ensaios eletroquímicos com aminocumarinas, há apenas alguns relatos do estudo eletroquímico da cumarina simples (1,2-benzopirona)^[133–135], descritos para a quantificação eletroanalítica da cumarina em

infusões^[135] e óleos medicinais^[134]. Foram encontrados potencial de redução irreversíveis em $-1,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}^{[134]}$ por voltameria cíclica e de pulso diferencial, em eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio; ou em $-1,65 \text{ V vs. Ag/AgCl}^{[135]}$ por voltametria cíclica com eletrodo de diamante dopado com boro, ambos em solução tampão pH 8; portanto, fora da faixa de potencial em que foram adquiridos os voltamogramas das betalaínas artificiais.

Já em ensaios de voltametria cíclica realizados com betalaínas naturais, foram encontrados três potenciais de pico para betanina (404 mV, 616 mV e 998 mV) e outros dois para indicaxantina (611 mV e 895 mV) vs. Ag/AgCl em solução tampão PBS^[129], contudo tais potenciais não foram atribuídos a oxidação de grupos químicos das betalaínas. Em estudo mais detalhado^[130], foram observados dois potenciais de oxidação para betanidina na faixa de pH entre 3 e 5, que se misturam em valores de pH maiores, indicando que mecanismos de oxidação de betalaínas dependem do pH do meio. Ensaio de voltametria de onda quadrada em eletrodo de diamante dopado com boro mostraram que o $E_{p,a} = 849 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ para o ácido betalâmico, em pH 9^[97]. Portanto, é possível inferir que o $E_{p,a}$ na região de potencial superior a 700 mV observado nas betalaínas artificiais pode ser correlacionado ao processo de oxidação na porção betalâmica, sendo pouco afetado pela estrutura do substituinte da cumarina na **cBeet120/151** e ou do carboestiril em **csBeet124**. Já o segundo potencial, na faixa de 600 mV, observado apenas em **cbzBeet**, não pôde ser relacionado à oxidação de uma porção específica da molécula.

Na Tabela 12 resumimos as propriedades fotofísicas e físico-químicas determinadas para as betalaínas artificiais semissintetizadas. A mudança estrutura não afetou algumas das propriedades fotofísicas estudadas em meio aquoso: os máximos de

absorção (λ^{abs}) e emissão (λ^{em}) e conseqüentemente o deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) mudam pouco em relação com a variação da estrutura da betalaína, assim como os valores de coeficiente de atenuação molar (ϵ) e energia singlete (E_s). As energias do HOMO e LUMO calculadas para os compostos também são semelhantes, o que corrobora com os resultados experimentais. Contudo, tanto o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl}), quanto o tempo de vida de emissão (τ_{Fl}) é afetado pela mudança tanto do substituinte na posição 4 da aminocumarina, quanto pela mudança de cumarina para carboestiril, conforme discutido anteriormente. As mudanças no ϕ_{Fl} fazem com que as betalaínas estudadas apresentem eficiência no processo de emissão, representada pelo *brilho*, distintas; de forma que, como os valores de ϵ são semelhantes, a betalaína mais fluorescente (**cBeet151**) também apresenta o maior *brilho* comparado a todas as betalaínas conhecidas.

Como os valores de τ_{Fl} e ϕ_{Fl} mudam com a estrutura, esperar-se-ia que as constantes radiativas (k_r) e não radiativas (k_{nr}) fossem afetadas pela mudança estrutural das betalaínas em estudo. Entretanto, a maior variação com a estrutura ocorre na k_{nr} que é para o caso da **cbzBeet** quase $7\times$ maior que k_{nr} de **cBeet151**; enquanto k_r dos betalaínas é praticamente a mesma, variando entre $1,3-2,0 \times 10^{10}$. Da mesma forma, há uma diferença de cerca de 3 kJ mol^{-1} na E_a^{nr} para a **cBeet120**, **csBeet124** e **cbzBeet** em relação a **cBeet151**, que apresenta menor k_{nr} dentre as betalaínas estudadas. O aumento da E_a^{nr} pode ser o responsável pelo maior ϕ_{Fl} para uma betalaína, natural ou artificial, já descrito em meio aquoso. Os deslocamentos químicos de **cBeet151** mais desblindados em relação às outras betalaínas sugerem que o efeito indutivo do $-\text{CF}_3$ afeta o sistema 1,7-diazaheptametílico mesmo a longa distância. Entretanto, a constante de acoplamento ${}^3J_{\text{H7-H8}}$ se mantém praticamente a mesma (12,8 para **cBeet120** e **csBeet124**

e 12,9 para a **cBeet151**) sugerindo que a delocalização da carga, se ocorre não afeta a ordem da ligação entre o C7-C8 nos diferentes compostos. Além disso, o rendimento quântico não se correlaciona com os deslocamentos de Stokes das moléculas que são similares (*ca.* 1700 cm⁻¹). Desta forma, a explicação para o maior rendimento da **cBeet151** pode estar relacionada ao maior caráter de transferência de carga nessa molécula. Esta hipótese não é totalmente suportada pelos dados de RMN apresentados acima ou pela variação do momento de dipolo necessária para explicar deslocamentos de Stokes iguais para moléculas com momentos de dipolo no estado fundamental diferentes, i.e. **cBeet151** e **cBeet120** tem $\mu_G = 15,8$ e 13,8 e, portanto para manter o deslocamento de Stokes constante o μ_E deve diminuir para a **cBeet151** e aumentar para a **cBeet120**. Isso sugere que no estado excitado, a **cBeet151** poderia ser menos polar que a **cBeet151**, se o raio de Onsager for similar ou variar pouco entre as moléculas.

A mudança do substituinte também afetou a estabilidade da betalaína frente à hidrólise somente no caso da **cbzBeet**, em que o tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$) em água é quase 2× maior em relação aos demais compostos; que pode ser correlacionado ao efeito estérico ou doador de densidade eletrônica do sistema aromático para o nitrogênio da imina, diminuindo seu caráter eletrofílico e dificultando o ataque nucleofílico da água.

Os potenciais de pico anódico sugerem que a principal reação de oxidação que ocorre na faixa de potencial estudada (0,3–1,0 V) afeta o sistema 1,7-diazaeptamético, presente nos quatro compostos, uma vez que o potencial é pouco afetado pela estrutura da betalaína. E tanto o coeficiente de partição estimado experimentalmente na membrana lipídica (Log $D_{m/w}$), quanto os valores calculados (ALog P e Log D) indicam que a **cBeet151** e **cbzBeet** são mais lipofílicas que **cBeet120** e **csBeet124**, mas ainda

são compostos bastante polares. Os valores de pKa dos ácidos carboxílicos e também do pK_{aH} no nitrogênio da imina calculados também pouco mudam com o substituinte da betalaína, reforçando a ideia que efeitos eletrônicos são pouco relacionados à estrutura da porção carboestiril e cumarina.

Tabela 12. Propriedades fotofísicas e físico-químicas das betalaínas artificiais semissintetizadas em relação a sua estrutura.

λ_{abs} (nm)	520	519	518	512
ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	65.000	65.000	66.000	64.000
λ_{EM} (nm)	570	570	570	564
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	1.687	1.724	1.761	1.800
E_s (kJ mol ⁻¹)	218	219	218	220
ϕ_{Fl} (%)	0.63	2.14	0.32	0.34
τ_{Fl} (ps)	38	110	24	17
k_f (s ⁻¹)	$1,7 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
k_{nr} (s ⁻¹)	$2,6 \cdot 10^{10}$	$8,9 \cdot 10^9$	$4,2 \cdot 10^{10}$	$5,9 \cdot 10^{10}$
E_a^{nr} (kJ mol ⁻¹)	12,7	15,4	11,6	12,1

Brilho ($\epsilon \times \phi_{PI}$)	0,41 10^3	1,39 10^3	0,21 10^3	0,22 10^3
$\tau_{1/2}$ (min. em H ₂ O, 25 °C)	110	119	149	216
Log D _{m/w} (pH 3)	-1,7	-1,3	-1,4	-1,1
E _{p,a} (mV)	714	762	711	631
E _{p,a2} (mV)				812
μ (D) ^a	14,4	15,8	13,8	14,1
Vol. cavidade (Å^3) ^a	341,1	365,8	346,7	371,7
E _{HOMO} (eV) ^a	-7,10	-7,17	-7,05	-7,03
E _{LUMO} (eV) ^a	-2,56	-2,63	-2,53	-2,53
Alog P ^b	1,937	2,393	1,29	2,541
log D ^b	-1,009	-0,553	-1,656	-0,415
Volume (Å^3) ^b	223,63	233,92	224,66	241,47
pKa =N ⁺ H	5,81	5,65	5,89	5,75
pKa CO ₂ H <i>sp</i> ²	3,09	3,05	3,15	3,08
pKa CO ₂ H <i>sp</i> ³	3,79	3,74	3,85	3,77

^a valores determinados através de cálculo químico-quântico no nível m062x/6-31+g(d,p)

^b valores calculados a partir das estruturas otimizadas no nível m062x/6-31+g(d,p)

3.2. Efeito de albumina sobre a fluorescência de cBeets e csBeet: interação intermolecular vs. ligação covalente

Proteínas são biomoléculas importantes e albumina é um modelo muito comum de proteína para estudos *in vitro* dada a sua capacidade de interagir com moléculas com diferentes características^[136]. Albuminas séricas (SA), a principal classe proteica constituinte do plasma sanguíneo, são proteínas transportadoras de inúmeros compostos exógenos e endógenos no corpo.^[137] A interação de SA com fluoróforos é um importante para obter informações a respeito da forma como a proteína interage com diferentes substratos dada a sensibilidade das propriedades fotofísicas de alguns destes compostos a modificações nas propriedades do meio^[138,139,140,34]. Nesse contexto, albumina sérica bovina (BSA), de massa molar de 66,5 kDa com ponto isoelétrico de 4,7^[141], é muito usada como proteína modelo, dada a sua homologia com a albumina sérica humana (HSA) e menor custo. Logo, avaliamos o efeito da adição de BSA em diferentes pHs na emissão de fluorescência das betalaínas como forma de entender como ocorre a interação destes compostos com proteínas. Foi realizado um ensaio exploratório para estudar o efeito da adição de BSA em uma faixa de concentração entre 0,5 – 100 equiv de BSA ($7,5 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de BSA) em relação a **cBeet120**. A concentração de betalaína foi mantida em $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e os experimentos foram feitos em meio tamponado (pH 3 e 7 com tampão fosfato 100 mmol L^{-1} e pH 5 com tampão acetato 100 mmol L^{-1}), de forma a variar o estado de protonação da betalaína e também a carga da proteína. A faixa de concentração de BSA escolhida baseia-se na concentração em que SAs estão presentes no citoplasma de mamíferos, estimada em $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ^[142], e na solubilidade da proteína em meio aquoso, 40 g L^{-1} . Já a concentração de betalaína foi mantida baixa para que pudéssemos variar a concentração

de BSA numa ampla faixa e também para manter a densidade óptica da solução de **cBeet120** abaixo de 0,1 no máximo de excitação, de forma a evitar processos de reabsorção^[8] que poderiam interferir na determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{FI}) da betalaína.

Não há mudança nos máximos de absorção e emissão de **cBeet120** com a adição de BSA, em nenhum dos pHs estudados; contudo, o ϕ_{FI} aumenta cerca de 5× em pH 3, na presença de 100 equiv BSA ($1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, Figura 17). Também há um aumento do ϕ_{FI} nos pHs 5 e 7 a partir da adição de 10 equiv de BSA ($1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), contudo o aumento é menor do que o observado em pH 3 (Figura 17).

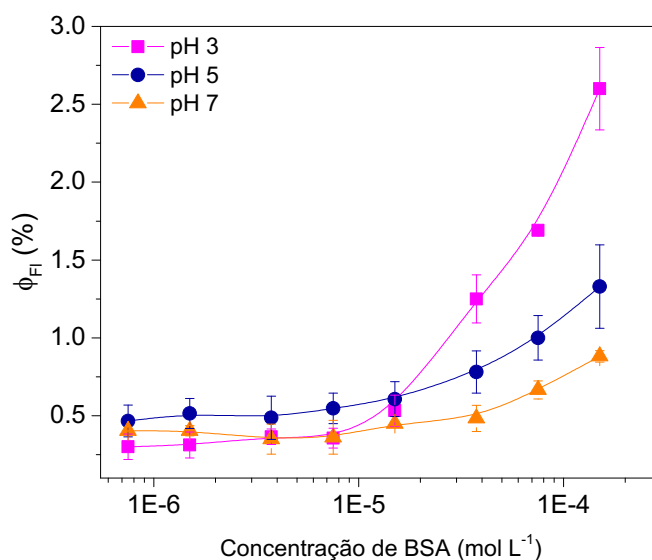


Figura 17. Efeito da concentração de BSA e do pH no rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{FI}) de **cBeet120**. [**cBeet120**] $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, [BSA] = $7,5 \times 10^{-7}$ (0,5 equiv BSA) a $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (100 equiv BSA).

Durante a realização destes ensaios, Cabanes e colaboradores^[143] relataram a semissíntese de uma BSA marcada com ácido betalâmico, *BSA-betaxantina* (**BtBSA**), via acoplamento aldmínico, em água pH 5. Os autores confirmaram a semissíntese da **BtBSA** pela determinação da massa exata da proteína marcada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização eltrospray, no modo

positivo, com tempo de voo (HPLC-ESI+-TOF). Decidiu-se, então comparar as propriedades fotofísicas da **BtBSA** com os dados obtidos pela adição de BSA a solução de betalaína cumarínica e verificar a possível ocorrência de transaminação, em que há a formação de **BtBSA** e cumarina em solução, realizamos a semissíntese e purificação da proteína marcada como descrita na literatura^[143].

O espectro de massas da BtBSA descrito na publicação^[143] não está acompanhado de espectro. Apesar disso, são apresentados dados a respeito de dois picos moleculares de massas 66.442,08 Da e 66.652,36 Da, na proporção 1:1. Por conta da diferença de 210,28 Da entre os picos, os autores atribuíram o primeiro pico à BSA livre, e o segundo, à **BtBSA**^[143], na qual teria sido incorporada apenas uma unidade de **HBt**. A atribuição dos picos da análise por espectrometria de massas desperta dúvidas, uma vez que a massa exata do ácido betalâmico é de 211,0481 m/z , e não de 210,28 m/z , como foi reportado pelos autores, descrito no artigo em Da, não como *relação massa/carga* (m/z). Ainda, se supormos que, a **BtBSA** apresenta-se na forma $[M-H]^+$, como já reportado em ensaios de LCMS-ESI+ para diversas betaxantinas^[69], caso apenas 1 molécula de ácido betalâmico esteja ligada à BSA, a diferença de massas seria de 194 m/z , com a formação da **BtBSA** carregada positivamente (+ 1 m/z), pelo acoplamento da BSA ao ácido betalâmico (BSA + 211 m/z), seguida da perda de uma molécula de água (-18 m/z); a massa exata esperada para a **BtBSA** seria de 66.636,08 m/z , calculado com base no valor reportado para BSA livre, em vez dos 66.652,36 Da descrito pelos autores^[143].

A BSA utilizada na reação e a **BtBSA** semissintetizada foram comparadas por experimento de espectrometria de massas *via* MALDI-TOF, em matriz de ácido sinapínico (Figura 18). Como a faixa de aquisição de massas para analisar a BSA por

essa técnica é muito alta, entre 22.000 e 220.000 m/z não foi possível diferenciar a proteína da **BtBSA** com a precisão de massa molecular necessária. A otimização da análise da **BtBSA** via HPLC-ESI+-TOF não foi bem-sucedida.

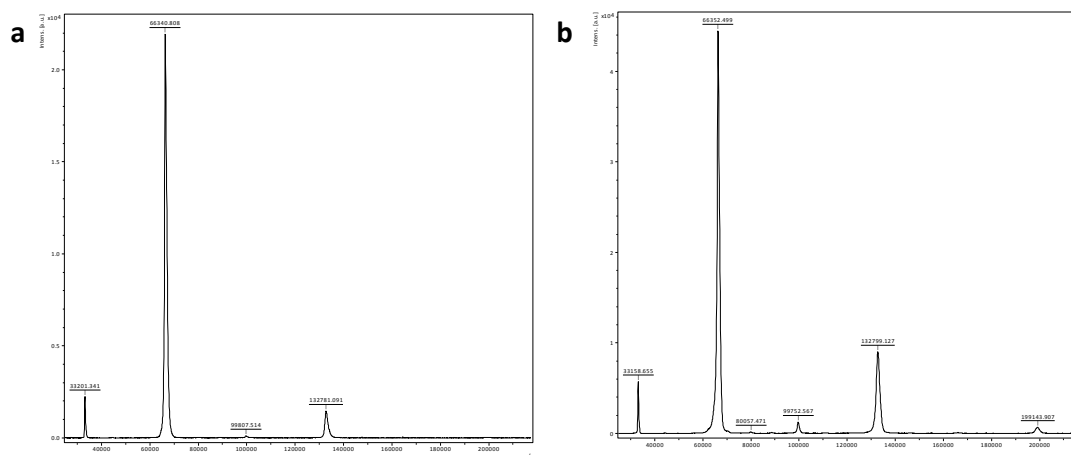


Figura 18. Comparação entre as análises de espectrometria de massas por MALDI-TOF de a) BSA e b) **BtBSA** semissintetizada. Relação massa carga do pico principal: BSA = 66.340,808 m/z e **BtBSA** = 66.352,499 m/z .

Além do resultado de espectrometria de massas, há na publicação^[143] apenas os espectros de absorção e emissão em meio aquoso da **BtBSA**. Estes dados foram comparados com os obtidos com a **BtBSA** semissintetizada por nós. Foram adquiridos espectros de absorção, emissão e excitação e determinado o rendimento quântico de fluorescência da **BtBSA** preparada em pH 3, 5 e 7 (Figura 19). Apesar dos espectros de absorção de **BtBSA** serem semelhantes ao apresentado na literatura, ambos com perfil e máximo de absorção ($\lambda^{\text{abs}} = 476 \text{ nm}$), o máximo de emissão de fluorescência descrito pelos autores é deslocado para o vermelho em relação ao observado com nossa amostra, de $\lambda^{\text{em}} = 505 \text{ nm}$ para $\lambda^{\text{em}} = 551 \text{ nm}$ ^[143]. Como os autores não descrevem qual BSA é utilizada na semissíntese da betalaína, não sabemos identificar a origem de tamanha diferença no espectro de emissão. Os ϕ_{FI} determinados para **BtBSA** variam muito pouco com o pH do meio e são de cerca de 1,8% (Figura 19b).

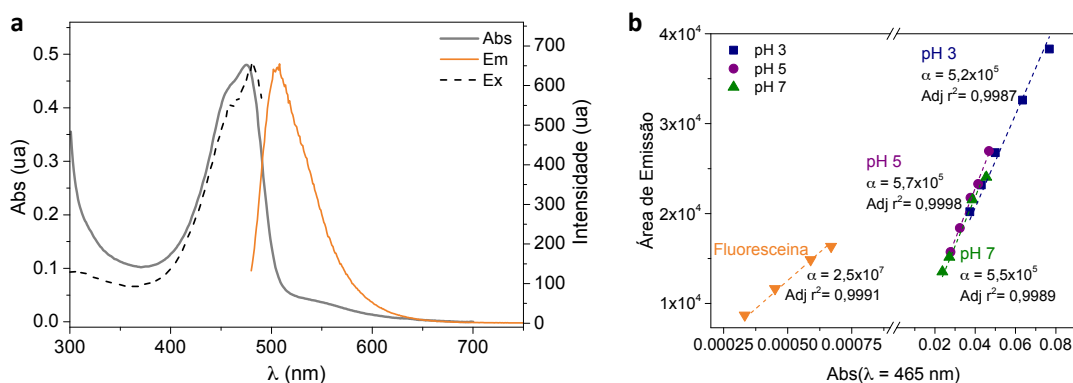


Figura 19. Caracterização fotofísica da **BtBSA** em meio aquoso. a) Espectros de absorção, emissão e excitação de **BtBSA** em tampão pH 7; b) Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{FI}) de **BtBSA**, em função do pH, com fluoresceína em NaOH 0,1 mol L⁻¹ como padrão secundário.

Sabendo que BSA presente em concentração de 100 equiv em relação a **cBeet120** acarreta num aumento significativo do ϕ_{FI} (Figura 18), estudamos o efeito de BSA nas outras betalaínas semissintéticas, incluindo a **BtBSA**. Para as **cBeets** e **csBeet124**, a adição de 100 equiv BSA (em pH 3, 5 e 7) provoca um aumento do rendimento quântico de fluorescência em relação ao controle sem adição de BSA (Figura 20). Assim como observado para **cBeet120**, os maiores valores de ϕ_{FI} são encontrados em pH 3, com 100 equiv BSA, para as demais betalaínas, chegando a cerca de $\phi_{FI} = 8\%$ para **cBeet151**. A variação do pH não afeta o ϕ_{FI} da **BtBSA** sugerindo que a interação de **cBeets** e **csBeet124** é dirente da observada quando a porção betalaínica está ligada covalentemente à proteína. Além do ϕ_{FI} , o τ_{FI} das betalaínas com 100 equiv de BSA também foi determinado, nos três pHs estudados, a fim de investigar a natureza da interação betalaína/BSA. Os decaimentos da **BtBSA** e das betalaínas, em função do pH, são apresentados nas Figura 21–Figura 25.

Os decaimentos de tempo de vida de fluorescência de **BtBSA** foram descritos por uma função bi-exponencial, ao contrário do observado para as **cBeets** em meio aquoso, sem BSA (Figura 21). Em todas as figuras são apresentados os ajustes finais e as

componentes de cada uma das exponenciais. Tanto os valores das constantes, quanto a proporção variam em função do pH, de forma que os valores do tempo de vida de fluorescência médio ($\langle\tau\rangle$) da **BtBSA** mudam de forma não linear com o pH do meio, sendo de 158 ps em pH 3, 143 ps em pH 5 e de 150 ps em pH 7. O tempo de vida de fluorescência das betalainas com 100 equiv BSA também foi descrito por função bi-exponencial (Figura 22–Figura 25). Notam-se mudanças no valor e na proporção da contribuição das constantes τ_1 e τ_2 com o aumento do pH; da mesma forma que para o ϕ_{FI} , o maior $\langle\tau\rangle$ observado foi em pH 3; o $\langle\tau\rangle$ também diminui com o aumento do pH.

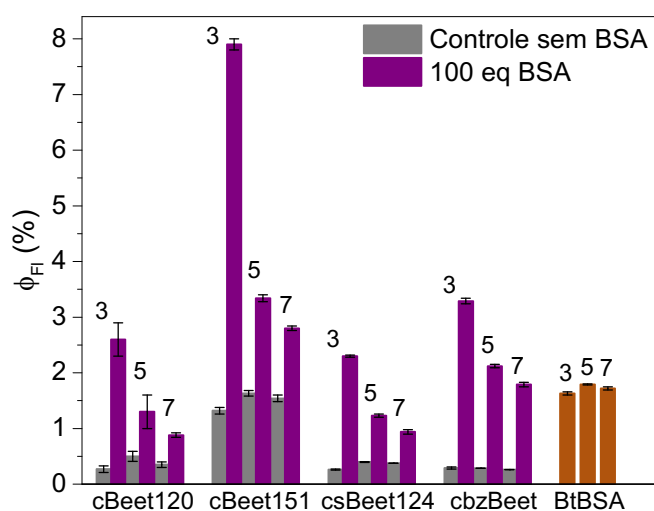


Figura 20. Efeito do pH e da adição de 100 eq de BSA no rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{FI}) de **cBeets** em relação a **BtBSA**, em pH 3, pH 5 e pH 7. $[cBeet] = 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[BSA] = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os ϕ_{FI} da **BtBSA** foram adquiridos somente em meio tamponado, sem adição de BSA. Os números 3, 5 e 7 indicados na figura indicam os valores de pH em que cada ϕ_{FI} foi determinado.

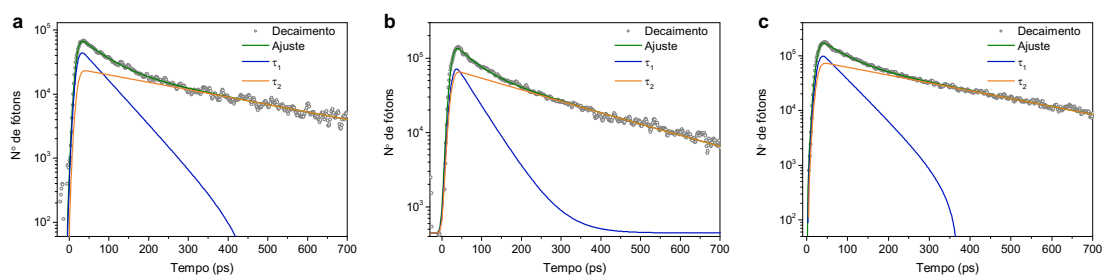


Figura 21. Decaimentos do tempo de vida de emissão (τ_{FI}) de **BtBSA** em função do pH. a) pH 3 (IRF = 19 ps), b) pH 5 (IRF = 21 ps) e c) pH 7 (IRF = 20 ps). $\lambda^{ex} = 400 \text{ nm}/\lambda^{em} = 490 \text{ nm}$. Ajustes bi-exponenciais, em que τ_1 representa a contribuição componente de tempo de vida mais curto no decaimento e τ_2 a contribuição componente de tempo de vida mais longa.

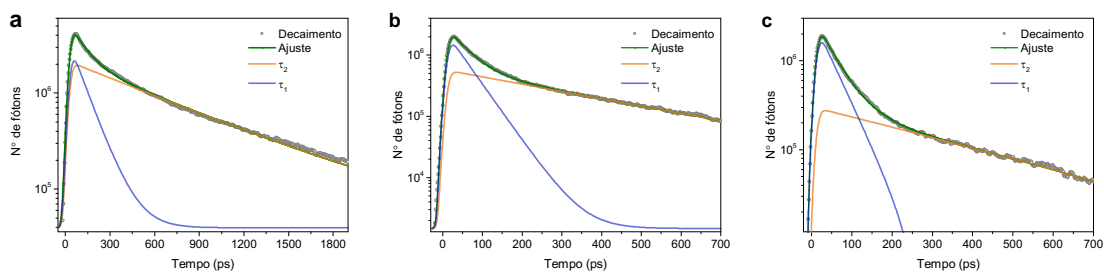


Figura 22. Decaimentos do tempo de vida de emissão (τ_{FI}) de **cBeet120** com 100 equiv BSA em função do pH. a) pH 3 (IRF = 49 ps), b) pH 5 (IRF = 21 ps) e c) pH 7 (IRF = 23 ps). $\lambda^{ex} = 520 \text{ nm}/\lambda^{em} = 570 \text{ nm}$, $[\text{cBeet120}] 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{BSA}] = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Ajustes bi-exponenciais, em que τ_1 representa a contribuição componente de tempo de vida mais curto no decaimento e τ_2 , a contribuição componente de tempo de vida mais longa.

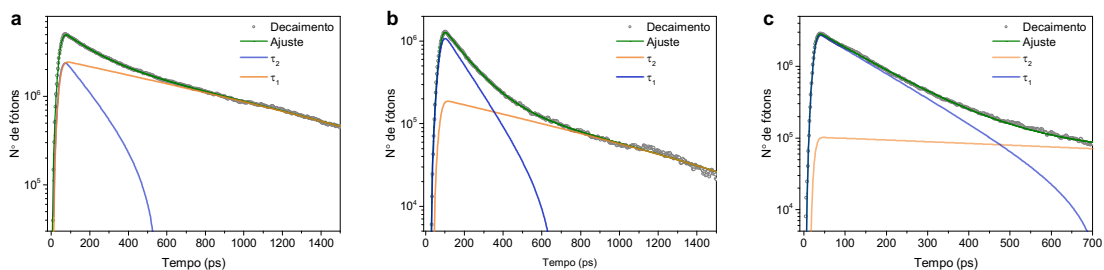


Figura 23. Decaimentos do tempo de vida de emissão (τ_{FI}) de **cBeet151** com 100 equiv BSA em função do pH. a) pH 3 (IRF = 43 ps), b) pH 5 (IRF = 43 ps) e c) pH 7 (IRF = 17 ps). $\lambda^{ex} = 520 \text{ nm}/\lambda^{em} = 570 \text{ nm}$, $[\text{cBeet151}] 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{BSA}] = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Ajustes bi-exponenciais, em que τ_1 representa a contribuição componente de tempo de vida mais curto no decaimento e τ_2 , a contribuição componente de tempo de vida mais longa.

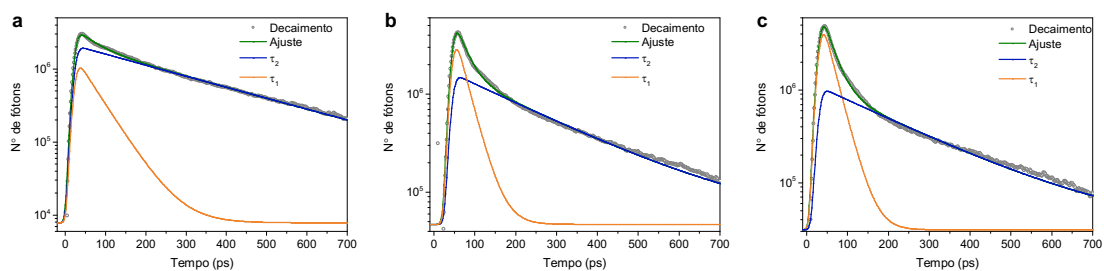


Figura 24. Decaimentos do tempo de vida de emissão (τ_{FI}) de **csBeet124** com 100 equiv BSA em função do pH. a) pH 3 (IRF = 20 ps), b) pH 5 (IRF = 21 ps) e c) pH 7 (IRF = 21 ps). $\lambda^{ex} = 520 \text{ nm}/\lambda^{em} = 570 \text{ nm}$, $[\text{csBeet124}] 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{BSA}] = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Ajustes bi-exponenciais, em que τ_1 representa a contribuição componente de tempo de vida mais curto no decaimento e τ_2 , a contribuição componente de tempo de vida mais longa.

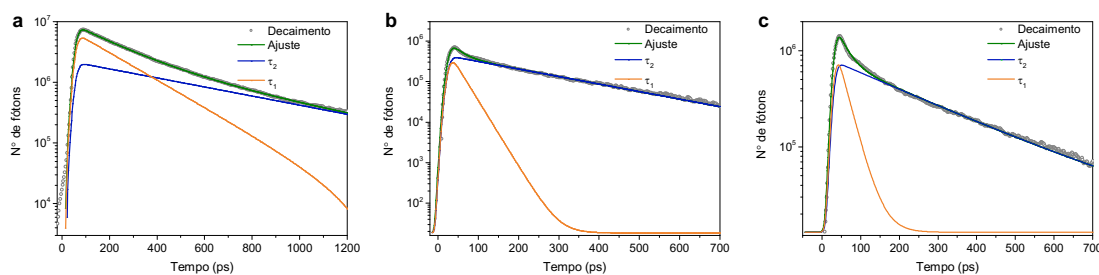


Figura 25. Decaimentos do tempo de vida de emissão (τ_{FI}) de **cbzBeet** com 100 equiv BSA em função do pH. a) pH 3 (IRF = 35 ps), b) pH 5 (IRF = 20 ps) e c) pH 7 (IRF = 21 ps). $\lambda^{ex} = 520 \text{ nm}/\lambda^{em} = 570 \text{ nm}$, $[\text{cbzBeet}] 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{BSA}] = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Ajustes bi-exponenciais, em que τ_1 representa a contribuição componente de tempo de vida mais curto no decaimento e τ_2 , a contribuição componente de tempo de vida mais longa.

Em alguns casos, o ajuste não linear para a determinação da constante mostra que a componente do ajuste para a constante mais alta mostra uma inflexão ora positiva ora negativa. Esse fato pode ser explicado com base no algoritmo utilizado nos ajustes dos decaimentos que não permitia que novos ajustes fossem refeitos com parâmetros diferentes, *e.g.* que uma das constantes fosse fixada, de forma a compararmos qual a melhor correlação encontrada. Contudo, a contribuição do decaimento mais lento é grande no ponto aonde ocorre a inflexão, sendo, portanto, este problema pouco relevante para os valores de tempo de vida calculados.

