

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

CAROLINE DE OLIVEIRA MACHADO

**Efeitos da Interação Direta de Betalaínas com a Luz e com
Fotossensibilizadores que Atuam na Retina**

Versão Corrigida

Data do Depósito na SPG: 28/06/2022

São Paulo

2022

Página deixada em branco intencionalmente.

CAROLINE DE OLIVEIRA MACHADO

**Efeitos da Interação Direta de Betalaínas com a Luz e com
Fotossensibilizadores que Atuam na Retina**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo

2022

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

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

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

M113e Machado, Caroline de Oliveira
Efeitos da Interação Direta de Betalainas com a Luz e com Fotossensibilizadores que Atuam na Retina / Caroline de Oliveira Machado. - São Paulo, 2022. 212 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Bastos, Erick Leite

1. betalainas. 2. antocianinas. 3. carotenoides. 4. antioxidante. 5. cor. I. T. II. Bastos, Erick Leite, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Efeitos da interação direta de betalaínas com a luz e com fotossensibilizadores que atuam na retina"

CAROLINE DE OLIVEIRA MACHADO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - no Programa de Química.

Prof. Dr. Erick Leite Bastos
(Orientador e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista
IQ - USP

Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro
IQSC - USP

Prof. Dr. René Alfonso Nome Silva
IQ - UNICAMP

SÃO PAULO
21 de outubro de 2022

Página deixada em branco intencionalmente.

Dedico esta Tese à minha amada Summer.

Página deixada em branco intencionalmente.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Erick Bastos pelos ensinamentos ao longo desses anos de convivência. Obrigada por acreditar na minha capacidade quando eu muitas vezes duvidei.

Ao Leandro pelo apoio incondicional e por ser uma referência de amor e dedicação ao trabalho na qual eu sempre vou me inspirar.

À minha família e amigos pela paciência e incentivo diários.

À Nathana, Ana Paula e Larissa pelo companheirismo, dentro e fora do laboratório, que foi imprescindível nessa jornada. Aos colegas do laboratório pela convivência e apoio.

Aos professores Jacinto Sá, Maurício Baptista, Fábio Forti, Renata Tonelli e Elizabeth Gaillard por me receberem em seus laboratórios me oferecendo toda infraestrutura necessária para realização dos meus experimentos. Aos pós-graduandos Dr. Paulo Newton, Jessica Farias, Dr. Yocef Hattori, Dr. Mohammed Abdellah, Prajkta Chivte e Dr. Michael Vega por dedicarem parte do seu tempo para me auxiliar em meus experimentos com tanta dedicação.

À Dra. Helena Junqueira pelos conselhos, ensinamentos e pela assistência constante. Aos funcionários do IQ: Joaquim Matheus, Cezar, Luciana, Cristiane, Vânia, Janaína e Milton por toda ajuda durante esses anos.

Ao Instituto de Química por disponibilizar as ferramentas necessárias para o meu aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Bolsa 2015/24760-0 e BEPE 2019/03134-4) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código de financiamento 001) pelo financiamento.

Avisos

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

*“Não me iludo
Tudo permanecerá
Do jeito que tem sido
Transcorrendo
Transformando
Tempo e espaço navegando
Todos os sentidos...”*

Gilberto Gil, Tempo Rei.

Página deixada em branco intencionalmente.

Resumo

MACHADO, C. O. **Efeitos da interação direta de betalaínas com a luz e com fotossensibilizadores que atuam na retina.** 2022. 212 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A luz solar fornece energia para a manutenção da vida e a sua interação com a matéria permite que vejamos o mundo à nossa volta. Entretanto, a exposição excessiva à luz, em especial à radiação ultravioleta e visível de alta energia, pode favorecer processos fotoquímicos deletérios que branqueiam produtos coloridos e afetam negativamente a viabilidade celular. Esta Tese de Doutorado mostra que é possível combinar pigmentos naturais em vesículas pequenas de forma a modular a cor e propriedades antioxidantes do sistema, que a degradação térmica de metabólitos secundários da classe das betalaínas é menos importante do que sua fotodecomposição e que betalaínas naturais reduzem o dano ao DNA induzido pela fotossensibilização de A2E e seus isômeros com luz azul. Esses achados são importantes para promover a substituição de aditivos colorantes e antioxidantes sintéticos por produtos naturais, para entender como pigmentos naturais com diferentes propriedades químicas atuam em conjunto e para o desenvolvimento de novas maneiras de evitar o dano oxidativo fotoinduzido em ambiente celular.

Palavras-chave – betalaínas, antocianinas, carotenoides, lipofuscina, lipossoma, cor, antioxidante, A2E, retina.

Página deixada em branco intencionalmente.

Abstract

MACHADO, C. O. **Effects of direct interaction of betalains with light and with retinal photosensitizers**. 2022. 212 p. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Sunlight provides energy for the maintenance of life and its interaction with matter allows us to see the world around us. However, excessive exposure to light, especially ultraviolet and high-energy visible radiation, can favor deleterious photochemical processes that bleach colored products and negatively affect cell viability. This Doctoral Thesis shows that it is possible to combine natural pigments in small vesicles to modulate the color and antioxidant properties of the system, that the thermal degradation of betalain secondary metabolites is less important than their photodecomposition, and that natural betalains reduce the DNA damage induced by photosensitization of A2E and its isomers with blue light. These findings are important to promote the replacement of coloring additives and synthetic antioxidants with natural products, to understand how natural pigments with different chemical properties work together, and to development new ways to prevent photoinduced oxidative damage in the cellular environment.

Keywords – betalains, anthocyanins, carotenoids, lipofuscin, liposome, color, antioxidant, A2E, retina.

Página deixada em branco intencionalmente.

Lista de abreviaturas e siglas

Ant	Cianidina-3-O-glucosídeo
Bn	Betanina
BtP	Indicaxantina
COSY	Espectroscopia de correlação, <i>do inglês correlation spectroscopy</i>
EDG	Grupo doador de elétrons, <i>do inglês electron donating group</i>
EIS	Efeito isotópico do solvente
EICS	Efeito isotópico cinético do solvente
EIES	Efeito isotópico de equilíbrio do solvente
EWG	Grupo atraente de elétrons, <i>do inglês electron withdrawing group</i>
HBt ^a	Ácido betalâmico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, <i>do inglês high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Espectrômetro de massas de alta resolução, <i>do inglês high resolution mass spectrometer,</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>k_{nr}</i>	Constante cinética para processos não radiativos
<i>k_{obs}</i>	Constante cinética observada
<i>k_r</i>	Constante cinética para processos radiativos
Lut	Luteína
<i>m/z</i>	Relação entre massa e carga
PCET	<i>Proton single electron transfer</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SET	<i>Single electron transfer</i>

TpAcO	Tampão acetato
TpP	Tampão fosfato
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
t_R	Tempo de retenção

^a Essa é a única abreviação de nome de reagente listada aqui, dada a sua importância. Para as abreviações usadas para outros reagentes vide texto.

Lista de símbolos

δ	Deslocamento químico, em ppm
ε	Coefficiente de absorção molar, em $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
ϕ_{Fl}	Rendimento quântico de fluorescência
χ	Fração molar
τ_{Fl}	Tempo de vida de fluorescência
λ^{Abs}	Comprimento de onda no máximo de absorção
λ^{EX}	Comprimento de onda no máximo de excitação
λ^{EM}	Comprimento de onda no máximo de emissão

Página deixada em branco intencionalmente.

Sumário

PREÂMBULO	25
1-1. CAPÍTULO 1 – LIPOSSOMAS COLORIDOS COM PIGMENTOS NATURAIS.....	27
1-1.1. INTRODUÇÃO	27
1-2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
1-2.1. OBTENÇÃO DOS PIGMENTOS NATURAIS.....	31
1-2.1.1 Betanina	31
1-2.1.2 Indicaxantina.....	37
1-2.1.3 Cianidina-3-O-glicosídeo	42
1-2.1.4 Luteína	46
1-2.2. <i>Lipossomas coloridos com pigmentos naturais</i>	49
1-2.2.1 Preparação de cSUVs e persistência dos pigmentos	49
1-2.2.2 Modulação da cor	55
1-2.3. <i>Capacidade antioxidante em lipossomas</i>	59
1-2.4. CONCLUSÕES	63
1-2.5. PARTE EXPERIMENTAL.....	64
1-2.6. <i>Reagentes e solventes</i>	64
1-2.7. <i>Soluções</i>	64
1-2.8. <i>Síntese, extração e purificação</i>	65
1-2.8.1 Betanina	65
1-2.8.2 Indicaxantina.....	66
1-2.8.3 Ácido betalâmico	66
1-2.8.4 Semissíntese de indicaxantina	67
1-2.8.5 Cianidina-3-O-glucosídeo.....	68
1-2.8.6 Luteína	68
1-2.9. <i>Caracterização estrutural</i>	69

1-2.10. Cromatografia acoplada à espectrometria de massas.....	69
1-2.11. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	70
1-2.12. Propriedades fotofísicas e redox.....	70
1-2.12.1 Espectroscopia de absorção e emissão	70
1-2.13. Preparação de lipossomas	70
1-2.14. Ensaio cinético ABTS.....	71
1-3. CAPÍTULO 2 – FOTODEGRADAÇÃO DE BETALAÍNAS	75
1-3.1. INTRODUÇÃO.....	75
1-3.2. Degradação fotoquímica de betalaínas.....	78
1-3.3. Aditivos estabilizantes	78
1-3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
1-3.5. Efeitos da temperatura e do pH.....	81
1-3.5.1 Caracterização dos produtos de fotodegradação por espectrometria de massas	93
1-3.6. Influência de antioxidantes.....	103
1-3.6.1 Alternância entre períodos de claro e escuro	108
1-3.7. Mecanismos de fotodegradação.....	112
1-3.8. CONCLUSÕES.....	117
1-3.9. PARTE EXPERIMENTAL.....	118
1-3.10. Reagentes.....	118
1-3.11. Soluções.....	118
1-3.12. Sínteses e purificações.....	119
1-3.13. Degradação térmica e fotoinduzida	119
1-3.14. Ensaio cinéticos	120
1-3.15. Análise dos produtos de degradação por espectrometria de massas.....	120
1-4. CAPÍTULO 3 – EFEITO DE PIGMENTOS NATURAIS SOBRE O DANO CELULAR	
FOTOINDUZIDO	121

1-4.1. INTRODUÇÃO	121
1-4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
1-4.3. <i>Obtenção de A2E e de pigmentos naturais</i>	127
1-4.4. <i>Estudo da interação entre A2E e pigmentos naturais</i>	135
1-4.5. <i>Efeito de pigmentos naturais sobre a foto-oxidação de A2E in vitro</i>	141
1-4.6. <i>Estudo das condições de incubação do A2E em células da retina</i>	146
1-4.7. <i>Efeito de pigmentos naturais antioxidantes na viabilidade de células incubadas com A2E</i> 155	
1-4.8. CONCLUSÃO.....	158
1-4.9. PARTE EXPERIMENTAL.....	161
1-4.10. <i>Reagentes e solventes</i>	161
1-4.11. <i>Síntese, extração e purificação</i>	161
1-4.11.1 A2E	161
1-4.11.2 Pigmentos naturais antioxidantes	162
1-4.12. <i>Métodos de caracterização</i>	162
1-4.12.1 Espectroscopia de absorção molecular	162
1-4.12.2 Espectrometria de massas de alta resolução	162
1-4.12.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	163
1-4.13. <i>Estudo da interação entre A2E e pigmentos naturais</i>	163
1-4.14. <i>Cultura de células ARPE-19</i>	164
1-4.14.1 Cultivo celular	164
1-4.15. <i>Exposição de células ARPE-19 a A2E</i>	164
1-4.16. <i>Tratamento com pigmentos naturais</i>	165
1-4.17. <i>Irradiação com luz azul</i>	166
1-4.18. <i>Viabilidade celular, ensaio MTT</i>	168
1-4.19. <i>Genotoxicidade, ensaio cometa</i>	168
1-5. CONCLUSÕES	171

1-6. REFERÊNCIAS172

1-7. SÚMULA CURRICULAR198

Preâmbulo

Preâmbulo

Esta Tese de Doutorado trata da interação entre pigmentos naturais da classe das betalaínas com luz ou fotossensibilizadores endógenos encontrados na retina. Os pigmentos naturais são os responsáveis pelas cores encontradas na natureza e apresentam características apreciáveis para aplicações em sistemas que carecem de cor ou que sejam susceptíveis à oxidação. Os principais achados descritos neste documento são: *i*) é possível combinar betalaínas e outros pigmentos naturais para criar lipossomas com cor e propriedades antioxidantes moduláveis, *ii*) luz é mais importante na degradação de betalaínas do que a temperatura e antioxidantes de quebra de cadeia previnem esse processo e *iii*) betalaínas previnem o dano ao DNA induzido por luz azul na presença do fotossensibilizador A2E.

O documento está dividido em três capítulos que apresentam as evidências experimentais obtidas, bem como a fundamentação teórica e detalhes experimentais que suportam as conclusões. Há uma conclusão final que integra os capítulos.

Página deixada em branco intencionalmente.

Capítulo 1

Lipossomas coloridos com pigmentos naturais

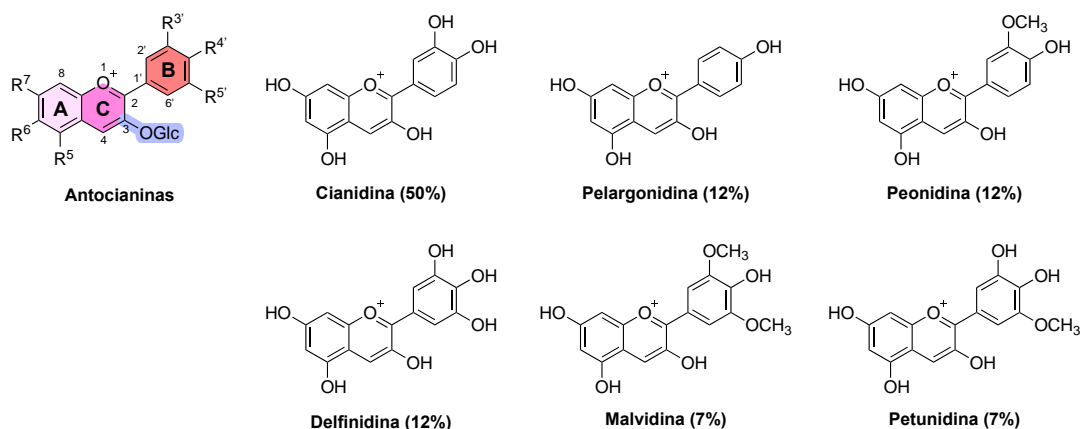
1-1.1. Introdução

Aditivos colorantes sintéticos são amplamente usados em produtos alimentícios e cosméticos dada a sua variedade de cores, alta capacidade tintorial e estabilidade, versatilidade na incorporação em formulações e baixo custo de produção.^{1,2} Há, entretanto, um aumento da preocupação dos órgãos reguladores e dos consumidores a respeito do possível impacto negativo desses compostos sobre a saúde humana e meio ambiente.³⁻⁶ Pigmentos de plantas tem potencial uso como aditivos colorantes, apesar de não serem *a priori* mais seguros do que os seus análogos sintéticos.^{4,7}

Quando se excluem os tetrapirróis, que incluem as clorofilas, restam três classes principais de pigmentos encontrados em plantas, são eles: as antocianinas, as betalaínas e os carotenoides.^{8,9} Antocianinas e betalaínas apresentam as mesmas funções biológicas mas são mutuamente exclusivas na natureza,¹⁰⁻¹² embora tenham sido encontradas individualmente combinadas com carotenoides em plantas.¹³ Antocianinas e betalaínas são pigmentos vacuolares solúveis em água, enquanto carotenoides são encontrados nas membranas de plastídios como os cloroplastos, por exemplo.^{14,15}

As antocianinas são flavonoides atóxicos responsáveis pelas cores vermelho, roxo e azul

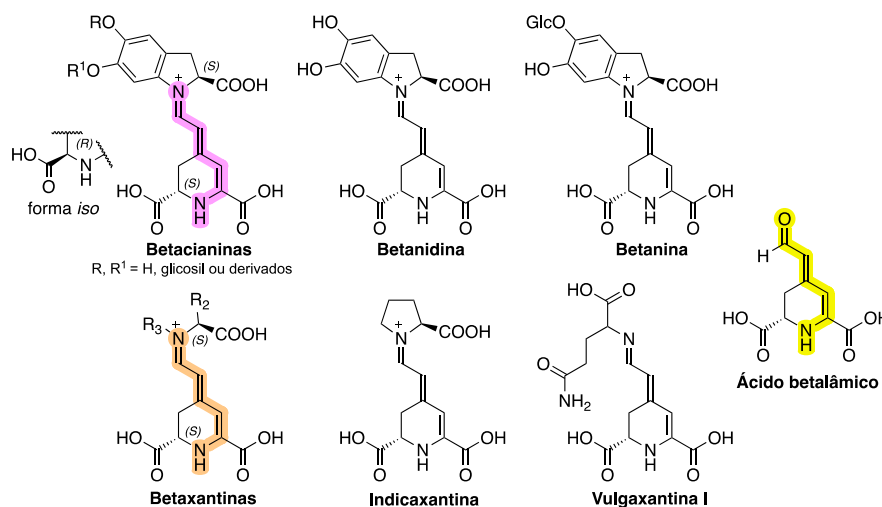
característicos das flores e frutos da maior parte das angiospermas. Essa classe de pigmentos apresenta uma estrutura química conjugada constituída por três anéis principais ligados a grupos hidroxilas, metoxilas ou a um ou mais açúcares (Esquema 1).^{16,17} A extração e purificação de antocianinas têm sido amplamente estudada devido à possibilidade da utilização desses pigmentos como corantes ou ainda, como antioxidantes no combate à doenças inflamatórias, neurológicas e degenerativas.¹⁸⁻²⁰ A casca dos frutos da jabuticaba [*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel] contém grande quantidades de antocianinas, sendo a cianidina-3-*O*-glicosídeo (Ant) o pigmento majoritário.^{21,22} De uma forma geral, as antocianinas estão presentes nas plantas em sua forma aglicona, ou seja, como antocianidinas, mas *in vitro* suas formas variam de acordo com o valor de pH do meio.^{23,24} A capacidade antirradicalar de antocianinas tem sido bastante estudada e sabe-se que sua alta eficiência em sequestrar radicais deve-se à sua estrutura fenólica, e depende do número e localização dos grupos hidroxilas presentes nos anéis, assim como da presença de outros grupos doadores de elétrons.²⁵⁻²⁷



Esquema 1. Estrutura geral das antocianinas e suas principais antocianidinas precursoras. Adaptado da referência ²⁸. Os valores percentuais entre parênteses correspondem à ocorrência natural estimada de cada antocianidina.

Betalainas são pigmentos atóxicos derivados da L-tirosina cuja ocorrência é restrita a plantas da ordem Caryophyllales, em alguns fungos basidiomicetos e à bactéria

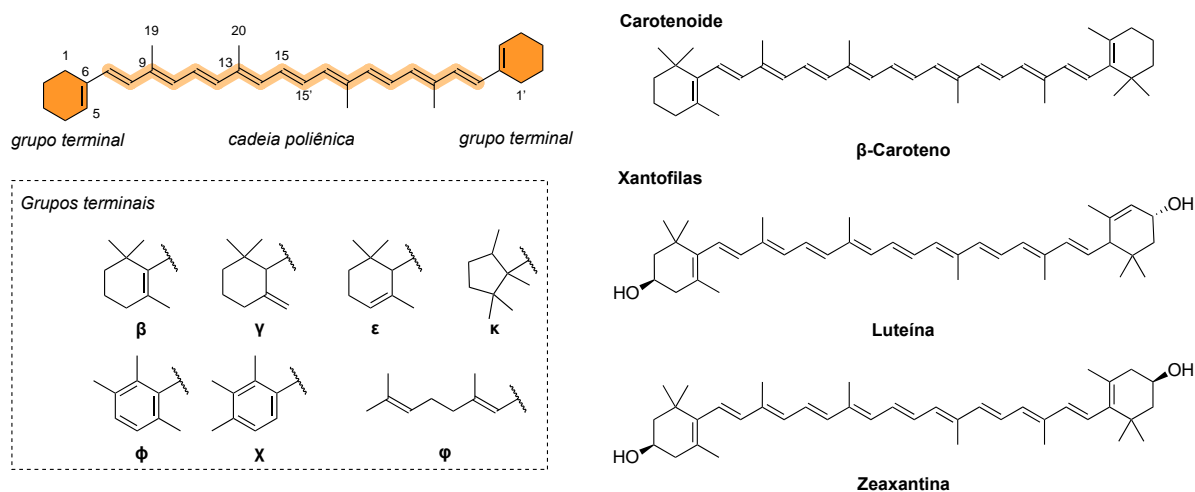
Gluconacetobacter diazotrophicus.^{29,30} As betacianinas são betalâinas de cor magenta (máximo de absorção, λ^{abs} , ao redor de 540 nm) que se originam da condensação entre ácido betalâmico, o precursor de todas as betalâinas, e ciclo-DOPA ou derivados glicosilados.^{31,32} As betaxantinas amarelas ($\lambda^{abs} \approx 480$ nm) são as betalâinas derivadas de outros nucleófilos de nitrogênio, em especial aminas e amino ácidos (Esquema 2).³³ Betanina e indicaxantina são os exemplos mais importantes de betacianinas e betaxantinas, respectivamente. A betanina é obtida principalmente da beterraba [*Beta vulgaris* (L.)] e sua mistura com outras betacianinas e maltodextrina é amplamente usada como corante alimentício (E162).³⁴⁻³⁶ Indicaxantina é um antioxidante com atividade anti-inflamatória e é encontrada em abundância nas variedades amarelas do fruto do cacto opuntia [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.], cuja ocorrência no Sudeste do Brasil é restrita.³⁷⁻³⁹



Esquema 2. Estrutura de betalâinas pertencentes às classes das betacianinas e betaxantinas e seu precursor comum, o ácido betalâmico. Adaptado da referência ²⁸.

Carotenoides são pigmentos naturais lipofílicos e antioxidantes responsáveis pelos tons de amarelo, laranja e vermelho em frutas e flores (Esquema 3).⁴⁰⁻⁴² Os carotenoides são tetraterpenos e desempenham um duplo papel na fotossíntese: proteção do aparato fotossintético contra decomposição fotoinduzida e participação no complexo fotossintético

II.⁴³⁻⁴⁵ Em órgãos não fotossintetizantes de plantas, carotenoides são precursores de hormônios vegetais e em animais eles atuam como fotoprotetores na retina e antioxidantes, graças à sua baixa energia triplete, que está relacionada à sua capacidade de sequestrar oxigênio singlete.⁴⁶⁻
⁴⁹ Por serem insaturados, estes pigmentos também reagem com radicais peroxila gerados como consequência de estresse oxidativo, levando à sua auto-oxidação via formação de radicais estabilizados por ressonância.^{50,51,52}



Esquema 3. Estrutura de carotenoides. Adaptado da referência ⁴⁶.

Sendo os carotenoides, as betalainas e as antocianinas pigmentos naturais com capacidade antioxidante complementar, sua combinação permite o desenvolvimento de um sistema com cor modulável e potencial aplicação como aditivo antioxidante. Há, contudo, grandes desafios no desenvolvimento de tal sistema, visto que carotenoides são lipofílicos enquanto os demais pigmentos são solúveis em água. Este capítulo descreve a obtenção de pigmentos naturais das três classes em alto grau de pureza e a criação de nanolipossomas coloridas (cSUVs) com 100 nm de diâmetro. Além de estudos prospectivos de sinergia antioxidante entre os compostos nesse sistema.

1-2. Resultados e discussão

1-2.1. Obtenção dos pigmentos naturais

Foram selecionados como pigmentos-modelo para a preparação dos nanolipossomas a betanina (Bn, magenta), a indicaxantina (BtP, laranja), a cianidina-3-*O*-glucosídeo (Ant, violeta) e a luteína (Lut, laranja). Todos os pigmentos naturais foram obtidos em alto grau de pureza, como descrito a seguir.

1-2.1.1 *Betanina*

A betanina precipita junto a outras betalaínas quando isopropanol [2:1 álcool/água (v/v)] é adicionado a suco de beterraba com pH 2 e a solução é resfriada e mantida a -20 °C por 24 h. O isopropanol diminui a polaridade do meio e age como antissolvente favorecendo a precipitação das betalaínas junto a outros componentes do suco, principalmente betacianinas, dada a presença de uma porção glicosídica. A Bn na mistura foi purificada por cromatografia de coluna de sílica em condições de fase reversa (sílica C18/água) seguida por cromatografia em gel de Sephadex LH-20 em água. A Figura 1 mostra os espectros de absorção nas regiões ultravioleta e visível (UV-Vis) do suco de beterraba e da betanina após as etapas de purificação cromatográfica e o espectro de emissão obtido para betanina purificada ($\lambda^{\text{EX}} = 520 \text{ nm}$). Observa-se que a purificação resulta em um espectro de absorção marcado pela banda simétrica característica de betanina com máximo de absorção (λ^{Abs}) em 536 nm e bandas correspondentes a transições eletrônicas com coeficientes de absorção molar (ϵ) menores na região do UVB.

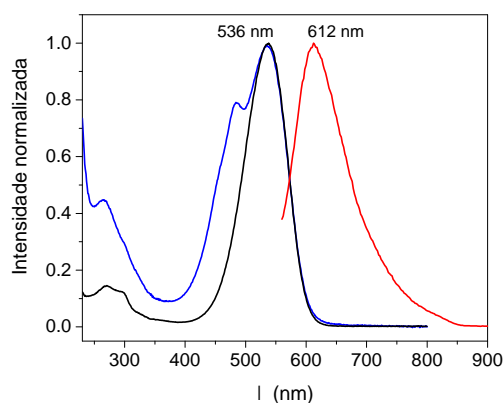


Figura 1. Espectros de absorção normalizada do suco de beterraba bruto (—) e da betanina após purificação cromatográfica (—) e espectro de emissão da betanina purificada (—).

A betanina foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* em modo positivo e detecção por tempo de voo (HPLC-ESI-qTOF-MS) (Figura 2). O cromatograma de íons totais revelou um único pico com tempo de retenção (t_R) igual a 9,9 min e a análise por espectrometria de massas mostrou que a espécie majoritária apresenta m/z 551,1521 que é compatível com o valor de m/z esperado para o íon $[M^+]$ da Bn (m/z teórico 551,1508; erro: 2,4 ppm). O padrão isotópico obtido apresenta distribuição isotópica de acordo com o esperado: experimental, 551,1521 (100%), 552,1549 (21%) e 553,1568 (5%) *versus* 551,1508 (100%), 552,1542 (26%) e 553,1575 (3%) calculados. A fragmentação do íon molecular (Anexo 2) levou a um íon com m/z 389,0988 (perda de fragmento com 162,0533 Da) compatível com betanidina, a aglicona de Bn.

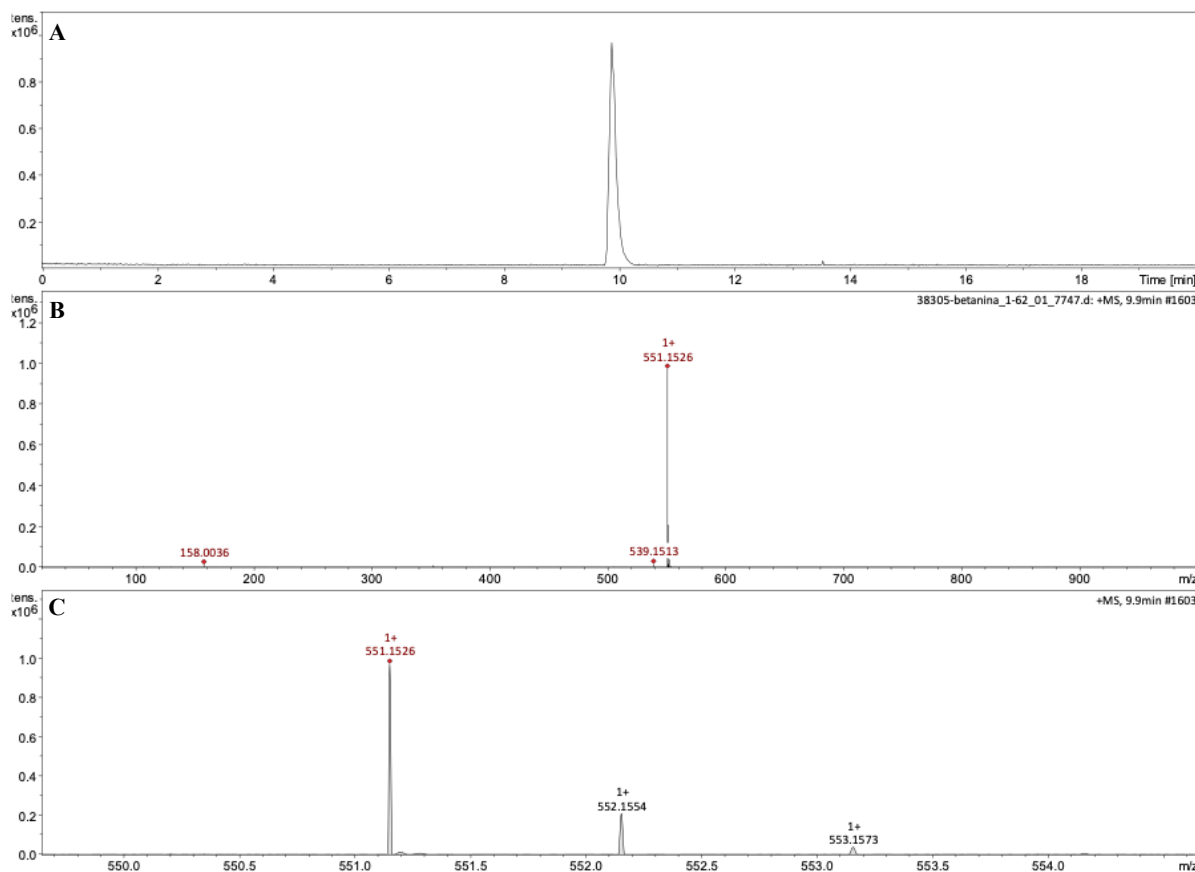


Figura 2. Análise da amostra de Bn por HPLC-ESI-qTOF-MS. Cromatograma de íons totais (A), espectro de massas da espécie com tempo de retenção (t_R) 9,9 min (B) e ampliação da região de interesse para observação do padrão isotópico da amostra de Bn (C).

A análise da Bn por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 3, RMN de ^1H) revelou que os deslocamentos químicos (δ) e as constantes de acoplamento (J) obtidas estão de acordo qualitativo com os dados da literatura (Tabela 1),⁵³ fato que junto à análise cromatográfica, indica que a metodologia utilizada na purificação do composto resulta em Bn com alto grau de pureza. Os sinais característicos do núcleo betalâmico são aqueles referentes aos H11 (+N=CH), H12 (+N=CH-CH), H14a/H14b (diastereotópicos), H15 (ligado ao C sp^3 1,2,3,4-tetra-hidropiridínico) e H18 (ligado ao C sp^2 1,2,3,4-tetra-hidropiridínico). Todos os sinais são observados com algum alargamento, sugerindo que há troca rápida entre espécies em solução, possivelmente diastereômeros. Foi possível atribuir os

sinais de RMN de ^1H com o auxílio dos dados da literatura.⁵³ Os dubletos em 8,28 ppm ($^3J = 6,8$ Hz) e em 5,91 ppm ($^3J = 6,7$ Hz) correspondem aos H11 e H12. O singlete em 6,29 ppm se refere ao H18. Um sistema ABX representado por um tripleto em 4,44 ppm ($^3J = 7,1$ Hz) referente ao H15 acoplado aos H14a e H14b. Por se tratar de um anel 2-piperideínico, o equilíbrio conformacional permite que o grupo carboxílico ligado ao carbono assimétrico assumira conformação axial ou equatorial, o que afeta seu acoplamento do H15 com o H14 antiperiplanar resultando em um sinal duplo dubleto em 3,24 ppm ($^2J = 17,2$, $^3J = 7,6$ Hz) referente ao H14a. O H14b está sujeito a troca rápida e se apresenta como um multiplete alargado em $\sim 3,35$ ppm. Quando os valores de deslocamento químico dos hidrogênios da betanina (D_2O) são comparados com os relatados na literatura⁵³ observa-se que nos dados relatados aqui os sinais estão consistentemente deslocados para campo alto. Betanidina, a aglicona da betanina, foi sintetizada a partir de uma seco-DOPA protegida e caracterizada por espectroscopia de RMN em tampão fosfato (pH 6, 200 mM), condição que segundo os autores previne a sua isomerização *cis-trans* e o surgimento de diastereômeros.⁵⁴ Os dados apresentados aqui para o sistema ABX H2/H3a/H3b é muito superior em termos de resolução dos sinais comparado ao padrão de betanidina sintética.⁵⁴

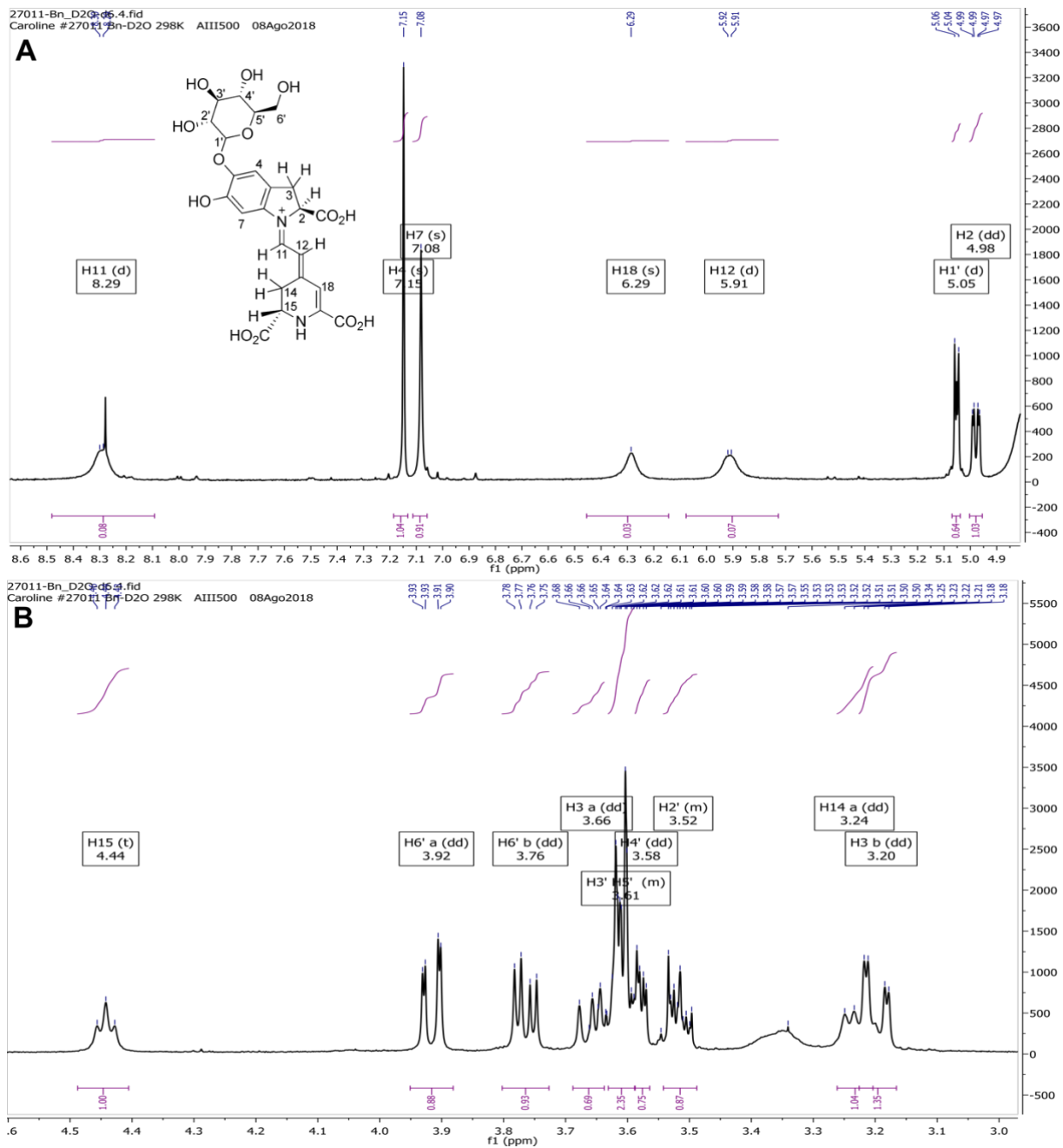
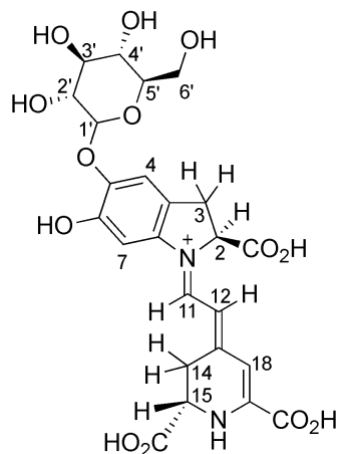


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da Bn em D_2O para a região de 8,6 a 4,9 ppm. O sinal de ^1H residual no solvente foi suprimido com a sequência de pulso *zgpr*.

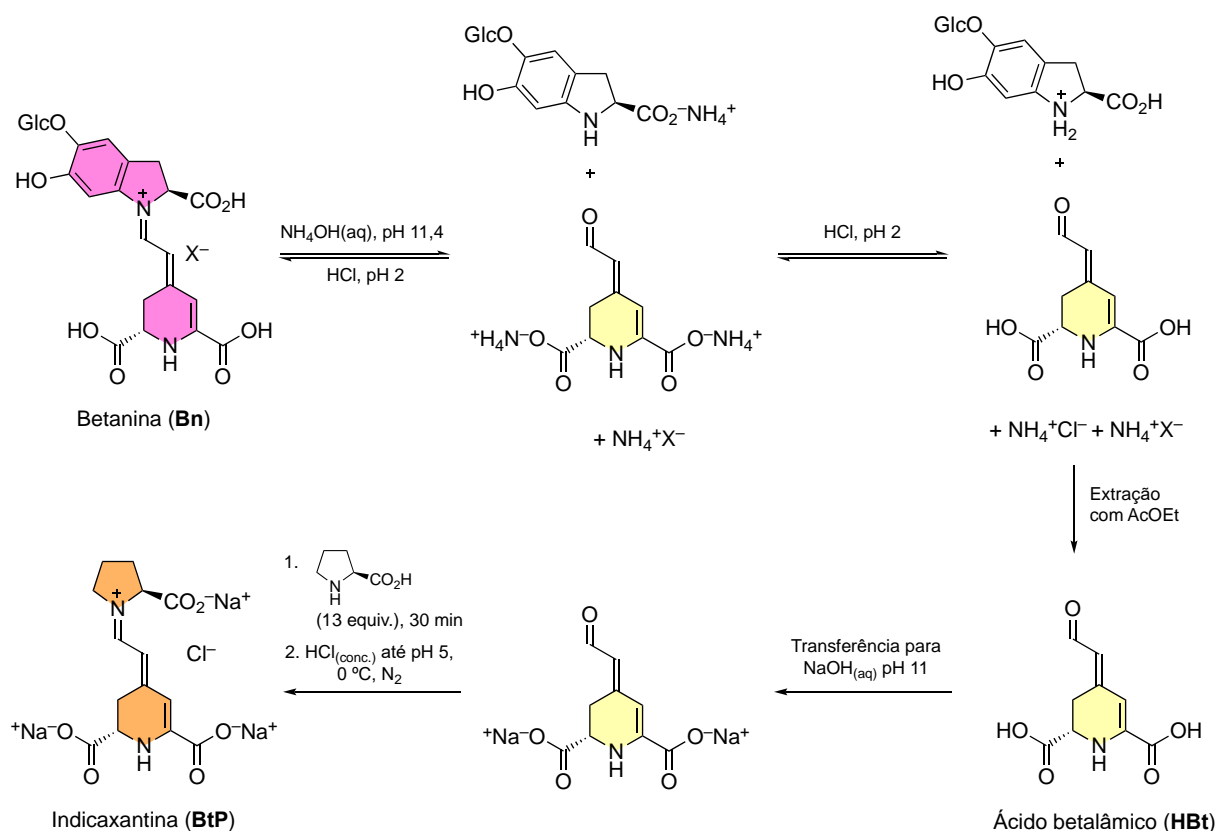
Tabela 1. Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos de RMN de ^1H de betanina em 500 MHz (s: singlete, d: dubleto, t: triplo dd: duplo dubleto, m: multipeto, b: alargado).