Para as quatro betalaínas, nos três pHs, a presença de 100 equiv de BSA aumenta tanto o ϕ_{FI} quanto o τ_{FI} . O ajuste bi-exponencial sugere que há duas espécies emitindo no comprimento de onda de emissão selecionado (570 nm); betalaínas em solução tampão sem BSA apresentam somente um decaimento. Por isso, acredita-se que haja formação de um complexo cBeet-BSA e csBeet124-BSA de tempo de vida mais longo que possa ser responsável por essa emissão (Tabela 13). Uma estrutura modelo de BSA (Figura 26), obtida pela sequência de aminoácidos e pela estrutura cristalina da proteína homóloga, HSA, indica que a proteína é constituída por três domínios homólogos (I, II e III), de forma que cada domínio é dividido em outros dois sub-

domínios, A e B. Os principais sítios de interação da BSA são localizados nos subdomínios IIA e IIIA, que são nomeados como sítios de interação I e II, respectivamente (Figura 26).^[144] Considerando que as betalainas possam existir em solução, interagindo com a BSA pelo subdomínio IIA (mais hidrofóbico) ou pelo subdomínio IIIA poder-se-ia observar três tempos de vida distintos, sendo o menor em solução (livre) e o maior correspondendo a uma interação mais forte com BSA. BSA tem ponto isoelétrico igual a 4,7, ou seja, está positivamente carregada em pH 3, neutra em pH 5 e aniônica em pH 7. As betalainas por outro lado, tem pKa médio nas porções carboxílicas próximo a 3 e pKaH da imina entre 5 e 7. Desta forma, em pH 3 betalainas estão carregadas positivamente ou neutra, enquanto em pH 5 e 7 as betalainas estão negativamente carregadas. Em pH 3 o tempo de vida é sempre maior que o calculado para a betalaina em solução, sugerindo uma interação com ambos os sítios da BSA. Contudo em pHs 5 e 7 o tempo de vida mais curto (τ_1 , Tabela 13) é próximo ao calculado em solução na ausência de BSA (Tabela 5, p. 58) enquanto τ_1 é mais alto, como esperado supondo-se a interação da betalaina com um dos sítios da BSA. Para inferir qual o sítio de interação seria necessário realizar experimentos de bloqueio seletivo de cada um dos sítios. Entretanto, os valores de ClogD calculados sugerem que a **cbzBeet** é a menos polar entre as betalainas e o efeito em pH 3 sobre a constante τ_1 é o mais alto, bem como sua contribuição, que nos permite especular uma interação com a cavidade IIA. Estes resultados contrinuem para o entendimento dos dados obtidos com *P. falciparum*, cujo acúmulo no parasita pode estar relacionado à interação com proteínas.

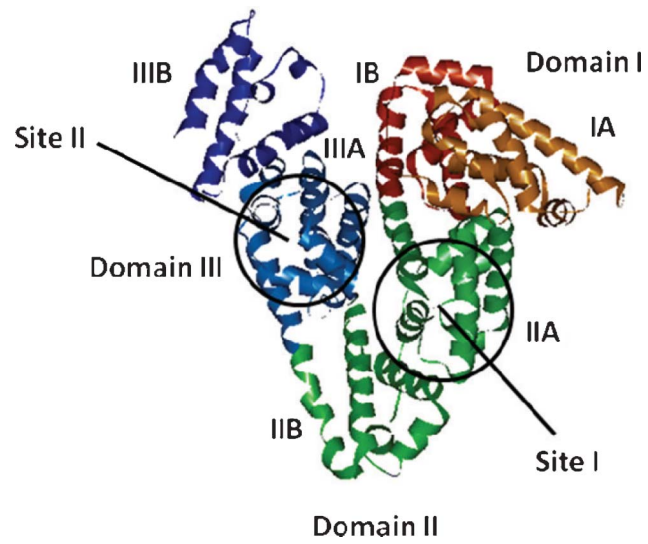


Figura 26. Representação pictórica da estrutura da BSA obtida da estrutura cristalina da proteína homóloga, HSA, seus domínios e principais sítios de ligação.^[144,145]

Tabela 13. Comparação entre os tempos de vida (τ) e rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{Fl}) de cBeets na presença de 100 equiv BSA, em relação ao meio aquoso.

Betaina		Meio	a_1	τ_1 (ps)	a_2	τ_2 (ps)	$\langle\tau_{Fl}\rangle$ (ps)	r^2	ϕ_{Fl} (%)
cBeet120	H ₂ O	Tampão pH 3 + 100 equiv BSA	0,6	102	0,4	686	335	0,9993	0,63 ± 0,01
		Tampão pH 5 + 100 equiv BSA	0,79	47	0,21	362	113	0,9995	1,3 ± 0,3
		Tampão pH 7 + 100 equiv BSA	0,89	45	0,11	392	83	0,9996	0,88 ± 0,04
cBeet151	H ₂ O	Tampão pH 3 + 100 equiv BSA	-	-	-	-	110	0,9988	2,14 ± 0,03
		Tampão pH 5 + 100 equiv BSA	0,54	170	0,46	975	540	0,9996	7,9 ± 0,1
		Tampão pH 7 + 100 equiv BSA	0,87	123	0,13	826	214	0,9996	3,34 ± 0,06
csBeet124	H ₂ O	Tampão pH 3 + 100 equiv BSA	0,96	128	0,04	2078	206	0,9995	2,80 ± 0,04
		Tampão pH 5 + 100 equiv BSA	-	-	-	-	23	0,9992	0,32 ± 0,01
		Tampão pH 7 + 100 equiv BSA	0,41	50	0,59	284	188	0,9984	2,30 ± 0,02
cbzBeet	H ₂ O	Tampão pH 3 + 100 equiv BSA	0,76	27	0,24	216	72	0,9983	1,23 ± 0,03
		Tampão pH 5 + 100 equiv BSA	0,87	25	0,13	207	49	0,9987	0,94 ± 0,04
		Tampão pH 7 + 100 equiv BSA	-	-	-	-	17	0,9986	0,34 ± 0,02
BtBSA	H ₂ O	Tampão pH 3	0,75	193	0,25	589	292	0,9975	3,29 ± 0,05
		Tampão pH 5	0,54	27	0,46	234	122	0,9979	2,12 ± 0,03
		Tampão pH 7	0,61	27	0,39	247	113	0,9979	1,79 ± 0,04
BtBSA	H ₂ O	Tampão pH 3	0,70	64	0,30	377	158	0,9954	1,63 ± 0,03
		Tampão pH 5	0,59	51	0,41	276	143	0,9959	1,79 ± 0,01
		Tampão pH 7	0,63	58	0,37	307	150	0,9975	1,72 ± 0,03

3.3. Efeitos do meio sobre a fluorescência da **cBeet120**

A solubilidade quase que exclusivamente em água e em alguns solventes polares próticos (*e. g.* metanol, etanol, 2,2,2-trifluoretanol, etilenoglicol)^[84] dificulta o estudo de efeitos solvatocrômicos nas propriedades fotofísicas de betalaínas. Por isso o grupo propôs uma abordagem que envolve três solventes, agrupados em misturas binárias, como forma de avaliar o efeito da polaridade e viscosidade do meio nas propriedades fotofísicas de **cBeet120**. Os solventes empregados são: água; 2,2,2-trifluoretanol e glicerol; e as misturas binárias: glicerol/água, 2,2,2-trifluoretanol/água e glicerol/2,2,2-trifluoretanol. O efeito de misturas 2,2,2-trifluoretanol/água no aumento da estabilidade frente à hidrólise e também sob o rendimento quântico de fluorescência de indicaxantina e **cBeet120** já foi previamente descrito pelo grupo^[78]. Além disso, o efeito do aumento da viscosidade e da polaridade sob o rendimento quântico de fluorescência de indicaxantina foi avaliado nas mesmas misturas^[98]. Nas próximas seções descrevemos o efeito das propriedades das misturas na fotofísica de 1,8-ANS, como sonda de absorção e fluorescência, e no fator de polaridade empírica, $E_T(30)$; além disso, verificamos tais propriedades na fotofísica de **cBeet120**, com estudos de espectroscopia de absorção, emissão, além da determinação dos ϕ_{FI} e do τ_{FI} nas misturas. Ainda, estudamos o efeito da compartimentalização de **cBeet120** em micelas reversas de AOT (dioctilsulfocinato de sódio) em heptano, variando a razão entre a $[H_2O]/[AOT]$ (W_0), com consequente mudança no raio hidrodinâmico da micela, sob suas propriedades fotofísicas.

3.3.1. Efeitos da polaridade e viscosidade de misturas binárias de solvente

Uma maneira de estudar o efeito do meio sobre propriedades físico-químicas em compostos que não apresentam solubilidade em diversos solventes é o uso de misturas

binárias. Misturas binárias glicerol/metanol são amplamente empregadas no estudo do efeito da viscosidade sobre a fotofísica de rotores moleculares^[146]. A mistura binária glicerol/água permite variar a viscosidade do meio em mais de 100×, mas também há uma variação da polaridade, descrito pelo ϵ_r , e o índice de refração do meio (Tabela 14). Dessa forma, para avaliar o efeito da polaridade e da viscosidade é necessário um terceiro solvente; escolhemos o 2,2,2-trifluoretanol, pela alta solubilidade e estabilidade das betalaínas neste solvente^[78]. As propriedades dos solventes puros são descritas na Tabela 14. No caso da mistura TFE/H₂O, a viscosidade apenas dobra, enquanto que a polaridade diminui muito mais que para a mistura glicerol/H₂O. Para separarmos o efeito da polaridade e da viscosidade do meio nas propriedades fotofísicas de cBeet120, escolhemos então três sistemas de misturas binárias: glicerol/água, 2,2,2-trifluoretanol/água e glicerol/2,2,2-trifluoretanol.

Tabela 14. A viscosidade (η), permissibilidade relativa (antiga constante dielétrica, ϵ_r) e índice de refração (n_D) de água, glicerol e 2,2,2-trifluoretanol.^[147]

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

^a25 °C e ^b20 °C

Inicialmente, utilizamos sondas solvatocrômicas conhecidas, betaína de reichardt e 1,8-ANS, para estudar as propriedades dos sistemas de misturas selecionados. Soluções de betaína de Reichardt (**RB**, fenolato de 2,6-4-(2,4,6-trifenilpiridíneo, *lista de compostos*) são solvatocrômicas, termocrômicas, piezocrômicas e halocrômicas, o que significa que o λ^{abs} da banda do complexo de transferência de carga intramolecular de **RB** depende da polaridade do solvente, da temperatura, da pressão externa e da natureza e concentração de sais adicionados à

solução^[148]. O solvatocromismo de **RB** foi utilizado para determinação de um parâmetro de polaridade empírica do solvente, correlacionado ao λ^{abs} do espectro de absorção de **RB**, o $E_T(30)$ ^[149]. Os valores de $E_T(30)$ são definidos em função da energia de transição da banda do complexo de transferência de carga de **RB**, em diferentes solventes, ou misturas de solventes, definida como:

$$E_T(30) = \frac{28591}{\lambda_{abs}} \quad \text{Eq. 25}$$

A temperatura de 25 °C, 1 bar de pressão, em que λ_{abs} corresponde ao máximo de absorção de **RB** na respectiva mistura ou solvente puro, em nm, valor de $E_T(30)$ é dado em kcal mol⁻¹.^[149] Foram adquiridos espectros de absorção de **RB** nas misturas binárias (Figura 27), a fim de calcularmos o fator de polaridade empírica para os sistemas de solventes com o λ^{abs} .

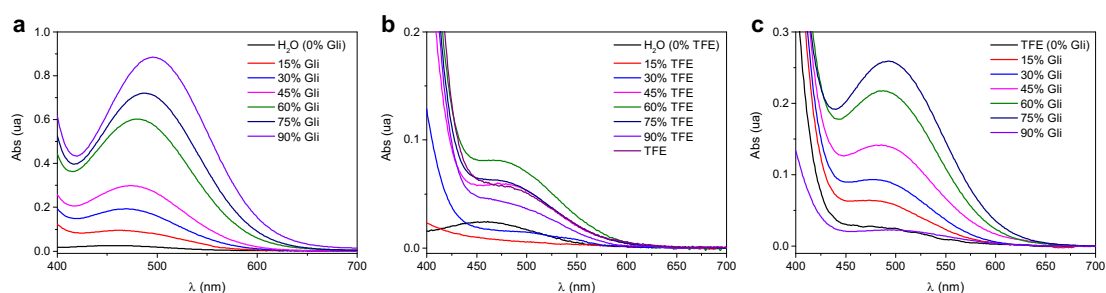


Figura 27. Espectros de absorção de **RB** nas misturas binárias. a) glicerol/água, b) 2,2,2-trifluoretanol/água e c) 2,2,2-trifluoretanol/glicerol. $[RB] = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Tanto os λ^{abs} , quanto os valores de absorção variam nas diferentes proporções das misturas. O coeficiente de atenuação molar (ϵ) é bem menor na presença de TFE que de H₂O, apesar da baixa solubilidade de **RB** em meio aquoso; o aumento da proporção de glicerol também parece aumentar o ϵ de **RB**. Por exemplo, foram efetuadas diversas tentativas de aquisição do espectro de absorção de **RB** na mistura 15%TFE/85% H₂O sem sucesso; a baixa solubilidade de **RB** em água e o efeito do TFE

sob o ϵ da sonda podem justificar a impossibilidade de aquisição desse dado. Contudo, como o conjunto de dados contempla outras dezenove medidas, o estudo do efeito da polaridade não foi prejudicado.

Com a obtenção dos λ^{abs} de **RB** nas misturas binárias, calculamos o fator de polaridade empírica, $E_T(30)$ pela Eq. 25. Correlacionamos a fração molar (χ) de um dos componentes de cada mistura com os valores de $E_T(30)$ calculados (Figura 28). Como esperado pela variação da permissibilidade relativa, a maior variação do $E_T(30)$ entre as misturas é encontrado na mistura glicerol/água, em que o $E_T(30)$ aumenta de 57 kcal mol⁻¹, em glicerol puro^[149], para 62,9 kcal mol⁻¹, para água pura, cerca de 6 kcal mol⁻¹. Nos outros dois sistemas de misturas binárias a variação de $E_T(30)$ é de cerca de 2 x menor, já que o $E_T(30)$ de TFE é 59,8 kcal mol⁻¹. Nota-se que, a variação do $E_T(30)$ não é linear em relação à fração molar dos componentes das misturas, em nenhum dos três sistemas estudados o que revela a não idealidade destes sistemas (Figura 28). Em outras palavras, a medida do valor de $E_T(30)$ seria uma reta se a contribuição de cada solvente para o resultado final fosse uma média ponderada do valor de $E_T(30)$ dos solventes puros (Figura 28, linhas pontilhadas). Os dados mostram que a glicerina desloca a água na primeira camada de solvatação da sonda, que o TFE desloca a água e o glicerol. Resultados que mostram que solventes menos polares tendem a deslocar a água são bastante conhecidos e se relacionam com a formação de uma espécie mista entre os dois solventes.^[150,151]

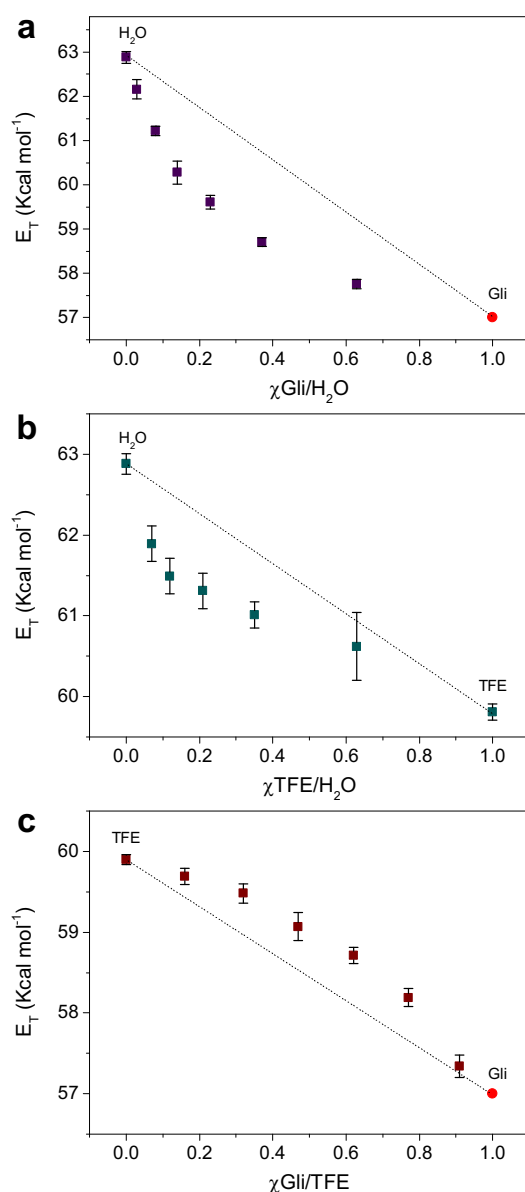


Figura 28. Correlação entre o $E_T(30)$ com a fração molar (χ) das misturas binárias. a) glicerol/água, b) 2,2,2-trifluoretanol/água e c) 2,2,2-trifluoretanol/glicerol. Linha preta pontilhada indica a regressão linear dos valores de $E_T(30)$ dos solventes puros. O ponto que corresponde a glicerol puro está em vermelho, pois não foi determinado experimentalmente, foi obtido da literatura.^[149]

Após a caracterização da polaridade empírica das misturas binárias, foram adquiridos espectros de absorção e emissão de 1,8-ANS nas mesmas misturas, em temperatura ambiente e, em seguida foram determinados os valores de rendimento quântico de fluorescência (Figura 29). Ainda, medidas de tempo de vida do estado excitado singlete foram realizadas (Figura 30).

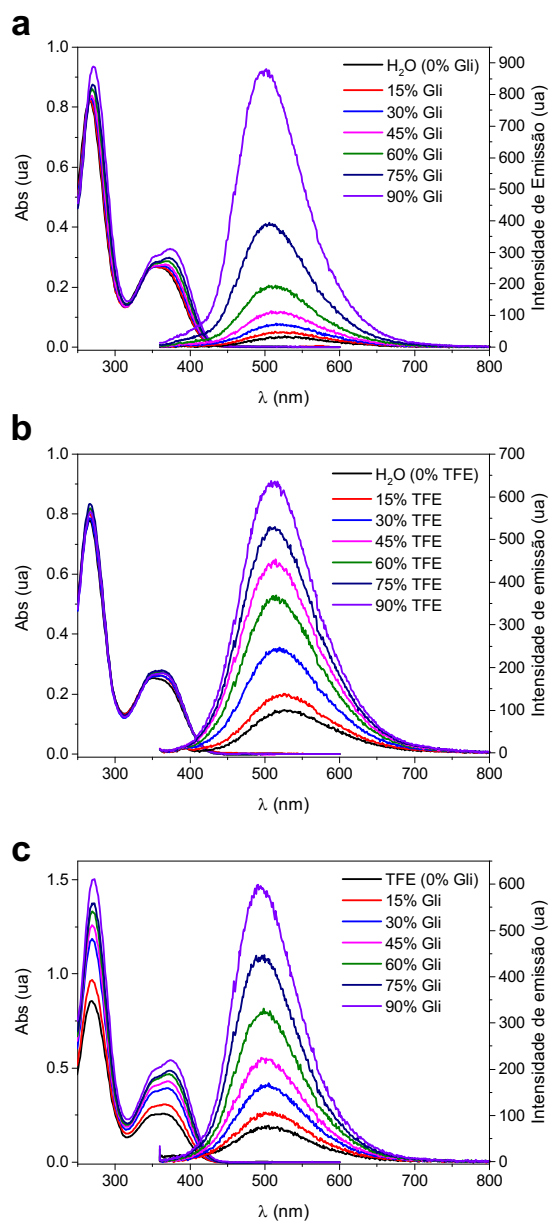


Figura 29. Espectros de absorção e emissão de **1,8-ANS** nas misturas binárias. a) glicerol/água, b) 2,2,2-trifluoroetanol/água e c) 2,2,2-trifluoroetanol/glicerol. $[1,8-ANS] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

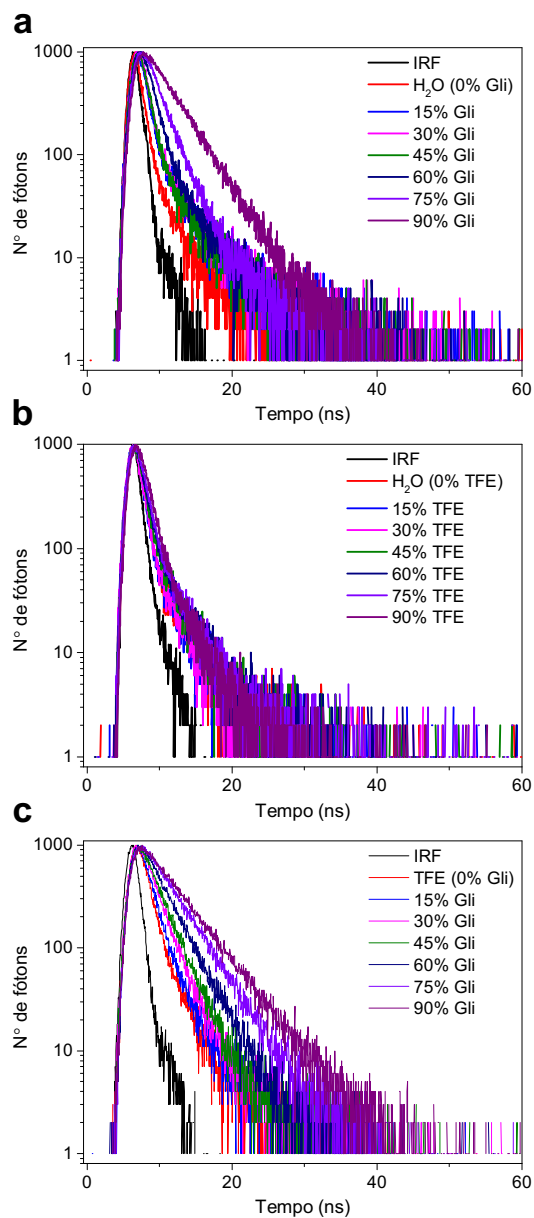


Figura 30. Decaimentos do tempo de vida de fluorescência de **1,8-ANS** nas misturas binárias. a) glicerol/água; b) 2,2,2-trifluoretanol/água e c) 2,2,2-trifluoretanol/glicerol. $\lambda^{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$; $\lambda^{\text{fl}} = 510 \text{ nm}$. $[\mathbf{1,8-ANS}] = 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Os dados obtidos são apresentados em função da fração molar de um dos solventes na Figura 31. Observa-se que a diminuição da polaridade do meio e o aumento da viscosidade resultam no aumento do rendimento quântico de fluorescência, bem como do tempo de vida do estado singlete.

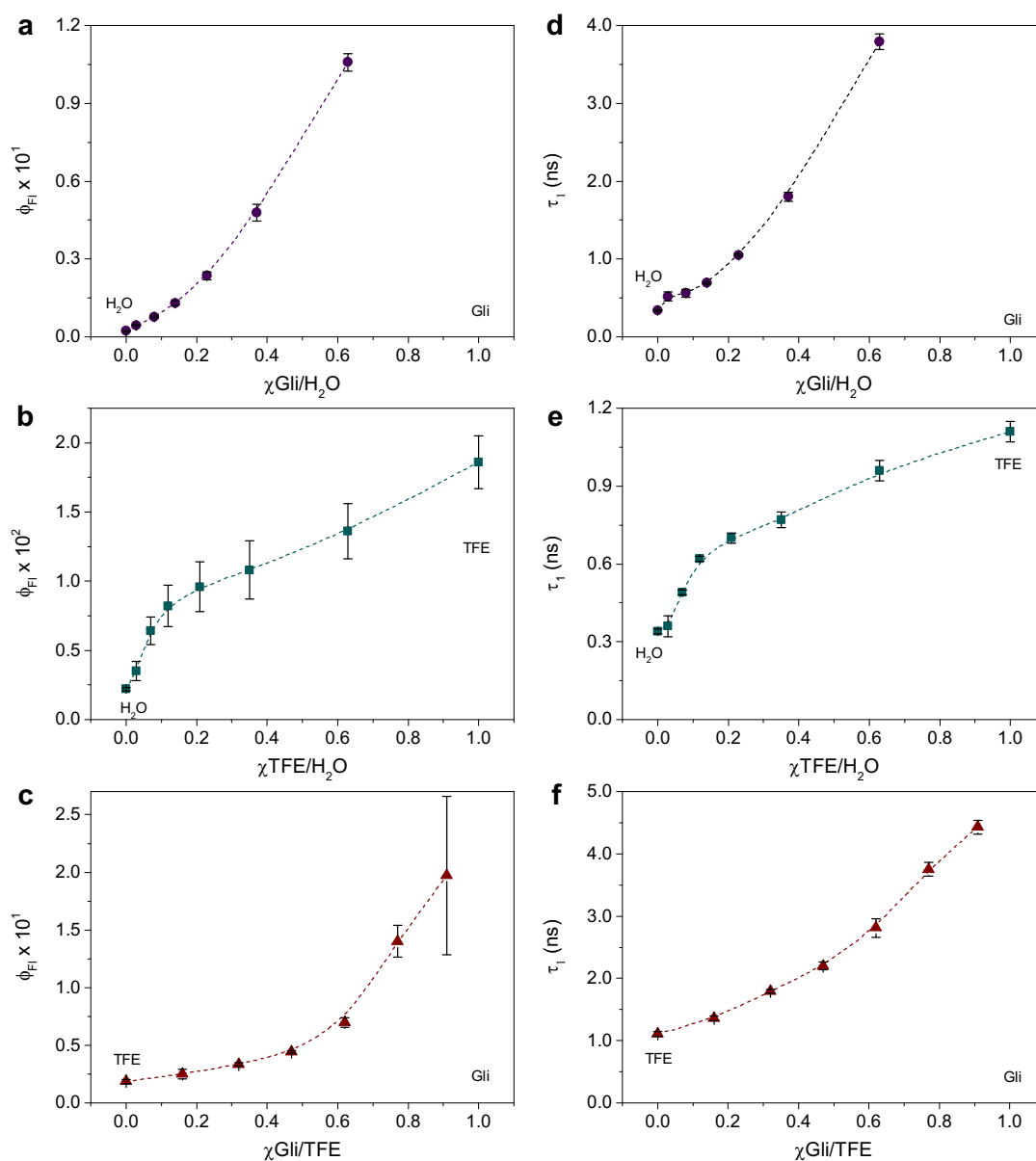


Figura 31. Relação entre os rendimentos quânticos (ϕ_{FI}) e tempo de vida de fluorescência (τ_1) de **1,8-ANS** em relação a fração molar (χ) das misturas. a), b) e c) ϕ_{FI} de **1,8-ANS** e d), e) e f) τ_1 de **1,8-ANS** nas misturas binárias glicerol/água, 2,2,2-trifluoretanol/água e 2,2,2-trifluoretanol/glicerol, respectivamente.

Foi realizado um ajuste linear multivariado baseado na equação de Förster-Hoffman (Eq. 24) adicionando-se o valor de $E_T(30)$. Este parâmetro permite que os dados de rendimento quântico sejam ajustados quando a viscosidade do meio é baixa, uma eliminação do modelo de Förster-Hoffman. A equação resultante tem um coeficiente de determinação ajustado ($Adj-R^2$) igual a 0.9820.

$$\log(\Phi_{Fl}) = 12.963 - 0.24647 E_T(30) + 0.15003 \log \eta \quad \text{Eq. 26}$$

Foram determinados valores de β estatístico que permitem comparar a magnitude dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento quântico. A soma dos valores de beta em módulo é igual a 1. O valor de β para o parâmetro $\log h$ é 0,27 e para $E_T(30)$ é -0,73. Este resultado sugere que a polaridade é mais importante para o rendimento quântico do que a viscosidade do meio no caso de 1,8-ANS. Além disso, o aumento da viscosidade resulta em aumento do valor de Φ_{Fl} , enquanto o aumento do $E_T(30)$ o diminui. O modelo foi usado para analisar o comportamento de **cBeet120**. Foram adquiridos espectros de absorção e emissão de **cBeet120** nas mesmas misturas, em temperatura ambiente e, em seguida foram determinados os valores de rendimento quântico de fluorescência (Figura 32) e tempo de vida do estado excitado singlete (Figura 33).

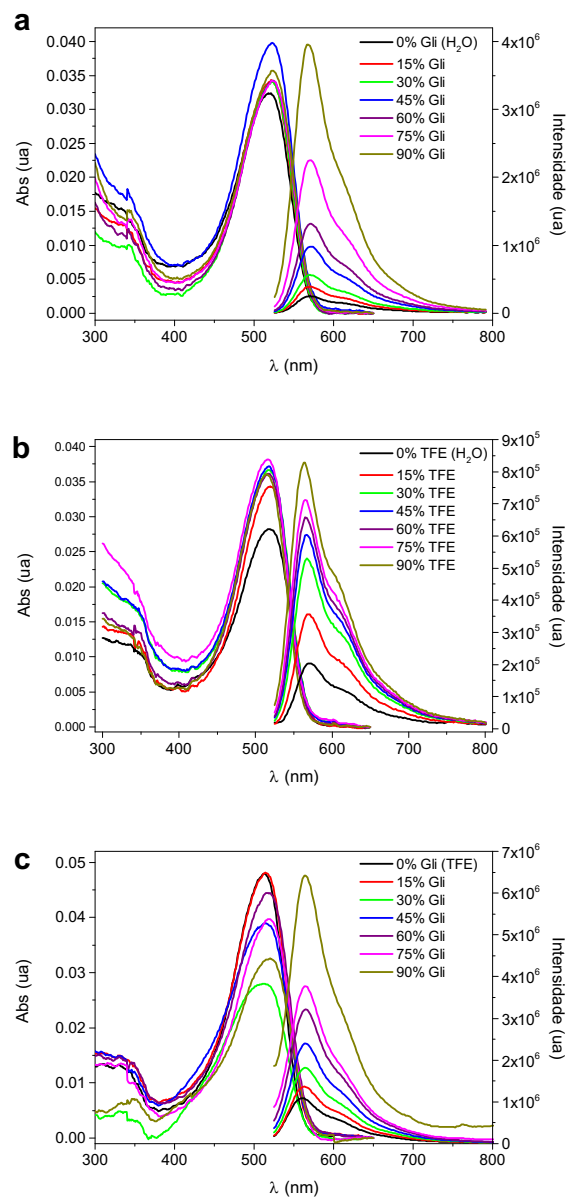


Figura 32. Espectros de absorção e emissão de **cBeet120** nas misturas binárias. a) glicerol/água; b) 2,2,2-trifluoretanol/água e c) 2,2,2-trifluoretanol/glicerol.

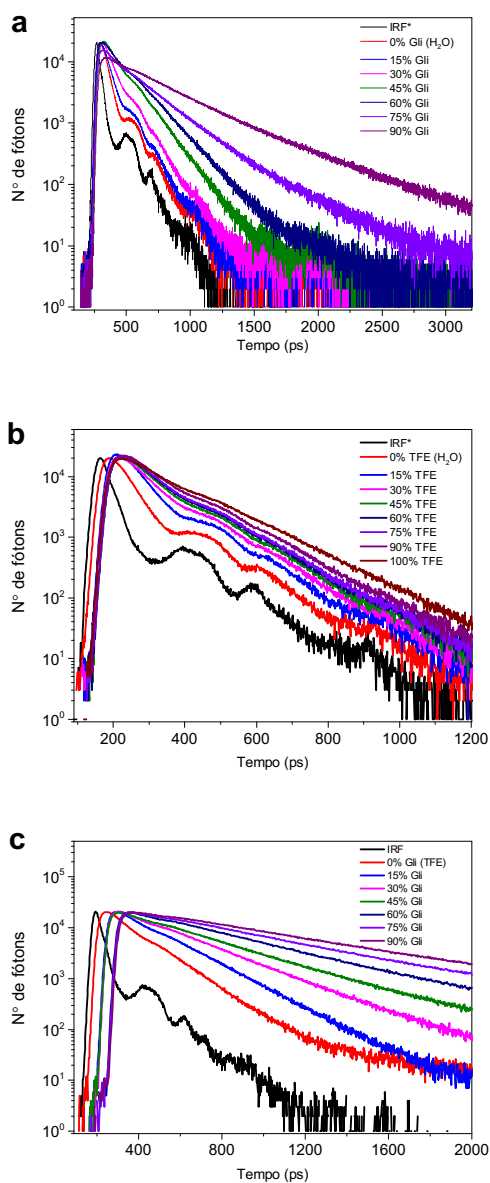


Figura 33. Decaimentos do tempo de vida de fluorescência de **cBeet120** nas misturas binárias. a) glicerol/água; b) 2,2,2-trifluoretanol/água e c) 2,2,2-trifluoretanol/glicerol. IRF*: obtido no decaimento de **cBeet120** em água e IRF: obtido no decaimento de **cBeet120** em 2,2,2-trifluoretanol. $\lambda^{ex} = 532 \text{ nm}$; $\lambda^{fl} = 570 \text{ nm}$.

Os dados obtidos são apresentados em função da fração molar de um dos solventes na Figura 34. Observa-se que, novamente, a diminuição da polaridade do meio e o aumento da viscosidade resultam no aumento do rendimento quântico de fluorescência, bem como do tempo de vida do estado singlete.

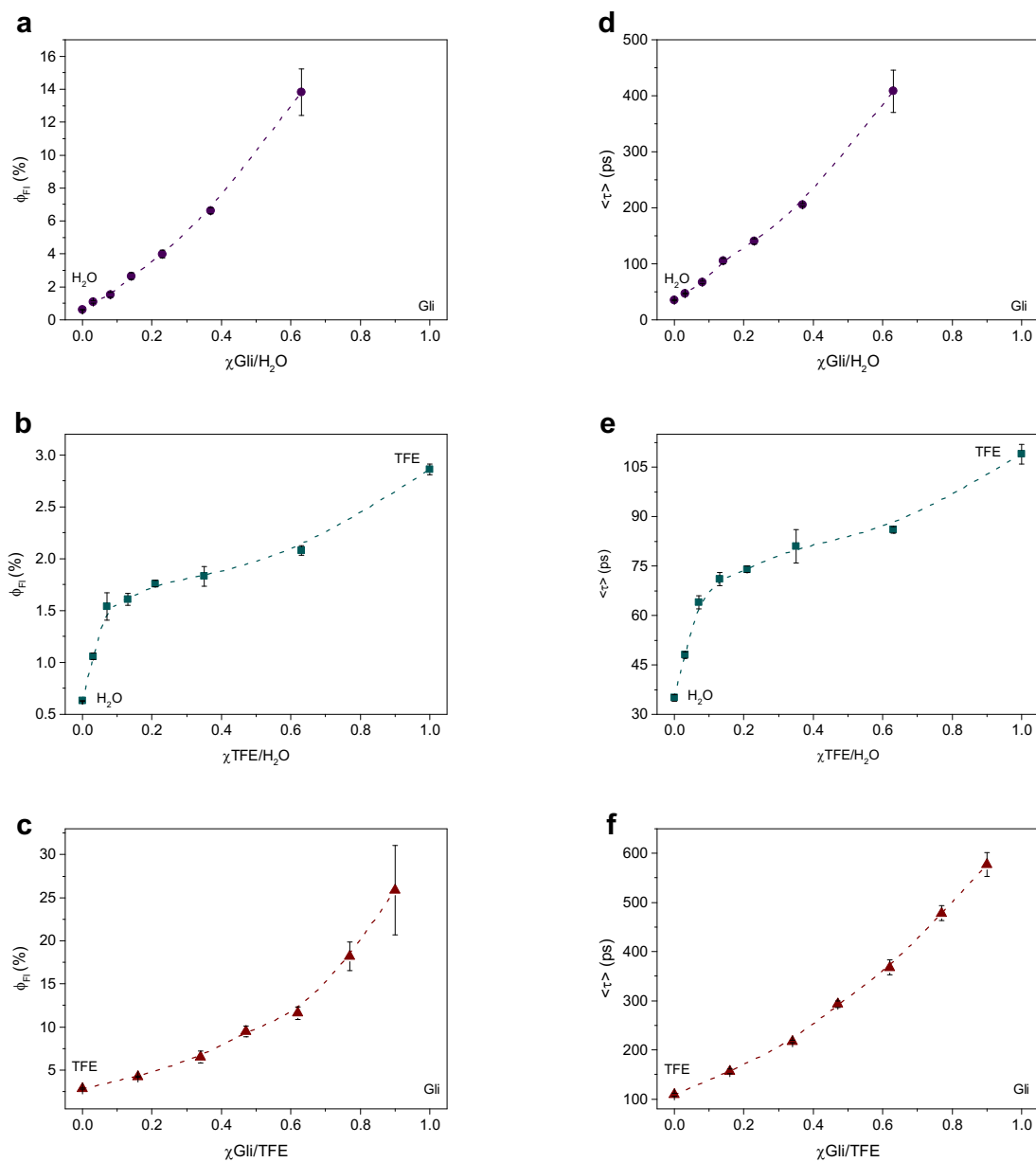


Figura 34. Relação entre os rendimentos quânticos (ϕ_{FI}) e tempo de vida médio de fluorescência ($\langle \tau \rangle$) de **cBeet120** em relação a fração molar (χ) das misturas. a), b) e c) ϕ_{FI} de **cBeet120** e d), e) e f) $\langle \tau \rangle$ de **cBeet120** nas misturas binárias glicerol/água, 2,2,2-trifluoretanol/água e 2,2,2-trifluoretanol/glicerol, respectivamente.

Usando o mesmo modelo foi obtida a Eq. 27, que tem um valor de Adj-R² igual a 0.9876, sugerindo um bom ajuste dos dados experimentais.

$$\log(\Phi_{FI}) = 7.845 - 0.1585 E_T + 0.1890 \log \eta \quad \text{Eq. 27}$$

Novamente, foram calculados os valores de β estatístico que resultaram em 0,43 para o

$\log \eta$ e -0.57 para $E_T(30)$ sugerindo que para o rendimento quântico de fluorescência de **cBeet120** o aumento da viscosidade é mais importante do que a diminuição da polaridade, dado que faz sentido considerando-se a alta magnitude da constante de desativação não radiativa deste composto.

Este método e a equação resultante permitem não somente prever o valor do rendimento quântico de fluorescência de fluoróforos polares como separar efeitos de viscosidade e polaridade sobre esta propriedade.

3.3.2. Efeitos de agregação em micelas reversas de AOT em heptano

Muitos fluoróforos orgânicos apresentam propriedades fotofísicas bastante diferentes dependendo da concentração em que estão presentes em solução^[152]. Em altas concentrações, fluoróforos planares, como o perileno, formam agregados que causam a supressão da emissão de fluorescência (*quenching*).^[3] Contudo, em alguns compostos ocorre o fenômeno inverso, com a restrição de rotação e de fotoisomerização, há a o aumento da intensidade de emissão de fluorescência induzida por agregação^[153,154]. Como observamos na sessão anterior, o aumento da viscosidade do meio, que acarrega numa maior restrição dos graus de liberdade rotacionais de **cBeet120**, levou a um aumento drástico no rendimento quântico de fluorescência, pela diminuição de k_{nr} ; logo, iremos também investigar o efeito da agregação na fotofísica da betalaína cumarínica.

Uma forma de favorecer a agregação de fluoróforos solúveis em água, é o confinamento dos compostos em micelas reversas^[155,156,157]. Micelas reversas são constituídas por um solvente polar, neste caso a água, e um tensoativo solubilizado em solvente orgânico (*e.g.* AOT, dioctilsulfocinato de sódio, em heptano); a interação dos grupos da cabeça polar do tensoativo com as moléculas de água resulta numa região bem definida em que há a formação de um “poço polar” na cavidade da micela^[158]. O

número de moléculas de água presente em soluções micelares do tensoativo AOT é descrita pelo parâmetro W_0 , definido como:

$$W_0 = \frac{[H_2O]}{[AOT]} \quad \text{Eq. 28}$$

Considerando-se que a micela reversa de AOT apresenta-se na forma esférica, o “poço de água”, em que há o confinamento de espécies hidrofílicas, é também caracterizado por uma esfera, cercada por monocamadas de tensoativo^[156]. O raio hidrodinâmico (R_H) da micela desse compartimento aquoso é diretamente proporcional ao W_0 seguindo a Eq. 29:^[159]

$$R_H = 1,5 + 0,175W_0 \quad \text{Eq. 29}$$

O confinamento aquoso de **cBeet120** na cavidade de micelas reversas de AOT ocasionou no deslocamento batocrômico do λ^{abs} em relação à água (de 520 nm, em água, para 524 nm, na micela), e levou ao aparecimento de uma banda de absorção com $\lambda^{abs} = 628$ nm, em todos os valores de W_0 estudados (Figura 35), que pode se relacionar ao aparecimento de um agregado de **cBeet120**. Essa banda não está presente na ausência de betalaína.

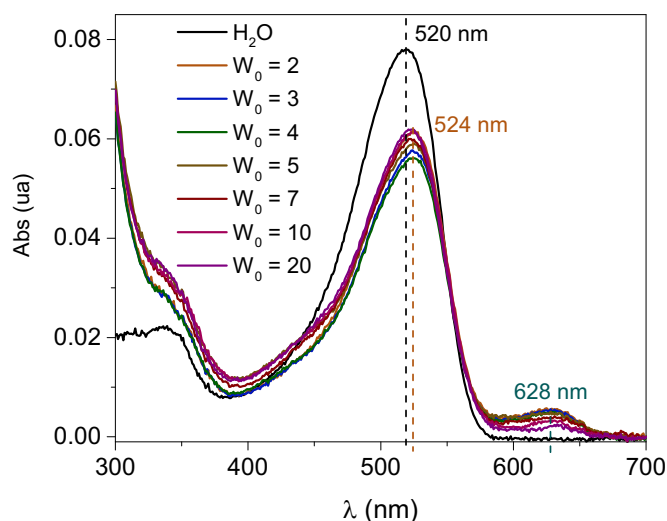


Figura 35. Espectros de absorção de **cBeet120** em meio aquoso e em micelas reversas de AOT/heptano. $[cBeet120] = 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[AOT] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em heptano; $W_0 = [H_2O]/[AOT]$.

Ao avaliarmos os espectros de emissão e excitação de **cBeet120** nas soluções micelares, em relação ao estudo em água, observamos que a intensidade de emissão aumenta com a diminuição do W_0 (Figura 36); o espectro de emissão apresenta deslocamento hipsocrômico do λ^{Fl} em relação ao meio aquoso, de 570 nm para 564 nm, de água para $W_0 = 2$, respectivamente. A diminuição da polaridade do meio, com a também diminuição de W_0 pode estar relacionada a variação do máximo de λ^{Fl} de **cBeet120**. Os espectros de absorção estão deslocados para o vermelho, enquanto os de emissão estão deslocados para o azul em $W_0 = 2$, ao compararmos com o meio aquoso. Contudo, ao compararmos o deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) em água, $\Delta\nu = 1687 \text{ cm}^{-1}$ com o observado em $W_0 = 20$, $\Delta\nu = 1557 \text{ cm}^{-1}$ ou ainda em $W_0 = 2$, $\Delta\nu = 1286 \text{ cm}^{-1}$, a diminuição do $\Delta\nu$ pode estar correlacionada a diminuição da micropolaridade no ambiente micelar em relação ao meio aquoso.

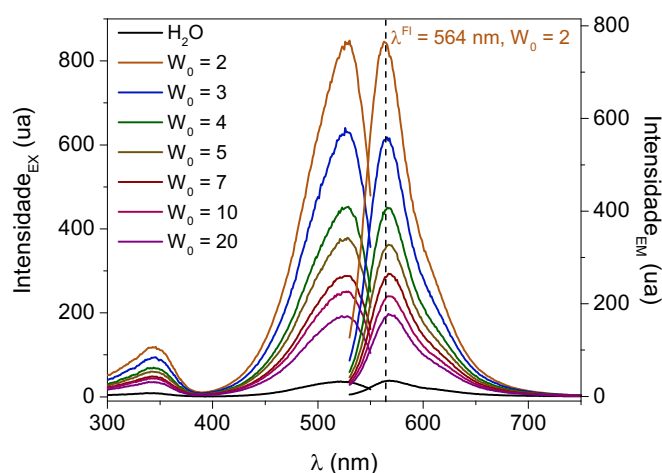


Figura 36. Espectros de emissão e excitação de **cBeet120** em meio aquoso e em micelas reversas de AOT/heptano. $[\text{cBeet120}] = 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{AOT}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em heptano; $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$. $\lambda^{ex} = 510 \text{ nm}$; $\lambda^{Fl} = 570 \text{ nm}$.

Por conta do aumento significativo da intensidade de emissão de **cBeet120** nas soluções micelares, também determinamos o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl}) da betalaína nos diferentes W_0 estudados. Como esperado, o ϕ_{Fl} da **cBeet120** aumenta

com a diminuição do volume da cavidade aquosa da micela reversa (Figura 37); há um aumento significativo dos valores em comparação ao ϕ_{FI} determinado em água: para $W_0 = 20$, o ϕ_{FI} determinado é quase $7\times$ maior que o encontrado em água ($\phi_{FI} = 4,4 \times 10^{-2}$, em $W_0 = 20$), e **cBeet120** em $W_0 = 2$, apresenta um aumento de quase $30\times$ em relação ao ϕ_{FI} em meio aquoso ($\phi_{FI} = 18,4 \times 10^{-2}$, em $W_0 = 2$), efeito comparável apenas ao observado na mistura binária que apresenta maior viscosidade dentre todas as estudadas ($\phi_{FI} = 21 \times 10^{-2}$, em $\chi_{\text{glicerol/TFE}} = 0,9$, $\eta = 1.046$ cP). A aparente saturação do aumento do ϕ_{FI} entre $W_0 = 10$ e $W_0 = 20$ pode ainda estar correlacionado à polaridade da cavidade da micela reversa, uma vez que em $W_0 \geq 10$ também há saturação no aumento da micropolaridade com o aumento da concentração de água na micela^[160,161].

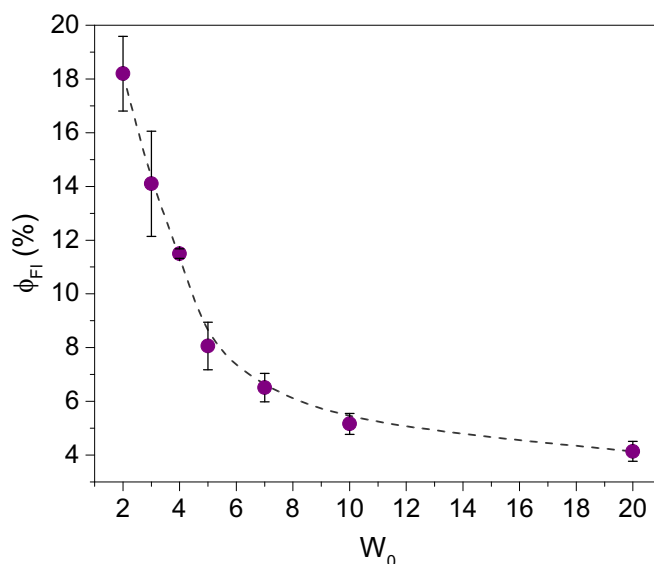


Figura 37. Correlação entre o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{FI}) de **cBeet120** e o valor de W_0 ($[H_2O]/[AOT]$) das micelas reversas de AOT/heptano.

A menor micela reversa, com R_H de cerca de 1 nm, apresenta 50–100 moléculas de água, enquanto que micelas maiores, com $R_H = 14$ nm, possuem cerca de 400.000 moléculas de água^[162]. As moléculas de água presentes na cavidade da micela reversa são classificadas em três categorias^[163,164]: tipo I, as que interagem fortemente com a

cabeça polar do tensoativo; tipo II, as moléculas de água de solvatação, que aparecem com o aumento de W_0 ; e o tipo III, as moléculas de água presentes na interface da micela. Há na literatura ensaios que estudam a mudança da micropolaridade do ambiente micelar, com a variação de W_0 , por meio do estudo da constante dielétrica (ϵ_r)^[164], ou do $E_T(30)$ ^[161]. Em ambas as publicações, o aumento de W_0 acarreta num aumento da polaridade, atingindo um plateau no aumento da ϵ_r quando $W_0 = 12$ ^[164] e do $E_T(30)$, com $W_0 = 10$ ^[161]. Nos ensaios, variamos o R_H da micela entre 1,85 ($W_0 = 2$) a 5 nm ($W_0 = 20$), de acordo com o determinado pela Eq. 29, com também aumento da polaridade do meio com o W_0 . O confinamento da **cBeet120** em micelas reversas parece então ter o mesmo efeito do aumento da viscosidade sob o ϕ_{FI} , com a restrição dos graus de rotacionais, há menor dissipação de energia em processos não radiativos; dessa forma, o ϕ_{FI} aumenta. Ainda, o aumento do ϕ_{FI} pode estar relacionado também ao menor grau de solvatação do estado excitado de **cBeet120**, por conta menor disponibilidade de moléculas de água para solvatação, e conseqüente menor polaridade do meio, em valores de W_0 menores. Estes resultados parecem concordar com os resultados obtidos na presença de BSA, sugerindo que betalaínas do tipo cBeet e csBeet124 tentem a fluorescer em ambientes pouco polares (com menor quantidade de água) e com volume livre reduzido.

3.4. Propriedades óticas não lineares de betalaínas: absorção de dois fótons

A absorção de dois fótons de algumas aminocumarinas, em etanol, é descrita na literatura^[165,166]. A sessão de choque de dois fótons (σ_2) determinada para **C120** e **C151** em etanol é de 20 GM e 47 GM^[167]. Como as betalaínas cumarínicas possuem um cromóforo capaz de absorver dois fótons em suas estruturas e são derivados de

cumarinas solúveis em água, investigamos se as betalainas derivadas da **C120** e **C151** também absorvem dois fótons.

Foram registrados os espectros de excitação dos compostos entre 710–990 nm, com máximo de emissão fixo no comprimento de onda máximo da emissão obtida com absorção linear ($\lambda^{\text{em}} = 570$ nm). Inicialmente, foi verificada se a relação entre a intensidade de emissão e a potencia de excitação apresenta resposta quadrática, caracterizando a absorção de dois fótons^[168] das cBeets (Figura 38).

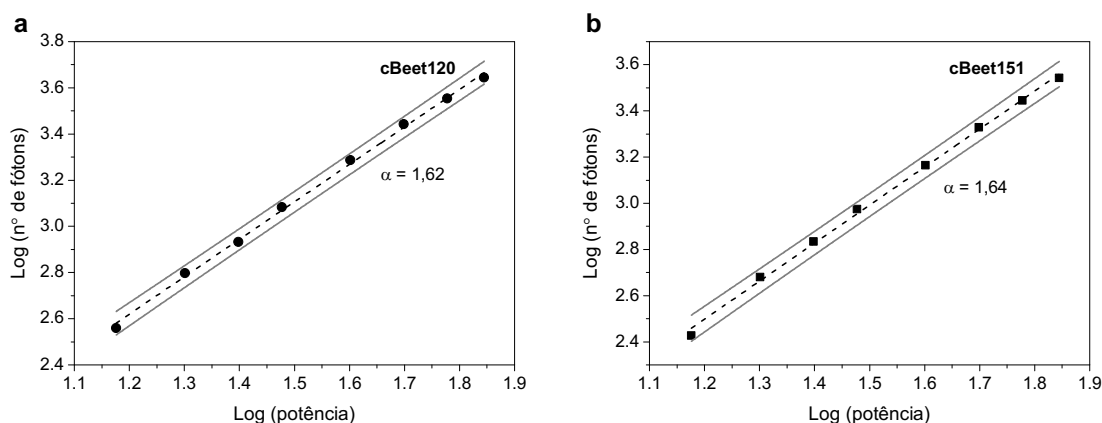


Figura 38. Relação quadrática entre a potência e a número de fótons emitidos das betalainas (a) **cBeet120** e (b) **cBeet151**. $\lambda^{\text{ex}} = 710$ nm / $\lambda^{\text{em}} = 570$ nm. Faixa de potencia do laser: 15–70 mW.

Em seguida, a sessão de choque de dois fótons (σ_2) de cBeets, em meio aquoso foi calculada utilizando-se um procedimento baseado no uso de rodamina 6G em metanol como padrão secundário^[166] (Figura 40). A σ_2 determinada para **cBeet120** é de 323 GM e 179 GM para **cBeet151**, em 710 nm (Figura 39). Apesar dos valores de σ_2 serem menores do que os reportados para moléculas centrossimétricas em solventes orgânicos^[16], as cBeets tem a vantagem de serem solúveis em água e serem obtidas de fontes renováveis. Ainda, a σ_2 de cBeets é ao menos 5× maior que o determinado para fluoresceína, fluoróforo solúvel em solução aquosa alcalina com $\phi_{\text{FI}} = 0,95$ ^[11], que é de 36 GM em 750 nm^[166]. A σ_2 efetiva (ε_2), ou o brilho de emissão com excitação de 2

fótons ($2PA \text{ Brightness}, \phi_{F1} \times \sigma_2$), corresponde a 2,03 GM para **cBeet120** e 3,83 GM para **cBeet151**.

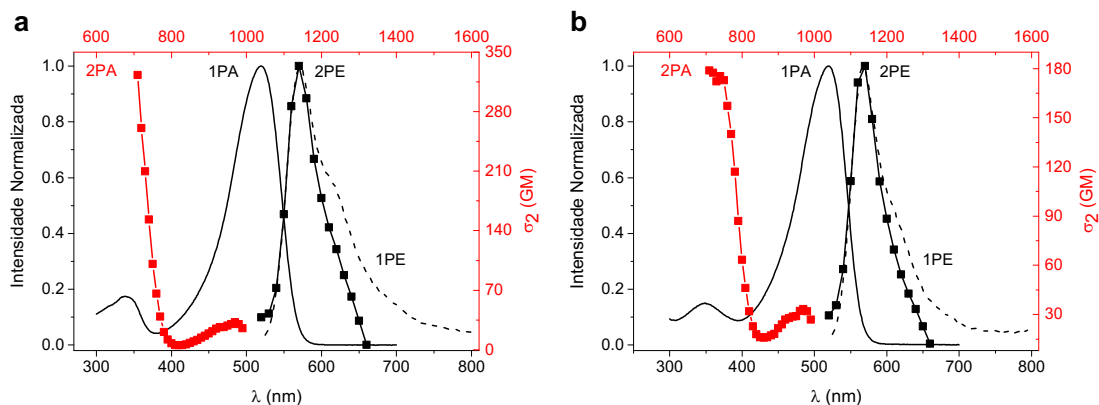


Figura 39. Espectros de absorção e emissão de um e dois fótons de cBeets em água. a) **cBeet120** e b) **cBeet151**. 2PA: espectro de absorção de 2 fótons; 1PA: espectro de absorção de 1 fóton; 2PE: espectro de emissão com excitação de 2 fótons de 710 nm; 1PE: espectro de emissão com excitação de 1 fóton de 510 nm.

O comprimento de onda máximo de absorção de 2 fótons (2PA) é difícil de prever e normalmente está deslocado para o azul em relação ao dobro do comprimento de onda de excitação com 1 fóton^[169], como ocorre com o máximo de 2PA para as cBeets. Os espectros de emissão com excitação de um ($\lambda^{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$) e dois fótons ($\lambda^{\text{ex}} = 710 \text{ nm}$) apresentam perfis semelhantes, tanto para **cBeet120** quanto para **cBeet151**. A ausência do ombro vibrônico próximo a 650 nm no espectro de emissão de dois fótons deve-se provavelmente ao filtro usado para cortar a excitação pelo laser em 700 nm (Figura 39). **C120** tem máximo de absorção de um fóton em 344 nm em meio aquoso; portanto, o máximo de 2PA poderia indicar que a seção de choque calculada para **cBeet120** em 710 nm ($\sigma_2 = 323 \text{ GM}$) pode corresponder à excitação não linear da **C120**. Neste caso, o espectro de emissão resultante da excitação de dois fótons de 710 nm poderia ser resultado da transferência de energia de **C120** (presente no meio como impureza ou vinda da hidrólise da betalaina) para **cBeet120** caso o espectro de emissão

da cumarina se sobreponha ao espectro de absorção da betalaína, o que ocorre. O fato da energia dos dois fótons absorvidos pela **cBeet151** corresponder a energia de excitação da **C151** corrobora a hipótese da transferência de energia. Contudo, ao compararmos as σ_2 de cBeets com suas respectivas cumarinas (Figura 40), observamos que o valor obtido de σ_2 para as cBeets é pelo menos $3\times$ maior se comparado ao σ_2 calculado nos máximos de emissão de cBeets ($\lambda^{\text{em}} = 570$ nm) e das cumarinas ($\lambda^{\text{em}} = 450$ nm), e cerca de $6\times$ maior se fixarmos o $\lambda^{\text{em}} = 570$ nm. Este resultado dá suporte à hipótese da emissão se originar diretamente das betalaínas e não ser resultado de transferência de energia.

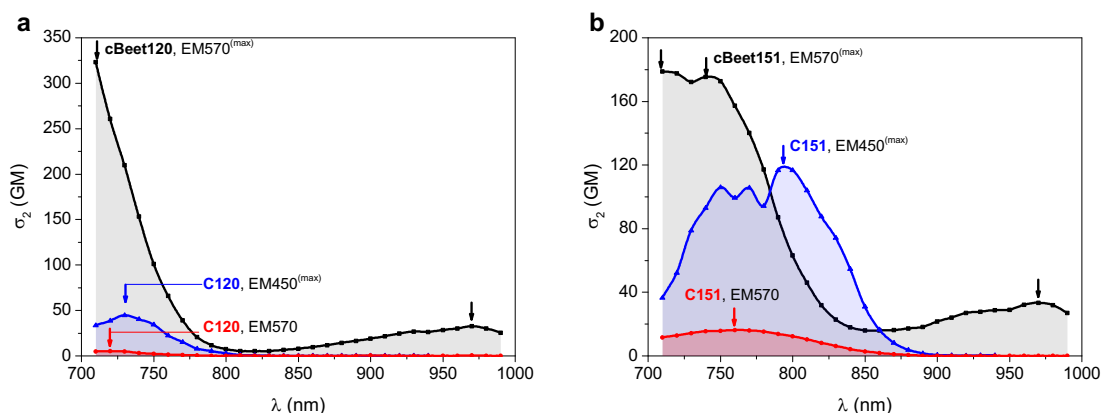
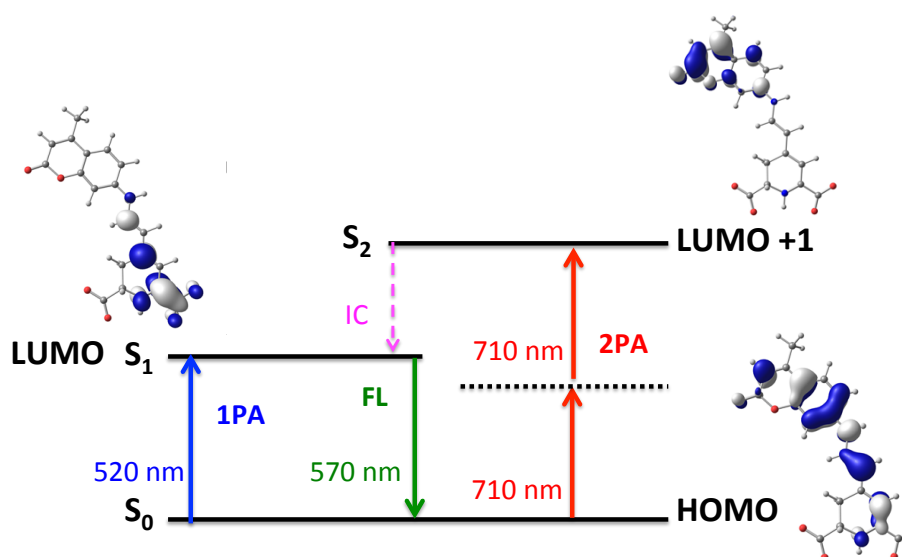


Figura 40. Comparação da sessão de choque de 2 fótons (σ_2) de cBeets com as respectivas cumarinas. a) **cBeet120** e b) **cBeet151**. As σ_2 foram determinadas no máximo de emissão das cBeets (570 nm) e também no máximo de emissão das cumarinas (450 nm).

Cálculos teóricos (ZINDO/PCM(W)//cam-B3LYP/6-31+G(d,p)) das energias das transições eletrônicas da **cBeet120** mostram que a energia da transição $S_0 \rightarrow S_1$ (HOMO-LUMO) corresponde a um comprimento de onda de 534 nm, enquanto que a energia da transição $S_0 \rightarrow S_2$ (HOMO-LUMO+1) possui energia que corresponde a $\lambda = 388$ nm. Logo, ao excitarmos a **cBeet120** com dois fótons de $\lambda^{\text{ex}} = 710$ nm, que corresponde a mesma energia de um fóton de $\lambda^{\text{ex}} = 355$ nm, estaríamos fornecendo energia suficiente para levar ao estado eletronicamente excitado S_2 (LUMO+1), que por

conversão interna é desativado ao estado eletronicamente excitado S_1 (LUMO); que então pode voltar ao estado fundamental (S_0 , HOMO) emitindo fluorescência em $\lambda^{Fl} = 570$ nm (Esquema 10). A análise da densidade de orbital para o HOMO, LUMO e LUMO+1 da cBeet120 mostra que a densidade de orbital está bem distribuída por toda molécula no HOMO mas se encontra localizada na porção betalaínica no LUMO e na cumarina no LUMO+1, sugerindo que a transição que resulta da absorção de dois fótons produz uma espécie no estado excitado cujo vetor de transição aponta no sentido da cumarina, parecendo-se com a excitação da própria aminocumarina. A relaxação deste estado para o estado S_1 acontece via desativação vibracional e resulta na emissão em 570 nm. O fato da transição HOMO-LUMO+1 ter uma maior contribuição da porção cumarínica da betalaína explica o máximo de excitação de dois fótons e se apresenta como uma alternativa à ocorrência de transferência de energia intermolecular. Como a fonte de excitação bifotônica, laser Ti:safira, apresenta λ^{ex} na faixa de 710–990 nm não pudemos verificar se seria possível obter excitação bifotônica da betalaína com a energia da transição $S_0 \rightarrow S_1$, que seria superior a $\lambda^{ex} = 1010$ nm.



Esquema 10. Diagrama de níveis de energia proposto para as transições com absorção de um e dois fótons e densidade de orbital do HOMO, LUMO e LUMO+1 da cBeet120 em nível mp2/6-31+g(d,p).

Compostos que apresentam emissão de fluorescência com excitação bifotônica podem ser usados como marcadores em microscopia de fluorescência^[170]. As principais sondas fluorescentes comerciais, que apresentam seletividade na marcação de organelas, possuem $\sigma_2 < 20$ GM, com excepcionalmente alguns fluoróforos com $\sigma_2 = 200$ GM.^[171] O desenvolvimento de novos marcadores fluorescentes com absorção de dois fótons para aplicação de microscopia de fluorescência, na marcação de diferentes compartimentos intracelulares, é de grande interesse de diversos grupos^[172]. Por exemplo, extratos vegetais fluorescentes de *Cryptolepis sanguinolenta* com $\varepsilon_2 < 0,3$ GM, foram usados como sondas de microscopia confocal de fluorescência com excitação bifotônica^[173].

Dessa forma, sabendo a bicompatibilidade de **cBeet120**, também verificamos a potencial aplicação da **cBeet120** e **cBeet151** como sondas de marcação de fluorescência com excitação bifotônica. Os ensaios de microscopia confocal de fluorescência foram realizados pela Dra. Nathana Pettigiani, utilizando células de glioma humano (linhagem U-87). As duas sondas acumulam no interior das células. Contudo, **cBeet120** marca principalmente o núcleo, enquanto a marcação de **cBeet151** é difusa no citoplasma (Figura 41). Imagens feitas com excitação de um ou dois fótons resultam no mesmo padrão de marcação. A discussão do padrão de marcação celular e dos mecanismos de entrada na célula estão fora do escopo desta tese, mas as imagens de microscopia da Figura 41 indicam que tanto **cBeet120**, quanto a **cBeet151** podem ser utilizadas como sondas fluorescentes com excitação bifotônica em aplicações de biologia celular.

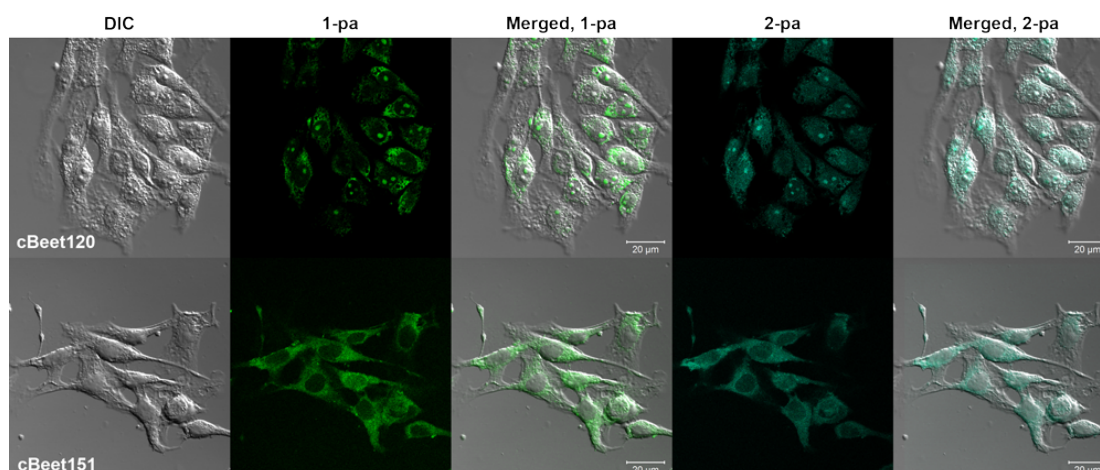


Figura 41. Microscopia confocal de fluorescência de células fixadas de U-87, marcadas com **cBeet120** e **cBeet151**. 1-PA: excitação com 1 fóton, $\lambda^{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; 2-PA: excitação com 2 fótons, $\lambda^{\text{ex}} = 800 \text{ nm}$. $[\text{cBeet}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de incubação: 3 min. DIC: microscopia de contraste diferencial, 1-pa: microscopia confocal de fluorescência com excitação de 1 fóton; 2-pa: microscopia confocal de fluorescência com excitação de 2 fótons.

csBeet124 e **cbzBeet** também apresentam absorção de dois fótons. As σ_2 também foram determinadas em meio aquoso, seguindo as mesmas condições experimentais, como 152 GM ($\varepsilon_2 = 0,51 \text{ GM}$) e 114 GM ($\varepsilon_2 = 0,36 \text{ GM}$), para **csBeet124** e **cbzBeet**, respectivamente, em 710 nm. Contudo, seus espectros de emissão com excitação bifotônica não foram adquiridos, nem há comparação da σ_2 das cBeets com suas respectivas aminas; além disso, **csBeet124** e **cbzBeet** não apresentam marcação celular nos ensaios realizados com linhagem U-87, por isso tais resultados não foram apresentados na tese.