^1H	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (600 MHz, ppm), D_2O ; Ref. 53
2	4,98 (dd, $J_{2,3a} = 10,2$, $J_{2,3b} = 3,1$ Hz, 1H)	4,86 (dd, $J_{2,3} = 10,3$, $3,1$ Hz, 2H)
3a	3,66 (dd, $J_{2,3} = 10,6$ Hz, $J_{3a,3b} = 16,7$ Hz, 1H)	3,58 (dd, $J = 10,5$, $16,7$ Hz, 1H)
3b	3,20 (dd, $J_{2,3} = 3,2$ Hz, $J_{3a,3b} = 16,6$ Hz, 1H)	3,11 (dd, $J = 3,2$, $16,4$ Hz, 1H)
4	7,15 (s, 1H)	7,09 (s, 1H)
6'a	3,92 (dd, $J_{5',6'} = 12,6$, $J_{4',6'} = 2,2$ Hz, 1H)	3,86 (dd, $J_{5',6'} = 12,5$ Hz, $J_{4',6'} = 1,8$ Hz, 1H)
6'b	3,76 (dd, $J_{5',6'} = 12,5$, $J_{4',6'} = 5,3$ Hz, 1H)	3,71 (dd, $J_{5',6'} = 12,2$ Hz, $J_{4',6'} = 5,3$ Hz, 1H)
7	7,08 (s, 1H)	7,01 (s, 1H)
11	8,29 (d, $J_{11,12} = 6,8$ Hz)	8,19 (bd, $J_{11,12} = 11,4$ Hz, 1H)
12	5,91 (bd, $J_{11,12} = 6,7$ Hz, 0H)	5,82 (bd, $J = 12,2$ Hz, 1H)
14a	~3,35 (bm)	3,26 (bm, 1H)
14b	3,24 (dd, $J = 17,2$, $J_{14,15} = 7,6$ Hz, 1H)	3,16 (bm, 1H)
15	4,44 (t, $J_{14,15} = 7,1$ Hz, 1H)	4,29 (bt, $J = 7,3$ Hz, 1H)
18	6,29 (s)	6,21 (bs)
1'	5,05 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H)	4,99 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H)
3', 5'	3,63 – 3,59 (m, 2H)	3,42 – 3,53 (sobreposição, 3H)
4'	3,58 (dd, $J_{4',6'b} = 5,3$ Hz, $J_{4',6'a} = 2,3$ Hz, 1H)	3,42 – 3,53 (sobreposição, 3H)
2'	3,54 – 3,49 (m, 1H)	3,55 (sobreposição, 1H)



1-2.1.2 Indicaxantina

BtP foi semissintetizada através do acoplamento aldimínico entre ácido betalâmico (HBt) e L-prolina em meio aquoso usando a metodologia desenvolvida em conjunto com a Dra. Ana Paula Pagano, egressa do grupo de pesquisa.⁵⁵ O HBt foi extraído com acetato de etila do suco de beterraba hidrolisado,^{56,57} transferido para a água alcalinizada (NaOH, pH 11) e o aminoácido L-prolina sólido foi adicionado em excesso (Esquema 4). Quando o HBt foi totalmente consumido (após cerca de 30 min), o meio foi acidulado com HCl conc. até pH 5 em atmosfera de N₂ para prevenir a oxidação da BtP.



Esquema 4. Semissíntese de BtP. Após a hidrólise alcalina de Bn no suco de beterraba, o ácido betalâmico é extraído para acetato de etila e depois para $\text{NaOH}(\text{aq})$ pH 11. A reação de acoplamento é conduzida com excesso de L-prolina. Os anéis foram pintados com as cores características dos compostos de interesse.

A purificação de BtP a partir da reação bruta foi feita por cromatografia de coluna de sílica em condições de fase reversa (sílica C18/água) seguida por HPLC em condições de fase reversa e escala semipreparativa e por cromatografia em gel de Sephadex LH-20 em água antes do uso para remover traços de L-prolina e ácido betalâmico. A Figura 4 mostra o espectro de absorção UV-Vis de indicaxantina após as etapas de purificação cromatográfica. Observa-se que a purificação resulta em um espectro de absorção marcado pela banda característica de betaxantinas marcada por um máximo de absorção (λ^{Abs}) em 485 nm e um ombro em 470 nm. Indicaxantina tem rendimento quântico de fluorescência mais alto que a betanina e seu máximo de emissão está situado em 515 nm ($\lambda^{\text{EX}} = 470$ nm).

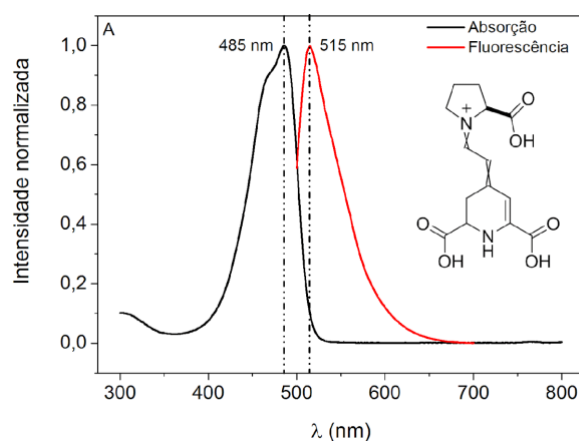


Figura 4. Espectros de absorção (—) e emissão (—) de BtP com máximos em 485 e 520 nm, respectivamente, obtidos em água.

Indicaxantina foi analisada por HPLC-ESI-qTOF-MS (Figura 5). O cromatograma de íons totais revelou dois picos com tempos de retenção (t_R) 9,3 e 9,8 min que correspondem a espécies com m/z 309,1090, valor compatível com o valor de m/z esperado para o íon $[M^+]$ da BtP (m/z teórico 309,1082; erro: 5,2 ppm). Esse resultado indica que houve separação cromatográfica de dois ou mais diastereômeros da BtP. A distribuição isotópica obtida está de acordo com os valores calculados: experimental, 309,1098 (100%), 310,1127 (12%) e 311,1142 (1,5%) versus 309,1082 (100%), 310,1115 (26%) e 311,1124 (3,2%) calculados. A

fragmentação do íon molecular (Anexo 3) levou a um íon com m/z 263,1036 (perda de fragmento com 46,00 Da) compatível com BtP descarboxilada.

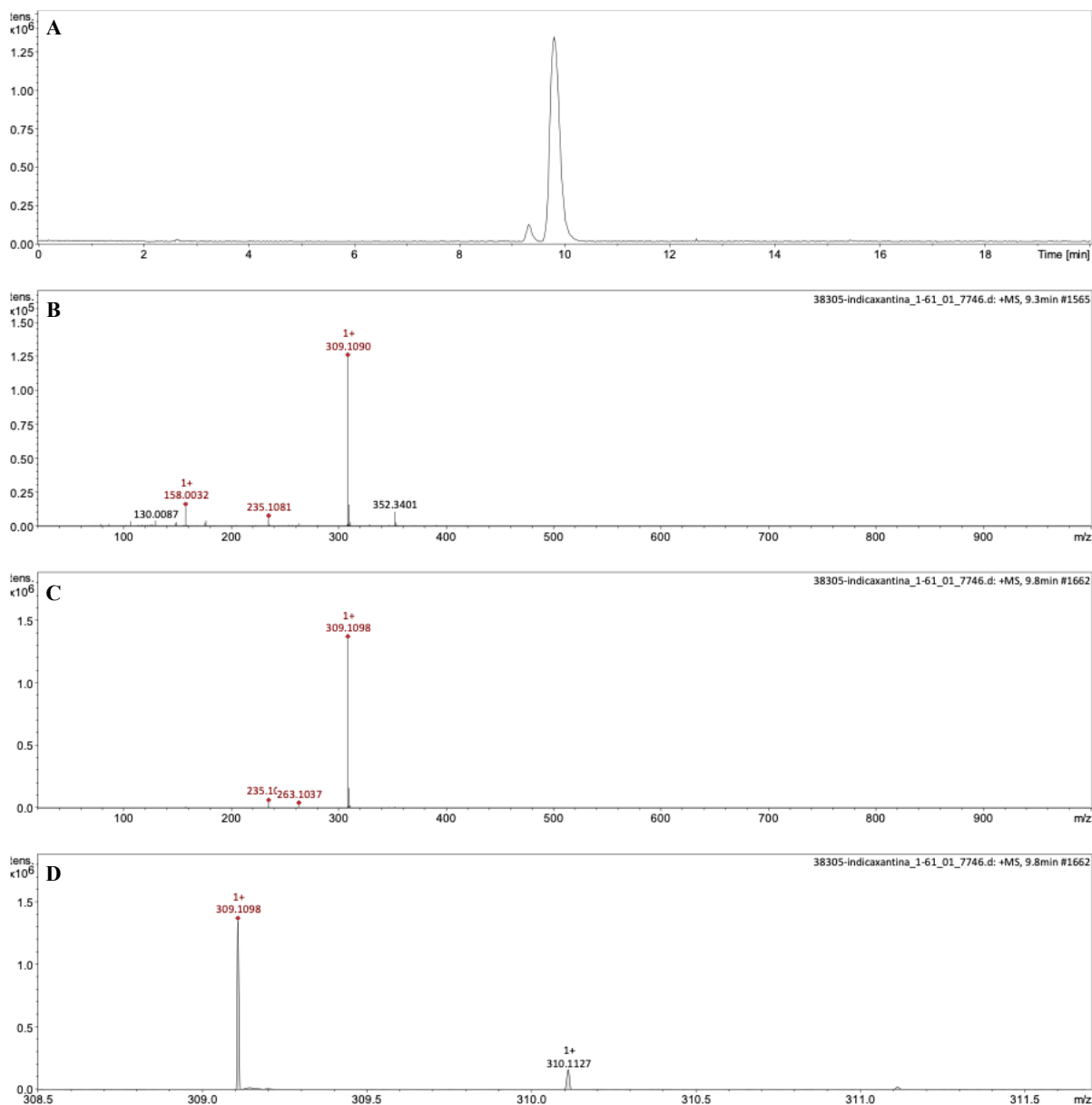
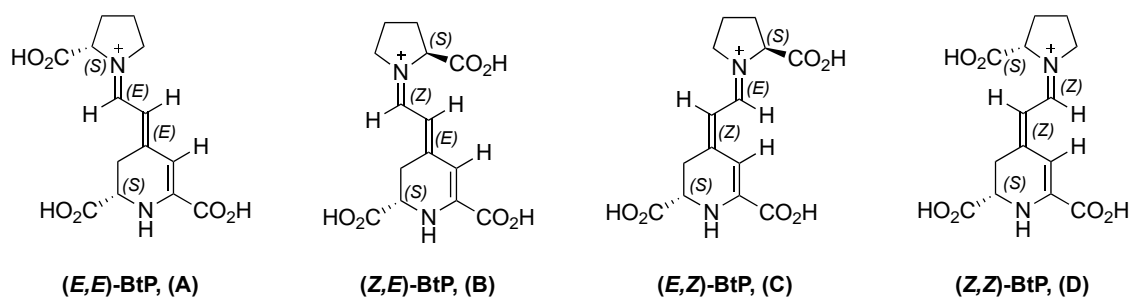


Figura 5. Análise da amostra de BtP por HPLC-ESI-qTOF-MS. Cromatograma de íons totais (A), espectro de massas da espécie com tempo de retenção (t_R) de 9,3 (B) e 9,8 min (C) e ampliação da região de interesse para observação do padrão isotópico da amostra de BtP (D).

Como os processos de semissíntese, purificação e caracterização de BtP foram desenvolvidos em conjunto com a Dra. Ana Paula Pagano e os espectros de RMN de ^1H e ^1H - ^1H COSY encontram-se em sua Tese de Doutorado, a descrição aqui será resumida. Os

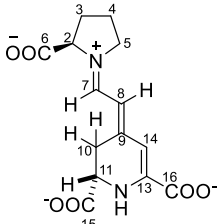
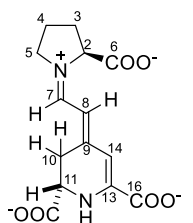
deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento determinadas para os prótons dos quatro isômeros de BtP, sendo dois majoritários (*E,E* e *Z,E*) e dois minoritários (*Z,Z* e *E,E*) estão de acordo com os dados da literatura.⁵⁸



Esquema 5. Estrutura química dos quatro isômeros de BtP identificados por RMN de ^1H .

A Tabela 2 apresenta os resultados de deslocamento químico e constantes de acoplamento obtidos para os dois isômeros majoritários (A e B). É possível observar os sinais característicos do núcleo betalâmico referentes aos H7 (+N=CH), H8 (+N=CH-CH) e H14 (C_{sp^2} da porção 1,2,3,4-tetra-hidropiridínica). Entretanto, para os hidrogênios H10a/H10b (diastereotópicos) e H11 (quiral da porção 1,2,3,4-tetra-hidropiridínica) os sinais obtidos se sobrepõem e não é possível determinar a sua multiplicidade. Embora, BtP tenha sido amplamente estudada no que se refere às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias *in vivo* e *in vitro*,³⁷⁻³⁹ não há evidências na literatura que identifiquem atividades distintas para os diferentes isômeros. Como isomerização da indicaxantina ocorre naturalmente em água pela epimerização do carbono assimétrico no anel piperidínico e pela isomerização *cis-trans* e o ácido betalâmico usado na síntese é racêmico optou-se então por trabalhar com a amostra contendo a mistura de isômeros ao invés de purificar um deles.

Tabela 2. Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos de RMN de ^1H de betanina em 500 MHz (s: singlete, d: dubleto, t: triplo dd: duplo dubleto, m: multiplete, b: alargado).

	^1H	δ_{H} (ppm) A	δ_{H} (ppm) B	δ_{H} (ppm) A ²⁸	δ_{H} (ppm) B ²⁸	
 <p>Isômero A</p>	2	4.52 (dd, $J_{2,3} = 3,9$ Hz, 8,3 Hz, 1H)	4.37 (dd, $J_{2,3} = 4,8$ Hz, 8,7 Hz, 1H)	4.63 (dd, $J = 3,5$ Hz e 8,4 Hz, 1H)	4.53 (dd, $J = 4,3$ Hz, 8,6 Hz, 1H)	
	3a	2,21 – 2,07 (m)*	2,21 – 2,07 (m)*	2,32*	2,39 – 2,46 (m)	
	3b	2,21 – 2,07 (m)*	2,21 – 2,07 (m)*	2,19*	2,18*	
	4a	2,06 – 1,96*	2,06 – 1,96*	2,03 – 2,10 (m)	1,96 – 1,98*	
	4b	2,06 – 1,96*	2,06 – 1,96*	2,00*	1,96 – 1,98*	
	5a/b	3,77 – 3,59 (m)*	4,00 – 3,08 (m)*	3,62 – 3,71*	3,83 – 3,93*	
	 <p>Isômero B</p>	7	8,10 (d, $J_{7,8} = 12,3$ Hz, 1H)	8,21 (d, $J_{7,8} = 12,4$ Hz, 1H)	8,19 (d, $J_{7,8} = 12,3$ Hz, 1H)	8,29 (d, $J_{7,8} = 12,3$ Hz, 1H)
		8	5,98 (d, $J_{7,8} = 12,3$ Hz, 1H)	5,68 (d, $J_{7,8} = 12,4$ Hz, 1H)	6,02 (d, $J = 12,2$)	5,76 (d, $J = 12,3$)
		9	-	-	-	-
		10a	3,13*	3,13*	3,28*	3,28*
10b		3,13*	3,13*	3,04*	3,04*	
11		4,21 (m)*	4,21 (m)*	4,43 (t, $J_{11,10} = 6,5$ Hz, 1H)	4,43 (t, $J_{11,10} = 6,5$ Hz, 1H)	
13		-	-	-	-	
14		6,13 (s, 1H)	6,08 (s, 1H)	6,15 (s)	6,10 (s)	

1-2.1.3 Cianidina-3-O-glicosídeo

Antocianinas foram extraídas da casca dos frutos da jabuticaba (*P. cauliflora*) com uma mistura água/etanol 3:7 (v/v) acidulada com HCl 0,1% (v/v). O extrato pode ser armazenado no escuro a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 6 meses. As etapas de purificação para obtenção de Cianidina-3-O-Glicosídeo (Ant) foram realizadas com base no protocolo adaptado desenvolvido por Wang e colaboradores.⁵⁹ Impurezas pouco polares foram extraídas do extrato hidroalcoólico com acetato de etila, o volume do extrato resultante foi reduzido e a Ant foi purificada por cromatografia de afinidade com a resina macroporosa não iônica Amberlite XAD7HP seguida por cromatografia em gel de Sephadex LH-20 em água.

A análise por HPLC-ESI-qTOF-MS (Figura 6) revelou um pico cromatográfico com tempo de retenção de 2,9 min que corresponde a uma espécie com m/z 449,1097 que é compatível com o valor calculado para o íon $[\text{M}^+]$ da Ant (m/z 449,1078; erro: 4,0 ppm). Observa-se também no espectro de massas o íon $[2\text{M}]^+$ com m/z 897,2117. A fragmentação do íon molecular levou a um íon com m/z 287,0562 que foi atribuído ao íon $[\text{M}]^+$ da cianidina, a aglicona da cianidina-3-O-glicosídeo, de massa exata igual a 287,0550 Da (perda de fragmento com 162,05 Da, Anexo 4).⁶⁰ A distribuição isotópica está de acordo com o esperado: experimental, 449,1097 (100%), 450,1125 (22%) e 451,1140 (4,5%) versus 449,1079 (100%), 450,1112 (23%), 451,1146 (2,5%) e 451,1121 (2,3%) calculados. Além disso, o pico com tempo de retenção em 2,1 min se refere ao padrão *lock mass* utilizado contendo formato de sódio e que foi utilizado para calibração do experimento. Os demais sinais minoritários presentes não foram atribuídos (Anexo 5).

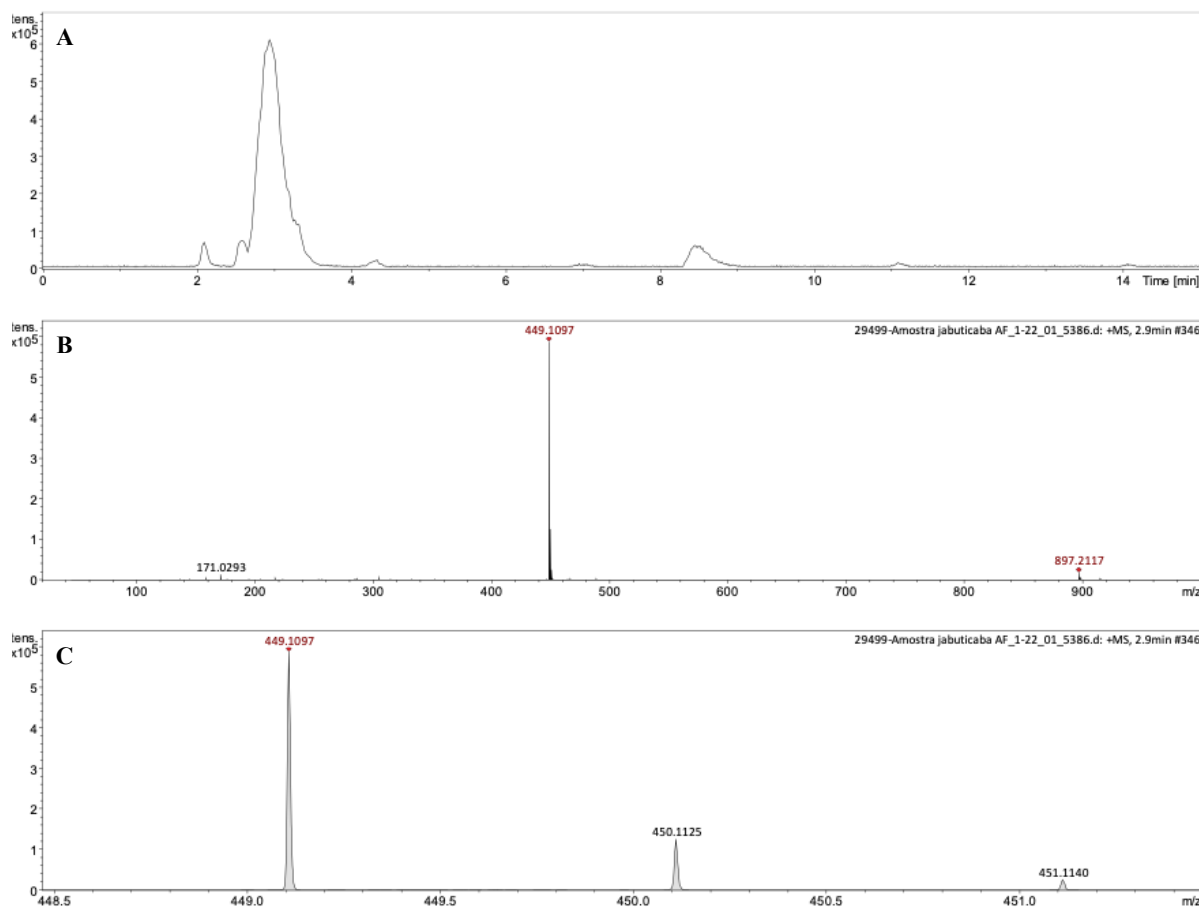


Figura 6. Análise da amostra de antocianinas por HPLC-ESI-qTOF-MS. Cromatograma de íons totais, espectro de massas da espécie com tempo de retenção (t_R) 2,9 min e ampliação da região de interesse para observação do padrão isotópico da amostra de antocianina.

A análise de RMN de ^1H da Ant (Figura 7) foi feita em metanol deuterado acidulado com ácido acético deuterado (5% v/v) e os valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento encontram-se na Tabela 3. Dois dubletos correspondendo a hidrogênios com 3J igual a 2,0 Hz foram observados em 6,67 e 6,91 ppm. O sinal em 6,91 ppm foi atribuído ao H8 e o sinal em 6,67 ppm ao H6. Três sinais de hidrogênios aromáticos em 7,01 (dublete, $J = 8,7$ Hz), 8,05 (dublete, $J = 2,3$ Hz) e 8,28 (duplo dublete, $J = 8,7$ e 2,3 Hz) indicam a presença de um anel benzeno contendo substituições nas posições H1', H3' e H4'. Um hidrogênio anomérico foi observado como um dublete em 5,32 ppm, $J = 7,5$ Hz, seguido por outros sinais entre 3 e 4 ppm relacionados porção da glicose presente na molécula.

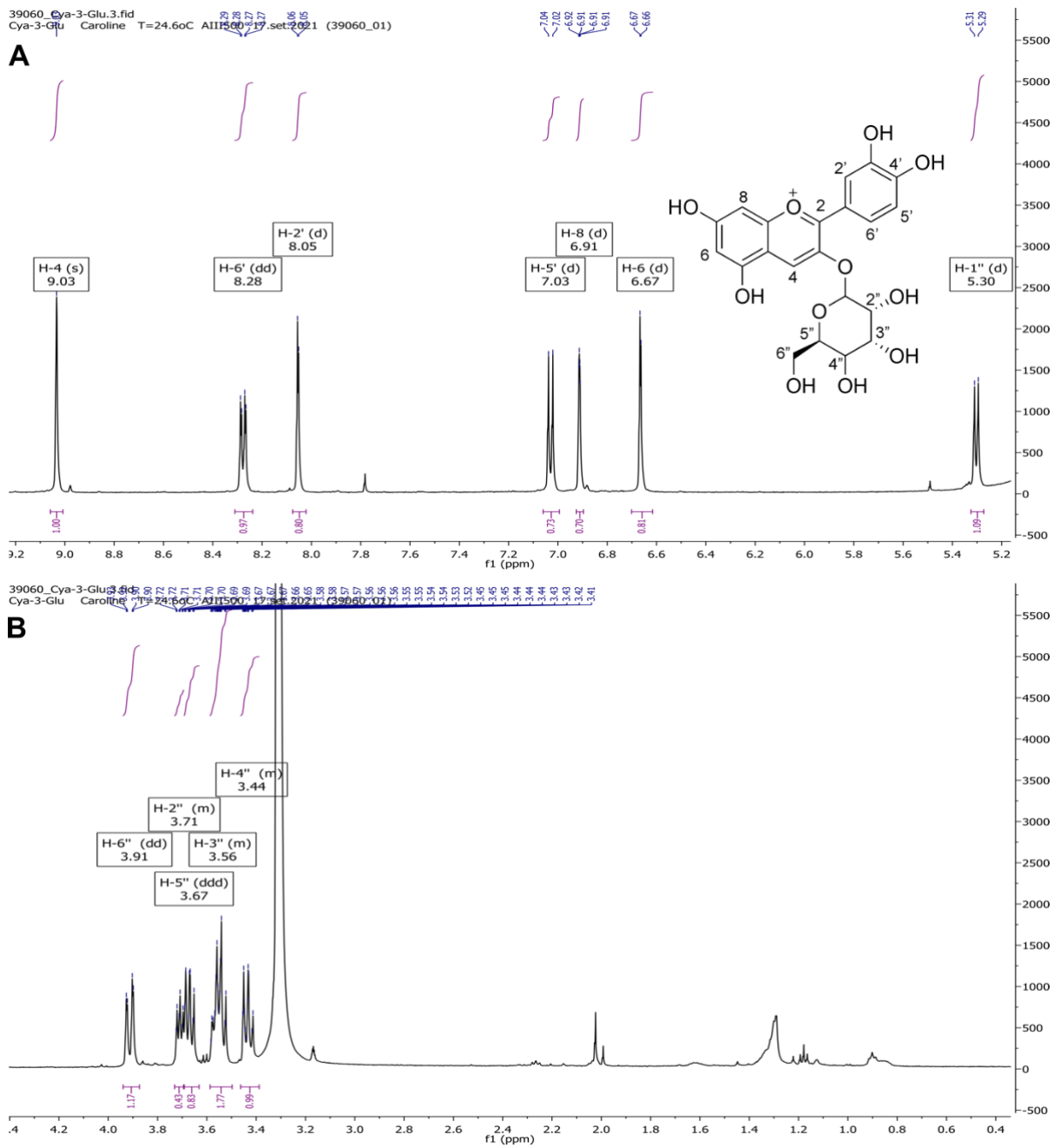
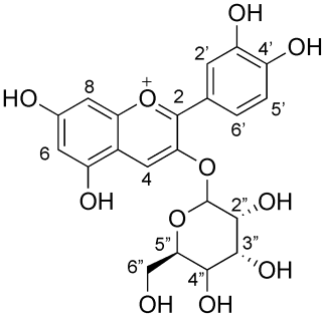


Figura 7. Ampliação do espectro de RMN de ^1H para a amostra de cianidina-3-*O*-glicosídeo purificada na região entre 9,2 e 5,2 ppm.

Tabela 3. Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos de RMN de ^1H de cianidina-3-*O*-glucosídeo em 500 MHz (s: singlete, d: dubleto, dd: duplo dubleto, m: multipleteo, b: alargado).

	^1H	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm) ⁶¹
	4	9,03 (s, 1H)	9,08 (s)
	6	6,67 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,74 (bs)
	8	6,91 (d, $J = 2,0$, Hz, 1H)	6,95 (bs)
	2'	8,05 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H)	8,11 (d, $J = 2,0$ Hz)
	5'	7,03 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H)	7,08 (d, $J = 8,4$ Hz)
	6'	8,28 (dd, $J = 8,7$ Hz, 2,3 Hz, 1H)	8,30 (dd, $J = 8,4$ Hz e 2,0 Hz)
	1''	5,30 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H)	5,42 (d, $J = 8$ Hz)
	2''	3,73 – 3,69 (m, 0H)	3,79 (m)
	3''	3,59 – 3,50 (m, 2H)	3,59 (m)
	4''	3,46 – 3,39 (m, 1H)	3,49 (m)
	5''	3,67 (ddd, $J = 9,3$ Hz, 7,6 Hz, 2,0 Hz, 1H)	3,71 (m)
	6''	3,91 (dd, $J = 12,1$ Hz, 2,0 Hz, 1H)	4,11 (dd, $J = 12$ Hz e 2,5 Hz)
			3,92 (m)

1-2.1.4 Luteína

O processo mais comumente utilizado industrialmente para obtenção de luteína (Lut) é a extração do composto a partir das pétalas do cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.).^{62,63} Nessa técnica, Lut está quimicamente ligada a ácidos graxos como ácido láurico e mirístico e a saponificação do extrato é necessária para a obtenção da Lut livre.⁶⁴ Ainda que o cravo de defunto seja comercialmente disponível, a metodologia descrita demanda o uso de grandes quantidades de solvente e tempo. Assim, o suplemento alimentar para tratamento de problemas de visão contendo Lut (10 mg) e zeaxantina (0,5 mg) em óleo de soja foi usado como fonte de luteína. O emprego de cápsulas comerciais de Lut para obtenção do composto é mais conveniente do que a extração do cravo, visto que 120 cápsulas equivalem a 100 g de pétalas desidratadas em quantidade de Lut (1,2 g)⁵⁶ a um custo aproximado de R\$ 160,00 (cerca de \$30).

Os componentes da solução de carotenoides em óleo foram submetidos a separação por cromatografia radial em escala preparativa empregando-se um sistema Chromatotron (placa de 4 mm de SiO₂ com gesso, AcOEt/DCM 1:1 (v/v)). A fração laranja contendo Lut foi coletada, mantida protegida do oxigênio e da luz e analisada por espectroscopia de RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz, Figura 8). A Tabela 4 apresenta os valores encontrados para os deslocamentos químicos dos hidrogênios, bem como os valores encontrados na literatura⁶⁵ para os diastereômeros (3*R*, 3'*R*, 6'*R*) e (3*R*, 3'*S*, 6'*S*) de Lut. Não há estudos da atividade biológica dos diferentes estereoisômeros da luteína em humanos. O espectro de RMN de ¹H revelou sinais de ressonâncias na região de 5,4 – 6,8 ppm, que correspondem a diferentes hidrogênios olefínicos distribuídos ao longo do sistema π. Os sinais referentes aos hidrogênios dos grupos metilas da cadeia conjugada (H19, H20 e H20') estão sobrepostos, o que interferiu a obtenção da multiplicidade e integração dos sinais (δ = 1,97 ppm), e o hidrogênio H19' apresentou

deslocamento de 1,91 ppm (s). Os hidrogênios das metilas H16, H16', H17 e H17' apresentaram-se como singletos na região entre 0,8 e 1,0 ppm. Enquanto os hidrogênios dos grupos metilas H18 e H18' apresentaram-se como singletos com deslocamento químico entre 1,60 e 1,75 ppm. Os sinais dos hidrogênios adjacentes ao grupo metoxila do carbono C3 e C3' apresentaram deslocamento químico de 4,00 (m) e 4,26 ppm (bs), respectivamente, e suas multiplicidades se adequam aos valores descritos na literatura.⁶⁵

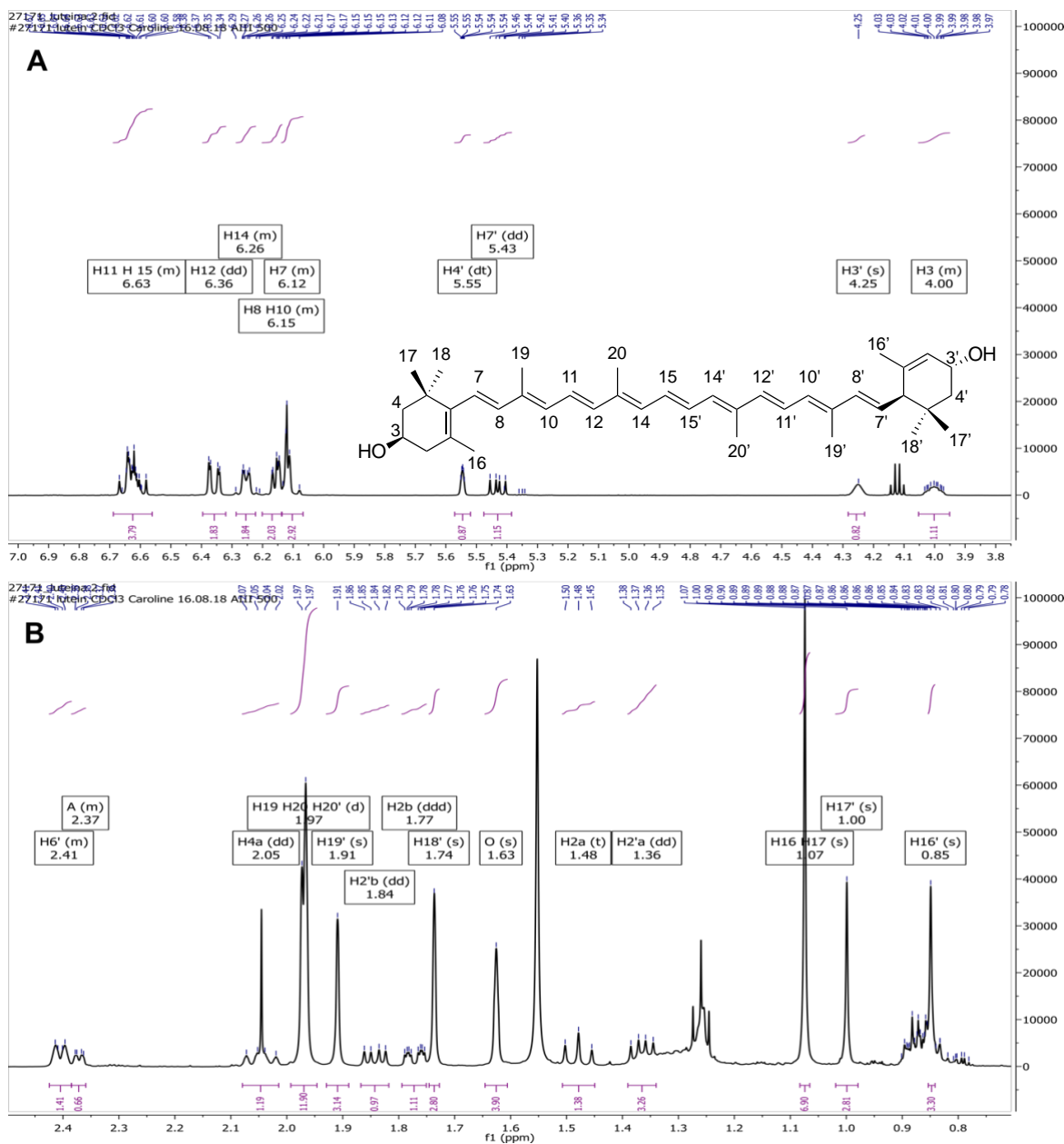


Figura 8. Ampliação do espectro de RMN de ^1H para a amostra de luteína purificada na região entre 7,0 e 3,8 ppm (A) e entre 2,4 e 0,8 ppm (B).

Tabela 4. Atribuição dos sinais do RMN de ^1H da luteína (500 MHz; s: singlete, d: dubleto, t: triplo, dd: duplo dubleto, m: multipeto, b: alargado).

^1H	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm) 3R, 3'R, 6'R ⁶⁵	δ_{H} (ppm) 3R, 3'S, 6'S ⁶⁵
16'	0,85 (s, 3H - sobreposição)	0,86 (s, 3H)	0,85 (s, 3H)
17'	1,00 (s, 3H)	1,01 (s, 3H)	1,00 (s, 3H)
16,17	1,07 (s, 6H)	1,08 (s, 7H)	1,07 (s, 7H)
2'a	1,36 (dd, J = 13,1 Hz e 6,8 Hz, 1H)	1,37 (dd, J = 13,1 Hz e 6,7 Hz, 1H)	1,36 (dd, J = 13,1 Hz e 6,8 Hz, 3H)
2a	1,49 (t, J = 11,9 Hz, 1H)	1,49 (t, J = 12,3 Hz, 1H)	1,49 (t, J = 11,9 Hz, 1H)
18'	1,63 (s, 3H)	1,63 (s, 3H)	1,63 (s, 4H)
18	1,74 (s, 3H)	1,74 (s, 3H)	1,74 (s, 3H)
2b	1,77 (ddd, J = 12,1 Hz, 3,7 Hz, e 2,1 Hz, 1H)	1,78 (dd, J = 12,3 Hz e 2,8 Hz, 1H)	1,77 (ddd, J = 12,1 Hz, 3,7 Hz, e 2,1 Hz, 1H)
2'b	1,84 (dd, J = 13,1 Hz e 5,9 Hz, 1H)	1,85 (dd, J = 13,1 Hz e 5,8 Hz, 1H)	1,84 (dd, J = 13,1 Hz e 5,9 Hz, 1H)
19'	1,91 (s, 3H)	1,92 (s, 3H)	1,91 (s, 3H)
19, 20, 20'	1,97 (sobreposição)	1,97 (s, 9H)	1,97 (d, J = 3,4 Hz, 12H)
4a	2,05 (dd, J = 16,7 Hz e 9,7 Hz, 1H)	2,05 (dd, J = 16,3 Hz e 9,7 Hz, 1H)	2,05 (dd, J = 16,3 Hz e 9,7 Hz, 1H)
4b	2,39 (dd, J = 16,6 Hz e 6,8 Hz, 3H)	2,40 (dd, J = 16,3 Hz e 6,7 Hz, 1H)	2,37 (m, 1H)
6'	2,41 (m, 1H)	2,41 (m, 1H)	2,41 (m, 1H)
3	4,00 (m, 1H)	4,01 (m, 1H)	4,00 (m, 1H)
3'	4,26 (bs, 1H)	4,26 (bs, 1H)	4,26 (bs, 1H)
7'	5,43 (dd, J = 15,5 Hz e 9,9 Hz, 1H)	5,44 (dd, J = 15,4 Hz e 9,9 Hz, 1H)	5,44 (dd, J = 15,4 Hz e 9,9 Hz, 1H)
4'	5,54 (s, 1H)	5,55 (bdt, J = 2,8 Hz e 1,6 Hz)	5,55 (bdt, J = 2,8 Hz e 1,6 Hz)
7	6,12 (m, 3H)	6,12 (m, 3H)	6,12 (m, 3H)
8, 10	6,15 (m, 2H)	6,15 (m, 2H)	6,15 (m, 2H)
14	6,26 (m, 2H)	6,26 (m, 2H)	6,26 (m, 2H)
12	6,36 (dd, J = 14,9 Hz e 2,8 Hz, 2H)	6,36 (dd, J = 14,9 Hz e 2,8 Hz, 2H)	6,36 (dd, J = 14,9 Hz e 2,8 Hz, 2H)
11, 15	6,63 (m, 4H)	6,63 (m, 4H)	6,63 (m, 4H)

1-2.2. Lipossomas coloridos com pigmentos naturais

1-2.2.1 Preparação de cSUVs e persistência dos pigmentos

Lipossomas permitem encapsular compostos hidrofílicos em sua fase aquosa interna e compostos lipofílicos em sua bicamada lipídica e, portanto, são ideais para o preparo de amostras contendo compostos de diferentes polaridades.⁶⁶ Vesículas unilamelares pequenas (SUVs) foram preparadas empregando-se dimetilfosfatidilcolina (DMPC) devido à sua baixa temperatura de transição ($T = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$), ausência de insaturações suscetíveis a oxidação e à sua conhecida aplicabilidade em formulações farmacêuticas (Figura 9).⁶⁷⁻⁶⁹ O processo de formação de SUVs consiste na formação de filmes lipídicos finos que, após serem hidratados com uma solução aquosa, são extrusados de forma a produzir vesículas monodispersas.^{70,71} As dispersões lipídicas em PBS foram extrusadas 21 vezes através da membrana de 100 nm o que resultou em nanolipossomas com diâmetro efetivo de 109 nm, conforme determinado por espalhamento dinâmico de luz (DLS, Figura 10a). Os nanolipossomas coloridos e antioxidantes, chamados de cSUVs, contém uma mistura de betalaínas, cianidina-3-*O*-glucosídeo (50 mmol L^{-1} de cada pigmento em PBS) e luteína (0,3% mol/mol em DMPC) e apresentam diâmetro efetivo de 149 nm (Figura 10b), indicando que os pigmentos naturais aumentam o número de agregação dos lipídios.