4. Conclusões

A semissíntese de betalaínas do tipo cBeet ou csBeet pode ser realizada com sucesso em acetato de etila empregando-se ácido *p*-toluenossulfônico como catalisador ácido. A etapa de purificação é a mais crítica para a obtenção dos compostos mas pode ser feita empregando-se cromatografia em coluna com gel de Sephadex LH20. O substituinte afeta pouco as propriedades eletrônicas dos compostos, o que pode se observar pela similaridade dos parâmetros fotofísicos e eletroquímicos dos compostos. A estabilidade dos compostos frente à hidrólise parece aumentar com o aumento da hidrofobicidade da amina precursora. O derivado contendo o grupo $-CF_3$ apresenta alto rendimento quântico de fluorescência e alto brilho, sugerindo que substituintes atraentes de elétrons na porção iminica da betalaína pode aumentar a sua fluorescência. A **cBeet120** e a **cBeet151** tem seção de choque de dois fótons superior a 170 GM, raro em fluoróforos solúveis em água. Este estudo mostra que o acoplamento para a formação de betalaínas diminui a eficiência de fluorescência de aminocumarinas e aminocarboestiril. Contudo, observa-se alta solubilidade em água, absorção e emissão no visível, baixo potencial de pico anódico e seção de choque de dois fótons mais alta do que a das aminas precursoras nas mesmas condições. A interação com BSA aumenta a fluorescência dada a interação da sonda com porções menos polares da proteína. Esta suposição é corroborada pelo aumento do rendimento de fluorescência em micelas reversas de AOT com valores de W_0 baixos. O uso de misturas binárias de solvente permitiu incluir efeitos de polaridade na equação de Förster-Hoffman, permitindo modelar efeitos deste parâmetro junto à viscosidade sobre a eficiência de fluorescência. Os estudos de interação sugerem que interações intermoleculares podem resultar em um

aumento significativo da intensidade de emissão, ampliando a faixa dinâmica para o uso destes compostos em métodos analíticos. Além disso, a interação com proteína com pI relativamente baixo sugere que a interação com proteínas em meio biológico pode ser favorecida, sugerindo uma possível aplicação destes compostos. Este trabalho oferece as bases físicas para a aplicação de betalaínas no desenvolvimento de sondas e marcadores fluorescentes que ofereçam dados que permitir inferir sobre o problema em estudo sob um ponto de vista molecular.

5. Parte Experimental

5.1. Materiais

As substâncias químicas utilizadas neste trabalho, suas características são listadas na Tabela 15 .

Tabela 15. Reagentes e solventes utilizados no trabalho, sua origem e grau de pureza

Reagente/solvente	Fórmula/ Abreviatura	Fornecedor	Grau de pureza
Acetonitrila	MeCN	Tedia	HPLC
Acetato de etila	AcOEt	Vetec	HPLC
Acetato de sódio	CH ₃ COO ⁻ Na ⁺	S.A.	
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	S.A.	
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	S.A.	
Ácido clorídrico	HCl	Vetec	37%
Ácido fórmico	HCO ₂ H	Fluka	
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	S.A.	85%
Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico	-	S.A.	
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	S.A.	95-98%
Água deuterada	D ₂ O	S.A.	
Albumina sérica bovina	BSA	S.A.	
Amberlite XAD 16	-	S.A.	
6-amino-3,4-benzocumarina	Cbz	S.A.	
7-amino-4-metilcumarina	C120	S.A.	
7-amino-4-trifluormetilcumarina	C151	S.A.	
Carboestiril 124	Cs124	S.A.	
Cloreto de Ferro (III)	FeCl ₃	Synth	
Clorero de potássio	KCl	S.A.	
Cumarina 153	-	S.A.	
Diocilsulfocinato de sódio	AOT	Across	

Dihidrogenofosfato de sódio	NaH ₂ PO ₄	S.A.	
Dodecilsulfato de sódio	NaSDS	S.A.	
Etanol	EtOH	Vetec	P.A.
Fenolato de 2,6-4-(2,4,6-trifenilpiridíneo)	RB	S.A.	
Ferricianeto de potássio	K ₃ [Fe(CN) ₆]	S.A.	
Fluoresceína	-	-	
Glicerol	Gli	S.A.	
Hidrogenofosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	S.A.	
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH	Vetec	27%
Hidróxido de sódio	NaOH	S.A.	
Ludox	-	S.A.	
Metanol	MeOH	Vetec	P.A.
1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina	POPC	S.A.	
Rodamina 6G	-	S.A.	
Rodamina B	-	Fluka	
Sephadex LH20	-	G.E.	
Sulfato de quinino	-	S.A.	
Tiocianeto de amônia	NH ₃ SCN	Synth	
2,2,2-trifluoretanol	TFE	S.A.	
Triton X-100	-	S.A.	

S.A.: Sigma-Aldrich

5.2. Métodos

5.2.1. Soluções de trabalho

Todas as soluções foram preparadas com água desmineralizada (18 MΩ·cm, milli-Q, Millipore).

Geral:

- Solução aquosa de NaOH 0,2 mol L⁻¹: 4 g de NaOH foram solubilizados em 500

mL de água.

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

Análise Cromatográfica por HPLC analítico:

As soluções foram preparadas imediatamente antes das análises cromatográficas e agitadas em banho ultrassônico por 15 min antes de sua utilização.

- Solvente A (0,05% HCO₂H/H₂O): 125 µL de HCO₂H foram diluídos em 250 mL de água.
- Solvente B (0,05% HCO₂H e 60%MeCN/40%H₂O): 125 µL de HCO₂H foram diluídos em uma mistura de 150 mL de acetonitrila e 100 mL de água.

Soluções Tampão:

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

- Solução tampão Britton-Robinson (acetato-fosfato-borato, 40 mmol L⁻¹, pH 1,1 - 11): 2,5 g de H₃BO₃ (pK_a = 9,24), 2,3 mL de CH₃COOH (pK_a = 4,76, d = 1,049 g/mL) e 1,9 mL H₃PO₄ (pK_{a1} = 2,14; pK_{a2} = 7,21; pK_a = 12,36, d = 1,685 g/mL) foram dissolvidos em 1 L de água. Foram adicionados, sob agitação, porções de solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹ ajustando os valores de pH da solução tampão para o valor desejado.
- Solução tampão H₃PO₄/H₂PO₄⁻ 0,1 mol L⁻¹, pH 3: 1,4 mmol de H₃PO₄ (96 µL de H₃PO₄ 85%, wt%) e 8,6 mmol de H₂PO₄⁻ (1,032 g de NaH₂PO₄) foram adicionados em balão volumétrico (100 mL) e o volume completado com água.

- Solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5: 3,2 mmol de CH_3COOH (183 μL de ácido acético) e 6,8 mmol de CH_3COO^- (0,9253 g de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) foram adicionados em balão volumétrico (100 mL) e o volume completado com água.
- Solução tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7: 3,7 mmol de H_2PO_4^- (0,4432 g de NaH_2PO_4) e 6,3 mmol de HPO_4^{2-} (0,8943 g de Na_2HPO_4) foram solubilizados em 100 mL de água.

Coefficiente de partição na membrana

- Solução aquosa de 50 mmol L^{-1} SDS + 10% Triton X-100: 1,442 g de dodecilsulfato de sódio (NaSDS) e 1 mL de Triton X-100 foram adicionados em um balão volumétrico (100 mL) e o volume foi completado com água. A solução foi mantida a temperatura ambiente.
- Solução aquosa de ferrotiocianato de amônio: 3,04 g de NH_3SCN (0,4 mol) e 2,70 g de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mol) foram solubilizados em 100 mL de água. A solução foi mantida em temperatura ambiente e sob abrigo da luz.

Voltametria Cíclica

- Solução aquosa de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$: 1,864 g de KCl foram solubilizados em 250 mL de água; a solução foi mantida a temperatura ambiente.
- Solução aquosa de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$): 0,329 g de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ foram solubilizados em 100 mL de solução aquosa de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; a solução foi mantida a temperatura ambiente, sob o abrigo da luz.

Interação com BSA

- Solução aquosa de BSA $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$: 0,3325 g de albumina sérica bovina (MM $\approx 66,5 \text{ kDa}$) foram solubilizados em 10 mL de água; nos ensaios em pH 3,

a solução foi preparada com a adição de 25 μL de HCl 37% para ajustar o valor de pH da solução de BSA para pH = 5. A solução foi preparada imediatamente antes dos ensaios.

Obtenção de ácido betalâmico (HBt) em meio aquoso

- Solução aquosa de NaOH 2%^{m/m}: 10 g de NaOH foram solubilizados em 500 mL de água.
- Solução aquosa de CH₃COOH 1%^{m/m}: em um balão volumétrico (500 mL) foram adicionados 5 mL de CH₃COOH e o volume foi completado com água.

Propriedades das misturas binárias

- Solução estoque de 1,8-ANS 4×10^{-4} mol L⁻¹: 6 mg de ácido 8-anilino-1-naftalenosulfônico foram solubilizados em 10 mL de água ou 2,2,2-trifluoretanol.
- Solução de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹: em um balão volumétrico (25 mL) foram adicionados 1,4 mL de H₂SO₄ 95-98% (d = 1,80-1,82 g/mL) e o volume foi completado com água.
- Solução sulfato de quinino 5×10^{-4} mol L⁻¹: 2 mmg de sulfato de quinino foram solubilizados em 10 mL de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹.
- Solução estoque de RB 5×10^{-4} mol L⁻¹: 14 mg de RB foram solubilizados em 50 mL de etanol.

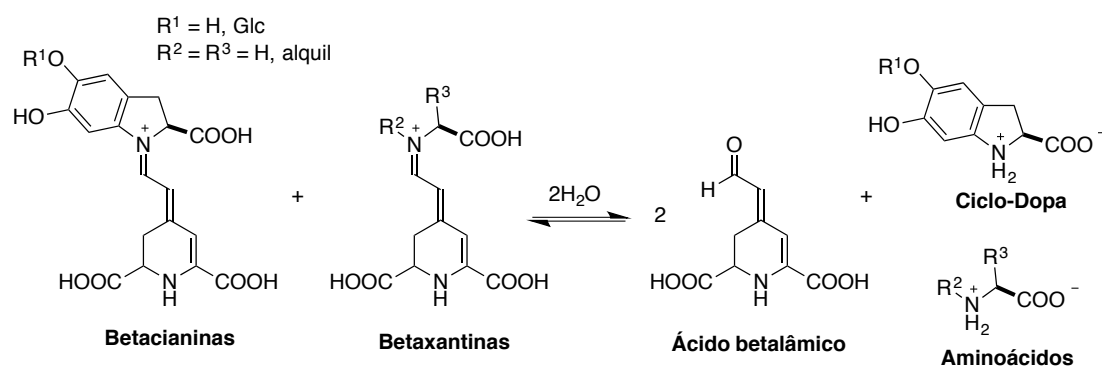
Micela reversa

- Solução de AOT (dioctilsulfocinato de sódio) 0,1 mol L⁻¹: 1,11 g de dioctilsulfocinato de sódio foram solubilizados em 25 mL de heptano.

5.2.2. Semissíntese e purificação de cBeets e csBeet124

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

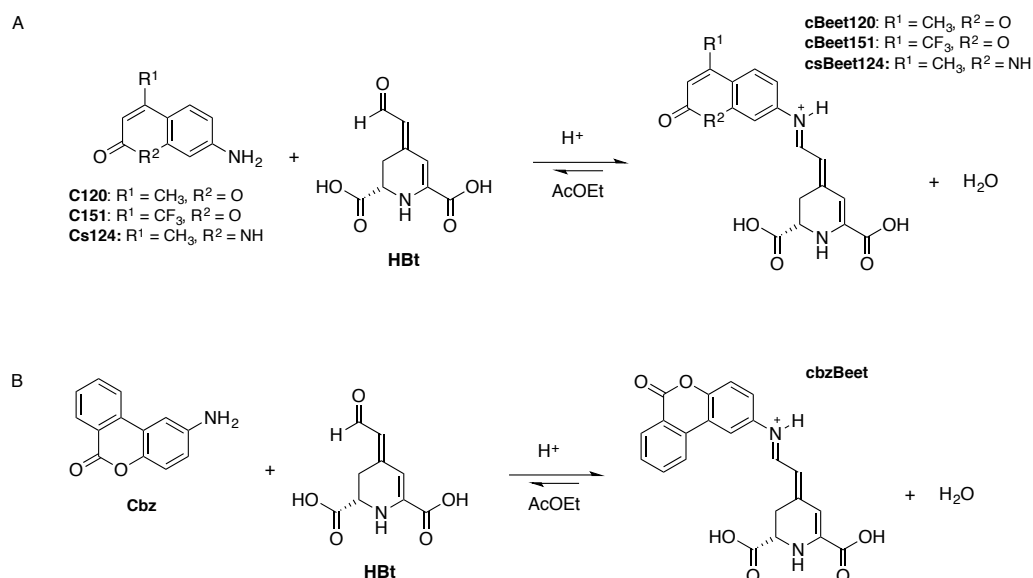
Em procedimento padrão do grupo^[83], adaptado da literatura^[64]; cerca de 2 kg de beterrabas frescas (*Beta vulgaris*) foram cortadas e processadas em uma centrífuga de alimentos tipo juicer (Phillips-Walita, modelo PI1855). Cerca de 500 mL de suco foi filtrado em filtro de pano e transferido para um béquer de 1 L e resfriado a 10 °C. Sob agitação mecânica, foi adicionado hidróxido de amônio 27%, até que a solução atingisse valor de pH 11,4, acompanhado com o auxílio de um eletrodo de pH mergulhado cuidadosamente no suco. Após cerca de 1h, ainda sob agitação mecânica, foi observada a mudança de coloração da solução de vinho para castanho amarelada, indicando que houve a hidrólise das betalaínas presentes no suco, formando ácido betalâmico (**HBt**, Esquema 11). O béquer foi mergulhado em banho de gelo seco com etanol, de forma que a temperatura da solução ficasse próxima a 0 °C, em seguida, foi adicionado em pequenas porções, de forma que a temperatura da solução não fosse superior a 5 °C, de HCl 37% até que o valor de pH da solução fosse 1,5. Duas extrações com acetato de etila (50 mL, ou 10% do volume inicial de suco) foram realizadas. Cerca de 90 mL da suspensão contendo fase orgânica (HBt em acetato de etila), e suco foi centrifugada a 7.000xg, 2 min, 0 °C. O sobrenadante amarelo foi congelado em banho de etanol e gelo seco (-8 0 °C), de forma que cristais brancos de gelo contendo sais e água se formassem. O precipitado foi filtrado e a concentração da solução de **HBt** em acetato de etila foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon^{\text{AcOEt}}_{378 \text{ nm}} = 30.000$). Em uma extração típica são obtidos 50 mL de **HBt** $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, cerca de 6 mg do composto. O rendimento em mol, calculado a partir da concentração inicial de betalaínas (betacianinas e betaxantinas) no suco, é de cerca de 1%.



Esquema 11. Equilíbrio de hidrólise das betalainas presentes no suco de beterraba.

5.2.2.2 Acoplamento aldímico

A 5 mL de ácido betalâmico $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em acetato de etila foram adicionados a 6,7 mg de ácido p-toluenossulfônico (10 equiv) em frasco âmbar. Após completa solubilização do ácido p-toluenossulfônico, foram adicionados 5 equiv de amina precursora, notando-se mudança de cor de amarelo para vermelho, indicando a formação da betalaina correspondente (Esquema 12). A mistura reacional foi então mantida a -20°C por 48h, para precipitação da betalaina. O precipitado foi centrifugado a 10.00XG, 0°C , por 10 min em tubo falcon de vidro, para recuperação da betalaina. O sobrenadante foi removido com pipeta de pasteur e o precipitado foi lavado com pequenas quantidades de acetato de etila gelado (cerca de 5 mL) para remoção de excesso de amina precursora e novamente centrifugado nas mesmas condições; o sobrenadante de acetato de etila foi removido e uma nova lavagem foi executada. O solvente remanescente nos falcons foi removido por meio de fluxo de N_2 . O sólido seco da betalaina bruta foi ressuspensionado em água, congelado e liofilizado, e armazenado novamente no freezer antes da purificação.



Esquema 12. Acoplamento aldímínico entre as aminas precursoras e o ácido betalâmico acetato de etila, com catálise ácida. A) Semissíntese de **cBeet120**, **cBeet151** e **csBeet124**; B) Semissíntese de **cbzBeet**.

5.2.2.3 Purificação das betalainas

As amostras brutas das betalainas foram purificadas por cromatografia de permeação em gel (GPC), com Sephadex LH20 como fase estacionária e água como eluente, fluxo 4 mL min⁻¹. A fração rosa resultante de cada uma das purificações foi coletada, congelada e liofilizada em seguida. A coluna de Sephadex LH20 foi então regenerada com a limpeza com cerca de 10 volumes de coluna com água e novamente utilizada.

5.2.2.4 Análise cromatográfica

Antes de cada ensaio, foi efetuada análise cromatográfica em cada fração coletada na purificação por GPC. As frações das betalainas purificadas foram analisadas por HPLC analítico em HPLC Shimadzu 20A, acoplado a detector PDA SPD-M20A e de fluorescência RF-20A em fase reversa, nas condições: coluna C₁₈, 250 mm x 46 mm, 5 μm (Acentis, Supelco), em um gradiente de 30–70% B (**cBeet120**) ou 55–95% B (**cBeet151**) em 20 min, de 30–45% B (**csBeet124**) ou de 55–70% B em 15 min para

cbzBeet, com fluxo de 1 mL min^{-1} . A mistura de solventes utilizada para as amostras foi A: 0,05% ácido fórmico em água e solvente B: 0,05% ácido fórmico/60% MeCN/água, com detecção em $\lambda_{\text{abs}} = 254 \text{ nm}$ e 520 nm (PDA) e $\lambda_{\text{EX}} = 520 \text{ nm}/\lambda_{\text{EM}} = 570 \text{ nm}$ (fluorescência).

5.2.3. Caracterização estrutural

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

5.2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

A análise por HPLC-UV/Vis-MS (ESI+) foi realizada utilizando um detector a Bruker Maxis 3G q-TOF equipado com uma fonte *electrospray* e acoplado um HPLC Shimadzu Prominence. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna Acentis C18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 4.6 \text{ mm}$, Supelco) mantida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, e com um detector PDA SPD-M20A. N_2 foi utilizado como nebulizador (27.6 psi) and e gás secante (9 L min^{-1} , $300 \text{ }^\circ\text{C}$). A voltage do capilar utilizada foi de 4.500 V . Condições da corrida: gradiente linear de 30–95% B em 30 min, sendo A uma solução 0,05% de ácido fórmico em água, e B, 0,05% de ácido fórmico em 60%MeCN/40% H_2O , para as amostras de **cBeet120** e **cBeet151**. Para **csBeet124**, o gradiente utilizado foi de 30–45% B em 15 min e de 55–70% B em 15 min para **cbzBeet**. As corridas foram realizadas sob fluxo de 1 mL min^{-1} .

O erro experimental da correlação massa/carga (m/z), em ppm (partes por milhão) é obtido pela correlação^[174]:

$$Erro = \frac{(m_a - m_e)}{m_a} \times 10^6 \quad \text{Eq. 30}$$

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

5.2.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os experimentos de ^1H -RMN foram obtidos a 25°C em espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500,13 MHz para ^1H e 125,75 MHz para ^{13}C , equipado com uma sonda de tripla ressonância (TXI) de 5mm com detecção inversa.

As amostras de betalínas foram solubilizadas em D_2O , imediatamente antes da aquisição dos espectros, com concentração de cerca de 2mg/500 μL . Os ensaios de ^1H e ^1H com supressão (zgpr) foram realizados com as soluções em tubos de 5mm, com ns = 512, td = 64K, ds = 4.

5.2.4. Caracterização fotofísica

5.2.4.1 Espectroscopia de absorção, emissão e excitação

Os espectros de absorção foram adquiridos em espectrofotômetro Cary 50 da Varian e os espectros de emissão e excitação em espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian. Na aquisição dos espectros foram utilizadas cubetas de quartzo de volume final de 1,5 mL e caminho ótico de 10 mm. A temperatura das celas foi mantida a 25°C por meio de banho termostático acoplado a ambos os equipamentos. As amostras apresentavam densidade óptica de 0,7 e a configuração do espectrofluorímetro empregada na obtenção dos espectros de emissão das betalínas foi de: $\lambda_{\text{EX}} = 510 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 530 \text{ nm} - 750 \text{ nm}$, $f^{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$, $f^{\text{em}} = 10 \text{ nm}$, tensão = 600 V; e de excitação: $\lambda_{\text{EM}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EX}} = 300 \text{ nm} - 550 \text{ nm}$, $f^{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$, $f^{\text{em}} = 10 \text{ nm}$, tensão = 600 V.

5.2.4.2 Determinação do coeficiente de atenuação molar

O coeficiente de atenuação molar (ϵ) das cBeets foi determinado pelo método do ponto final (*end point*)^[69]. A decomposição das betalainas em solução tampão Britton-Robinson pH 8,5 foi monitorada em cubeta de quartzo (caminho ótico de 1 cm, 1,5 mL) por espectroscopia de absorção na faixa de 250–700 nm, a 25 °C, de acordo com procedimento descrito a seguir: 200 μ L de solução aquosa de betalaína foi adicionada a 800 μ L de tampão Britton-Robinson pH 7; após seu espectro de absorção ser registrado, a mesma diluição das betalaína foi realizada substituindo a solução tampão em pH 7 por uma solução tampão da mesma concentração em pH 8,5. A cinética de hidrólise em pH 8,5 foi acompanhada por 240 min, com aquisição de espectros de absorção a cada 5 min. Ao término da cinética, o ϵ foi determinado correlacionando a concentração final de ácido betalâmico (**HBt**), precursor produto da hidrólise, com valor de ϵ conhecido, com a concentração inicial da betalaína em pH 7 (Eq. 31):

$$C_{\text{HBt}}^{\text{Final}} = C_{\text{cBeet}}^{\text{inicio}} \quad \text{Eq. 31}$$

Considerando-se a Lei de Beer-Lambert (Eq. 7), temos que:

$$\frac{Abs^{\text{cBeet}}}{\epsilon^{\text{cBeet}}} = \frac{Abs^{\text{HBt}}}{\epsilon^{\text{HBt}}} \quad \text{Eq. 12}$$

Reorganizando a Eq. 32, o coeficiente de atenuação molar das betalainas foi então determinado pela seguinte relação:

$$\epsilon^{\text{cBeet}} = \frac{Abs^{\text{cBeet}}}{Abs^{\text{HBt}}} \times \epsilon^{\text{HBt}} \quad \text{Eq. 33}$$

Os valores de ϵ e Abs foram obtidos no λ^{abs} dos compostos: 520 nm para **cBeet120**, 519 nm (**cBeet151**), 518 nm (**csBeet124**) e 512 nm (**cbzBeet**), sendo que o valor de ϵ padrão utilizado para o cálculo foi de $\epsilon^{424 \text{ nm}} = 26.270 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o **HBt**^[97].

5.2.4.3 Determinação do rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{Fl}) foram determinados utilizando-se rodamina 6G em metanol ($\phi = 0,94$)^[3] como padrão secundário através da equação, devido a semelhança entre os espectros de absorção e emissão da rodamina 6G em metanol e das betalaínas estudadas. Espectros de absorção e emissão de amostras de diferentes concentrações de betalaína e padrão foram adquiridos nas mesmas condições experimentais, de forma que a densidade óptica da amostra fosse inferior a 0,1. Um gráfico que correlaciona a área de emissão com a absorção do composto foi construído para cada betalaína, e o coeficiente angular da reta traçada com intercepto igual a zero foi correlacionado com o padrão de acordo com a Eq. 34^[8]:

$$\phi_{Fl}^x = \phi_{Fl}^p \frac{\alpha^x}{\alpha^p} \left(\frac{n^x}{n^p} \right)^2 \quad \text{Eq. 34}$$

onde, ϕ_{Fl} = rendimento quântico de fluorescência, α = coeficiente angular do gráfico área sob a curva de emissão de fluorescência vs. absorção, e n = índice de refração; x e p se referem à betalaína e à rodamina 6G, respectivamente.

Os espectros de absorção e emissão das amostras e do padrão foram adquiridos em cubeta de quartzo de 1,5 mL com caminho óptico de 10 mm. As soluções foram diluídas de forma que em $\lambda_{abs} = 500$ nm a absorção da amostra fosse inferior a 0,1, a fim de evitar efeitos de reabsorção da amostra^[8]. Os espectros de emissão do padrão e das betalaínas foram adquiridos nas mesmas condições do equipamento ($\lambda_{EX} = 500$, $\lambda_{EM} = 520-750$ nm, $f^{ex} = f^{em} = 20$ nm, tensão = 600 V).

Nos ensaios de variação de temperatura, temperatura da cela foi matida com banho Cary temperature controller, acoplado ao fluorímetro. A temperatura selecionada, 5, 10, 15, 20 ou 25 °C, foi selecionada no modo *scan* do equipamento; os espectros de

emissão foram obtidos ($\lambda_{\text{EX}} = 500$, $\lambda_{\text{EM}} = 527\text{--}800$ nm, $f^{\text{ex}} = 10$ nm, $f^{\text{em}} = 20$ nm, tensão = 600 V) após cerca de 1 min em que a temperatura desejada fosse atingida na cela.

5.2.4.4 Determinação do tempo de vida de emissão de fluorescência

Os decaimentos do tempo de vida de emissão das cBeets e da **csBeet124** foram adquiridos durante estágio no *Centro de Física-Química Molecular (CQFM)*, no Instituto Superior Técnico (IST), em Lisboa e no *Ångström Laboratoriet*, na Universidade de Uppsala, Suécia, em dois sistemas de excitação e detecção distintos.

Em Lisboa, o tempo de vida de emissão de fluorescência (τ_{FI}) das betalaínas foi determinado com o uso de um conjunto ótico^[175] composto por um laser de corante com DCM(4-(dicianometileno)-2-metil-6-(4-dimetilaminostiril)-4H-pirano)^[176] sincronizado com um laser sólido de Nd:YVo4 com excitação em 532 nm, com uma frequência de 76 MHz e duração do pulso de aprox. 12 ps. A emissão de luz é detectada por utilizando uma fotomultiplicadora Hamamatsu 2809U-01, com $\lambda^{\text{em}} = 570$ nm. Os decaimentos foram adquiridos tipicamente com 20.000 *counts*, 1024 canais, 1,22 ps/canal, sendo que o sinal do laser (função de resposta do instrumento, IRF, *Instrument Response Function*, aprox. 35 ps) foi obtida pelo sinal de uma dispersão coloidal de sílica (Ludox) e utilizada na deconvolução dos decaimentos. Os decaimentos de fluorescência foram analisados pelo método de reconvolução iterativa de mínimos quadrados não lineares, utilizando o software TRFA da SSTC (Scientific Software Technologies Center, Belarusian State University, Minsk, Bielorrússia).

Os ajustes das curvas de decaimento de fluorescência foram feitos considerando a IRF pelo software TRFA através da análise de componentes discretos com o método dos mínimos quadrados (Eq. 35):

$$I(t) = \sum_{i=1}^n B_i e^{(-t/\tau_i)} \quad \text{Eq. 35}$$

onde I corresponde a intensidade de fluorescência, t ao tempo, e B_i e τ_i às amplitudes e o tempo de vida de fluorescência do decaimento exponencial de n componentes, respectivamente^[175].

As frações de intensidade serão determinadas de acordo com a Eq. 36,

$$f_i = \frac{B_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n B_i \tau_i} \quad \text{Eq. 36}$$

onde, $\sum_{i=1}^n B_i \tau_i = \langle \tau \rangle$, média do tempo de vida de fluorescência.

Em Uppsala, os decaimentos foram obtidos através da detecção do sinal de fluorescência da amostra, na qual foi excitada com $\lambda_{\text{EX}} = 520$ nm. O comprimento de onda do laser foi ajustado utilizando um sistema ótico composto por um amplificador paramétrico de onda (OPA, Coherent) excitado por um sistema de lasers ultra-rápido Ti:safira (Coherent Mira 900: gerador de pulsos de largura de 160 fs; Coherent RegA 900: amplificador do laser e Coherent Verdi-V18: pump laser). A frequência é de 200kHz. Uma cubeta de caminho ótico de 1 cm foi utilizada, e a linha do laser foi direcionada à parede da cubeta, posicionada em frente ao detector, reduzindo a passagem do laser por cerca de 1–2 mm do caminho ótico da cubeta. A fluorescência da amostra é detectada pelo espectrômetro Streak Camera (Hamamatsu) numa janela de observação de cerca de 200 nm (Bruker SPEC 250IS). O dispositivo de carga acoplada da camera (Hamamatsu Orca-ER C4742–95) foi utilizado no modo de armazenamento de 2×2 pixels, originando uma matrix de 512×512 pixel. Um filtro OG550 foi posicionado antes da *streak camera*, a fim de remover o pulso do laser (o filtro cortava toda luz antes de $\lambda = 550$ nm). As janelas de observação de tempo, em diferentes faixas de tempo foram de (largura a meia altura, FWHM, da resposta do instrumento é dada

em parênteses) aproximadamente 150 (6), 700 (20), ou 1800 (50) ps.

Para a detecção dos eventos rápidos do laser, assume-se que a resposta do instrumento, pulso do laser, um perfil gaussiano^[177] em função do tempo com uma largura σ em t_0 , cuja equação pode ser descrita por^[178]:

$$F_{Gauss}(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}} \quad \text{Eq. 37}$$

$$FWHM = 2\sqrt{2\ln 2} \quad \text{Eq. 38}$$

Para combinar as Eqs. 37 e 38, um processo de reconvolução é feito pela multiplicação de duas funções e introduzindo a função complementar de erro para reconvoluir tanto as funções exponenciais, quanto a gaussiana. Dessa forma, a função do ajuste mono exponencial é descrita pela Eq. 39:

$$I_{fit}(t) = \frac{1}{2} I_0 e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau}} \times e^{-\frac{\sigma^2}{2\tau^2}} \left(1 + \text{erf} \left(\left(\frac{\sigma}{\tau} - \frac{t-t_0}{\sigma} \right) \cdot \frac{1}{\sqrt{2}} \right) \right) \quad \text{Eq. 39}$$

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

As imagens dos decaimentos da *streak camera* e seus ajustes dos decaimentos, obtidos com as equações 37 a 39 combinadas, foram obtidos com funções matemáticas descritas no *Mathlab*, já previamente programadas para o tratamento dos dados.

5.2.5. Propriedades físico-químicas de cBeets e csBeet124

5.2.5.1 Cinéticas de hidrólise das betalaínas

As cinéticas de hidrólise em meio aquoso foram acompanhadas com o auxílio de espectrofotômetro Shimadzu UV1800 por 12h (aquisição do espectro de absorção na faixa de 700 – 250 nm a cada 15 min), com TCC-controller a 25°C. As medições foram realizadas em cubetas de quartzo de 1,5 mL, caminho ótico de 1 cm, com um volume final de solução de 1 mL. O tempo de meia-vida de hidrólise ($\tau_{1/2}$) e a constante de

hidrólise (k_{obs}) foram determinados no comprimento de onda de máxima absorção de cada uma das betalaínas: 520 nm para **cBeet120**, 519 nm (**cBeet151**), 518 nm (**csBeet**) e 512 nm (**cbzBeet**).