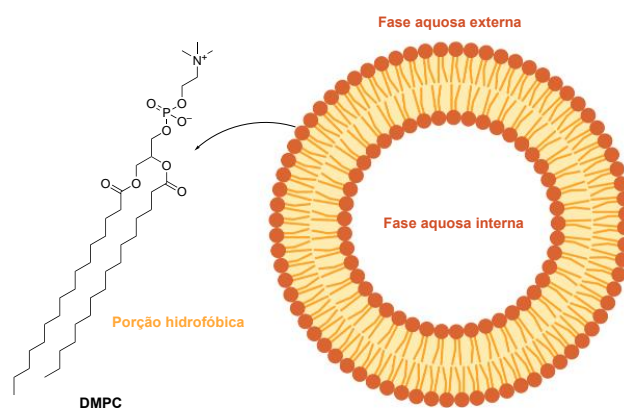


Figura 9. Estrutura da dimetilfosfatidilcolina (DMPC) e representação de um corte de um lipossoma.

Devido ao caráter apolar da molécula de luteína é esperado que haja uma interação entre o composto e os lipídios da vesícula. De fato, há relatos na literatura que demonstram o aumento do diâmetro efetivo de vesículas preparadas com DPPC e luteína pela incorporação do carotenoide na membrana fosfolipídica.⁷² Devido a presença de dois grupos hidroxilas, as moléculas de luteína também podem interagir por meio de ligações de hidrogênio com a cabeça polar do lipídio e, por isso, supõe-se que luteína esteja orientada perpendicularmente ao plano da membrana. Essa incorporação aumenta a rigidez da vesícula e é capaz de gerar mudanças físicas na membrana.⁷²

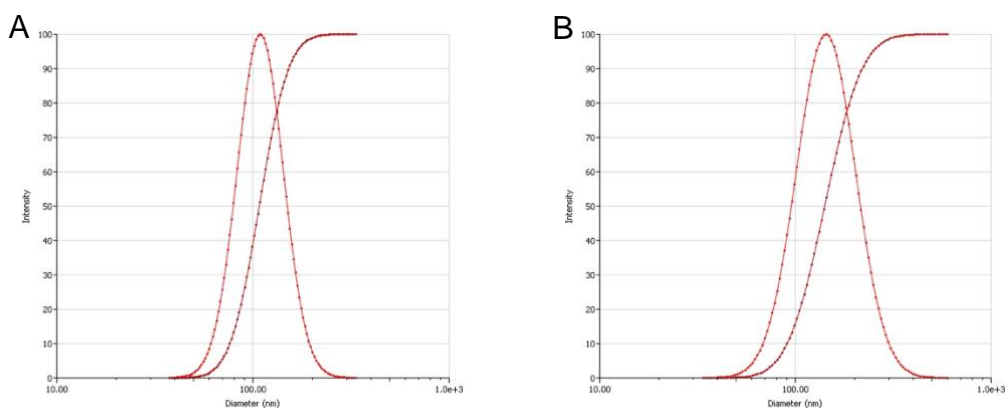


Figura 10. Distribuição de tamanho de lipossomas determinados por DLS. (a) Controle negativo; DMPC em PBS tem diâmetro efetivo igual a 109 nm. (b) Lipossomas feitos na presença de 50 mmol L⁻¹ de pigmentos naturais hidrossolúveis e 0.3% mol/mol de luteína/DMPC apresentaram diâmetro efetivo de 149 nm.

O espectro de absorção UV-Vis de cSUVs contendo quantidades equimolares (50 × 10⁻⁶ mol L⁻¹) de betalaínas e Ant e Lut na proporção de 0,3% equiv. de DMPC é apresentado na Figura 11. Observa-se que os compostos combinados resultam em um perfil de absorção idêntico àquele obtido pela soma dos espectros dos componentes isolados, não havendo evidência de copigmentação⁷³ ou outro tipo de associação entre os componentes da formulação que leve a deslocamentos batocrômicos e hipercrômicos.

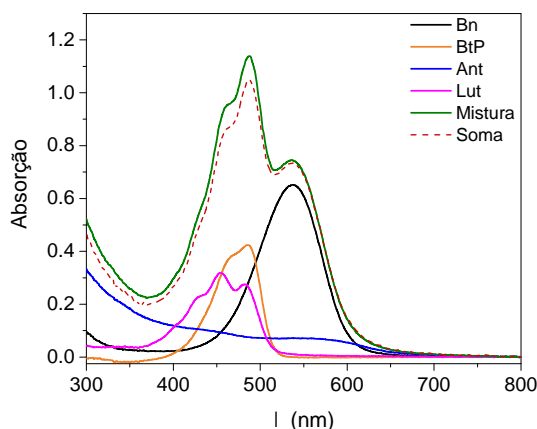
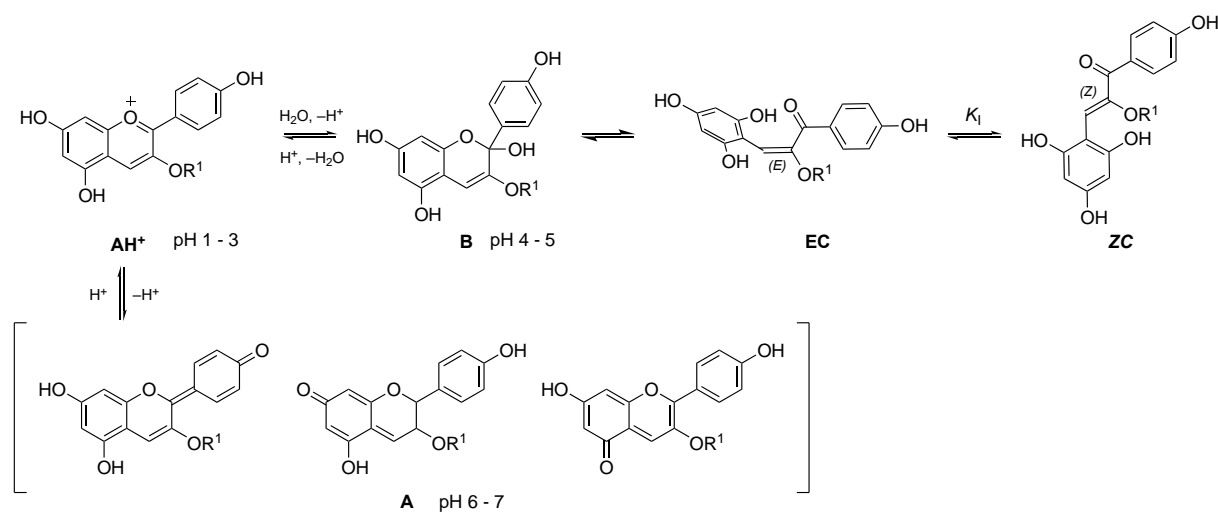


Figura 11. Espectro de absorção das cSUVs em PBS pH 7,4, de SUVs preparadas com cada um dos pigmentos separados ($50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para os hidrossolúveis e 0.3% mol/mol de luteína/DMPC) e soma dos espectros individuais.

A mistura contendo todos os pigmentos naturais escolhidos apresenta um espectro de absorção na região do UV-visível que cobre os comprimentos de onda entre 380 e 600 nm (linha verde). Luteína e indicaxantina possuem coloração laranja e, portanto, absorvem luz na região azul do espectro visível. Já betanina que é violeta absorve luz na região do verde e sua banda de absorção se sobrepõe à banda de absorção da amostra de antocianina, que em pH 7,4 absorve luz entre 300 e 650 nm. Ainda que a concentração de betalaínas e cianidina-3-*O*-glicosídeo na amostra seja a mesma, a contribuição da antocianina para o espectro de absorção final da mistura é menor do que a contribuição das betalaínas. Isso se dá devido a diferença nos coeficientes de absorção molar dos pigmentos. Os coeficientes de absorção molar de betanina ($\lambda^{\text{Abs}} = 536 \text{ nm}$) e indicaxantina ($\lambda^{\text{Abs}} = 485 \text{ nm}$) são, respectivamente, $6,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $4,8 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e variam pouco com o pH da solução.^{74,75} Entretanto, o mesmo comportamento não é observado para antocianinas. Cianidina-3-*O*-glicosídeo tem coeficiente de absorção molar entre $0,3 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $1,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda^{\text{Abs}} \sim 550 \text{ nm}$) em pH 7, *i.e.*, Ant absorve cerca de 6× menos luz do que Bn quando excitada no mesmo comprimento de onda. Tal efeito é resultado do pH utilizado, já que a variação de pH do meio aquoso acarreta mudanças químicas estruturais em antocianinas que proporcionam diferentes

colorações às soluções.⁷⁶

Em pH abaixo de 3, a forma predominante de antocianinas em solução aquosa é o cátion 7-hidroxi-flavílio vermelho ou vermelho-púrpura apresentando pK_a para formação da base conjugada na faixa de 4 – 5 (Esquema 6). No entanto, acima de pH 3, o ataque de água na posição 2 da forma catiônica da cianidina-3-*O*-glucosídeo forma a espécie hemiacetal resultando em uma solução quase completamente transparente.^{28,77,78} O tautomerismo de abertura do anel subsequente produz a *cis*-chalcona, que lentamente, se equilibra com sua forma *trans*.⁷⁹ Dessa forma, o espectro de absorção de cianidina-3-*O*-glucosídeo em lipossoma (Figura 11, linha azul) mostra uma menor intensidade de absorção desse composto na região do espectro visível ($\lambda = 440$ e 550 nm) e maior na região ultravioleta ($\lambda = 330$ nm). Tal comportamento era esperado visto que o equilíbrio em pH 7,4 contém tanto as espécies químicas hemiacetal e chalcona (transparentes) como o cátion flavílio (vermelho).



Esquema 6. Equilíbrios relevantes para o estudo de antocianinas em função do pH. Adaptado da referência ²⁸.

A encapsulação de compostos em vesículas unilamelares pode estabilizar e prolongar o tempo de prateleira de moléculas sensíveis a luz e calor.^{66,80} O efeito da encapsulação em vesículas de DMPC foi investigado na persistência de Bn e BtP a 30 °C (Figura 12). Nota-se

que o encapsulamento acelera discretamente a decomposição de ambas as betalaínas, possivelmente pela presença de um grupo quaternário de amônio no lipídeo (Figura 9) que, mesmo sendo neutro, tende a se associar com as porções ácido carboxilato das betalaínas e ânions hidroxila e outras espécies básicas e/ou nucleofílicas, como observado no grupo para a catálise da hidrólise de betanina por CTAB e CTAC (Figura 13).

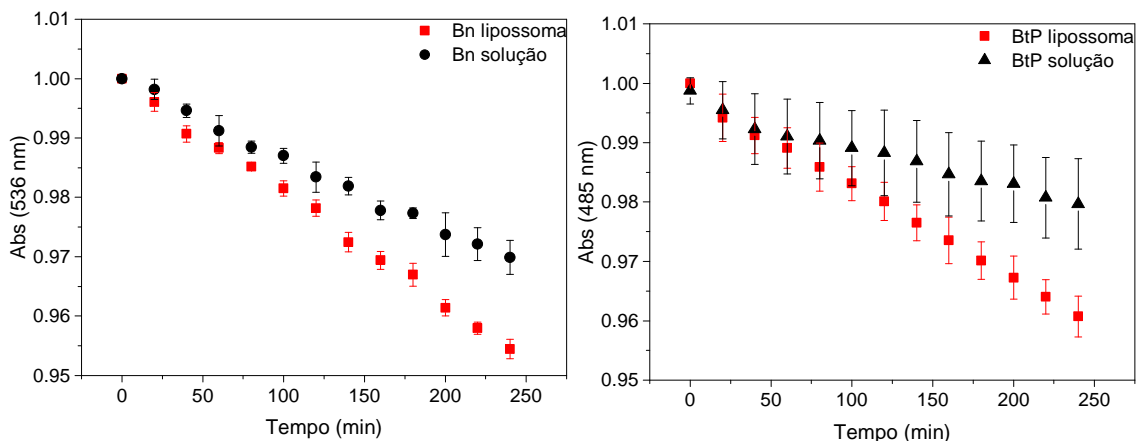


Figura 12. Variação em função do tempo da absorção máxima de Bn ($\lambda^{\text{Abs}} = 536 \text{ nm}$) e BtP ($\lambda^{\text{Abs}} = 485 \text{ nm}$) em lipossomas e livre em solução.

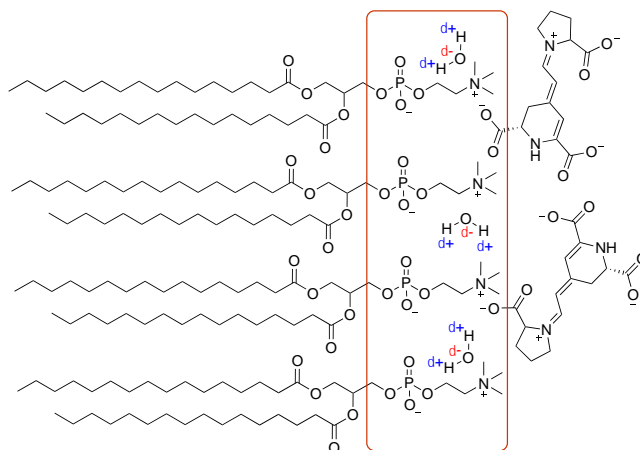


Figura 13 Interação eletrostática entre os ácidos carboxilatos de BtP e os grupos quaternários de amônio da cabeça polar do lipídeo (destacada em laranja) presentes na fase aquosa interna e externa das lipossomas. A interação com Bn segue o mesmo princípio.

Existem diversas opções de lipídeos neutros, ou seja, que não possuem cargas positivas

e negativas em suas cabeças polares além de outras classes de moléculas capazes de formar estruturas lipídicas e que estão disponíveis comercialmente. Dentre esses compostos estão os esteróis e os glicerídeos que têm sido empregados em lipossomas para diversas aplicações. Esses compostos são candidatos possíveis à substituição do DMPC no sistema lipossomal contendo pigmentos naturais e cuja estrutura química poderia superar as adversidades causadas pela cabeça polar carregada do fosfolípido.

cSUVs não são fluorescentes. Ant, Lut e Bn são fracamente fluorescentes^{81,82} e mesmo utilizando amplas fendas de excitação e emissão, não foi possível observar a emissão de fluorescência desses compostos, puros ou em mistura. Em contrapartida, BtP possui um rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FI} , $\lambda = 485$ nm) de 4×10^{-3} ,⁸³ que mesmo baixo comparado, por exemplo, a fluoresceína ($\Phi_{FI} = 0,92$, $\lambda = 496$ nm)⁸⁴ permite a observação da emissão de fluorescência desse composto puro ou na mistura contendo os demais pigmentos naturais (Figura 14). Ambas as amostras contendo apenas BtP (Figura 14A) ou SUV contendo todos os pigmentos naturais (Figura 14B) apresentam máximo de emissão em 510 nm. Entretanto, a intensidade de fluorescência diminuiu 40% no sistema contendo Bn, Ant e Lut que podem atuar tanto como filtros físicos quanto como sequestradores de BtP excitado.

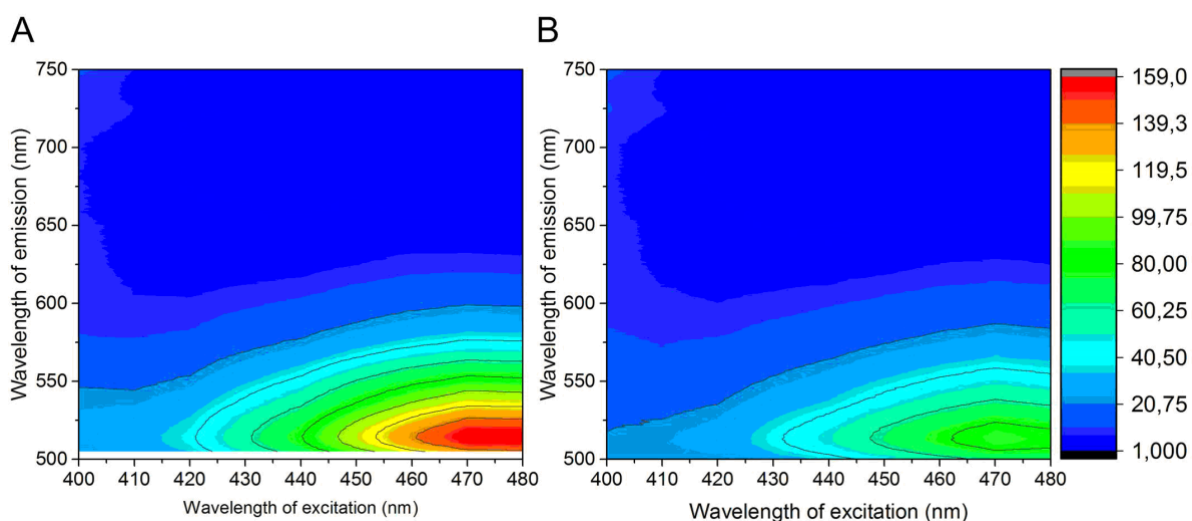


Figura 14. Gráfico 3D que correlaciona os comprimentos de onda de excitação com os de emissão de

fluorescência. A) emissão de cSUVs contendo BtP ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$); B) emissão de cSUVs contendo $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de BtP, Bn, Ant e 0,3% mol/mol de Lut em relação a DMPC.

































1-2.2.2 Modulação da cor

cSUVs contendo Bn, BtP e Ant em diferentes proporções foram preparadas com o objetivo de se verificar as variações de cores possíveis com suas misturas. Foram feitas duas séries de experimentos: em pH 3 e 7 (TpP 100 mmol L^{-1}) com o sistema completo (Bn, BtP, Ant e Lut) e em pH 5 (TpAcO⁻ 100 mmol L^{-1}) na ausência de Lut. As concentrações dos produtos naturais foram variadas entre 0 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para permitir a determinação da cor por espectroscopia de absorção empregando-se o programa Color. A partir dos dados de absorção, o programa faz uma comparação com o espaço de cor CIE com iluminante D65 e ângulo de observador a 10° para determinar os valores dos parâmetros de u' e v' (Figura 15). As cores obtidas a partir de diferentes proporções dos pigmentos evidenciam a capacidade dessas misturas em fornecer novas colorações a partir de pigmentos naturais para aplicações alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Ainda, os resultados mostram, pela primeira vez, a combinação de antocianinas e betalaínas que são mutuamente exclusivas em plantas.

As colorações obtidas com a variação da concentração dos pigmentos se concentram na região do salmão e laranja. Dessa forma, a variação da concentração de BtP que é laranja, providencia para esses sistemas cores que estão mais deslocadas para o rosa avermelhado. A diminuição da contribuição alaranjada permite que as misturas recebam maior contribuição da cor violeta de Bn. Nos pHs estudados Ant apresenta um baixo coeficiente de absorvidade molar e, portanto, contribui infimamente para as colorações obtidas nas diversas concentrações estudadas.

Tabela 5. Cores das soluções de lipossomas obtidas a partir de diferentes concentrações de indicaxantina,

betanina, cianidina-3-O-glucosídeo em pH 3 e 7 utilizando tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ como solvente.

Amostra	+ Lut	- Lut	+ Lut	Concentração (μmol L ⁻¹)		
	pH 3	pH 5	pH 7	BtP	Bn	Ant
1				50	50	50
2				0	50	50
3				10	50	50
4				25	50	50
5				50	0	50
6				50	10	50
7				50	25	50
8				50	50	0
9				50	50	10
10				50	50	25
11				50	100	50

Os pontos obtidos para amostras diluídas em tampão (1:5 v/v) estão circulados e se concentram, majoritariamente, em uma região alaranjada, enquanto as soluções de vesículas concentradas passam por regiões de coloração mais avermelhada e intensa. Com a Tabela 5 é possível observar que a presença de luteína nas misturas de pigmentos naturais limita o alcance das cores já que as soluções tendem a ser alaranjadas nesse sistema. Na ausência de Lut e em maiores concentrações de Bn é possível obter tonalidades mais voltadas para o magenta.

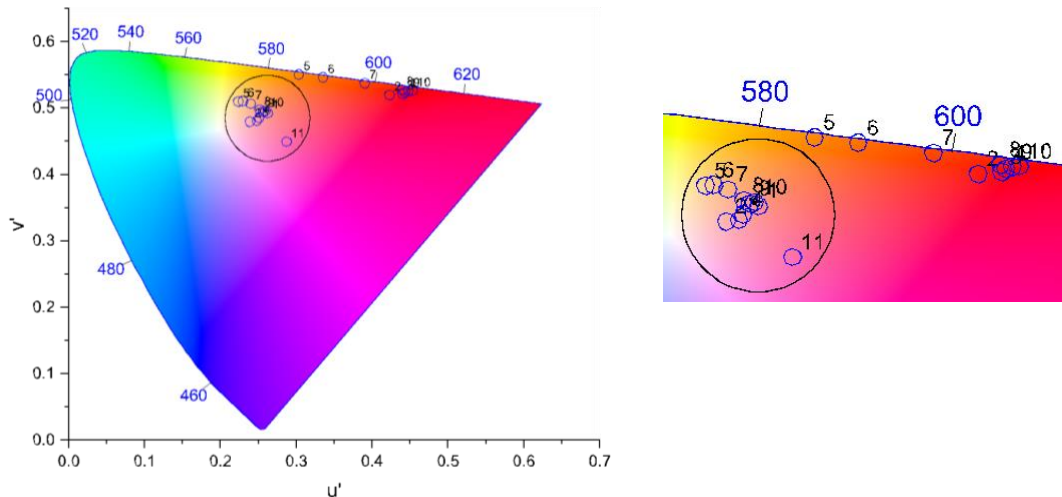


Figura 15. Diagrama de cromaticidade para lipossomas contendo diferentes proporções de pigmentos naturais em pH 3. Os valores de u' e v' obtidos a partir de uma análise feita pelo software Color utilizando os parâmetros CIE D65 a 10° . A região circulada representa as amostras diluídas na proporção de 1:5 (v/v) em PBS, enquanto as amostras fora do círculo são representações das amostras concentradas.

As amostras de cSUVs listadas na Tabela 5 foram submetidas a um teste de estabilidade no qual os espectros de absorção foram adquiridos imediatamente após a preparação e depois de 48 h. Observa-se que a degradação da betanina em função do tempo altera o perfil de absorção na região de 500 nm para todas as amostras, o que promove a mudança da coloração das soluções para tonalidades amarelo/laranja (Figura 16). O uso de lipossomas permite que as três classes de pigmentos sejam combinadas, entretanto a interação dos grupos quaternários de amônio na cabeça polar do lipídio influencia na estabilidade da Bn limitando a persistência e aplicações desse sistema. Entretanto, a utilização de lipossomas não impede a utilização de compostos estabilizantes já usados na maioria das formulações contendo betalaínas. Ainda a prospecção realizada mostra que a para preparação de cSUVs pode ser expandida com o uso de diferentes antocianinas, como por exemplo, delphinidinas e malvinidinas cuja coloração se aproxima do roxo em meios com pH acima de 7.^{28,59} Além disso, nosso grupo publicou recentemente um artigo com a síntese de uma pseudo-betalaína azul (Beetblue) cujos testes

preliminares mostraram baixa toxicidade *in cellulo* e no modelo Zebrafish.⁸⁵ Dessa forma, inúmeras combinações são possíveis entre as classes das betalaínas e antocianinas para um maior alcance de pigmentos naturais como corantes industriais.

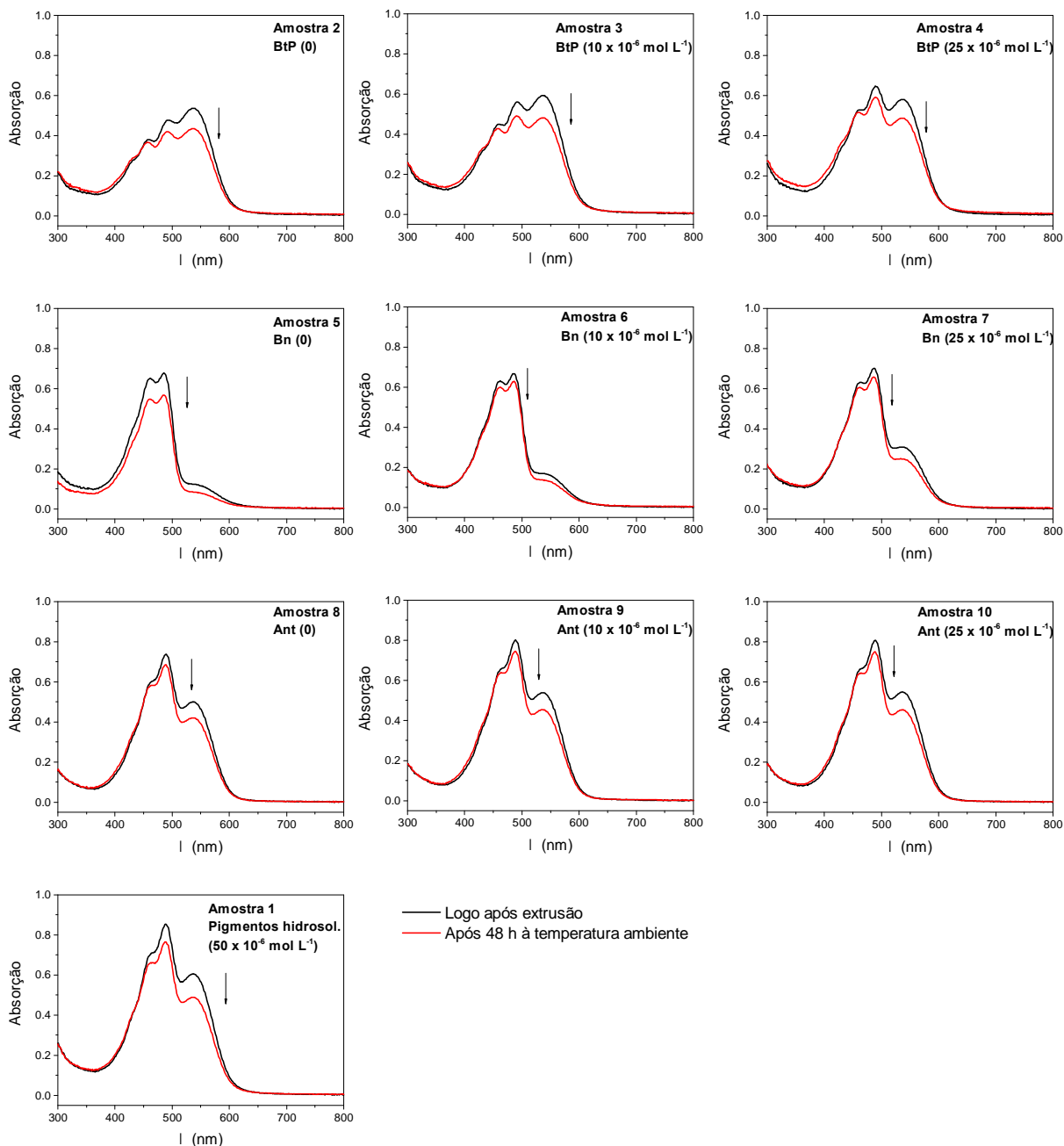


Figura 16. Espectros de absorção das amostras (1 – 10) logo após o processo de extrusão (preto) e após 48 h (vermelho). As amostras foram preparadas usando tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, pH 7.

1-2.3. Capacidade antioxidante em lipossomas

A capacidade antirradicalar de lipossomas contendo pigmentos naturais puros ou combinados foi medida a partir do ensaio com cátion-radical ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) em pH 3, 5 ou 7. O $\text{ABTS}^{\bullet+}$ que apresenta cor verde é preparado 16 h antes do experimento a partir da oxidação do ABTS, transparente, com persulfato de potássio. O ensaio é baseado na variação da absorção do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em 734 nm após 6 min da adição dos lipossomas contendo pigmentos naturais. Esta variação foi correlacionada com a concentração do pigmento natural adicionada e os valores de coeficiente angular obtidos para cada amostra foram comparados com o valor obtido para o Trolox nas mesmas condições experimentais (Figura 17).

A cSUV contendo uma mistura dos quatro compostos de estudo foi chamada de “mistura” e contém luteína (0,3% equiv de DMPC) e Bn, BtP e Ant, todos em concentração final $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A amostra contendo a mistura foi comparada com cSUVs preparadas nas mesmas condições com cada pigmento separadamente. Seguindo uma ordem decrescente de TEAC encontram-se: a mistura contendo todos os pigmentos em vesículas de DMPC, seguida de Ant, Bn e BtP.

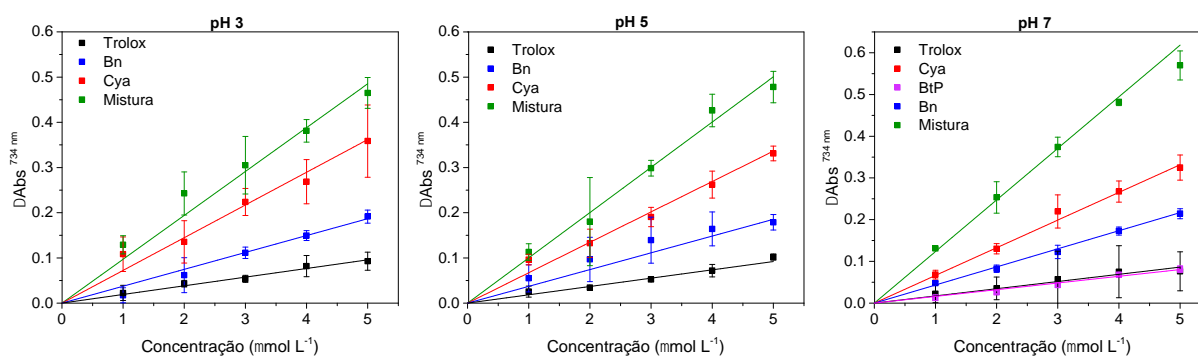


Figura 17. Correlação linear da variação de absorção em 734 nm do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em relação à concentração de antirradical e o ajuste linear da média da triplicata para cada composto. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 100 mmol L^{-1} (pH 3 ou pH 7) e em tampão acetato 100 mmol L^{-1} (pH 5).

Para algumas amostras não foram observadas variações da absorção de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em

função da concentração, são elas: controles de lipossomas sem pigmentos, lipossomas contendo Lut em todos os pHs e BtP em pH 3 e 5 (Figura 18).

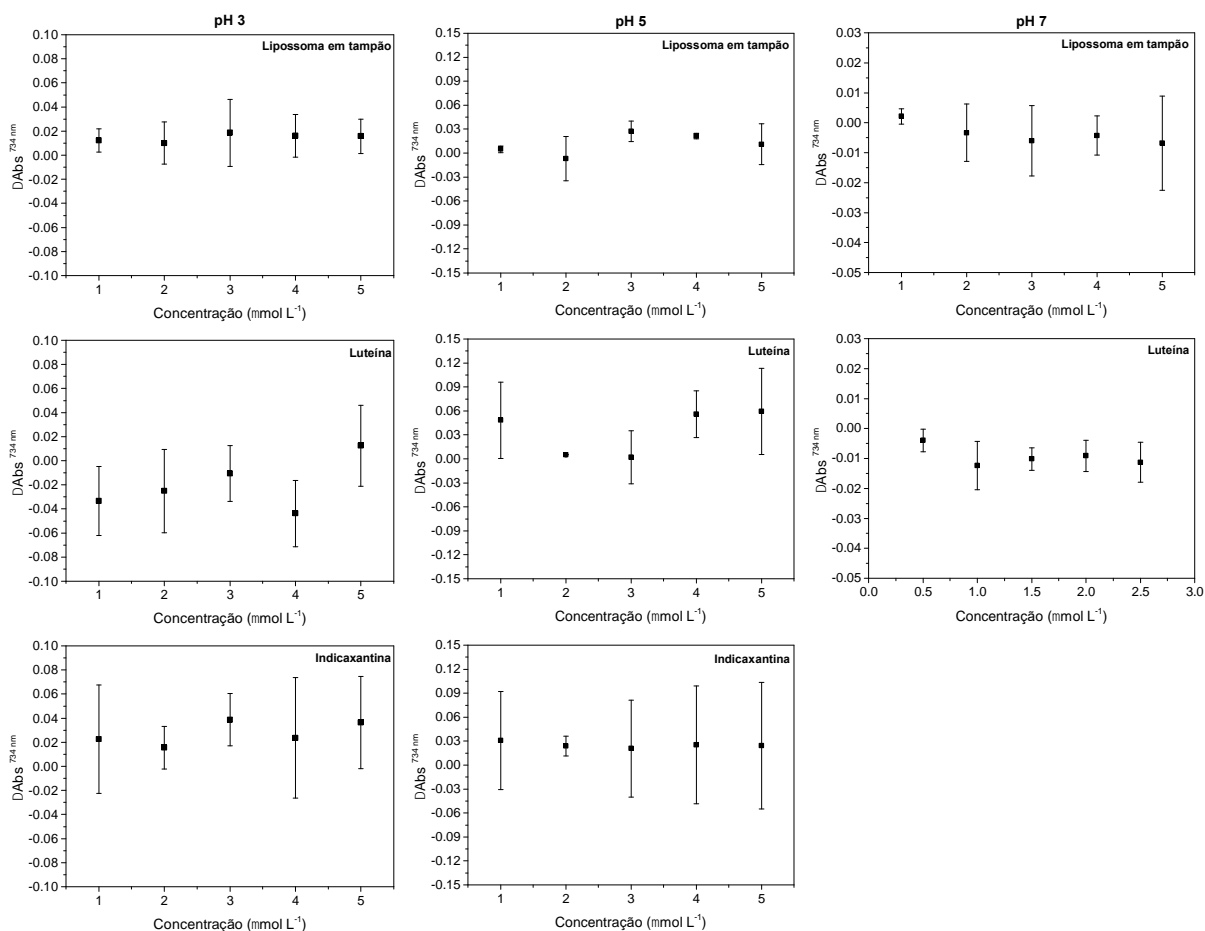


Figura 18. Variação de absorção em 734 nm do ABTS^{•+} em relação à concentração de antirradical ou de lipossoma (controle) preparado em tampão. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ (pH 3 ou pH 7) e em tampão acetato 100 mmol L⁻¹ (pH 5).

As análises feitas com diferentes concentrações de luteína não influenciaram na absorção do ABTS^{•+}, tal fenômeno pode ser explicado pela sua localização na lipossoma. A estrutura química do ABTS^{•+} é aniônica (SO₃⁻) e dessa forma não é esperado que o composto atravessasse a membrana. Como Lut se encontra na porção lipofílica do lipossoma, sua disponibilidade para reagir com o cátion-radical que se encontra fora da vesícula ou interagindo com as cabeça polar do lipídio é pequena e, portanto, não é esperado que haja variação na

concentração de $ABTS^{+\cdot}$ nesse sistema. Para as análises feitas com BtP encapsulada em lipossomas em pH 3 e 5 também não foi observada variação da absorção do cátion-radical em função da concentração da betalaína. BtP possui um menor TEAC ($BtP^{TEAC} = 1,6$) do que Bn ($Bn^{TEAC} = 4,8$) devido à ausência da porção fenólica em sua estrutura química.

A Tabela 6 apresenta os valores de TEAC obtidos para as amostras de pigmentos naturais encapsuladas em lipossomas de DMPC em pH 3, 5 e 7 e os valores de TEAC para os mesmos compostos em solução para fins comparativos. O valor de TEAC obtido para as amostras de lipossomas contendo pigmentos naturais isolados foi somado para cada pH e denominado como “soma”. O resultado mostra que para pH 3 e 5 a soma resulta em valores de TEAC moderadamente maiores do que os obtidos para o valor experimental (mistura). Enquanto para pH 7 a soma e a mistura apresentaram o mesmo valor de TEAC.

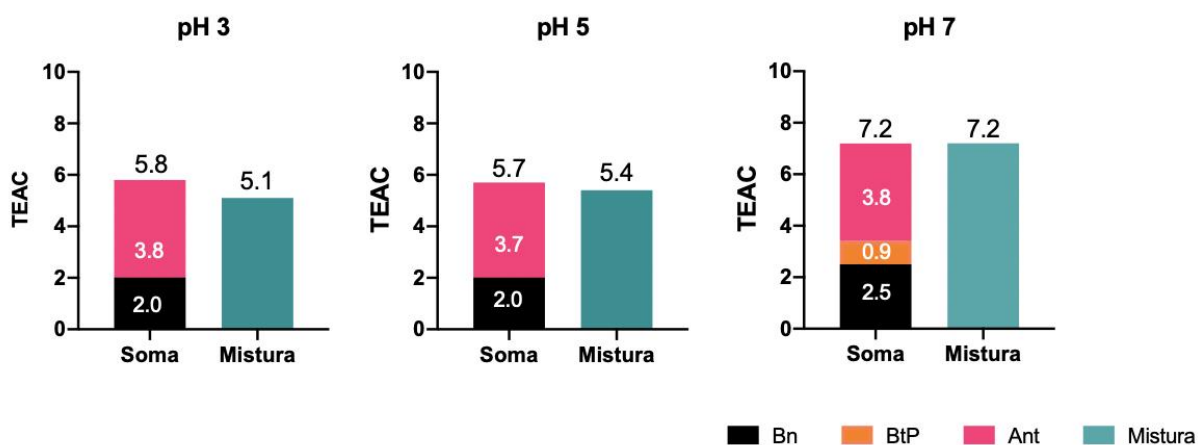


Figura 19 Valores de TEAC obtidos para os pigmentos naturais encapsulados em lipossomas individualmente e na mistura (50×10^{-6} mol L⁻¹ dos pigmentos hidrossolúveis e 0,3% mol/mol de luteína/DMPC). Os resultados foram obtidos em três pHs distintos: pH 3 – tampão fosfato 100 mM, pH 5 – tampão acetato 100 mM, pH 7 – tampão fosfato 100 mM.