5.2.5.2 Determinação do coeficiente de partição na membrana lipídica

61,5 mg de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) foram pesados em tubo de ensaios e solubilizados numa alíquota mínima de clorofórmio, que foi evaporado sob fluxo de N_2 , de forma que um filme lipídico fosse formado no fundo do tubo. O filme foi suspenso em 2,1 mL de tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 10 mmol L^{-1} , pH 7; a suspensão foi agitada em vortex por cerca de 1 min e fracionada em 3 eppendorfs que foram centrifugados a 10.000xg, 25 °C por 3 min, de forma que o lipídeo se depositasse no fundo do eppendorf. O sobrenadante foi retirado com pipeta de pasteur, e novamente cerca de 500 μL de tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 10 mmol L^{-1} , pH 7 foi adicionado, seguido de agitação em vortex e centrifugação; processo repetido por mais dois ciclos^[127]. Após o 3º ciclo de centrifugação, o sobrenadante foi removido e os eppendorfs foram rotulados como *pH 3*, *pH 5* e *pH 7*; foram então adicionados 1 mL de tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 10 mmol L^{-1} , *pH 3*; ou de tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 10 mmol L^{-1} , *pH 5*; ou então $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 10 mmol L^{-1} , *pH 7*; o conteúdo dos eppendorf foi novamente ressuspenso no tampão correspondente e a partição na membrana lipídica das cBeets foi acompanhada espectrofotometricamente: 60 μL da suspensão de POPC foram adicionados a um eppendorf com 940 μL de solução de cBeet (5×10^{-6} mol L^{-1}) no respectivo pH; o ensaio foi realizado em triplicata, com 3 alíquotas da suspensão fracionadas em 3 eppendorfs distintos. Após 15 min de interação da betalaína com POPC, sob abrigo da luz, os eppendorfs foram novamente centrifugados (10.000xg, 25 °C, 3 min); o controle foi realizado com 60 μL da solução tampão correspondente. 870

μL do sobrenadante foram adicionados a cubeta de caminho óptico de 1 cm, contendo 30 μL de solução de SDS 50 mmol L^{-1} com 10% de Triton X100, e então os espectros de absorção do controle e da triplicata foram adquiridos em espectrofotômetro Cary 50. A partição entre as betalainas em meio aquoso (W) e a membrana (m), em função do pH do meio, é definida pelo logaritmo da taxa distribuição de betalaina na membrana ($P_{m/W}$):

$$\text{Log } D_{m/W} = \log\left(\frac{Abs_c - Abs_a}{Abs_c}\right) \quad \text{Eq. 40}$$

Em que Abs_c corresponde à absorção do controle e Abs_a , a da alíquota, após a interação com a membrana lipídica.

De forma a assegurar que a quantidade de lipídeo utilizada nos ensaios em diferentes pHs foi a mesma, a concentração foi determinada por ensaio colorimétrico de dosagem de fosfato orgânico, complexado com ferrotiocianato de amônio, como descrito na literatura^[179]. Em resumo, foi construída uma curva de calibração de concentração crescente de POPC; inicialmente, uma solução de 11 mg/mL de POPC em clorofórmio foi preparada, volumes crescentes (1-6 μL) dessa solução foram adicionados a diferentes tubos de ensaio e clorofórmio suficiente para completar 1 mL de volume final foi adicionado; em seguida, 1 mL de solução de aquosa de ferrotiocianato de amônio foi adicionado a cada um dos tubos de ensaio, que foram então agitados no vortex por 1 min. Esperou-se a separação do sistema bifásico ferrotiocianato de amônio/clorofórmio em um suporte para tubos, em seguida espectros de absorção da fração de clorofórmio, extraída com uma pipeta de pasteur, foram adquiridos. A curva de calibração foi então construída correlacionado linearmente o valor de absorção em 488 nm (máximo de absorção do complexo) com a concentração do lipídeo (anexo 7.21). A dosagem de POPC nos 3 pHs estudados foi obtida com o preparo do complexo

com a adição de 1 μL da suspensão lipídica em 999 μL de clorofórmio e 1 mL de ferrotiocinato de amônio, após agitação em vortex, seguida de separação de fase, foram adquiridos espectros de absorção da fração orgânica; os valores de absorção em 488 nm dos espectros foram substituídos na equação obtida da curva de calibração e então a concentração de lipídeo em cada um dos pHs foi determinada. A concentração de lipídeo foi de 19 mg L^{-1} em pH 3 e 5, e de 17 mg L^{-1} em pH 7.

5.2.5.3 Voltametria cíclica de cBeets e csBeet124

Experimentos de voltametria cíclica foram conduzidos empregando-se um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT101 (Metrohm), utilizando o software NOVA. As medidas foram realizadas em cela eletroquímica adquirida do prof. Cecílio Sadao Fugivara (Unesp-Araraquara), composta por um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo (diâmetro do disco = 2 mm); contra-eletrodo de fio de platina e eletrodo de referência Ag|AgCl, KCl sat. A velocidade de varredura foi fixada em 50 mVs^{-1} e o potencial foi varrido de -1 V a $+1\text{ V}$, em janela aberta, em seguida de varredura em janela fechada, entre 0,3 a 0,9 V (**cbeet120 e csBeet124**) ou 0,3 a 1 V (**cBeet151 e cbzBeet**), com 8 ciclos de varredura. As soluções aquosas das betalaínas foram preparadas em KCl 0,1 mol L^{-1} , também utilizado como solução controle nos ensaios, numa concentração fixa de $8 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ para determinação do potencial de pico anódico ($E_{p,a}$).

Todas as varreduras de betalaínas foram alternadas com o seguinte procedimento: (i) polimento do eletrodo de trabalho com alumina depositada em um pedaço de feltro umedecido – 60 ciclos de movimentos em forma de "8" eram realizados, com partículas de alumina de 1, 0,3 e 0,05 μm de diâmetro, respectivamente; (ii) enxague do eletrodo com água e banho ultrassônico por 1 min; (iii) voltamograma

de solução "padrão" de $K_3[Fe(CN)_6]$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , janela de potencial de 0 a $+0,5 \text{ V}$); (iv) registro do *branco* do próximo voltamograma, na janela de potencial desejada, com solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Tal procedimento foi realizado de forma a garantir que o eletrodo de trabalho estivesse em condições idênticas às iniciais e é fundamental, uma vez que há adsorção das betalaínas na superfície do eletrodo de carbon vítreo.^[83]

5.2.6. Interação de **cBeets** e **csBeet124** com **BSA** e semissíntese de **BtBSA**

5.2.6.1 Espectroscopia de absorção e emissão de **cBeet120** na presença de **BSA**

O efeito da adição de **BSA** nos espectros de absorção e emissão de **cBeet120** foi avaliado numa ampla faixa de concentração de **BSA**, de $(7,5 \times 10^{-7}$ a $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), obtidas a partir da diluição da solução estoque de **BSA** ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) como descrito na Tabela 16. A concentração de **cBeet120** na cubeta ($v_f = 2,0 \text{ mL}$) foi mantida fixa em $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e determinada espectrofotometricamente pelo coeficiente de atenuação molar da betalaína ($\epsilon^{520 \text{ nm}} = 65.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, *vide sessão 3.1.2*), de forma que o valor de absorção em $\lambda=510 \text{ nm}$ fosse menor que 0,1. Dessa forma a variação de concentração de **BSA** em relação a **cBeet120** foi de 0,5 a 100 equiv.

Os ensaios foram realizados em meio tamponado em pH 3 (tampão $H_3PO_4/H_2PO_4^-$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5 (tampão CH_3COOH/CH_3COO^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e pH 7 (tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) de forma a avaliar o efeito do pH do meio e da adição de **BSA** nos espectros de absorção e emissão, e também do rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência – que serão descritos experimentalmente na próxima sessão.

Tabela 16. Preparo de 5,0 mL das soluções estoque de BSA, nas diferentes concentrações estudadas.

Nº de equivalentes	Concentração na cubeta ^a	Concentração da solução estoque ^a	V BSA ^b (mL)	V H ₂ O (mL)
0,5	$7,5 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$	0,025	4,975
1,0	$1,5 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	0,05	4,95
2,5	$3,75 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-5}$	0,125	4,875
5,0	$7,5 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-5}$	0,25	4,75
10	$1,5 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	0,5	4,5
25	$3,75 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-4}$	1,25	3,75
50	$7,5 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-4}$	2,5	2,5
100	$1,5 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	5,0	-

^a em mol L⁻¹; ^b da solução estoque de BSA 5×10^{-4} mol L⁻¹

A adição das soluções a cubeta foi sempre realizada na seguinte ordem: x µL de solução tampão; 600 µL de solução aquosa de BSA, na concentração estudada; y µL de **cBeet120** em água, de forma que o volume de $x + y = 1,4$ mL). O pH do meio foi conferido após os ensaios, de forma a assegurar que o feito avaliado em cada pH poderia ser correlacionado apenas à concentração de BSA em solução. Nos ensaios controle, sem BSA, os 600 µL de solução aquosa de BSA, foram substituídos por solução tampão no pH estudado.

Os espectros de absorção e emissão foram adquiridos em cubeta de plástico, de caminho óptico de 1 cm. A faixa de varredura de absorção foi de 300 – 750 nm em espectrofotômetro cary 50, termostatizado a 25 °C com banho peltier, e os espectros de emissão, adquiridos em fluorímetro varian eclipse, foram obtidos nas seguintes condições: $\lambda_{EX} = 510$ nm, $\lambda_{EM} = 530 - 750$ nm, $f^{ex} = f^{em} = 20$ nm, tensão = 600 V.

5.2.6.2 Determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência e do tempo de vida de fluorescência de cBeets e csBeet124 na presença de excesso de BSA

Após os ensaios exploratórios com **cBeet120**, avaliando uma ampla faixa de concentração de BSA, novos ensaios com as demais cBeets foram realizados com adição de 100 equiv BSA, nos 3 valores de pHs estudados, foram realizados. O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{FI}) de cBeets na presença de BSA foi obtido em triplicata, pelo método de Williams^[180], utilizando Rodamina B em etanol ($\phi_{FI} = 0,5$)^[11] como padrão secundário de acordo com a Eq. 20.

Os espectros de emissão do padrão e das cBeets com 100 equiv BSA e na ausência da proteína (controle) foram adquiridos nas mesmas condições experimentais, como descrito na sessão anterior. O efeito da adição de BSA, em pH 3, 5 e 7, no ϕ_{FI} de **cBeet120** foi estudado na faixa de 0,5 a 100 equiv BSA; já para **cBeet151**, **csBeet124** e **cbzBeet**, foi estudada somente a adição de 100 eq BSA; sempre mantendo fixa a concentração de cBeet na cubeta em $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

O efeito da adição de 100 eq BSA no tempo de vida de emissão (τ_{FI}) das betalaínas também foi avaliado, nos 3 pHs. Os ensaios, realizados durante estágio sanduíche em Uppsala, foram previamente descritos (*vide sessão 5.2.4.4*), sempre mantendo o $\lambda_{EX} = 520 \text{ nm}$ e o $\lambda_{EM} = 570 \text{ nm}$.

5.2.6.3 Semissíntese e caracterização fotofísica de **BtBSA**

Extrato de beterraba foi hidrolisado pela adição de NH_4OH 28%, levando à formação de ácido betalâmico (**HBt**) e ciclo-dopa. O **HBt** foi então purificado por cromatografia de troca iônica em Amberlite X16 como fase estacionária^[181]. **BtBSA** foi semissintetizada pela adição de 0,725 g de BSA (cerca de 2,5 equiv) a 30 mL de HBt

$1,34 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em pH 11,4; após cerca de 30 min de agitação, o pH do meio foi levado a pH 4 pela adição gota a gota de HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, notando-se um aparecimento deslocamento da banda de absorção do **HBt** (máximo em 430 nm) para 476 nm, indicando a formação de aduto^[143]. A purificação de **BtBSA** também foi realizada por GPC com Sephadex LH20 como fase estacionária, com água como eluente.

As análises de espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF da BSA de partida e da BtBSA semissintetizada foram realizadas em espectrômetro UltrafleXtreme (Bruker) no modo refletor, em matriz de ácido sinapínico. A faixa de aquisição do massas foi de 2.200–22.000 *m/z*.

Espectros de absorção, emissão e excitação, além do tempo de vida de emissão de **BtBSA** purificada foram adquiridos em aparelhagem descrita previamente (sessões 5.2.4.1 e 5.2.4.4, respectivamente), em soluções tampão pH 3, 5 e 7.

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl}) de **BtBSA** também foi determinado em função do pH, em triplicata, pelo método de Williams^[180], utilizando fluoresceína em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\phi_{\text{Fl}} = 0,95$)^[11] como padrão secundário, de acordo com a Eq. 20. Os espectros de emissão do padrão e da **BtBSA** foram adquiridos em cubetas de 1,5 mL e caminho óptico de 1 cm, mantendo as mesmas condições do equipamento ($\lambda_{\text{EX}} = 465 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 480\text{--}750 \text{ nm}$, $f^{\text{ex}} = f^{\text{em}} = 10 \text{ nm}$, tensão = 600 V), sempre com densidade óptica menor que 0,1, a fim de evitar processos de reabsorção na excitação da amostra^[8].

O tempo de vida de emissão (τ_{Fl}) de **BtBSA** também foi avaliado, nos 3 pHs. Os ensaios, realizados durante estágio sanduíche em Uppsala, foram previamente descritos (*vide sessão 5.2.4.4*), contudo o $\lambda_{\text{EX}} = 400 \text{ nm}$ utilizado nos ensaios, diferente do ideal para as **cBeets**, foi obtido duplicando a frequência do laser Ti:safira (Coerent Mira),

sem passar pelo OPA. A detecção da fluorescência foi obtida também pela *Streak Camera*, em $\lambda_{EM} = 490$ nm, com filtro GG3 para remoção do sinal do laser.

5.2.7. Efeitos do meio sobre a fotofísica de cBeet120

5.2.7.1 Preparo e caracterização de misturas binárias

6 mL de soluções de misturas binárias glicerol/água (Gli/W), 2,2,2-trifluoretanol/água (TFE/W) e glicerol/2,2,2-trifluoretanol (Gli/TFE) foram preparadas nas proporções 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90%^{m/m} pela pesagem dos componentes, como descrito na Tabela 17. O TFE utilizado no preparo das misturas foi previamente tratado, com K₂CO₃ anidro prosseguido por destilação simples, como descrito na literatura^[182].

Tabela 17. Proporção em massa da mistura correspondente, massa pesada do respectivo componente (g) e fração molar do componente de referência

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

^a $d_{\text{glicerol}} = 1,25$ g/mL, $pH_W = 7,6$. ^b $d_{2,2,2\text{-trifluoretanol}} = 1,373$ g/mL, $pH_W = 7,2$.

A viscosidade das misturas foram medidas a 25°C em reômetro digital DV-III da Brookfield (spindels C-40 (0,7–7,66 cP) e C-52 (20–230 cP)); e índice de refração, a 20°C, em refratômetro ABBE 60/ED (Bellingham & Stanley) equipado com lâmpada de sódio ($\lambda = 589,6$ nm), previamente descritas^[98].

5.2.7.2 Estudo do fator de polaridade empírica ($E_T(30)$) das misturas binárias

Uma alíquota de 3 mL da solução estoque de **RB**, 5×10^{-4} mol L⁻¹ em etanol, foi evaporada a pressão reduzida, até a completa remoção do solvente, e aparecimento de sólido azul no fundo do balão. Em seguida, 1 mL da respectiva mistura binária foi adicionado ao balão contendo o sólido seco de **RB** e a solução foi agitada em vortex, até que houvesse a formação de uma solução do **RB** na mistura binária de solventes. A solução foi adicionada em cubeta de quartzo de 1,5 mL, caminho óptico de 1 cm, e o espectro de absorção na faixa de 700–400 nm foi adquirido, a 25 °C, em espectrofotômetro varian cary 50, com controle de temperatura realizado por banho peltier. Os ensaios também foram realizados também com água e 2,2,2-trifluortanol puros, sempre em triplicata, em que o máximo de absorção (λ_{abs}) foi registrado em cada um dos espectros. O cálculo do $E_T(30)$, em kcal mol⁻¹, das misturas binárias e dos solventes puros, a 25 °C, foi realizado pela Eq. 25^[149].

5.2.7.3 Caracterização fotofísica de 1,8-ANS nas misturas binárias

Os espectros de absorção, adquiridos na faixa de 600–200 nm em espectrofotômetro varian cary 50, e emissão, em fluorímetro varian cary eclipse, de **1,8-ANS** nas misturas binárias foram adquiridos pela diluição da solução estoque ($4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, em água ou TFE) nas respectivas misturas, em cubetas de quartzo de 3,5 mL, com caminho óptico de 1 cm.

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl}) do **1,8-ANS** também foi determinado, em triplicata, pelo método de Williams^[180], utilizando sulfato de quinino em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ ($\phi_{Fl} = 0,546$)^[111] como padrão secundário. Os valores de absorção, área de emissão e índice de refração das misturas foram correlacionados de acordo com a Eq. 20. Os espectros de emissão do padrão e do **1,8-ANS** foram

adquiridos em cubetas de 3,5 mL e caminho óptico de 1 cm, mantendo as mesmas condições do equipamento ($\lambda_{EX} = 345$ nm, $\lambda_{EM} = 360-750$ nm, $f^{ex} = 10$ nm, $f^{em} = 20$ nm, tensão = 600 V), sempre com densidade óptica menor que 0,1.

O tempo de vida de emissão (τ_{FI}) do **1,8-ANS** nas misturas binárias foi adquirido em equipamento Edinburgh FL980, com sistema *Time Correlated Single Photon Counting* (TCSPC), acoplado a lâmpada de H₂, de 40 kHz. As condições do equipamento foram: $\lambda_{EX} = 345$ nm, $\lambda_{EM} = 510$ nm; $f^{ex} = f^{em} = 20$ nm, 1.000 counts, 2048 canais, numa janela temporal de 100 ns. A função da resposta instrumental (IRF) foi coletada com Ludox, com $\lambda_{EX} = \lambda_{EM} = 345$ nm.

Os ajustes das curvas de decaimento de fluorescência foram realizadas por meio da deconvolução do IRF, pelo software Fast (Edinburgh Fotonics), através da análise dos componentes discretos, com o método dos mínimos quadrados, descritos na Eq. 35, com o tempo de vida médio, $\langle\tau\rangle$ obtido pela Eq. 36.

5.2.7.4 Caracterização fotofísica de **cBeet120** nas misturas binárias

Os ensaios foram efetuados durante estágio no *Centro de Química-Física Molecular* no IST, em Lisboa, utilizando aparelhagem e materiais disponíveis.

O preparo das soluções de **cBeet120** nas misturas binária foi realizado de acordo com as proporções descritas na Tabela 17. O valor de absorção de **cBeet120** foi mantido de forma que a densidade óptica fosse inferior a 0,05 em todas as misturas.

Os espectros de absorção foram adquiridos em espectrofotômetro JASCO V-540 e os espectros de emissão e excitação em espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3-22. Na aquisição dos espectros foram utilizadas cubetas de quartzo de volume final de 1 mL e caminho óptico de 5 mm. A temperatura das celas foi mantida a 25°C por meio de banho termostático acoplado a ambos os equipamentos. As condições

do fluorímetro empregadas foram as mesmas utilizadas para rodamina 6G em metanol ($\phi_{FI} = 0,93$), utilizado como padrão para o rendimento quântico de fluorescência ($\lambda_{EX} = 510$ nm, $\lambda_{EM} = 530\text{--}800$ nm, $f^{ex} = f^{em} = 5$ nm, tensão = 950 V, tempo de integração = 0,5 s).

A aquisição do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{FI}), pelo método de Williams^[180], e dos decaimentos de tempo de vida de fluorescência (τ_{FI}) foi feita em triplicata, para cada uma das misturas binárias, utilizando rodamina 6G em metanol como padrão secundário, de acordo com a Eq. 20. Os ensaios de τ_{FI} foram realizados e as constantes de decaimentos foram obtidas de maneira semelhante ao descrito para os ensaios feitos em Lisboa na seção 5.2.4.4, da *parte experimental*.

5.2.7.5 Compartimentalização de **cBeet120** em micela reversa de AOT/heptano

Uma solução estoque de **cBeet120** $4,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em água foi preparada e congelada de forma que a adição de 7 μ L da solução estoque em água, num volume final de 2 mL, correspondesse a concentração na cubeta, mantida fixa nas diferentes proporções [H₂O]/[AOT], de $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A Tabela 18 foi utilizada para adição dos volumes de água, de solução de AOT 0,1 mol L⁻¹ em heptano, mantendo fixos os 7 μ L adicionados de solução estoque de **cBeet120** nos diferentes valores de W_0 ([H₂O]/[AOT])^[156] estudados. As soluções de diferentes W_0 e do controle foram preparadas na cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm e volume final 3,5 mL, imediatamente antes da aquisição dos espectros absorção, emissão e excitação. A faixa de varredura de absorção foi de 300–750 nm em espectrofotômetro Cary 50, termostaticado a 25 °C com banho peltier, e os espectros de emissão, adquiridos em fluorímetro Varian Eclipse, foram obtidos nas seguintes condições: $\lambda_{EX} = 510$ nm, $\lambda_{EM} = 530\text{--}750$ nm, $f^{ex} = 5$ nm $f^{em} = 10$ nm, tensão = 600 V.

Tabela 18. Volumes de solução de AOT $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em heptano e água adicionados a $7 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de **cBeet120** $4,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($V_{\text{final}} = 2 \text{ mL}$)

	$V^{\text{AOT}} (\mu\text{L})$	$V^{\text{H}_2\text{O}} (\mu\text{L})$
Controle	-	1.993
$W_0 = 2$	1.993	-
$W_0 = 3$	1.990	3
$W_0 = 4$	1.986	7
$W_0 = 5$	1.982	11
$W_0 = 7$	1.975	18
$W_0 = 10$	1.965	28
$W_0 = 20$	1.930	63

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl}) de **cBeet120** nos diferentes W foi obtido em triplicata, pelo método de Williams^[180], utilizando Rodamina B em etanol ($\phi_{\text{Fl}} = 0,5$)^[11] como padrão secundário, utilizando o $n_{\text{D}} = 1,394$ para as frações com heptano, de acordo com a Eq. 20.

5.2.8. Absorção de dois fótons

Os espectros de absorção de dois fótons foram realizados durante estágio sanduíche no CQFM- IST, em Lisboa, em arranjo óptico adaptado do descrito por Xu e Webb^[183,15]. Foram adquiridos espectros de absorção de dois fótons na faixa 710-990 nm com um laser de Ti:safira (Tsunami BB, Spectra-Physics, 1,7 W, 100 fs, 82 MHz), acoplado a um monocromador H20Vis Jobin Yvon localizado na entrada da fotomultiplicadora PMC-100-4 (Becker and Hickl GmbH).

Soluções aquosas de $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de cBeets, preparadas imediatamente antes dos ensaios, foram utilizadas nos ensaios. O comprimento de onda de emissão foi fixado em $\lambda_{\text{EM}} = 570 \text{ nm}$ (máximo de emissão de fluorescência das cBeets com

excitação de um fóton). Também foi avaliada se a relação entre a intensidade de emissão, reportada em número de fótons acumulados num tempo fixo de 10s, e a potencia de excitação (10–70 mW) apresenta resposta quadrática, caracterizando a absorção de dois fótons.^[15,21]

Dessa forma, um procedimento comparativo de excitação bifotônica utilizando rodamina 6G em metanol como padrão para acompanhar a eficiência e a característica do pulso^[166]. A seção de choque de absorção bifotônica (σ_2) em Göppert-Mayer (1 GM $\equiv 10^{-50}$ cm⁴ s fóton⁻¹ molécula⁻¹) foi então calculada através de:^[172]

$$\sigma_2(\lambda) = \sigma_2^p(\lambda) \frac{F_2(\lambda)}{F_2^p(\lambda)} \frac{\phi_{Fl}^p}{\phi_{Fl}} \frac{n_D^p}{n_D} \frac{c^p}{c} \quad \text{Eq. 41}$$

onde o sobrescrito p indica o padrão secundário e F é a intensidade de emissão, ou seja, número de fótons médio acumulados em 10 s de excitação para um comprimento de onda específico.

Em experimentos controle, as sessões de choque de dois fótons da cumarina120 (**C120**, 7-amino-4-metilcumarina) e cumarina151 (**C151**, 7-amino-4-trifluormetilcumarina) foram determinadas em $\lambda_{EM} = 570$ nm (máximo de emissão de **cBeets**, com rodamina 6G como padrão e em $\lambda_{EM} = 450$ nm (máximo de emissão das cumarinas) utilizando cumarina 153 em metanol como padrão de 2PA. A concentração das soluções de **C120** and **C151** utilizada nos ensaios foi de 15×10^{-6} mol L⁻¹ em metanol.

6. Referências

1. Sauer, M., Hofkens, J. & Enderlein, J. in *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging* 1–29 (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2011). doi:10.1002/9783527633500.ch1
2. Wardle, B. *Principles and Applications of Photochemistry*. (John Wiley & Sons, Inc, 2009).
3. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 2006).
4. Braslavsky, S. E. Glossary of terms used in photochemistry , 3rd edition. *Pure Appl. Chem.* **79**, 293–465 (2007).
5. Klessinger, M. & Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. (VCH, 1995).
6. Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*. (University Science Books, 1991).
7. Tomin, V. I. in *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I: Fundamental and Molecular Design* (ed. Demchenko, A. P.) 189–224 (Springer, 2010). doi:10.1007/978-3-642-04701-5
8. Fery-Forgues, S. & Lavabre, D. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. *J. Chem. Educ.* **76**, 1260 (1999).
9. Kirby, E. P. & Steiner, R. F. The Influence of Solvent and Temperature upon the Fluorescence of Indole Derivatives. *J. Phys. Chem.* **26**, 4480–4490 (1970).
10. Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2012).

11. Brouwer, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **83**, 2213–2228 (2011).
12. Oheim, M., Michael, D. J., Geisbauer, M., Madsen, D. & Chow, R. H. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 788–808 (2006).
13. Lavis, L. D. & Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *Acc. Chem. Res.* **3**, 142–155 (2007).
14. König, K. Multiphoton microscopy in life sciences in Life Sciences. *J. Microsc.* **200**, 83–104 (2000).
15. Albota, M. A., Xu, C. & Webb, W. W. Two-Photon Fluorescence Excitation Cross Sections of Biomolecular Probes from 690 to 960 nm. *Appl. Opt.* **37**, 7352–7356 (1998).
16. Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G. & Anderson, H. L. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 3244–3266 (2009).
17. Moura, G. L. C. & Simas, A. M. Two-Photon Absorption Cross-Sections from Electronic Structure Methods : Mesoionic Compounds Two-Photon Absorption Cross-Sections from Electronic Structure Methods : Mesoionic Compounds. *Chem. Mat.* **20**, 4142–4155 (2008).
18. Moura, G. L. C. & Simas, A. M. Two-photon absorption by fluorene derivatives: Systematic molecular design. *J. Phys. Chem. C* **114**, 6106–6116 (2010).
19. Diaspro, A., Chirico, G. & Collini, M. Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy. *Q. Rev. Biophys.* **38**, 97–166 (2005).
20. Balzani, V., Ceroni, P. & Juris, A. *Photochemistry and Photophysics: Concepts,*

- Research, Applications.* (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2014).
21. Rodrigues, C. A. B., Mariz, I. F. A., Maçôas, E. M. S., Afonso, C. A. M. & Martinho, J. M. G. Two-photon absorption properties of push-pull oxazolones derivatives. *Dye. Pigment.* **95**, 713–722 (2012).
 22. Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte mit zewi Quantensprüngen. *Ann. Phys.* **401**, 273–294 (1931).
 23. Rumi, M. & Perry, J. W. Two-photon absorption: an overview of measurements and principles. *Adv. Opt. Photonics* **2**, 451 (2010).
 24. Lavis, L. D. & Raines, R. T. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **3**, 142–155 (2008).
 25. Kupka, H. J. *Transitions in Molecular Systems.* (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2010). doi:10.1002/9783527630219
 26. Boguta, A. & Wróbel, D. Fluorescein and phenolphthalein - correlation of fluorescence and photoelectric properties. *J. Fluoresc.* **11**, 129–137 (2001).
 27. Sjöback, R., Nygren, J. & Kubista, M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **51**, 7–21 (1995).
 28. Haidekker, M. a & Theodorakis, E. a. Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors. *J. Biol. Eng.* **4**, 11 (2010).
 29. Dsouza, R. N., Pischel, U. & Nau, W. M. Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution. *Chem. Rev.* **111**, 7941–7980 (2011).
 30. Klymchenko, A. S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **50**, 366–375 (2017).

31. Kosower, E. M., Kanety, H., Kanetyla, H., Kosower, E. M. & Kanety, H. Intramolecular Donor-Acceptor Systems. 10. Multiple Fluorescences from 8-(Phenylamino) 1 -naphthalenesulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 6236–6243 (1983).
32. Möller, M. & Denicola, A. Study of protein-ligand binding by fluorescence. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **30**, 309–312 (2002).
33. Parul, D. A. *et al.* Time-resolved fluorescence reveals two binding sites of 1,8-ANS in intact human oxyhemoglobin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **58**, 156–162 (2000).
34. Kuznetsova, I. M., Sulatskaya, A. I., Povarova, O. I. & Turoverov, K. K. Reevaluation of ans binding to human and bovine serum albumins: Key role of equilibrium microdialysis in ligand - receptor binding characterization. *PLoS One* **7**, e40845 (2012).
35. Ramos, G. R., Alvarez-Coque, M. C. G., Berthod, A. & Winefordner, J. D. Fluorescence in microemulsions and reversed micelles. *Anal. Chim. Acta* **208**, 1–19 (1988).
36. Patra, A., Luong, T. Q., Mitra, R. K. & Havenith, M. The influence of charge on the structure and dynamics of water encapsulated in reverse micelles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 12875–83 (2014).
37. Upadhyay, A., Bhatt, T., Tripathi, H. B. & Pant, D. D. Photophysics of 8-anilino-naphthalene-1-sulphonate. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **89**, 201–207 (1995).
38. Kirk, W. & Wessels, W. Photophysics of ANS. IV. electron transfer quenching of ANS in alcoholic solvents and mixtures. *Biophys. Chem.* **125**, 32–49 (2007).

39. Someya, Y. & Yui, H. Fluorescence lifetime probe for solvent microviscosity utilizing anilino-naphthalene sulfonate. *Anal. Chem.* **82**, 5470–5476 (2010).
40. Kuimova, M. K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 12671–86 (2012).
41. Förster, T. & Hoffmann, G. Viscosity dependence of fluorescent quantum yields of some dye systems. *Zeitschrift für Phys. chemie* **75**, 63–76 (1971).
42. Valeur, B. & Berberan-Santos, N. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *J. Chem. Educ.* **88**, 731–738 (2011).
43. Lagorio, M. G., Cordon, G. B. & Iriel, A. Reviewing the relevance of fluorescence in biological systems. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1538–1559 (2015).
44. Chen, R. F. Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine. *Anal. Lett.* **1**, 35–42 (1967).
45. Roshchina, V. V. Vital Autofluorescence: Application to the Study of Plant Living Cells. *Int. J. Spectrosc.* **2012**, 1–14 (2012).
46. Lagorio, M. G., Cordon, G. B. & Iriel, A. Reviewing the relevance of fluorescence in biological systems. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1538–1559 (2015).
47. Oliveira, A. G. *et al.* Circadian control sheds light on fungal bioluminescence. *Curr. Biol.* **25**, 964–968 (2015).
48. Taboada, C. *et al.* Naturally occurring fluorescence in frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017). doi:10.1073/pnas.1701053114
49. Newsome, A. G., Culver, C. A. & Van Breemen, R. B. Nature's palette: The

- search for natural blue colorants. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 6498–6511 (2014).
50. García-Plazaola, J. I. *et al.* Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Sci.* **236**, 136–145 (2015).
 51. Iriel, A. & Lagorio, M. G. Is the flower fluorescence relevant in biocommunication? *Naturwissenschaften* **97**, 915–924 (2010).
 52. Delgado-Vargas, F. & Paredes-López, O. Anthocyanins and Betalains. *Nat. Color. Food Nutraceutical Uses* 167–220 (2003). doi:10.1016/S0924-2244(03)00076-1
 53. Stintzing, F. C. & Carle, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 19–38 (2004).
 54. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Botany: floral fluorescence effect. *Nature* **437**, 334 (2005).
 55. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta* **222**, 586–593 (2005).
 56. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Fluorescent pigments: New perspectives in betalain research and applications. *Food Res. Int.* **38**, 879–884 (2005).
 57. Stintzing, F. C. & Carle, R. Analysis of betalains. *Food Color. Chem. Funct. Prop.* 507–520 (2008).
 58. Strack, D., Vogt, T. & Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247–269 (2003).
 59. Gonçalves, L. C. P. *et al.* Betalainas: Das cores das beterrabas à fluorescência das

- flores. *Rev. Virtual Quim.* **7**, 292–309 (2015).
60. Miller, H. E. *et al.* Biogenese der Betalaine Biotransformation von Dopa und Tyrosin in den Betalaminsäureteil des Betanins. *Helv. Chim. Acta* **51**, 1470–1474 (1967).
 61. Brockington, S. F., Walker, R. H., Glover, B. J., Soltis, P. S. & Soltis, D. E. Complex pigment evolution in the. 854–864 (2011).
 62. Kobayashi, N. Contributions to betalain biochemistry. New structures, condensation reactions, and vacuolar transport. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002).
 63. Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H. & Strack, D. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* **208**, 114–124 (1999).
 64. Schliemann, W., Kobayashi, N. & Strack, D. The Decisive Step in Betaxanthin Biosynthesis Is a Spontaneous Reaction. *Plant Physiol.* **119**, 1217–1232 (1999).
 65. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem. Anal.* **17**, 262–269 (2006).
 66. Allegra, M. *et al.* Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 837–844 (2005).
 67. Qin, W., Long, S., Panunzio, M., Biondi, S. & Neuf, V. Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. *Molecules* **18**, 12264–12289 (2013).
 68. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. *PLoS One* **8**, e53874 (2013).
 69. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Structural implications

- on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **232**, 449–460 (2010).
70. Carey, F. A. & Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*. (Springer, 2007).
 71. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Stability and color changes of thermally treated betanin, phyllocactin, and hylocerenin solutions. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 390–398 (2006).
 72. Azeredo, H. M. C. Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 2365–2376 (2009).
 73. Gonçalves, L. C. P., Di Genova, B. M., Dörr, F. A., Pinto, E. & Bastos, E. L. Effect of dielectric microwave heating on the color and antiradical capacity of betanin. *J. Food Eng.* **118**, 49–55 (2013).
 74. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.* **71**, 41–50 (2006).
 75. Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W. & Corke, H. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4429–4435 (2001).
 76. Escribano, J., Gandía-Herrero, F., Caballero, N. & Pedreño, M. A. Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6123–6129 (2002).
 77. 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.* **19**, 2603–2616 (2005).

78. Bartoloni, F. H. *et al.* Photophysics and hydrolytic stability of betalains in aqueous trifluoroethanol. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **144**, 567–571 (2013).
79. Slimen, I. B., Najar, T. & Abderrabba, M. Chemical and Antioxidant Properties of Betalains. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 675–689 (2017).
80. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem.* **131**, 231–238 (2012).
81. Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. & Jiménez-Atiénzar, M. One-step synthesis of betalains using a novel betalamic acid derivatized support. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 3776–3782 (2014).
82. Trezzini, G. F. & Zrýd, J.-P. Characterization of Some Natural and Semi-Synthetic Betaxanthins. *Phytochemistry* **30**, 1901–1903 (1991).
83. Nakashima, K. K. Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalaínas. (Univesidade de São Paulo, 2015).
84. Wendel, M. *et al.* Photophysical properties of indicaxanthin in aqueous and alcoholic solutions. *Dye. Pigment.* **113**, 634–639 (2015).
85. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *J. Nat. Prod.* **75**, 1030–1036 (2012).
86. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *J. Nat. Prod.* **72**, 1142–1146 (2009).
87. Allegra, M. *et al.* Indicaxanthin from Cactus Pear Fruit Exerts Anti-Inflammatory Effects in Carrageenin-Induced Rat Pleurisy. *J. Nutr.* 185–192 (2014).

doi:10.3945/jn.113.183657.promoting

88. Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C. & Livrea, M. a. Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- κ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 β -exposed Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* **111**, 415–423 (2014).
89. Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M. & Livrea, M. A. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 391–5 (2004).
90. Tesoriere, L., Butera Daniela;, Allegra Mario;, Fazzari, M. & Livrea, M. A. Distribution of Betalain Pigments in Red Blood Cells after Consumption of Cactus Pear Fruits and Increased Resistance of the Cells to ex Vivo Induced Oxidative Hemolysis in Humans. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1266–1270 (2005).
91. Tesoriere, L. *et al.* Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radic. Res.* **37**, 689–696 (2003).
92. Naselli, F. *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16INK4a gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 652–658 (2014).
93. Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Gentile, C. & Livrea, M. a. Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells. *Free Radic. Res.* **40**, 753–761 (2006).
94. Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D. & Livrea, M. A. Absorption, excretion, and

- distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 941–945 (2004).
95. Liveri, M. L. T., Sciascia, L., Allegra, M., Tesoriere, L. & Livrea, M. A. Partition of indicaxanthin in membrane biomimetic systems. A kinetic and modeling approach. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10959–10963 (2009).
 96. Liveri, M. L. T. *et al.* Spectrophotometric evidence for the solubilization site of betalain pigments in membrane biomimetic systems. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2836–2840 (2007).
 97. Gonçalves, L. C. P. Betalaínas: semissíntese, capacidade antirradicalar e aplicação como sondas em sistemas biológicos. (Universidade Federal do ABC, 2012).
 98. Rodrigues, A. C. B. Efeitos do meio sobre as propriedades fotofísicas de betalaínas e sua estabilidade na presença de Cu(II). (Universidade Federal do ABC, 2012).
 99. Wendel, M. *et al.* Time-resolved spectroscopy of the singlet excited state of betanin in aqueous and alcoholic solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 18152–18158 (2015).
 100. Wendel, M. *et al.* Photophysical properties of betaxanthins: Vulgaxanthin I in aqueous and alcoholic solutions. *J. Lumin.* **167**, 289–295 (2015).
 101. Niziński, S. *et al.* Photophysical properties of betaxanthins: miraxanthin V – insight into the excited-state deactivation mechanism from experiment and computations. *RSC Adv.* **7**, 6411–6421 (2017).
 102. Reynolds, G. A. & Drexhage, K. H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers. *Opt. Commun.* **13**, 222–225 (1975).

103. Nad, S. & Pal, H. Unusual Photophysical Properties of Coumarin-151. *J. Phys. Chem. A* **105**, 1097–1106 (2001).
104. Pal, H., Nad, S. & Kumbhakar, M. Photophysical properties of coumarin-120: Unusual behavior in nonpolar solvents. *J. Chem. Phys.* **119**, 443–452 (2003).
105. Saroja, G., Sankaran, N. B. & Samanta, A. Photophysical study of two carbostyryl dyes: investigation of the possible role of a rotary decay mechanism. *Chem. Phys. Lett.* **249**, 392–398 (1996).
106. Rettig, W. & Klock, A. Intramolecular fluorescence quenching in aminocoumarines. Identification of an excited state with full charge separation. *Can. J. Chem.* **63**, 1649–1653 (1985).
107. Drexhage, K. H. H. Fluorescence efficiency of laser dyes. *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A Phys. Chem.* **80A**, 421 (1976).
108. Rechthaler, K. & Köhler, G. Excited state properties and deactivation pathways of 7-aminocoumarins. *Chem. Phys.* **189**, 99–116 (1994).
109. Nad, S. & Pal, H. Unusual Photophysical Properties of Coumarin-151. *J. Phys. Chem. A* **105**, 1097–1106 (2001).
110. Ge, P. & Selvin, P. R. Carbostyryl Derivatives as Antenna Molecules for Luminescent Lanthanide Chelates. *Bioconjug. Chem.* **15**, 1088–1094 (2004).
111. Rettig, W. & Klock, A. Intramolecular fluorescence quenching in aminocoumarines. Identification of an excited state with full charge separation. *Can. J. Chem.* **63**, 1649–1653 (1985).
112. Nielsen, M., Junge, H., Kammer, A. & Beller, M. Towards a green process for bulk-scale synthesis of ethyl acetate: Efficient acceptorless dehydrogenation of ethanol. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 5711–5713 (2012).

113. Döpp, H. & Musso, H. Isolierung und Chromophore der Farbstoffe aus *Amanita muscaria*. *Chem. Ber.* **106**, 3473–3482 (1973).
114. Barth, H., Burger, G., Döpp, H., Kobayashi, M. & Musso, H. Fliegenpilzfarbstoffe, VII. Konstitution und Synthese des Muscaflavins. *Liebigs Ann. der Chemie* **1981**, 2164–2179 (1981).
115. Stintzing, F. C., Kugler, F., Carle, R. & Conrad, J. First ¹³C-NMR Assignments of Betaxanthins. *Helv. Chim. Acta* **89**, 1008–1016 (2006).
116. Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B. & Mizrahi, Y. ¹H and ¹³C NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1725–1728 (2006).
117. Bindels, D. S. *et al.* mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat. Methods* **14**, 53–56 (2017).
118. Johnson, I. Fluorescent probes for living cells. *Histochem. J.* **30**, 123–140 (1998).
119. Bueno, C. *et al.* The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. Photophysics and photochemical reactions. *Photochem. Photobiol.* **76**, 385–390 (2002).
120. Schliemann, W., Cai, Y., Degenkolb, T., Schmidt, J. & Corke, H. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry* **58**, 159–165 (2001).
121. Bonacin, J. A., Engelmann, F. M., Severino, D., Toma, H. E. & Baptista, M. S. Singlet Oxygen Quantum Yields (ϕ_D) in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs. *J. Braz. Chem. Soc.* **20**, 31–36 (2009).
122. Wendel, M. *et al.* Chemical quenching of singlet oxygen by betanin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **15**, 872–878 (2016).
123. Tesoriere, L. *et al.* Trans-epithelial transport of the betalain pigments

- indicaxanthin and betanin across Caco-2 cell monolayers and influence of food matrix. *Eur. J. Nutr.* **52**, 1077–1087 (2013).
124. Allegra, M. *et al.* Indicaxanthin from opuntia ficus-indica crosses the blood-brain barrier and modulates neuronal bioelectric activity in rat hippocampus at dietary-consistent amounts. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 7353–7360 (2015).
125. Kanner, J., Harel, S. & Granit, R. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5178–5185 (2001).
126. Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Gentile, C. & Livrea, M. a. Kinetics of the lipoperoxyl radical-scavenging activity of indicaxanthin in solution and unilamellar liposomes. *Free Radic. Res.* **41**, 226–33 (2007).
127. Bacellar, I. O. L. *et al.* Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochem. Photobiol.* **90**, 801–813 (2014).
128. Deleu, M., Crowet, J. M., Nasir, M. N. & Lins, L. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 3171–3190 (2014).
129. Butera, D. *et al.* Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *J Agric Food Chem* **50**, 6095–6901 (2002).
130. Wybraniec, S. *et al.* Antioxidant activity of betanidin: electrochemical study in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 12163–12170 (2011).
131. Wendel, M., Kumorkiewicz, A., Wybraniec, S., Ziótek, M. & Burdziński, G. Impact of S1→S0 internal conversion in betalain-based dye sensitized solar cells. *Dye. Pigment.* **141**, 306–315 (2017).

132. Compton, R. G., Foord, J. S. & Marken, F. Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. *Electroanalysis* **15**, 1349–1363 (2003).
133. Harle, A. J. & Lyons, L. E. The Polarographic Reduction of Some Heterocyclic Molecules. Part II. Coumarin and Certain Derivatives Thereof. *J. Chem. Soc.* **352**, 1575–1578 (1950).
134. Wang, L. H. & Liu, H. H. Electrochemical reduction of coumarins at a film-modified electrode and determination of their levels in essential oils and traditional Chinese herbal medicines. *Molecules* **14**, 3538–3550 (2009).
135. Miyano, D. M. *et al.* Electrochemical study of simple coumarin and its determination in aqueous infusion of mikania glomerata. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 602–609 (2014).
136. Suryawanshi, V. D., Walekar, L. S., Gore, A. H., Anbhule, P. V & Kolekar, G. B. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *J. Pharm. Anal.* **6**, 56–63 (2016).
137. Paul, B. K., Samanta, A. & Guchhait, N. Exploring hydrophobic subdomain iia of the protein bovine serum albumin in the native, intermediate, unfolded, and refolded states by a small fluorescence molecular reporter. *J. Phys. Chem. B* **114**, 6183–6196 (2010).
138. Patra, S., Santhosh, K., Pabbathi, A. & Samanta, A. Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorescence correlation spectroscopy. *RSC Adv.* **2**, 6079–6086 (2012).
139. Bhattacharya, B., Nakka, S., Guruprasad, L. & Samanta, A. Interaction of bovine serum albumin with dipolar molecules: fluorescence and molecular docking

- studies. *J. Phys. Chem. B* **113**, 2143–2150 (2009).
140. Apadopoulou, A. T. P., Reen, R. E. J. G. & Razier, R. I. A. F. Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin : A Fluorescence Quenching Study. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 158–163 (2005).
 141. Ge, S., Kojio, K., Takahara, a & Kajiyama, T. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **9**, 131–150 (1998).
 142. Majorek, K. A. *et al.* Structural and immunologic characterization of bovine , horse , and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–182 (2012).
 143. Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. & Jiménez-Atiénzar, M. Fluorescent bioinspired protein labeling with betalamic acid. Derivatization and characterization of novel protein-betaxanthins. *Dye. Pigment.* **133**, 458–466 (2016).
 144. Patra, S., Santhosh, K., Pabbathi, A. & Samanta, A. Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorescence correlation spectroscopy. *RSC Adv.* **2**, 6079–6086 (2012).
 145. Jattinagoudar, L., Meti, M., Nandibewoor, S. & Chimatadar, S. Evaluation of the binding interaction between bovine serum albumin and dimethyl fumarate, an anti-inflammatory drug by multispectroscopic methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **156**, 164–171 (2016).
 146. Kuimova, M. K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 12671–86 (2012).
 147. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. (CRC Press, 2004).
 148. Catalán, J., de Paz, J. L. G. & Reichardt, C. On the Molecular Structure and

- UV/vis Spectroscopic Properties of the Solvatochromic and Thermochromic Pyridinium-N-Phenolate Betaine Dye B30. *J. Phys. Chem. A* **114**, 6226–6234 (2010).
149. Reichardt, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.* **94**, 2319–2358 (1994).
150. Silva, P. L., Bastos, E. L. & El Seoud, O. A. Solvation in Binary Mixtures of Water and Polar Aprotic Solvents: Theoretical Calculations of the Concentrations of Solvent-Water Hydrogen-Bonded Species and Application to Thermosolvatochromism of Polarity Probes. *J. Phys. Chem. B* **111**, 6173–6180 (2007).
151. Bastos, E. L., Silva, P. L. & El Seoud, O. A. Thermosolvatochromism of betaine dyes revisited: theoretical calculations of the concentrations of alcohol-water hydrogen-bonded species and application to solvation in aqueous alcohols. *J. Phys. Chem. A* **110**, 10287–10295 (2006).
152. Hong, Y., Lam, J. W. Y. & Tang, B. Z. Aggregation-induced emission. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5361–5388 (2011).
153. Hong, Y., Lam, J. W. Y. & Tang, B. Z. Aggregation-induced emission. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5361–5388 (2011).
154. Jung, S. H., Kwon, K.-Y. & Jung, J. H. A turn-on fluorogenic Zn(II) chemoprobe based on a terpyridine derivative with aggregation-induced emission (AIE) effects through nanofiber aggregation into spherical aggregates. *Chem. Commun. (Camb)*. **51**, 952–5 (2015).
155. McPhee, J. T., Scott, E., Levinger, N. E. & Van Orden, A. Cy3 in AOT reverse micelles I. Dimer formation revealed through steady-state and time-resolved

- spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **115**, 9576–9584 (2011).
156. Bayraktutan, T., Meral, K. & Onganer, Y. Photophysical properties of pyronin dyes in reverse micelles of AOT. *J. Lumin.* **145**, 925–929 (2014).
 157. Tatikolov, A. S. & Costa, S. M. B. Photophysics and photochemistry of hydrophilic cyanine dyes in normal and reverse micelles. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 211–218 (2002).
 158. Riter, R. E., Willard, D. M. & Levinger, N. E. Water Immobilization at Surfactant Interfaces in Reverse Micelles. *J. Phys. Chem. B* **102**, 2705–2714 (1998).
 159. Zulauf, M. & Eicke, H.-F. Inverted Micelles and Microemulsions in the Ternary System H₂O/Aerosol-OT/Isooctane as Studied by Photon Correlation Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **83**, 480–486 (1979).
 160. Belletete, M., Lachapelle, M. & Durocher, G. Dynamics of interfacial interactions between the molecular probe 2-(p-(dimethylamino)phenyl)-3,3-dimethyl-3H-indole and the Aerosol OT inverted micelles. *J. Phys. Chem.* **94**, 7642–7648 (1990).
 161. Correa, N. M., Biausti, M. A. & Silber, J. J. Micropolarity of Reverse Micelles of Aerosol-OT in n-Hexane. *J. Colloid Interface Sci.* **172**, 71–76 (1995).
 162. D.E. Moilanen, E.E. Fenn, D. Wong, M. D. F. Water dynamics at the interface in AOT reversemicelles. *J. Phys. Chem. B* **113** 8560–8568 (2009).
 163. Jain, T., Varshney, M. & Maitra, A. Structural studies of aerosol OT reverse micellar aggregates by FT-IR spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **93**, 7409–7416 (1989).
 164. Belletete, M., Lachapelle, M. & Durocher, G. Dynamics of interfacial

- interactions between the molecular probe 2-(p-(dimethylamino)phenyl)-3,3-dimethyl-3H-indole and the Aerosol OT inverted micelles. *J. Phys. Chem.* **94**, 7642–7648 (1990).
165. Hermann, J. P. & Ducuing, J. Absolute Measurement of Two-Photon Cross Sections. *Phys. Rev. A* **5**, 2557–68 (1977).
166. Makarov, N. S., Drobizhev, M. & Rebane, A. Two-photon absorption standards in the 550-1600 nm excitation wavelength range. *Opt. Express* **16**, 4029–4047 (2008).
167. Fischer, a, Cremer, C. & Stelzer, E. H. Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a pulsed titanium-sapphire laser. *Appl. Opt.* **34**, 1989–2003 (1995).
168. Mariz, I. F. A. *et al.* Molecular architecture effects in two-photon absorption: from octupolar molecules to polymers and hybrid polymer nanoparticles based on 1,3,5-triazine. *J. Mater. Chem. B* **1**, 2169 (2013).
169. Schwille, P., Haupts, U., Maiti, S. & Webb, W. W. Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation. *Biophys. J.* **77**, 2251–2265 (1999).
170. He, G. S., Tan, L.-S., Zheng, Q. & Prasad, P. N. Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem Rev* **108**, 1245–1330 (2008).
171. Diaspro, A., Chirico, G. & Collini, M. Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy. *Q. Rev. Biophys.* **38**, 97–166 (2005).
172. Marcelo, G. *et al.* Nonlinear emission of quinolizinium-based dyes with application in fluorescence lifetime imaging. *J. Phys. Chem. A* **119**, 2351–2362

- (2015).
173. Mariz, I. F. A., Pinto, S., Lavrado, J., Paulo, A. & Martinho, M. G. Cryptolepine and Quindoline : understanding their photophysics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2017). doi:10.1039/C7CP00455A
 174. Brenton, A. G. & Godfrey, A. R. Accurate mass measurement: Terminology and treatment of data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1821–1835 (2010).
 175. Menezes, F., Fedorov, A., Baleizão, C., Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. Methods for the analysis of complex fluorescence decays: sum of Becquerel functions versus sum of exponentials. *Methods Appl. Fluoresc.* **1**, 15002 (2013).
 176. Marason, E. G. Laser Dye DCM: CW, Synchronously Pumped, Cavity Pumd Single-Frequency Performance. *Opt. Commun.* **37**, 56–58 (1981).
 177. Van Stokkum, I. H. M., Larsen, D. S. & Van Grondelle, R. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1657**, 82–104 (2004).
 178. El-Zohry, A., Orthaber, A. & Zietz, B. Isomerization and aggregation of the solar cell dye D149. *J. Phys. Chem. C* **116**, 26144–26153 (2012).
 179. Charles, J., Stewart, M. & Stewart, J. C. M. Colorimetric Determination of Phospholipids Ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **104**, 10–14 (1980).
 180. Williams, A. T. R., Winfield, S. A. & Miller, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst* **108**, 1067–1071 (1983).
 181. Stintzing, F. C., Schieber, a & Carle, R. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J*

- Agric Food Chem* **50**, 2302–2307 (2002).
182. Marcus, Y. Recommended methods for the purification of solvents and tests for impurities: 1,2-Ethandiol and 2,2,2-Trifluoroethanol. *Pure Appl. Chem.* **62**, 139–147 (1990).
183. Xu, C. & Webb, W. W. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B* **13**, 481–491 (1996).

Súmula Curricular

I DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Clara Beltran Rodrigues

Local e data de nascimento: São Bernardo do Campo - SP, 09 de novembro de 1988

II EDUCAÇÃO

Universidade Federal do ABC, Santo André, 2012, Mestre em Ciência e Tecnologia/Química

Universidade Federal do ABC, Santo André, 2010 Bacharel em Química

Universidade Federal do ABC, Santo André, 2010 Bacharel em Ciência e Tecnologia

III FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Não possui

IV ATIVIDADES ACADÊMICAS

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

Período	1º semestre/2015 (Bolsita Estadiq)
Disciplina	QFL 0150 - Química Orgânica
Curso de graduação	Bacharelado em Ciências Biomédicas
Supervisor	Prof. Dr. Erick L. Bastos
Período	1º semestre/2014
Disciplina	QFL 2343 – Reatividade de compostos orgânicos I
Curso de graduação	Bacharelado em Química
Supervisor	Prof. Dr. Luiz Fernando Silva Junior
Período	2º semestre/2013 (Bolsita PAE)
Disciplina	QFL2343 - Química Orgânica Experimental
Curso de graduação	Bacharelado em Química
Supervisor	Prof. Dr. Josef W. Baader

V. PUBLICAÇÕES

V. I. Artigos completos publicados em periódicos

Barbeiro, C. S.; Vasconcelos, S. N. S.; Zukerman-Schpector, J.; Caracelli, I.; Pimenta, D. C.; Rodrigues, A. C. B.; Fernandes, A. S.; Correra, T. C.; Bastos, E. L.; Stefani, H. A. Chlorinated 2-hydroxynaphthalenoxazolines: Synthesis, Reaction Mechanism and Fluorescence Properties. *ChemistrySelect*. **2016**, *1*, p.5647 -5652.

Vasconcelos, S. N. S.; Rodrigues, A. C. B.; Bastos, E. L.; Stefani, H. A. Synthesis of a Tyr-Tyr Peptide Library and Fluorescence of the Stilbenyl Derivatives. *ChemistrySelect*. **2016**, *1*, p.1287 -1291.

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

Buzzo, G. S.; Rodrigues, A. C. B.; de Souza, R.; Silva, J. C. M.; Bastos, E. L.; Spinace, E. V.; O Neto, A.; Assumpcao, M. H. Synthesis of hydroquinone with co-generation of electricity from phenol aqueous solution in a proton exchange membrane fuel cell reactor. *Catalysis Communications*. **2015**, *59*, p.113 -115.

Bartoloni, F. H.; Gonçalves, L. C. P.; Rodrigues, A. C. B.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Bastos, E. L. Photophysics and hydrolytic stability of betalains in aqueous trifluoroethanol. *Monatshefte für Chemie*. **2013**, *144*, p.567 - 571.

Lima, F. S.; Cuccovia, I. M.; Horinek, D.; Amaral, L. Q.; Riske, K. A.; Schreier, S.; Salinas, R. K.; Bastos, E. L.; Pires, P. A. R.; Bozelli J. R., J. C.; Favaro, D. C.; Rodrigues, A. C. B.; Dias, L. G.; Seoud, O. A. E.; Chaimovich, H. The effect of counterions on the shape, hydration and degree of order at the interface of cationic micelles: the triflate case. *Langmuir*. **2013**, *29*, p.4193 - 4203.

Dantoni, P.; Rodrigues, A. C. B.; Matsuda, M. M. N.; Coichev, N. Effect of some surfactants on the chemiluminescent reactions of bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate and bis(2-nitrophenyl)oxalate with hydrogen peroxide. *Canadian Journal of Chemistry*. **2012**, *90*, p.534 - 541.

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

RODRIGUES, A. C. B.; MARIZ, I. F. A.; MARTINHO, J. M. G.; BASTOS, E. L. Linear and non-linear photophysical properties of coumarinic betalains. In: The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 2015, Wuerzburg. **MAF 14 - Book of Abstracts**, v.P-109. p.205

RODRIGUES, A. C. B.; JUNQUEIRA, H. C.; Da SILVA, C. B.; ITRI, R.; BASTOS, E. L. Incorporação de uma betalaina cumarínica em lipossomas. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. **SBQ**, 2014. p.FOT-008.

FREITAS, B. C.; RODRIGUES, A. C. B.; OLIVEIRA, C. C. S.; ITRI, R.; CAMARGO,

P. H. C.; BASTOS, E. L. Uso de betalaínas na fabricação de nanopartículas de ouro. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. **SBQ**, 2014. p.FOT-024.

RODRIGUES, A. C. B.; BASTOS, E. L. Efeito da presença de íons cobre(II) na cinética de braqueamento de betalaínas. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia. **SBQ**, 2012. p.FOT-021.

RODRIGUES, A. C. B.; GONÇALVES, L. C. P.; BASTOS, E. L. Medium viscosity effects on the fluorescence of betalains. In: 12th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes, 2011, Strasbourg. **MAF 12 - Book of Abstracts**. p.262

RODRIGUES, A. C. B.; GONÇALVES, L. C. P.; Araújo, J. N.; BASTOS, E. L. Efeito da viscosidade do meio sobre a fluorescência de betalaínas. In: 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis., **SBQ** 2011, p. FOT-006

RODRIGUES, A. C. B.; Lopes, N. B.; GONÇALVES, L. C. P.; BAADER, W. J.; BASTOS, E. L. Uso do luminol na determinação da atividade anti-radicalar de betalaínas In: 33ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. **SBQ**, 2010. p.FOT-009.

RODRIGUES, A. C. B.; Honório, K. M.; COICHEV, N.; DANTONI, P. Comparação do comportamento de diferentes oxalatos e fluoróforos na reação quimiluminescente do sistema peróxi-oxalato. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. **SBQ** , 2009. p.QA-031

RODRIGUES, A. C. B.; COICHEV, N.; DANTONI, P. Estudo da influência dos íons metálicos cobre(II) e níquel(II) na reação quimiluminescente do sistema peróxi-oxalato. In: 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador. **ENQA**, 2009. p.TR-607 .

RODRIGUES, A. C. B.; DANTONI, P.; COICHEV, N. Influência do imidazol e de surfactantes na reação quimiluminescente do sistema peróxi-oxalato por peróxido de hidrogênio. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. **SBQ**, 2008. p.QA-144.

DANTONI, P.; RODRIGUES, A. C. B.; COICHEV, N. Estudo da Influência de Surfactantes na Reação Quimiluminescente de H₂O₂ com Peróxi-Oxalato. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. **ENQA** , 2007. p.OT-091.

VI OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

VI I. Estágios de pesquisa realizados durante o doutorado

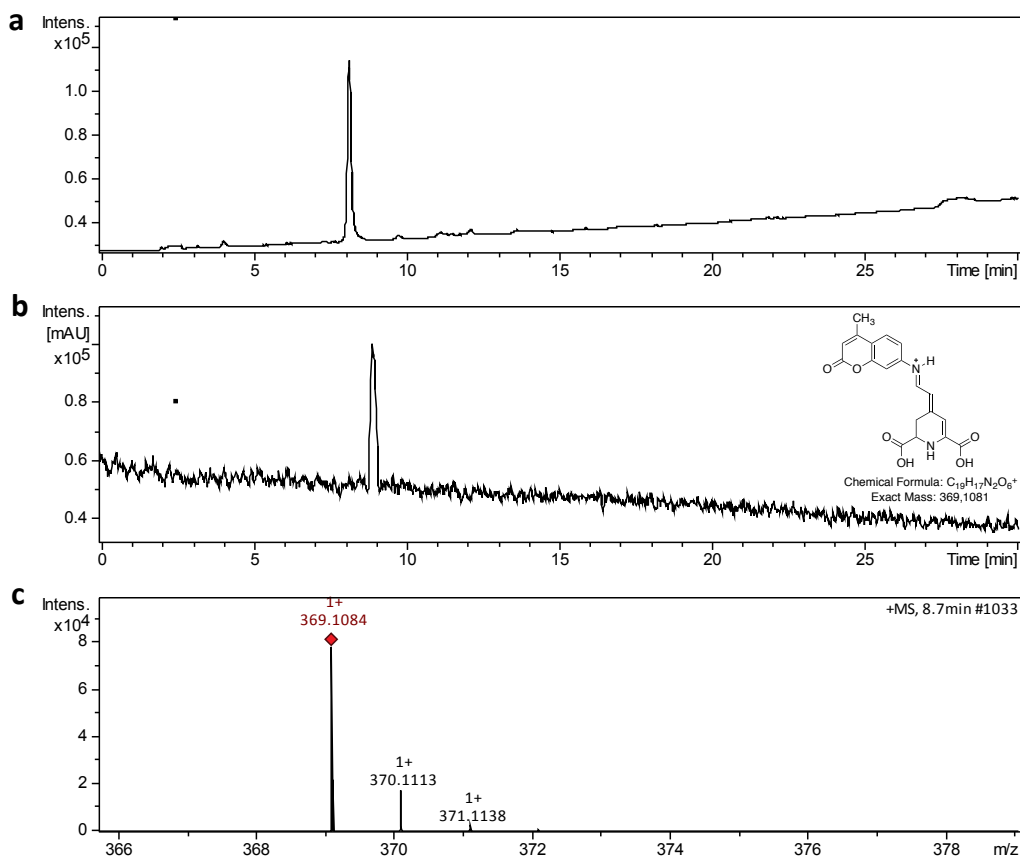
Agosto/2016 a Setembro/2016: *Ångström Laboratoriet*, Universidade de Uppsala sob orientação do Prof. Dr. Jacinto Sá.

Setembro/2014 a Fevereiro/2015: *Centro de Química-Física Molecular*, Instituto Superior Técnico (Lisboa) sob orientação do Prof. Dr. José M. G. Martinho.