Tabela 6. Valores de TEAC para amostras de lipossomas de DMPC contendo pigmentos naturais isolados ou em misturas. Os experimentos foram realizados a partir do ensaio com cátion-radical ABTS

em pH 3, 5 ou 7, utilizando tampão fosfato ou tampão acetato 100 mmol L⁻¹.

	TEAC			Solução
	pH 3	pH 5	pH 7	
Bn	2,0	2,0	2,5	4,8 (pH 7) ⁸⁶
BtP	*	*	0,9	1,6 (pH 7,4) ⁸⁶
Ant	3,8	3,7	3,8	3,9 (pH 5)
Lut	*	*	*	1,5 ^{**87}
Mistura	5,1	5,4	7,2	-
Soma	5,8	5,7	7,2	-

* Depleção de TEAC não foi suficiente para medição, ** solubilizado em hexano contendo 10% (v/v) de acetona

As betalaínas encapsuladas em DMPC apresentaram valores de TEAC abaixo do valor obtidos para esses compostos em solução. Estudos mostram que Bn e BtP não particionam na bicamada lipídica de DMPC e, dessa maneira, é esperado que betalaínas encontrem-se apenas nas regiões hidrofílicas do sistema (dentro e fora da vesícula). Entretanto, interações eletrostáticas e por pontes de hidrogênio entre betalaínas e as cabeças polares dos lipídios podem diminuir a disponibilidade do composto para reagir com ABTS^{•+}, tal efeito é mais pronunciado em pHs 3 e 5, mas também é observado em pH 7 já que nesse meio o TEAC das amostras de BtP e Bn em lipossoma é cerca de 2× menor do que o obtido em solução. As soluções contendo os pigmentos naturais encapsulados foram adicionadas a soluções de cátion-radical ABTS. Sendo assim, o resultado obtido é resultado da interação do cátion-radical com os pigmentos presentes dentro e fora dos lipossomas, e, portanto, a reação dos pigmentos localizados internamente depende do processo de difusão do cátion-radical. Os valores de TEAC obtidos para Ant nos três pHs estudados são próximos ao TEAC obtido em solução. De fato, a reação entre o cátion-radical ABTS e Ant não é estequiométrica já que uma molécula de Ant contém quatro hidroxilas fenólicas capazes de reagir.

1-2.4. Conclusões

Betalaínas e antocianinas que são mutuamente exclusivas na natureza foram combinadas, na presença de luteína, na forma de lipossomas coloridas que possuem propriedade antioxidante. O uso de DMPC como lipídeo para a formação das cSUVs foi adequado para o encapsulamento, mas a porção do quaternário de amônio pode diminuir a persistência das betalaínas através do favorecimento da hidrólise, apesar do caráter neutro da sua porção polar, assim como observado para tensoativos catiônicos. Tal efeito compromete a persistência de betanina no meio levando a mudanças de coloração orientadas para o amarelo/laranja.

O efeito do pH sobre as antocianinas compromete a sua cor nas cSUVs em meio neutro; contudo, é possível ajustar as quantidades dos pigmentos naturais para obter cSUVs das cores desejadas no intervalo do violeta ao vermelho, passando pelo laranja. Ainda, esse sistema permite que o pH também seja modulado a fim de se obter cores distintas, que podem agir como indicadores. cSUVs são excelentes antioxidantes e sua capacidade antirradicalar demonstra que não há sinergismo entre os pigmentos naturais estudados em relação a forma de como os componentes antioxidantes atuam frente ao radical cátion de ABTS. Dessa forma, esse estudo permitiu a identificação de condições potenciais para aplicação tecnológica de misturas contendo betalaínas, antocianinas e carotenoides.

1-2.5. Parte experimental

1-2.6. Reagentes e solventes

Todos os solventes e reagentes utilizados não foram purificados previamente exceto quando indicado. *Solventes*: metanol (Merck, grau HPLC), etanol (Merck, absoluto P.A.), isopropanol (Merck, ACS $\geq 99,5\%$), acetato de etila (Merck, ACS $\geq 99,5\%$), diclorometano (Merck, ACS $\geq 99,5\%$), clorofórmio (Merck, ACS $\geq 99,8\%$), acetonitrila (JT Baker, grau HPLC), metanol deuterado (99,5% de átomos de D), clorofórmio deuterado (99,8% de átomos de D) e óxido de deutério (99,9% de átomos de D). *Ácidos e bases*: ácido acético (Merck, ACS, $\geq 99,7\%$ ou 99% de átomos de D), ácido clorídrico (HCl, Merck, ACS 37%), ácido fórmico (Sigma-Aldrich, grau HPLC, 98 – 100%) hidróxido de sódio (NaOH, Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) e hidróxido de amônio (NH₄OH, Merck, 28% NH₃ em H₂O). *Sais*: cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$), cloreto de potássio (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), formato de sódio (Sigma-Aldrich, grau LC-MS), persulfato de potássio (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$). *Demais reagentes*: L-prolina (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$), DMPC (Avanti, $>99\%$), ABTS (Sal de diamônio de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico, Sigma-Aldrich, $>98\%$), Trolox (Sigma-Aldrich, 97%). *Fase estacionária para cromatografia*: sephadex LH-20 e sílica octadecil funcionalizada (200 – 400 mesh).

1-2.7. Soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura (18 M Ω cm⁻¹, 25 °C) obtida a partir de um sistema milliQ da Millipore.

Solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹: 4 g de NaOH foram solubilizados em um balão

volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água.

Solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹: 8,28 mL de HCl 37% (d = 1,2 g mL⁻¹) foram dissolvidos em balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água.

Tampão fosfato 100 mmol L⁻¹: a solução foi preparada pela dissolução de 1,2 g fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) a um balão de 100 mL. O pH foi ajustado utilizando HCl ou NaOH 1,0 mol L⁻¹ para 3 ou 7 e em seguida o volume de 100 mL foi completado com água.

Tampão acetato 100 mmol L⁻¹: a solução foi preparada pela dissolução de 573 µL ácido acético a um balão de 100 mL. O pH foi ajustado utilizando NaOH 1,0 mol L⁻¹ para 5 e em seguida o volume de 100 mL foi completado com água.

1-2.8. Síntese, extração e purificação

1-2.8.1 *Betanina*

Betanina foi obtida a partir da precipitação de betacianinas presentes no suco de beterraba seguida por um processo de purificação cromatográfica. No processo de precipitação, beterrabas vermelhas frescas foram processadas em um Juicer (Philips-Walita, modelo RI 1855) dando origem ao suco de beterraba. O suco obtido foi centrifugado (10 min, -10 °C, 7.000 xg) e filtrado por meio de uma filtração simples em papel de filtro, seguida de uma filtração em sílica gel à pressão reduzida. O pH foi ajustado até 2 com a adição de HCl concentrado. Essa solução foi condicionada em tubos Falcon com isopropanol em uma proporção 2:1, que foram colocados em banho de gelo seco e etanol durante 20 min e mantidos refrigerados (-20 °C). Após 24 h, os tubos foram retirados do freezer e centrifugados (15 min, 5 °C, 5000 xg). Um precipitado foi formado no fundo do tubo Falcon e o sobrenadante removido. O precipitado foi lavado com etanol e os tubos foram novamente centrifugados (10 min, 5 °C, 5000 xg). O sólido formado foi dissolvido em água e centrifugado (5 min, 5 °C, 5.000 xg), onde recolheu-se o sobrenadante agora contendo um extrato de betacianinas e açúcares. O extrato obtido passou

por duas etapas cromatográficas para purificação. Na primeira, a solução passou por coluna de sílica C18 usando água MilliQ como eluente e em seguida por uma coluna de filtração em gel usando Sephadex LH-20 como fase estacionária e água MilliQ como eluente. A amostra foi analisada por HPLC-MS-ESI(+) e por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , Bruker III, 500 MHz).

^1H NMR (500 MHz, Deuterium Oxide) δ 8.29 (d, $J = 6.8$ Hz, 0H, H11), 7.15 (s, 1H, H4), 7.08 (s, 1H, H7), 6.29 (s, 0H, H-18), 5.91 (d, $J = 6.7$ Hz, 0H, H12), 5.05 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H1'), 4.98 (dd, $J = 10.2, 3.1$ Hz, 1H, H2), 4.44 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H15), 3.92 (dd, $J = 12.6, 2.2$ Hz, 1H, H6'a), 3.76 (dd, $J = 12.5, 5.3$ Hz, 1H, H6'b), 3.66 (dd, $J = 16.7, 10.6$ Hz, 1H, H3a), 3.63 – 3.59 (m, 2H, H3' e H5'), 3.58 (dd, $J = 5.3, 2.3$ Hz, 1H, H4'), 3.54 – 3.49 (m, 1H, H2'), 3.24 (dd, $J = 17.2, 7.6$ Hz, 1H, H14a), 3.20 (dd, $J = 16.6, 3.2$ Hz, 1H, H3b).

1-2.8.2 Indicaxantina

Indicaxantina (BtP) foi semissintetizada a partir do acoplamento aldímico entre ácido betalâmico (HBt) e o aminoácido L-prolina e purificada por meio de HPLC em escala semipreparativa acoplado a outros métodos de cromatografia em coluna.

1-2.8.3 Ácido betalâmico

Ácido betalâmico (HBt) foi obtido em acetato de etila utilizando suco de beterraba e procedimento padrão do grupo, adaptado da literatura.^{56,57} Beterrabas vermelhas frescas foram lavadas, cortadas e processadas em uma centrífuga de alimentos tipo *juicer* (Phillips-Walita, modelo RI1855) para obtenção de suco de beterraba. Cerca de 500 mL do suco foi filtrado em filtro de pano, transferido para um béquer de 1 L e resfriado a 10 °C. Sob agitação mecânica, adicionou-se hidróxido de amônio (32%) até que a solução atingisse valor de pH igual à 11,4, acompanhado com o auxílio de um eletrodo de pH. A solução foi mantida sob agitação mecânica (ca. 400 rpm) até que sua coloração passasse de roxa para a amarelo-esverdeada (ca.

30 min). Em seguida, resfriou-se a solução a 1 °C (banho de CO₂(s)/etanol) e o pH foi levado a 1,5 – 2 utilizando HCl concentrado. O eletrodo de pH foi retirado e adicionou-se acetato de etila (10% do volume inicial do suco) sob a solução avermelhada. A emulsão resultante foi centrifugada (7000 xg, 5 min, 5 °C) e o processo de extração líquido-líquido foi realizado mais uma vez. A fase orgânica amarela contendo HBt foi separada da fase aquosa a partir do resfriamento com banho de CO₂(s)/etanol e filtrada a vácuo de forma que cristais de gelo contendo sais e água fossem retirados da fase orgânica. A concentração da solução de HBt em acetato de etila foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{378\text{nm}} = 30.000$, AcOEt).⁸⁸ Cerca de 50 mL de HBt em acetato de etila teve seu volume reduzido em, aproximadamente, 1/3 sob pressão reduzida (20 mmHg, 25 °C). HBt foi extraído para água (pH 11) em funil de separação e a fase superior contendo acetato de etila foi descartada. O HBt obtido foi utilizado para semissíntese de indicaxantina.

1-2.8.4 Semissíntese de indicaxantina

Ao ácido betalâmico em água foi adicionado NH₄OH concentrado até que a solução atingisse pH 11, adicionou-se em seguida L-prolina (13 eq.) e a reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos e acompanhada espectrofotometricamente até consumo total de HBt. Neste momento, a reação foi resfriada em banho de gelo sob atmosfera de N₂ e o pH foi ajustado para 5 pela adição lenta de HCl 37% para garantir a desidratação da BtP formada. A reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por mais 30 minutos e a solução obtida foi armazenada sob refrigeração (-20 °C) para posterior purificação.

A reação bruta foi purificada em três etapas. Primeiramente, o excesso de NH₄Cl formado a partir das modificações de pH durante a semissíntese foi retirado por cromatografia em coluna de sílica C18 utilizando água MilliQ como eluente. O excesso de L-prolina foi

removido por HPLC em condições de fase reversa e escala semi preparativa em um equipamento Shimadzu 20A equipado com detector PDA SPD20A, nas seguintes condições: coluna de sílica C18 Ascentis (5 μm , 250 mm x 10 mm, Supelco), em condição isocrática de 10% de B em 30 minutos com fluxo de 2 mL min^{-1} . As frações correspondentes a BtP foram coletadas entre 18,5 min e 19,5 min. Após esta etapa, se necessário, traços de ácido betalâmico ainda presentes na amostra foram removidos por cromatografia de exclusão de tamanho, utilizando-se coluna de Sephadex LH-20 e água como eluente. A amostra foi analisada por HPLC-MS-ESI(+) e por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , Bruker III, 500 MHz).

1-2.8.5 Cianidina-3-O-glucosídeo

A casca da jabuticaba foi utilizada como fonte de antocianinas. Cerca de 30 g foram submersa em 90 mL de solução contendo 70% etanol, 29,9% água e 0,1% de ácido clorídrico). Em seguida, foram realizadas extrações com acetato de etila (1:1, 4x) em um funil de separação, a fase aquosa resultante da extração foi utilizada para realizar a purificação em coluna. Amberlite XAD 7 foi empregada como fase estacionária e HCl 0,01% seguida de uma solução etanoica (35% EtOH, 0,01% HCl, água) como fases móveis.⁴²⁻⁴⁴ A última etapa de purificação envolve cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando solução aquosa de HCl (0,01%, v/v) como eluente. A amostra foi analisada por HPLC-MS-ESI(+) e por espectrometria de ^1H -RMN, Bruker III, 500 MHz). ^1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 9.03 (s, 1H), 8.28 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 2.0, 0.9 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.30 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.91 (dd, J = 12.1, 2.0 Hz, 1H), 3.73 – 3.69 (m, 0H), 3.67 (ddd, J = 9.3, 7.6, 2.0 Hz, 1H), 3.59 – 3.50 (m, 2H), 3.46 – 3.39 (m, 1H).

1-2.8.6 Luteína

Cápsulas comerciais contendo 10 mg de luteína e 0,5 mg de zeaxantina (Lut10,

Ophtalmos) foram obtidas na farmácia local e usadas como precursoras de luteína. O composto foi purificado por meio de cromatografia centrífuga de camada fina (Chromatotron, Harrison Research), utilizando uma placa de sílica normal com 4 mm de espessura e uma mistura de diclorometano e acetato de etila (1:1, v/v) como eluente. As cápsulas contendo carotenoides e óleo de soja foram solubilizadas (cerca de 10 unidades) na mistura eluente para serem aplicadas na placa de sílica. O composto foi caracterizado por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , Bruker III, 500 MHz): 0,85 (s, 3H - sobreposição), 1,00 (s, 3H), 1,07 (s, 6H), 1,36 (dd, $J = 13,1$ Hz e 6,8 Hz, 1H), 1,49 (t, $J = 11,9$ Hz, 1H), 1,63 (s, 3H), 1,74 (s, 3H), 1,77 (ddd, $J = 12,1$ Hz, 3,7 Hz, e 2,1 Hz, 1H), 1,84 (dd, $J = 13,1$ Hz e 5,9 Hz, 1H), 1,91 (s, 3H), 1,97 (sobreposição), 2,05 (dd, $J = 16,7$ Hz e 9,7 Hz, 1H), 2,39 (dd, $J = 16,6$ Hz e 6,8 Hz, 3H), 2,41 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 4,26 (bs, 1H), 5,43 (dd, $J = 15,5$ Hz e 9,9 Hz, 1H), 5,54 (s, 1H), 6,12 (m, 3H), 6,15 (m, 2H), 6,26 (m, 2H), 6,36 (dd, $J = 14,9$ Hz e 2,8 Hz, 2H), 6,63 (m, 4H).

1-2.9. Caracterização estrutural

1-2.10. Cromatografia acoplada à espectrometria de massas

As análises de HRLC-MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução q-TOF maxis 3G (Bruker Daltonics). A análise de betanina e indicaxantina foi realizada em uma coluna de fase reversa (Ascentis C18, 250 x 4,6 mm; 5 μm ; Supelco) utilizando o seguinte método cromatográfico: 2 – 20 % de B em 20 min, sendo o solvente A 0,05% ácido fórmico/água e o solvente B 0,05% ácido fórmico/acetonitrila com fluxo de 1,0 mL min^{-1} e temperatura do forno de 30 °C. A análise de antocianinas foi realizada em uma coluna de fase reversa (Ascentis C18, 250 x 4,6 mm; 5 μm ; Supelco) utilizando o seguinte método cromatográfico: 20 – 40% de B em 15 min, sendo o

solvente A 0,05% ácido fórmico/água e o solvente B 0,05% ácido fórmico/acetonitrila com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 30 °C.

1-2.11. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises de RMN foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP, em um espectrômetro Bruker AIII 500 acoplado a sonda de 5 mm TXI. Foram adquiridos espectros de ¹H. Para a análise, aproximadamente 3 mg dos compostos purificados e secos foram dissolvidos em 600 µL de D₂O para betalaínas, CDCl₃ para luteína e CD₃OD contendo 1% de ácido acético deuterado para antocianinas. Os deslocamentos químicos (δ) estão representados em unidades de partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do ácido trimetilsililpropanóico (TSP; δ 0,00) quando necessário e as multiplicidades dos sinais foram dadas como: s (singleto), d (dubleto) e dd (duplo dubleto) e m (multiplete). Para as amostras realizadas em D₂O o sinal residual da água em 4,79 ppm foi suprimido utilizando a sequência de pulso *zgpr*.

1-2.12. Propriedades fotofísicas e redox

1-2.12.1 Espectroscopia de absorção e emissão

Os espectros de absorção foram adquiridos em espectrofotômetro Varian Cary 50Bio na região de 250 a 800 nm e os espectros de emissão e excitação em espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. As análises foram realizadas em cubeta de quartzo de volume final 1,5 mL e caminho óptico de 10 mm mantendo a temperatura controlada por meio de banho termostático, quando necessário.

1-2.13. Preparação de lipossomas

Vesículas unimelares pequenas (SUVs) foram preparadas utilizando

dimetilfosfatidilcolina (DMPC). Um fino filme lipídico de DMPC foi produzido a partir da solubilização de 3 mg do lipídio em clorofórmio em um tubo de ensaio e da evaporação do solvente utilizando gás nitrogênio. Para a hidratação do filme formado foi utilizado 1 mL de meio aquoso contendo tampão PBS pH 7,4, tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 3 ou 7 ou tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 5. Betalaínas, antocianinas ou suas misturas (50 μmol L⁻¹) foram incluídas na etapa de hidratação enquanto luteína foi adicionada na etapa de formação de filme (0,3% mol/mol de DMPC). Após hidratação, os lipossomas foram homogeneizados com a ajuda de um vortex e passaram por um processo de extrusão com auxílio de um sistema Avanti utilizando uma membrana de 0,1 μm para homogeneização do tamanho das vesículas. Amostras das SUVs preparadas em tampão PBS foram diluídas (0,01 mg mL⁻¹, PBS) e tiveram seu diâmetro efetivo determinados a partir da análise de espalhamento de luz (DLS) utilizando um equipamento NanoBrook Series e empregando um esferas de látex de 100 nm como padrão. Também foram preparadas vesículas contendo diferentes proporções de betanina, indicaxantina ou cianidina-3-O-glucosídeo (5 – 50 μmol L⁻¹). Esses ensaios foram realizados em pH 3, 5 e 7 utilizando tampão fosfato ou acetato (100 x 10⁻³ mol L⁻¹). As análises de cor dessas amostras foram realizadas utilizando o parâmetro CIE D65 a 10° no software Color (Agilent). Os valores u' e v' foram obtidos em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio equipado com um porta-cubetas termostatizado a 25 ° ± 1 ° C.