7. Anexos

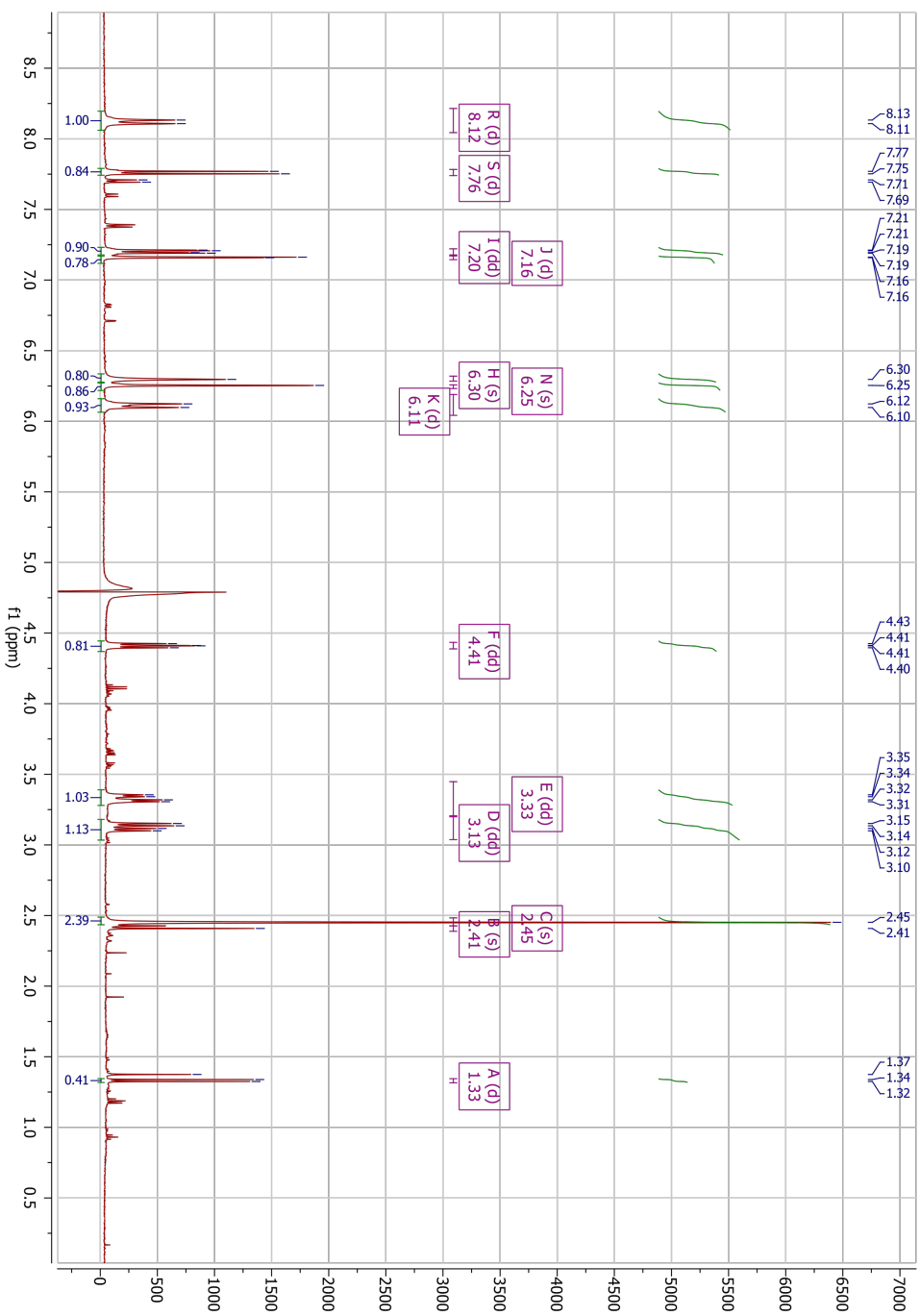
7.1.	Cromatogramas: Análise de HPLC-MS(ESI ⁺) de cBeet120	168
7.2.	Espectro de 1H-RMN (500 MHz) de cBeet120	169
7.3.	Cromatogramas: Análise de HPLC-MS(ESI ⁺) de cBeet151	170
7.4.	Espectro de 1H-RMN (500 MHz) de cBeet151	171
7.5.	Cromatogramas: Análise de HPLC-MS(ESI ⁺) de csBeet124.....	172
7.6.	Espectro de 1H-RMN (500 MHz) de csBeet124	173
7.7.	Cromatogramas: Análise de HPLC-MS(ESI ⁺) de cbzBeet.....	174
7.8.	Espectro de 1H-RMN (500 MHz) de cbzBeet	175
7.9.	Tabela de deslocamentos químicos de ¹ H-RMN, 500 MHz, de cBeets e csBeet124 em D ₂ O	176
7.10.	Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de cBeets em água (Determinados no CQFM-IST)	178
7.11.	Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de cBeets em solução tampão pH 3	179
7.12.	Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de cBeets em solução tampão pH 5	180
7.13.	Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de cBeets em solução tampão pH 7	181
7.14.	Comparação entre os τ_{FI} de cBeets em água e em soluções tampão pH 3, 5 e 7 ..	182
7.15.	Espectros de emissão de fluorescência de cBeets em função da temperatura.....	183
7.16.	Correlação linear entre o tempo de vida de fluorescência (τ_{FI}) de cBeets com o aumento da temperatura	184
7.17.	Determinação da barreira de ativação do processo não radiativo de Miraxantina I em metanol.....	185
7.18.	Espectros de absorção da partição de cBeets em membrana de POPC, em pH 3 ..	186
7.19.	Espectros de absorção da partição de cBeets em membrana de POPC, em pH 5 ..	187
7.20.	Espectros de absorção da partição de cBeets em membrana de POPC, em pH 7 ..	188
7.21.	Curva de calibração para dosagem lipídica.....	189

7.1. Cromatogramas: Análise de HPLC-MS(ESI⁺) de cBeet120

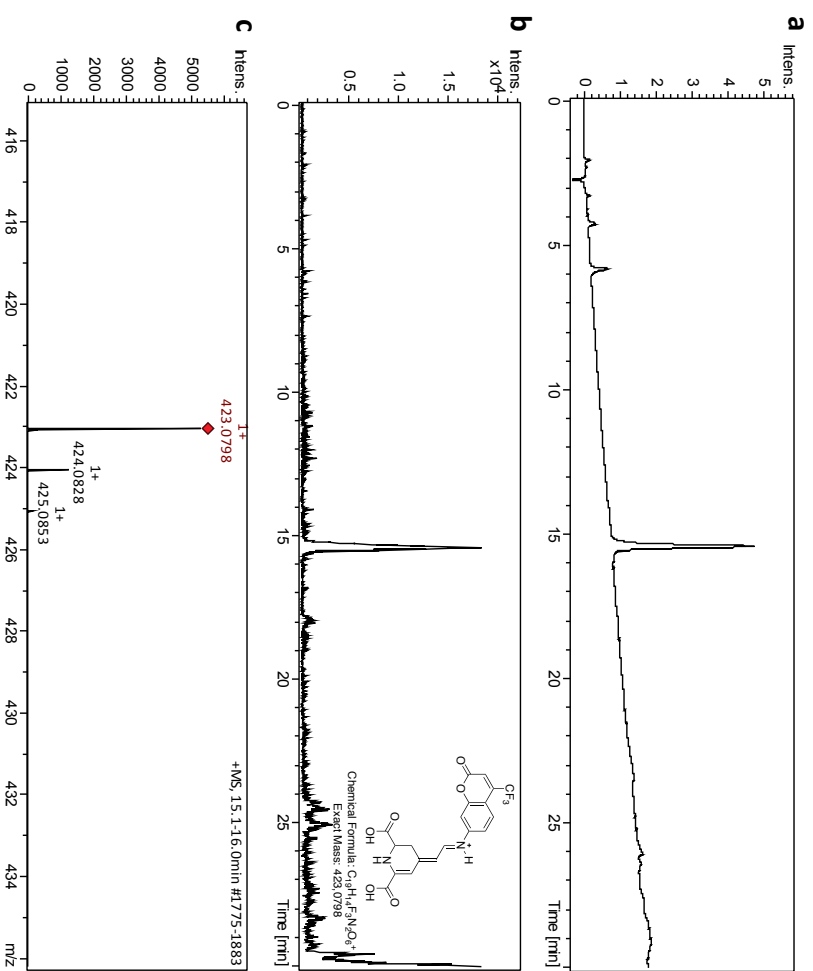


Análise de HPLC-MS(ESI⁺) de alta resolução de **cBeet120**. (a) Cromatograma em $\lambda^{abs} = 254$ nm, (b) Espectro de massas de alta resolução da amostra com $t_R = 8,7$ min; (c) Distribuição isotópica da $m/z = 369,1084$. Condições da corrida: Acentis C_{18} (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m, Supelco) em condições de fase reversa, num gradiente de 30-95% B em 30 min (Solvente A: 0,05% de HCO_2H em H_2O ; e solvente B: 0,05% de HCO_2H em 60%MeCN/ H_2O). Íon quasi-molecular ($[M+H]^+$) apresenta relação massa-carga (m/z) calculada para $C_{19}H_{17}N_2O_6^+$: 369,1081; observada: 369,1084 (dif.: -0,81 ppm).

7.2. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz) de cBet120

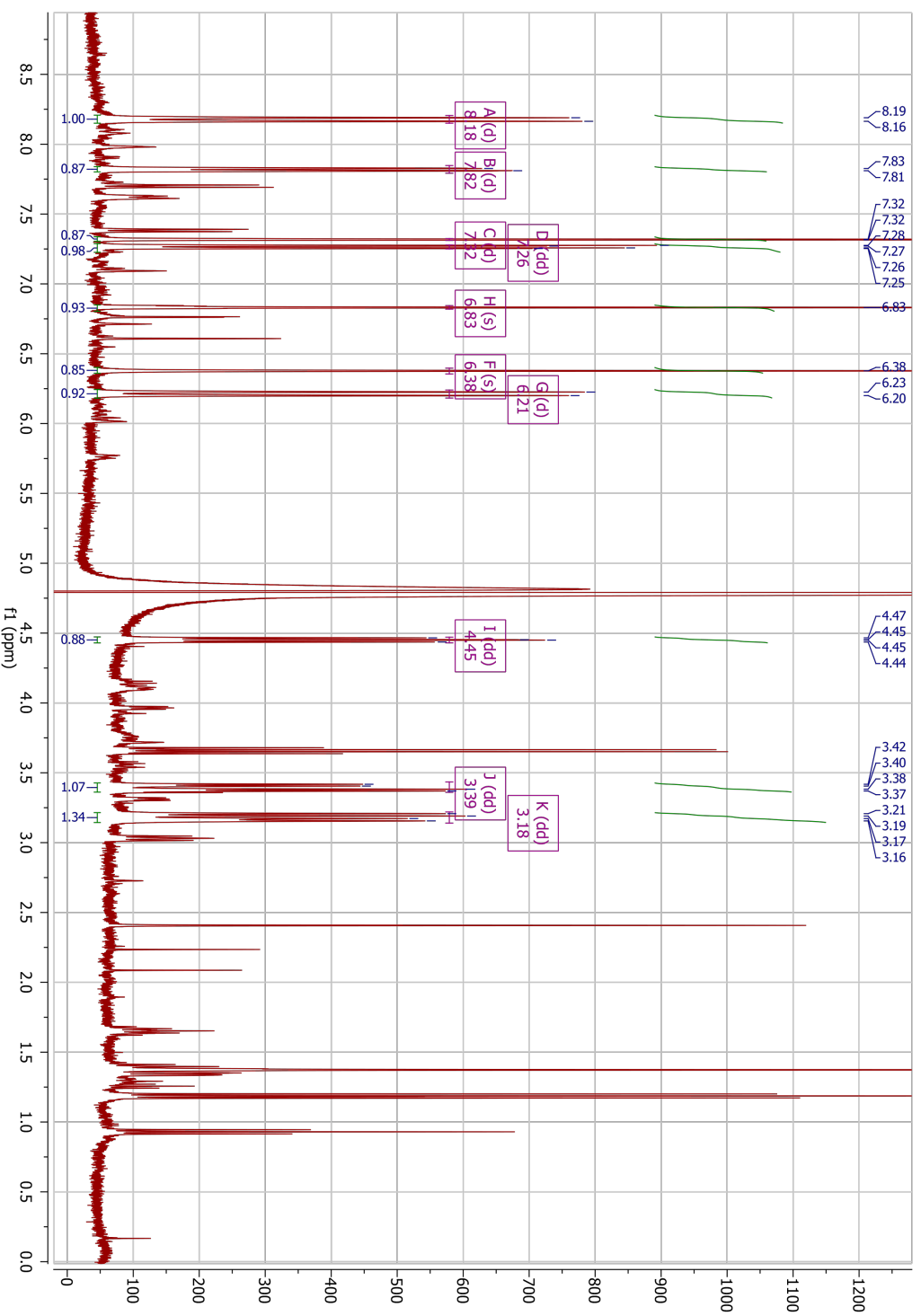


7.3. Cromatogramas: Análise de HPLC-MS(ESI+) de cBeet151

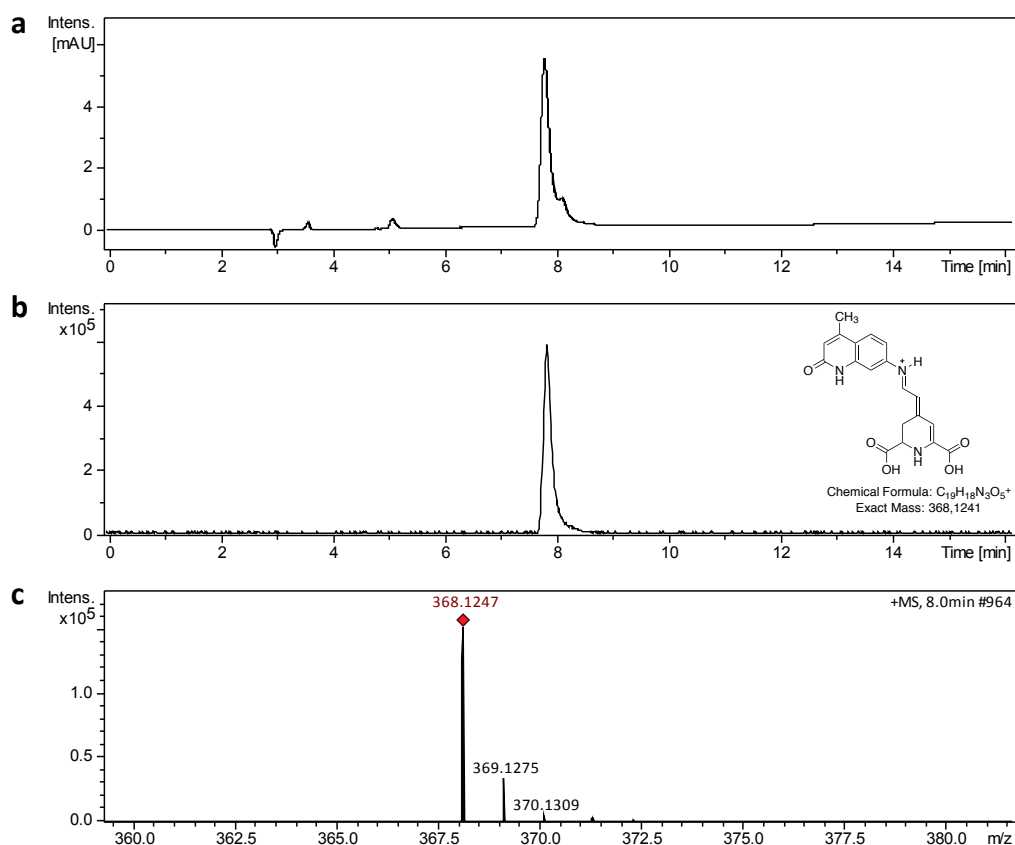


Análise de HPLC-MS(ESI+) de alta resolução de **cBeet151**. a) Cromatograma em $\lambda_{\text{abs}} = 254 \text{ nm}$, (b) Espectro de massas de alta resolução da amostra com $t_{\text{R}} = 15,1 \text{ min}$; (c) Distribuição isotópica da $m/z = 423,0798$. Condições da corrida: coluna Acetis C₁₈ (25 cm x 4,6 mm, 5 μm , Supelco) em condições de fase reversa, num gradiente de 30-95% B em 30 min (Solvente A: 0,05% de HCO₂H em H₂O; e solvente B: 0,05% de HCO₂H em 60%MeCN/H₂O). Íon quasi-molecular ([M+H]⁺) apresenta relação massa-carga (m/z) calculada para C₁₉H₁₄F₃N₂O₆⁺: 423,0798; observada 423,0798.

7.4. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz) de cBeet151

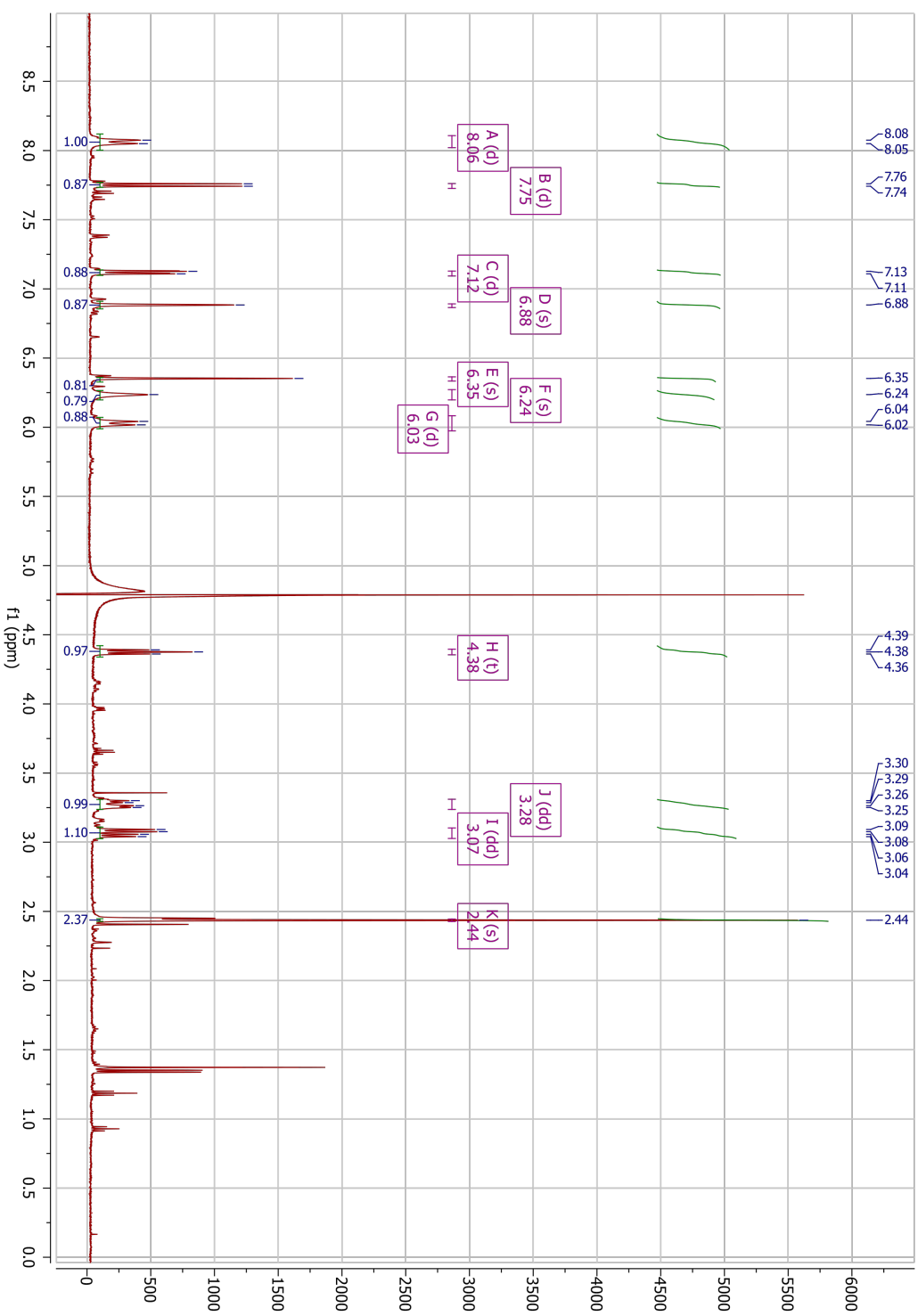


7.5. Cromatogramas: Análise de HPLC-MS(ESI+) de csBeet124

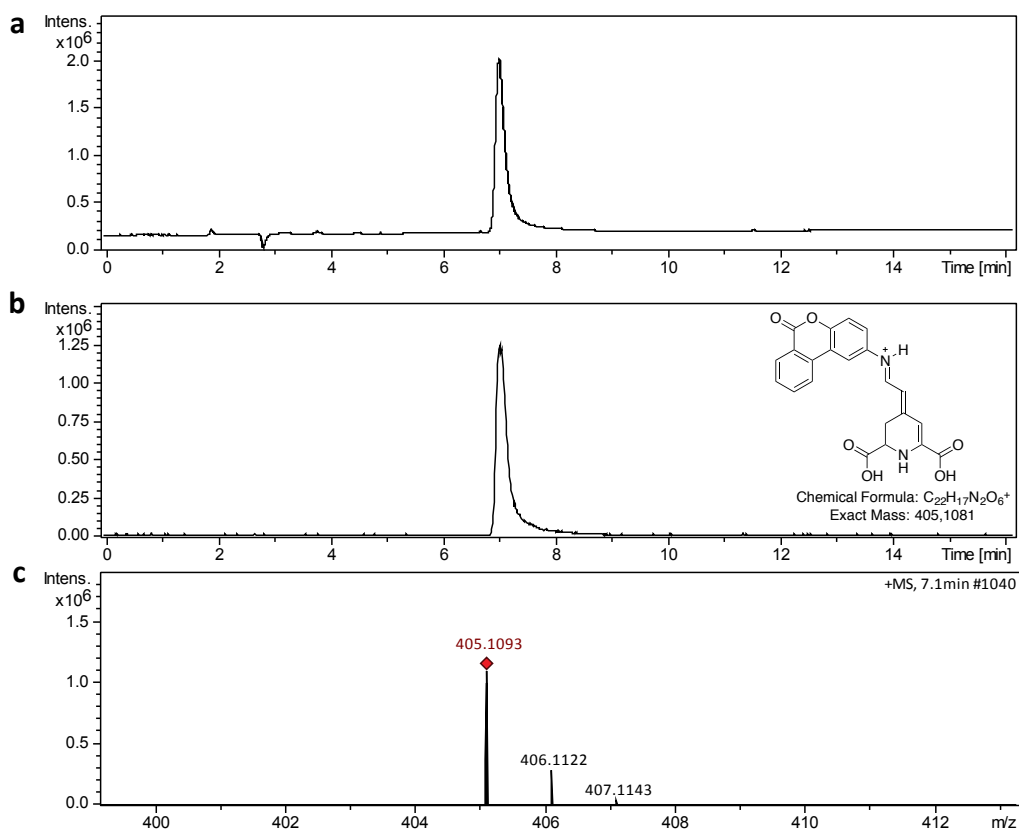


Análise de HPLC-MS(ESI+) de alta resolução de **csBeet124**. (a) Cromatograma em $\lambda^{abs} = 254$ nm, (b) Espectro de massas de alta resolução da amostra com $t_R = 8,0$ min; (c) Distribuição isotópica da $m/z = 368,1247$. Condições da corrida: coluna Acentis C_{18} (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m, Supelco) em condições de fase reversa, num gradiente de 30-45% B em 15 min (Solvente A: 0,05% de HCO_2H em H_2O ; e solvente B: 0,05% de HCO_2H em 60%MeCN/ H_2O). Íon quasi-molecular ($[M+H]^+$) apresenta relação massa-carga (m/z) calculada para $C_{19}H_{18}N_3O_5^+$: 368,1241; observada 368.1247 (dif.: -1,63 ppm).

7.6. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz) de cSBæet124

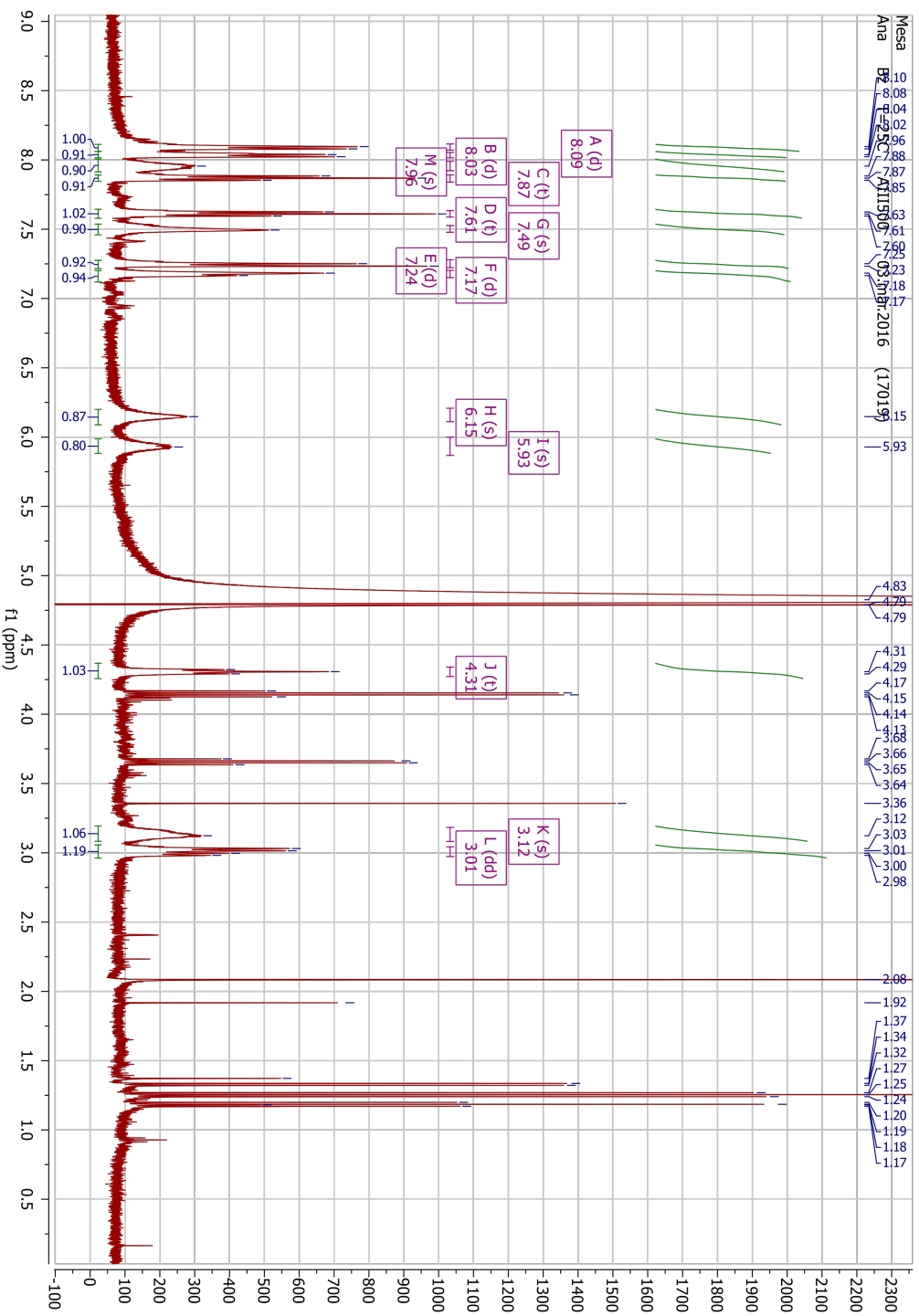


7.7. Cromatogramas: Análise de HPLC-MS(ESI+) de cbzBeet

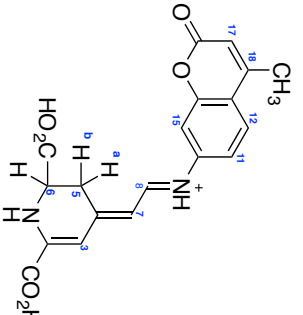
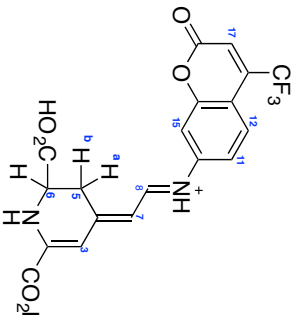
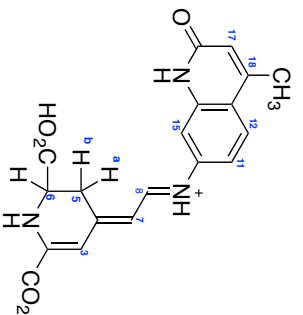
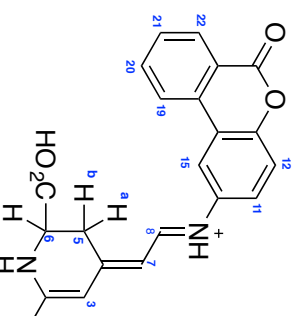


Análise de HPLC-MS(ESI+) de alta resolução de **cbzBeet**. (a) Cromatograma em $\lambda^{\text{abs}} = 254 \text{ nm}$, (b) Espectro de massas de alta resolução da amostra com $t_R = 7,1 \text{ min}$; (c) Distribuição isotópica da $m/z = 405,1093$. Condições da corrida: coluna Acentis C₁₈ (25 cm x 4,6 mm, 5 μm , Supelco) em condições de fase reversa, num gradiente de 55-70% B em 15 min (Solvente A: 0,05% de HCO₂H em H₂O; e solvente B: 0,05% de HCO₂H em 60%MeCN/H₂O). Íon quasi-molecular ($[M+H]^+$) apresenta relação massa-carga (m/z) calculada para C₂₂H₁₇N₂O₅⁺: 405,1081; observada: 405,1093 (dif.: -2,96 ppm).

7.8. Espectro de 1H-RMN (500 MHz) de cbzBeet



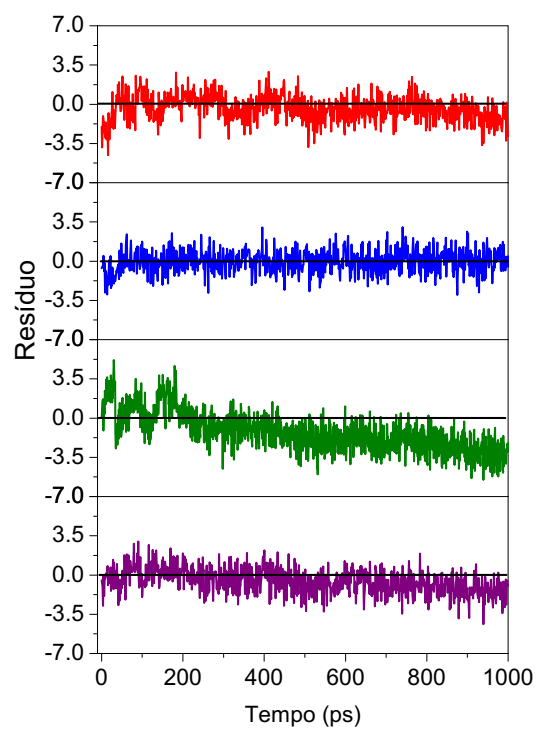
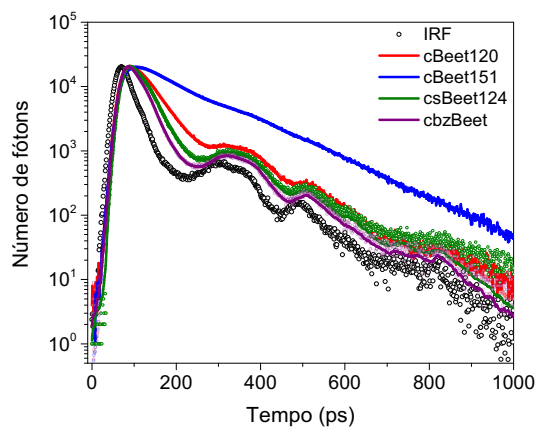
7.9. Tabela de deslocamentos químicos de ¹H-RMN, 500 MHz, de cBeets e csBeets 24 em D₂O

H	δ (ppm)			
	 <p>cBeet120</p>	 <p>cBeet151</p>	 <p>csBeet124</p>	 <p>cbzBeet''</p>
3	6,30 (1H, s)	6,38 (1H, s)	6,24 (1H, s)	6,15 (1H, s)
5a	3,33 (1H, dd) ² J _{5a,5b} = 17,6 Hz ³ J _{5a,6} = 7 Hz	3,39 (1H, dd) ² J _{5a,5b} = 17,6 Hz ³ J _{5a,6} = 7 Hz	3,33 (1H, dd) ² J _{5a,5b} = 17,6 Hz ³ J _{5a,6} = 7,5 Hz	3,12 (1H, bs)
5b	3,13 (1H, dd) ² J _{5b,5a} = 17,6 Hz ³ J _{5b,6} = 8 Hz	3,18 (1H, dd) ² J _{5a,5b} = 17,6 Hz ³ J _{5b,6} = 8 Hz	3,18 (1H, dd) ² J _{5a,5b} = 17,6 Hz ³ J _{5b,6} = 7,5 Hz	3,01 (1H, dd) ² J _{5b,5a} = 17,1 Hz ³ J _{5b,6} = 7,8 Hz
6	4,41 (1H, dd) ³ J _{6,5a} = 7 Hz ³ J _{6,5b} = 8 Hz	4,45 (1H, dd) ³ J _{6,5a} = 7 Hz ³ J _{6,5b} = 8 Hz	4,41 (1H, t) ³ J _{6,5a/5b} = 7,5 Hz	4,31 (1H, t) ³ J _{6,5a/5b} = 7,8 Hz
7	6,11 (1H, d) ³ J _{7,8} = 12,8 Hz	6,21 (1H, d) ³ J _{7,8} = 12,9 Hz	6,03 (1H, d) ³ J _{7,8} = 12,8 Hz	5,93 (1H, bs)
8	8,12 (1H, d) ³ J _{8,7} = 12,8 Hz	8,18 (1H, d) ³ J _{8,7} = 12,9 Hz	8,06 (1H, d) ³ J _{8,7} = 12,8 Hz	7,96 (1H, bs)
11	7,20 (1H, dd) ³ J _{11,12} = 8,7 Hz, ⁴ J _{11,15} = 2 Hz	7,26 (1H, dd) ³ J _{11,12} = 8 Hz ⁴ J _{11,15} = 2,2 Hz	7,12 (1H, dd) ³ J _{11,12} = 8,9 Hz	7,17 (1H, d) ³ J _{11,12} = 8,8 Hz

12	7,76 (1H, d) $^3J_{12,11} = 8,7\text{ Hz}$	7,82 (1H, d) $^3J_{12,11} = 8\text{ Hz}$	7,75 (1H, dd) $^3J_{12,11} = 8,9\text{ Hz}$	7,24 (1H, d) $^3J_{12,11} = 8,8\text{ Hz}$
15	7,16 (1H, d) $^4J_{15,11} = 2\text{ Hz}$	7,32 (1H, d) $^4J_{15,11} = 2,2\text{ Hz}$	6,88 (1H, s)	7,49 (1H, s)
17	6,25 (1H, s)	6,83 (1H, s)	6,35 (1H, s)	-
18	2,45 (3H, s)	-	2,44 (3H, s)	-
19	-	-	-	8,03 (1H, d) $^3J_{19,20} = 7,6\text{ Hz}$
20	-	-	-	7,61 (1H, t) $^3J_{20/19,21} = 7,3\text{ Hz}$
21	-	-	-	7,87 (1H, t) $^3J_{21/20,22} = 7,6\text{ Hz}$
22	-	-	-	8,09 (1H, d) $^3J_{22,21} = 8,3\text{ Hz}$

^a Atribuição tentativa baseada nos deslocamentos químicos e nas constantes de acoplamentos obtidas para os demais compostos.

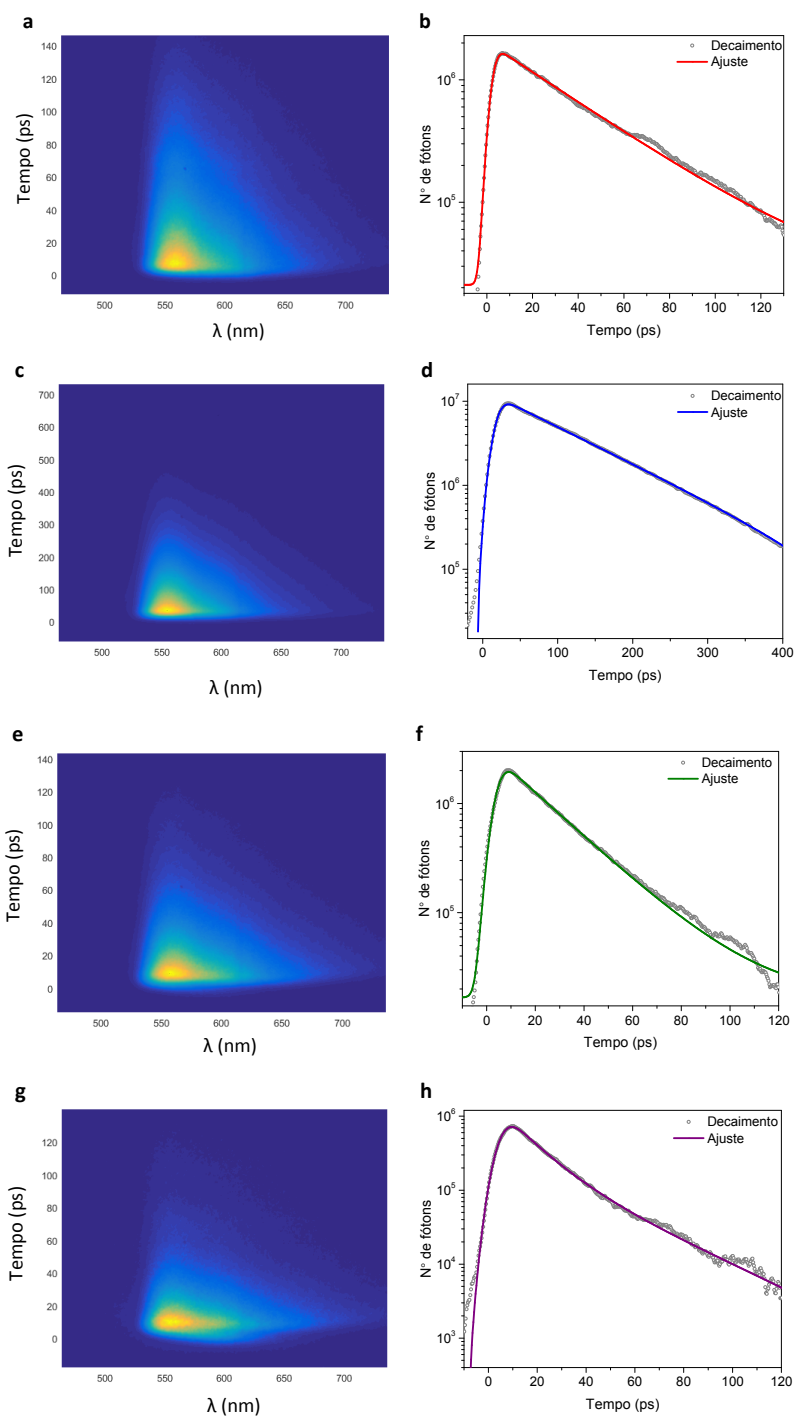
7.10. Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de cBeets em água (Determinados no CQFM-IST)



Parâmetros dos ajustes mono-exponenciais dos decaimentos de emissão de cBeets em água

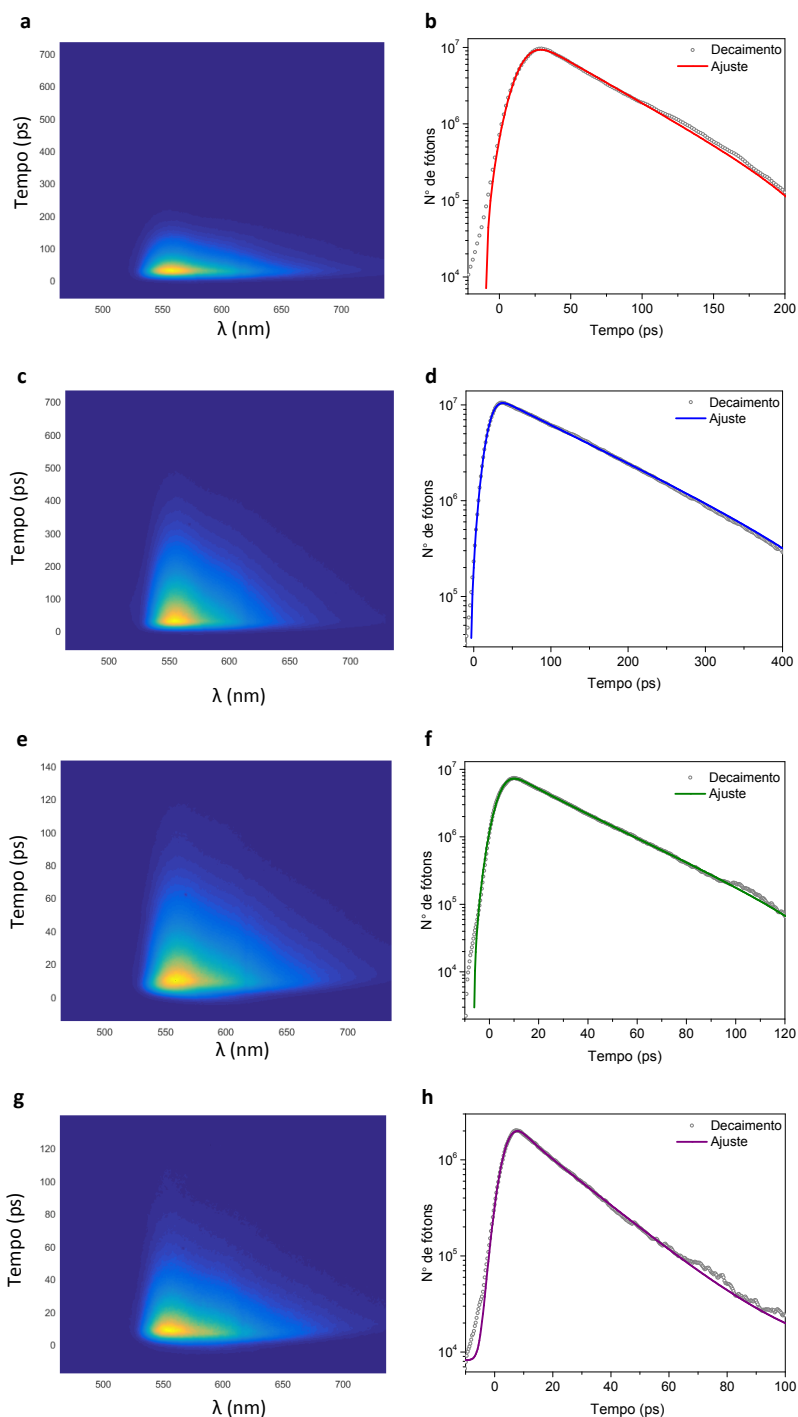
	τ_{F1}	χ^2
cBeet120	38 ps	1,15
cBeet151	100 ps	1,21
csBeet124	19 ps	5,3
cbzBeet	18 ps	1,09

7.11. Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de cBeets em solução tampão pH 3



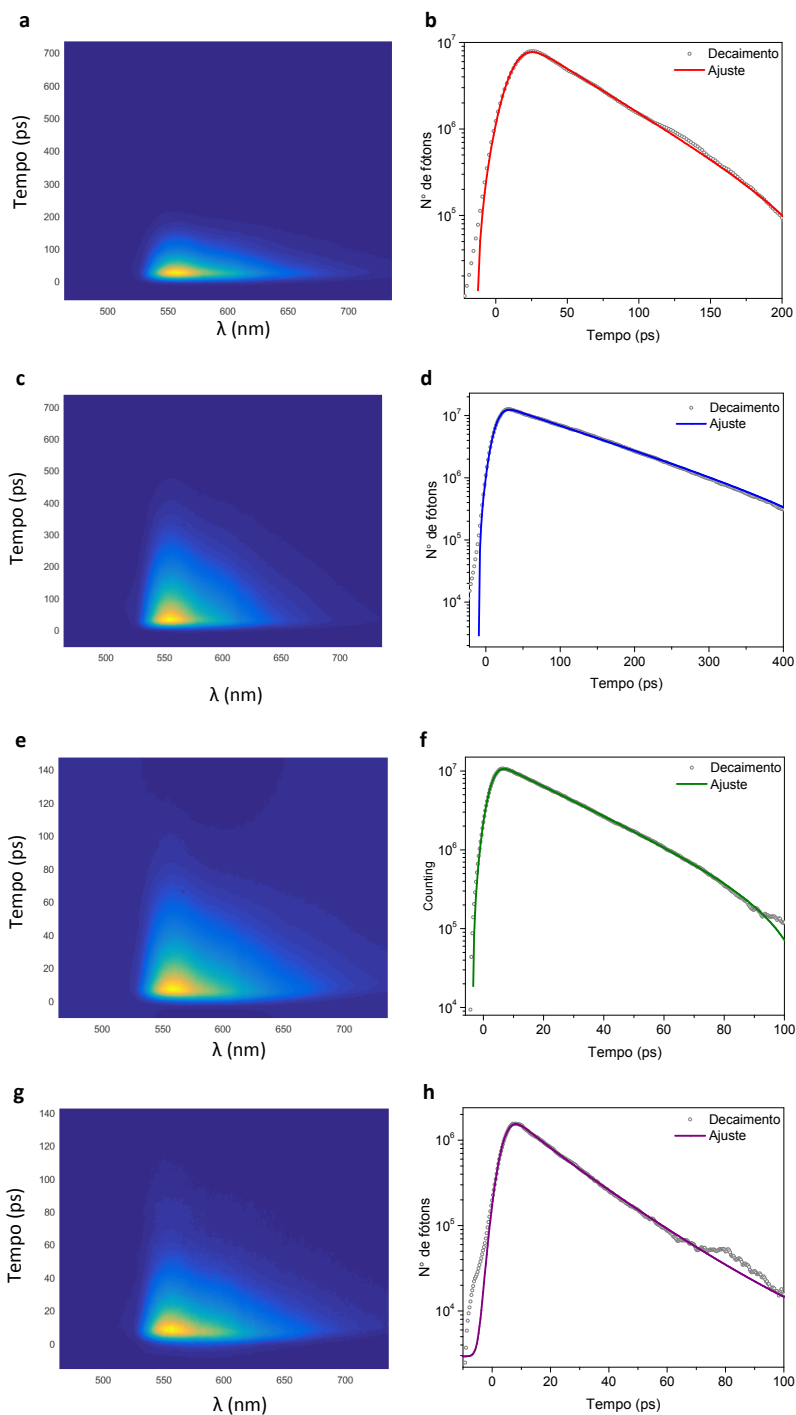
Decaimentos dos tempos de vida de emissão de fluorescência (τ_{Fl}) de cBeets em tampão $H_3PO_4/H_2PO_4^-$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3. Imagem obtida na streak câmera e decaimento, com ajuste monoexponencial (IRF), respectivamente: a) e b) **cBeet120** (22 ps) $\lambda^{em} = 570 \text{ nm}$, c) e d) **cBeet151** (22 ps) $\lambda^{em} = 570 \text{ nm}$, e) e f) **csBeet124** (8 ps) $\lambda^{em} = 570 \text{ nm}$ e g) e h) **cbzBeet** (8 ps) $\lambda^{em} = 564 \text{ nm}$.

7.12. Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de cBeets em solução tampão pH 5



Decaimentos dos tempos de vida de emissão de fluorescência (τ_{F1}) de cBeets em tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5. Imagem obtida na streak câmara e decaimento, com ajuste monoexponencial (IRF), respectivamente: a) e b) **cBeet120** (22 ps) $\lambda^{\text{em}} = 570 \text{ nm}$, c) e d) **cBeet151** (23 ps) $\lambda^{\text{em}} = 570 \text{ nm}$, e) e f) **csBeet124** (9 ps) $\lambda^{\text{em}} = 570 \text{ nm}$ e g) e h) **cbzBeet** (7 ps) $\lambda^{\text{em}} = 564 \text{ nm}$.

7.13. Decaimentos do tempo de vida de emissão de fluorescência de cBeets em solução tampão pH 7



Decaimentos dos tempos de vida de emissão de fluorescência (τ_{FI}) de cBeets em tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0,1 mol L⁻¹ pH 7. Imagem obtida na streak câmara e decaimento, com ajuste monoexponencial (IRF), respectivamente: a) e b) **cBeet120** (23 ps) $\lambda^{em} = 570$ nm, c) e d) **cBeet151** (23 ps) $\lambda^{em} = 570$ nm, e) e f) **csBeet124** (6 ps) $\lambda^{em} = 570$ nm e g) e h) **cbzBeet** (6 ps) $\lambda^{em} = 564$ nm.

7.14. Comparação entre os τ_{FI} de cBeets em água e em soluções tampão

pH 3, 5 e 7

cBeet120

Solvente	τ_{FI} (ps)	IRF (ps)	r^2
H ₂ O	38	6,2	0.9993
Tampão H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 3	39	21,8	0.9989
Tampão CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 5	41	22,5	0.9991
Tampão H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 7	43	22,7	0.9994

cBeet151

Solvente	τ_{FI} (ps)	IRF (ps)	r^2
H ₂ O	110	22,7	0.9988
Tampão H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 3	100	22,1	0.9995
Tampão CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 5	110	23,3	0.9996
Tampão H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 7	110	22,8	0.9996

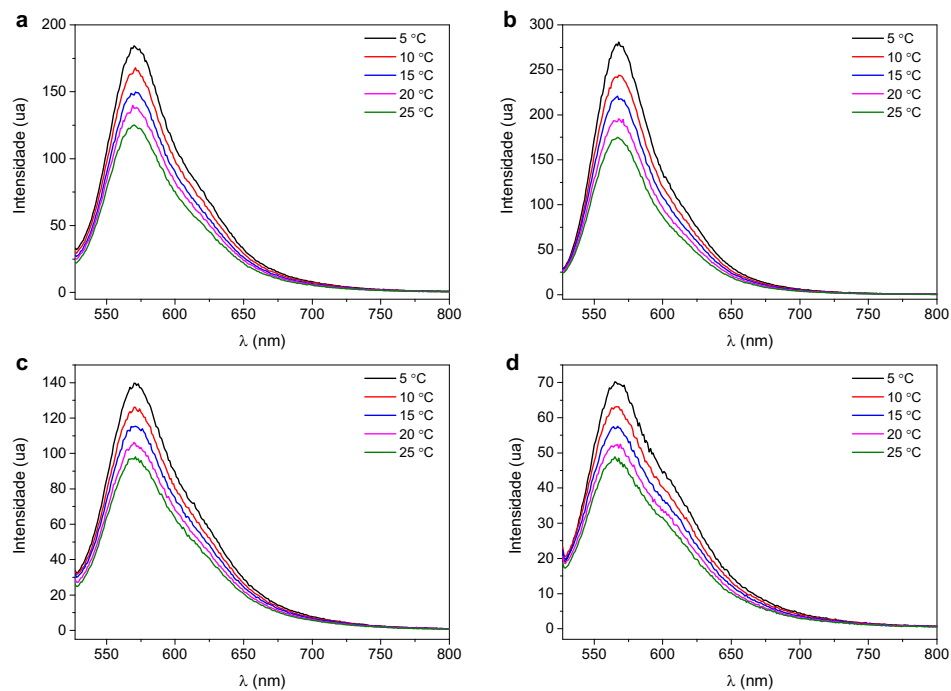
csBeet124

Solvente	τ_{FI} (ps)	IRF (ps)	r^2
H ₂ O	23	6,4	0.9992
Tampão H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 3	21	7,6	0.9986
Tampão CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 5	24	8,8	0.9990
Tampão H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 7	24	6,0	0.9998

cbzBeet

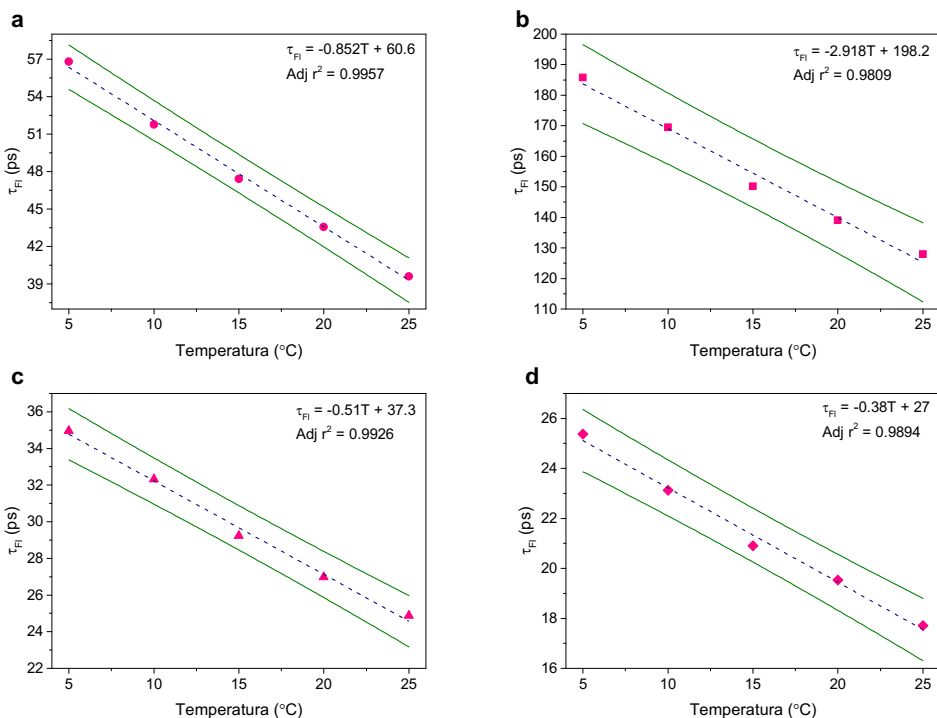
Solvente	τ_{FI} (ps)	IRF (ps)	r^2
H ₂ O	17	6,5	0.9986
Tampão H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 3	16	8,2	0.9980
Tampão CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 5	17	6,6	0.9991
Tampão H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ 0,1 mol L ⁻¹ pH 7	17	6,4	0.9990

7.15. Espectros de emissão de fluorescência de cBeets em função da temperatura



a) **cBeet120** ($Abs^{\lambda=500 \text{ nm}} = 0,0634$); b) **cBeet151** ($Abs^{\lambda=500 \text{ nm}} = 0,0201$); c) **csBeet124** ($Abs^{\lambda=500 \text{ nm}} = 0,0598$) e d) **cbzBeet** ($Abs^{\lambda=500 \text{ nm}} = 0,0554$). Condições do equipamento (Varian Cary Eclipse): $\lambda^{ex} = 500 \text{ nm}$, $\lambda^{em} = 527-800 \text{ nm}$, $f^{ex} = 10 \text{ nm}$; $f^{em} = 20 \text{ nm}$, tensão = 600 V.

7.16. Correlação linear entre o tempo de vida de fluorescência (τ_{FI}) de cBeets com o aumento da temperatura



Valores de τ_{FI} , em ps, obtidos para os decaimentos de cBeets em meio aquoso, com ajustes mono-exponenciais, com o aumento da temperatura

Temperatura (° C)	cBeet120	cBeet151	csBeet124	cbzBeet
5	56,8	186	34,9	25,4
10	51,8	170	32,3	23,1
15	47,4	150	29,2	20,9
20	43,6	139	26,9	19,5
25	39,6	128	24,9	17,7

7.17. Determinação da barreira de ativação do processo não radiativo de
Miraxantina I em metanol

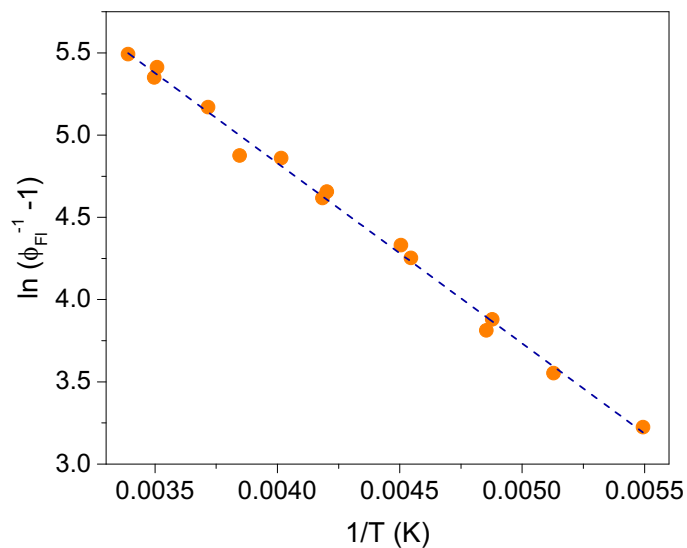
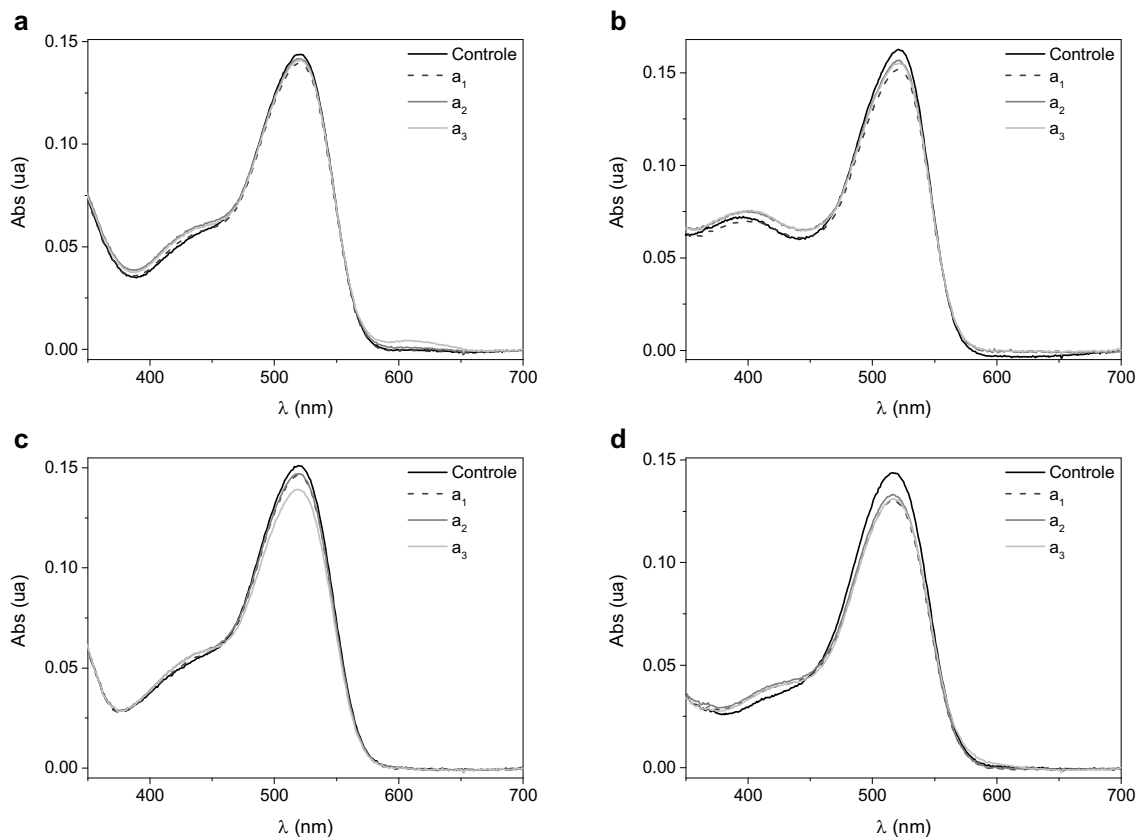


Gráfico de Arrhenius da energia de ativação para a desativação não radiativa (E_a^{nr}) de Miraxantina I em metanol. $\ln(\phi_{FI}^{-1} - 1) = 9,12 - 1099,5T^{-1}$, $Adj-R^2 = 0,9938$.

$\phi_{FI} = 4,7 \times 10^{-3}$ e $k_r = 2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$, em metanol^[97]

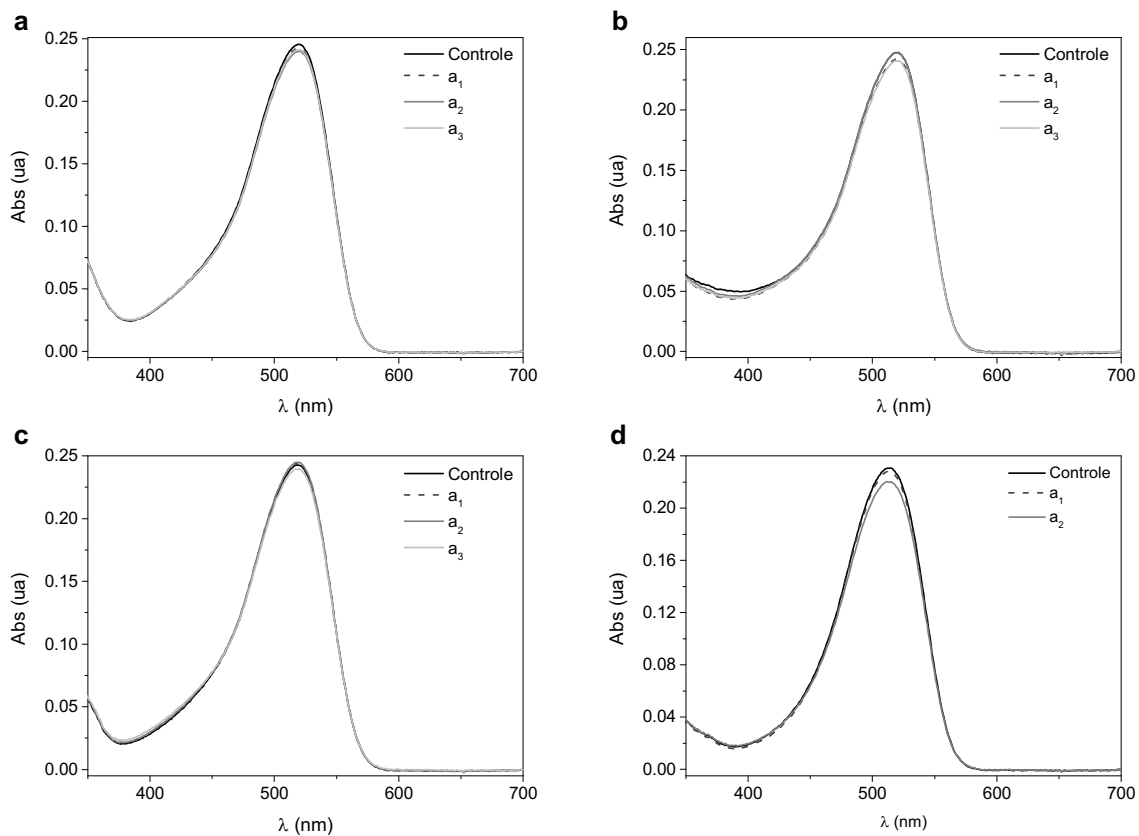
7.18. Espectros de absorção da partição de cBeets em membrana de POPC, em pH 3



a) **cBeet120**, b) **cBeet151**, c) **csBeet124** e b) **cbzBeet**. Tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 10 mmol L^{-1} , pH 3.

Controle: 60 μL de tampão; a₁- a₃: replicatas, cada uma com 60 μL de suspensão lipídica de POPC.

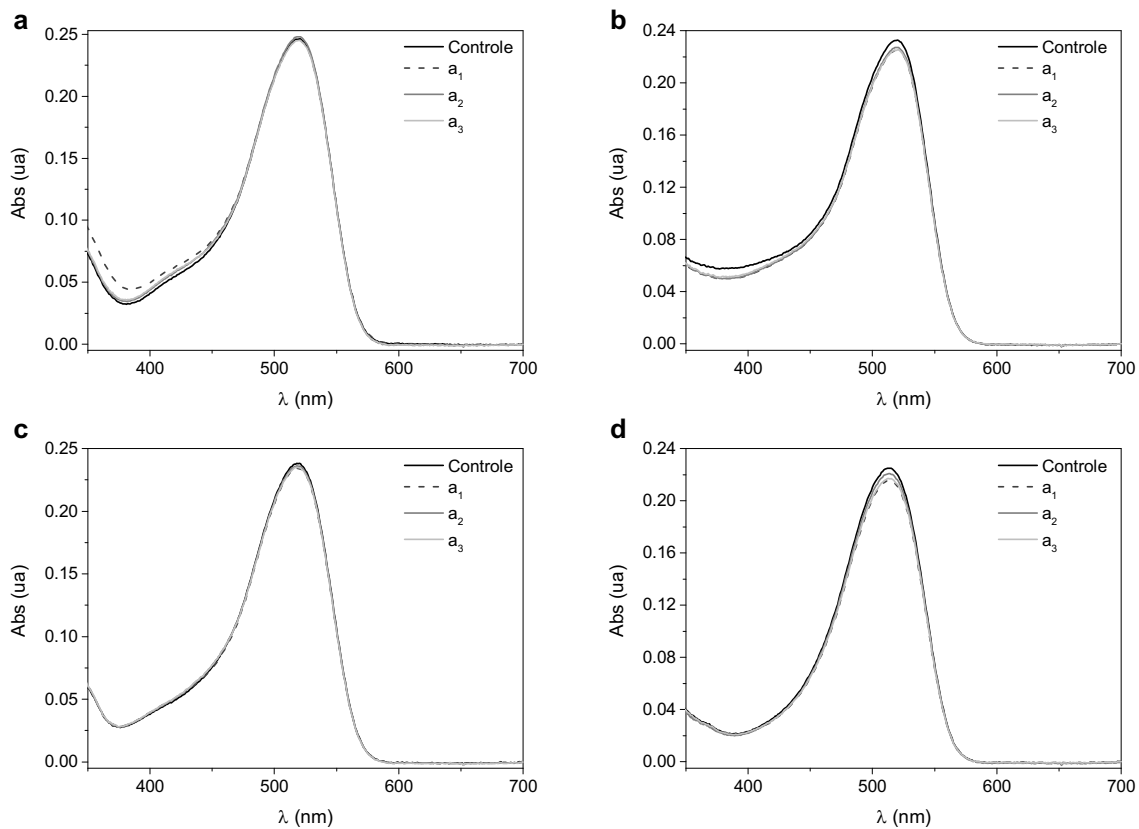
7.19. Espectros de absorção da partição de cBeets em membrana de POPC, em pH 5



a) **cBeet120**, b) **cBeet151**, c) **csBeet124** e b) **cbzBeet**. $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 10 mmol L^{-1} , pH 5.

Controle: $60 \mu\text{L}$ de tampão; a_1 - a_3 : replicatas, cada uma com $60 \mu\text{L}$ de suspensão lipídica de POPC.

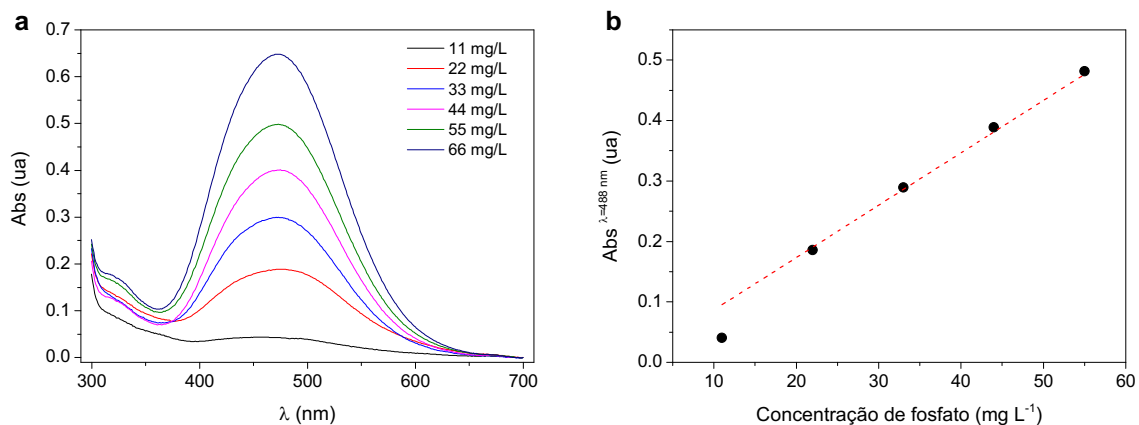
7.20. Espectros de absorção da partição de cBeets em membrana de POPC, em pH 7



a) cBeet120, b) cBeet151, c) csBeet124 e d) cbzBeet. Tampão $\text{HPO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 10 mmol L^{-1} , pH 7.

Controle: 60 μL de tampão; a_1 - a_3 : replicatas, cada uma com 60 μL de suspensão lipídica de POPC.

7.21. Curva de calibração para dosagem lipídica



a) Espectros de absorção do complexo formado entre ferrotiocianato de amônio-POPC, em relação ao aumento da concentração de lipídeo. B) Curva de calibração da concentração de lipídeo obtida para dosagem de POPC nos pHs estudados. Abs _{$\lambda=488$ nm} = 0,00867; Adj. $r^2 = 0,9922$.