1-2.14. Ensaio cinético ABTS

Preparação do radical cátion ABTS

Uma solução estoque de ABTS (7 x 10⁻³ mol L⁻¹) foi preparada pela solubilização de 192 mg de ABTS em 50 mL de água. O cátion radical foi formado pela adição de 88 μL de uma solução estoque de K₂S₂O₈ (1,4 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) em 5 mL da solução estoque de ABTS. Essa mistura foi mantida em repouso por 16 h antes do experimento à temperatura ambiente e

protegida da luz. A concentração da solução estoque de ABTS^{•+} foi medida espectrofotometricamente em 734 nm ($\epsilon_{734 \text{ nm}} = 1,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁸⁹

Preparação de SUVs contendo pigmentos naturais

As SUVs utilizadas no ensaio ABTS foram preparadas a partir do método de hidratação do filme lipídico de DMPC, conforme descrito no item 1-4.8. As vesículas foram feitas em tampão fosfato ou acetato 100 mmol L⁻¹ (pH 3, 5 ou 7) contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos pigmentos hidrossolúveis e/ou 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de luteína (0,3% mol/mol DMPC). O preparo das SUVs nessas concentrações foi feito com os pigmentos naturais isolados ou em uma mistura contendo todos os pigmentos de estudo. Soluções estoque das SUVs foram feitas conforme mostrado na Tabela 7 para que o volume de pigmento natural adicionado no experimento fosse o mesmo independente da concentração final.

Tabela 7. Volumes de solução inicial e de tampão utilizados para preparo de soluções estoque de lipossomas contendo pigmentos naturais.

Solução estoque ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	V lipossoma (μL)	V tampão (μL)
0	0	300
4	24	276
8	48	252
12	72	228
16	96	204
20	120	180

Ensaio cinético ABTS

A capacidade antirradicalar de SUVs contendo pigmentos naturais foi avaliada a partir do ensaio espectrofotométrico de sequestro do ABTS^{•+}. As medidas de absorção em 734 nm foram feitas com temperatura controlada (30 °C) em placas de 96 poços com caminho óptico de 6 mm a partir de um leitor de placas Multiskan SkyHigh. Soluções de trabalho contendo

ABTS^{•+} foram preparadas no tampão de estudo de forma que a absorção no poço ($V_f = 200 \mu\text{L}$) tivesse densidade ótica de $\sim 0,7$. Foram realizadas medidas em cinco concentrações distintas de SUVs contendo pigmentos naturais que variou entre 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nas placas foram adicionados $150 \mu\text{L}$ de solução de trabalho do ABTS^{•+} e $50 \mu\text{L}$ da solução estoque de SUV. O efeito dos pigmentos em reduzir o ABTS^{•+} foi medido pela diferença de absorção do cátion radical em 734 nm após 6 min ($\Delta\text{Abs}^{734\text{nm}}$).

Quantificação da capacidade antirradicalar

A capacidade antirradicalar foi determinada em equivalentes de Trolox (*Trolox Equivalent Antiradical Capacity*, TEAC). A medida relativa feita compara a capacidade antirradicalar das SUVs contendo pigmentos naturais em comparação àquela obtida com Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E. Solução de trabalho de Trolox ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram preparadas e utilizadas nos experimentos de ensaio cinética ABTS nas mesmas concentrações e pHs utilizados nos ensaios com as SUVs. Gráficos contendo a concentração utilizada no eixo x *versus* $\Delta\text{Abs}^{734\text{nm}}$ no eixo y foram feitos e os coeficientes lineares (α) obtidos a partir do ajuste linear. O TEAC foi então calculado utilizando a seguinte relação: $\text{TEAC} = (\alpha^{\text{SUV}}/\alpha^{\text{Trolox}})$.

Página deixada em branco intencionalmente

Capítulo 2

Fotodegradação de betalaínas

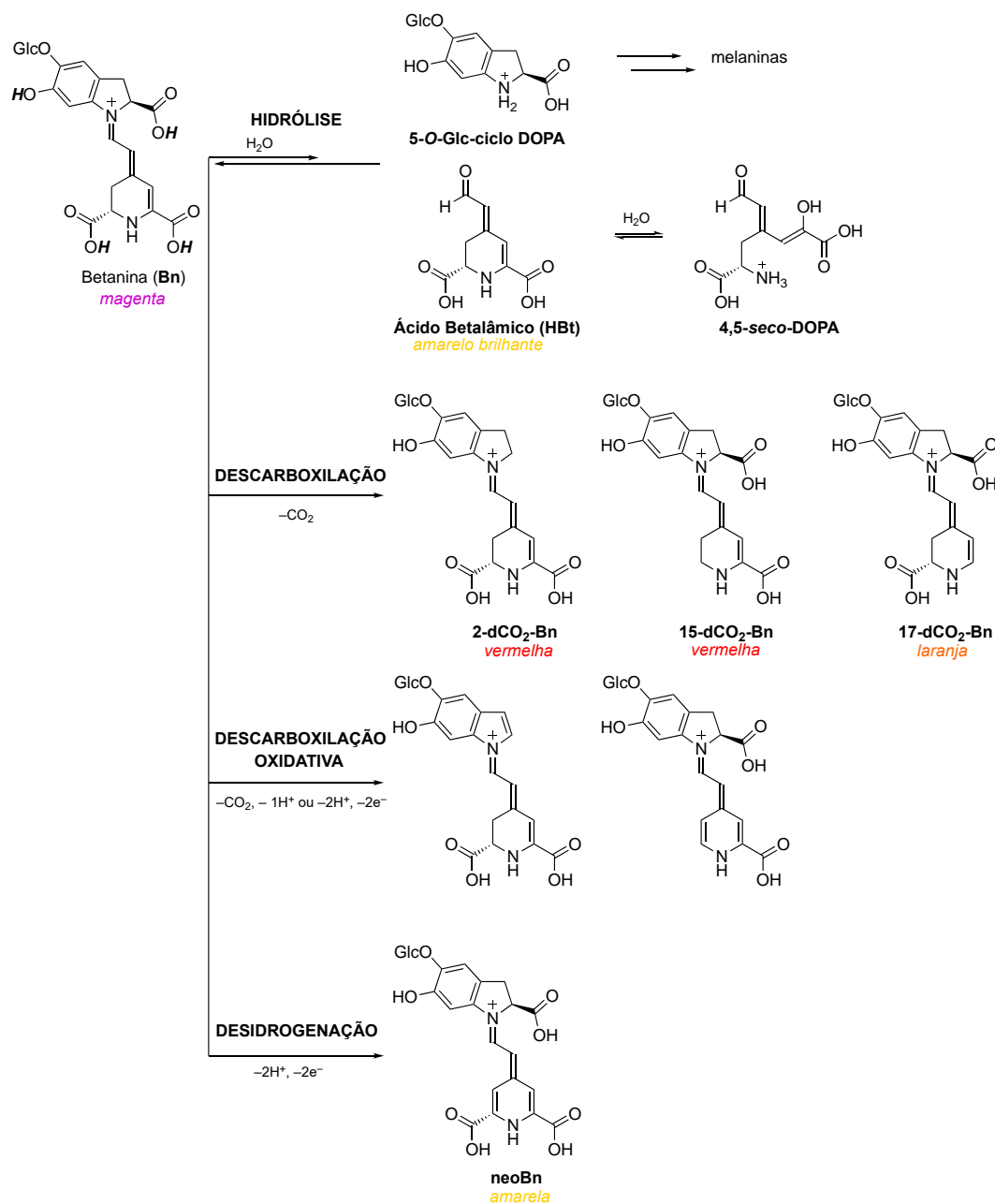
1-3.1. Introdução

Alterações de cor afetam negativamente a percepção do consumidor sobre a qualidade de um certo produto. Assim, para ampliar o uso de betalaínas como aditivos colorantes em alimentos e cosméticos é imprescindível adquirir conhecimento acerca da sua estabilidade (*termodinâmica*) e persistência (*cinética*) em diferentes condições. Betanina, a betacianina mais abundante da beterraba vermelha, foi aprovada pelas autoridades reguladoras americana e europeia para uso como aditivo colorante (EFSA/E162 e FDA/73.40) em produtos para uso/consumo humano e, por isso, é usada como betalaína-modelo em estudos de decomposição.^{36,90-93} Ácidos e bases fortes, alta atividade de água, presença de oxigênio, de outros oxidantes e de cátions metálicos, altas temperaturas e luz induzem a decomposição de betanina (Esquema 7).^{88,94-97}

Por serem iminas ou sais de imínio, betalaínas são sensíveis à hidrólise, reação que resulta em ácido betalâmico e em uma amina ou aminoácido. A velocidade desse processo depende do pH, aumentando em pH abaixo de 3 e acima de 8.^{16,77,98} Matrizes naturais como as pectinas, por exemplo, aumentam a persistência de betalaínas pois são capazes de diminuir a atividade da água (a_w), parâmetro medido como a razão entre a pressão de vapor da água no

sistema com e sem o aditivo.⁹⁹ A influência da atividade da água na estabilidade de betanina foi estudada em misturas hidroalcoólicas de etanol, glicerol e etileno glicol a 75 °C. A meia-vida da betanina aumentou de 33 para 124 min quando a_w diminuiu de 1,0 para 0,4 com o aumento da fração molar de álcool.⁹⁷ Embora a hidrólise seja a principal via de degradação das betalaínas, a baixa solubilidade desses produtos naturais em solventes não aquosos leva a uma busca por métodos para a sua estabilização, incluindo encapsulamento.^{100,101}

Outros processos de degradação térmica também são relevantes para a aplicação de betalaínas. Reações de descarboxilação ocorrem após tratamento térmico prolongado e podem atingir todas as funções carboxílicas das betalaínas. Contudo, o sítio da primeira descarboxilação depende do solvente e em meio aquoso a descarboxilação inicial de betacianinas ocorre no C2, enquanto em etanol ela ocorre no C17.¹⁰² A presença de um hidrogênio α carboxílico, que tem relativa acidez, pode ainda levar a tautomerização das betalaínas (2*S*/15*S*) com formação da sua forma *iso* (2*S*/15*R*). Neobetalaínas são formadas a partir de processos de oxidação ($-2e^-$, $-2H^+$) na porção tetra-hidropiridínica e, uma vez geradas, também estão sujeitas à descarboxilação. Com exceção do processo de epimerização que mantém a cor original da betalaína, os demais processos de degradação térmica geram produtos mais amarelos quando comparados aos seus compostos originais devido à diminuição da deslocalização dos elétrons π pela retirada do grupo atraente de elétrons. Além disso, o aquecimento pode levar à decomposição dos produtos de degradação das betalaínas, como é o caso da decomposição de ácido betalâmico e de algumas aminas produzidas por hidrólise como, por exemplo, a 5-*O*-glicosil ciclo-DOPA da betanina.



Esquema 7. Exemplos de vias de degradação de betanina e seus produtos mais comuns.

Betacianinas têm sido consideradas mais estáveis do que as betaxantinas.^{103,104} Entretanto, a comparação da estabilidade de betanina e indicaxantina, uma betaxantina proveniente do acoplamento entre ácido betalâmico e um aminoácido que contém uma amina secundária (L-prolina), indica que a hidrólise de indicaxantina em água é mais lenta ($t_{1/2} = 996$ h) do que a hidrólise de betanina ($t_{1/2} = 130$ h).³⁶ Por exemplo, a vulgaxantina I, a betaxantina da glutamina (aminoácido com amina primária) tem um tempo de meia vida ($t_{1/2} = 100$ min =

1,7 h) cerca de 10 vezes menor do que o da betanina.¹⁰⁵

1-3.2. Degradação fotoquímica de betalaínas

Sabe-se que a luz é um fator relevante na degradação de betalaínas.^{106,107} O efeito da luz sobre a persistência da betanina em solução foi estudado em temperaturas entre 25 e 55 °C monitorando-se a cinética de decomposição por espectroscopia de absorção UV-Vis. Observou-se que a temperatura era mais importante para as cinéticas de decomposição de betalaínas do que a luz, visto que o efeito da luz era inversamente proporcional à temperatura do sistema. A energia de ativação para fotodegradação de betanina em pH 5 foi determinada por von Elbe e colaboradores em 80 kJ mol⁻¹, enquanto a energia de ativação para a mesma amostra mantida no escuro é 104 kJ mol⁻¹.¹⁰⁶ Ainda, a fotodegradação de betalaínas parece envolver oxigênio, visto que amostras saturadas com nitrogênio submetidas a irradiação apresentaram a mesma meia vida que amostras mantidas no escuro.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ O processo de fotodegradação de betalaínas foi estudado usando extratos contendo betanina e outras betacianinas e os relatos na literatura de estudos feitos com betaxantinas são escassos.¹⁰¹ Além disso, pouco se entende sobre os mecanismos envolvidos no processo já que os produtos de degradação induzida por luz não foram caracterizados e as metodologias usadas nos experimentos englobam tanto os processos térmicos quanto os fotoquímicos visto que os sistemas de irradiação sempre utilizam lâmpadas convencionais com alta dissipação de calor.

1-3.3. Aditivos estabilizantes

A estabilidade de betalaínas pode ser aumentada através da utilização de aditivos ou de técnicas como microencapsulação capazes de diminuir a interação com fatores externos ou espécies químicas que possam levar a degradação de betalaínas. Dentre os estabilizantes estudados estão redutores como o ácido ascórbico e ácido isoascórbico, ácidos orgânicos como

o ácido láctico e agentes complexantes de metais de transição como o ácido cítrico e o EDTA. O efeito desses ativos foi investigado para prevenir a degradação térmica de betalaínas e os mecanismos de proteção não são totalmente compreendidos.^{92,107,111,112} Entretanto, a ineficácia dos antioxidantes fenólicos, que agem inibindo a propagação de reações de cadeia radicalar, indica que a oxidação da betanina induzida por calor não envolve radicais livres. O aumento dos valores de meia-vida da betanina na presença de 1% m/m de ácido cítrico ou EDTA pode estar associado a efeitos de pH e de formação de complexos que desfavorecem o ataque da água ao carbono imínico eletrofílico.

Ainda que a presença de aditivos estabilizantes tenha sido estudada para o processo de degradação térmica de betanina, a estabilidade frente a processos fotoquímicos só foi investigada na presença de ácido ascórbico e ácido isoascórbico.¹⁰⁷ Esses dois compostos aumentam a fotoestabilidade de betanina mesmo quando adicionados em concentrações baixas de 0,1 a 1,0% m/m. Entretanto, ácido isoascórbico foi mais eficiente e aumentou a meia-vida do composto em cerca de $5\times$ ($t_{1/2} = 30$ dias) enquanto seu isômero levou a um aumento de $2\times$ ($t_{1/2} = 13$ dias).¹⁰⁷ Além disso, pouco se sabe sobre a estabilização de betaxantinas, que só tiveram sua estabilidade térmica estudada, e sobre os produtos gerados a partir da degradação de betalaínas induzida por luz.^{108,113}

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nos estudos de fotodegradação acelerada de betanina e indicaxantina promovida por laser. Os parâmetros cinéticos para a fotodegradação das betalaínas de interesse foram obtidos a partir de cinéticas de absorção em diferentes temperaturas para pH 5 e 7. Os valores de energias de ativação calculados a partir da dependência das constantes cinéticas observadas com o inverso da temperatura são similares às aquelas determinadas para processos controlados por difusão sugerindo a participação de radicais, fato corroborado pela ocorrência de reação mesmo após o desligamento da fonte de excitação. Os produtos de fotodegradação das betalaínas foram identificados por meio de

espectrometria de massas e são em sua maioria produtos de processos oxidativos. Embora ácido ascórbico tenha inibido a degradação, o efeito de Trolox, um antioxidante fenólico, foi mais sutil sugerindo que possa haver a formação de um complexo entre as betalaínas e ácido ascórbico.

1-3.4. Resultados e discussão

1-3.5. Efeitos da temperatura e do pH

Para a realização do estudo de fotodegradação é necessário monitorar o efeito da irradiação das amostras sobre a concentração das betalaínas em tempo real. Dessa forma, os estudos foram realizados irradiando-se soluções aquosas de betanina (Bn) ou indicaxantina (BtP) com o auxílio de lasers Nd:YAG pulsados cujos feixes foram alinhados a um porta celas termostaticado, com agitação magnética e acoplado a um espectrofotômetro por fibras ópticas de irradiação e detecção ligadas a 90° em relação ao pulso (Figura 20).

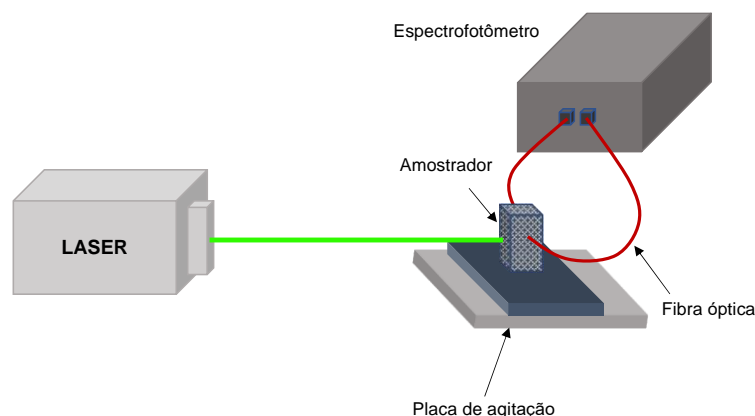


Figura 20. Montagem experimental para os experimentos de fotodecomposição.

Tampão acetato pH 5 (TpAcO^-) ou fosfato pH 7 (TpP), ambos 100 mmol L^{-1} para evitar efeitos catalíticos indesejados,⁹⁶ foram transferidos para uma cubeta com caminho óptico de 10 mm e termostaticados por 10 min ($30 - 50 \text{ }^\circ\text{C}$). As soluções de trabalho foram preparadas imediatamente antes da irradiação pela adição de alíquotas das soluções estoque de Bn ou BtP, cuja obtenção é descrita no Capítulo 1 dessa Tese, ao tampão termostaticado. Betanina foi excitada em 532 nm com um laser Quantel Q-smart 850 operando com frequência de repetição de pulso de 1 Hz e potência de $2,7 \pm 0,2 \text{ W}$ ($\sim 270 \text{ mJ}$ por pulso). Indicaxantina foi excitada em 480 nm com um laser Quantel Brilliant acoplado a um módulo de oscilador paramétrico óptico (OPO) e operando a 2,5 Hz com potência de $0,16 \pm 0,03 \text{ W}$ (16 mJ por pulso). Nas condições

de temperatura e pH empregados para ambas betalaínas, é observada uma diminuição nas bandas de absorção de Bn ($\lambda_{\text{max}} = 536 \text{ nm}$, Figura 21) e de BtP ($\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ nm}$, Figura 22) em função do tempo junto ao aparecimento de bandas na região de 350 a 450 nm, referentes à absorção de luz dos produtos de fotodegradação.

A cinética de fotodegradação foi estudada analisando-se a variação do máximo de absorção (536 nm para Bn e 485 nm para BtP) em função do tempo de irradiação (Figura 23). As constantes cinéticas observadas (k_{obs}) foram calculadas através do ajuste não-linear de uma função monoexponencial aos dados (Eq. 1):

$$Abs(\lambda) = Abs_0(\lambda) + Ae^{-k_{\text{obs}}t} \quad \text{Eq. 1}$$

onde Abs_0 é o coeficiente linear, A é o termo pré-exponencial e t é o tempo. As cinéticas de fotodegradação das duas betalaínas mostram que a decomposição é mais rápida em meio neutro, mas que a temperatura tem uma influência muito maior sobre a fotodecomposição das betalaínas em pH 5 do que em pH 7.

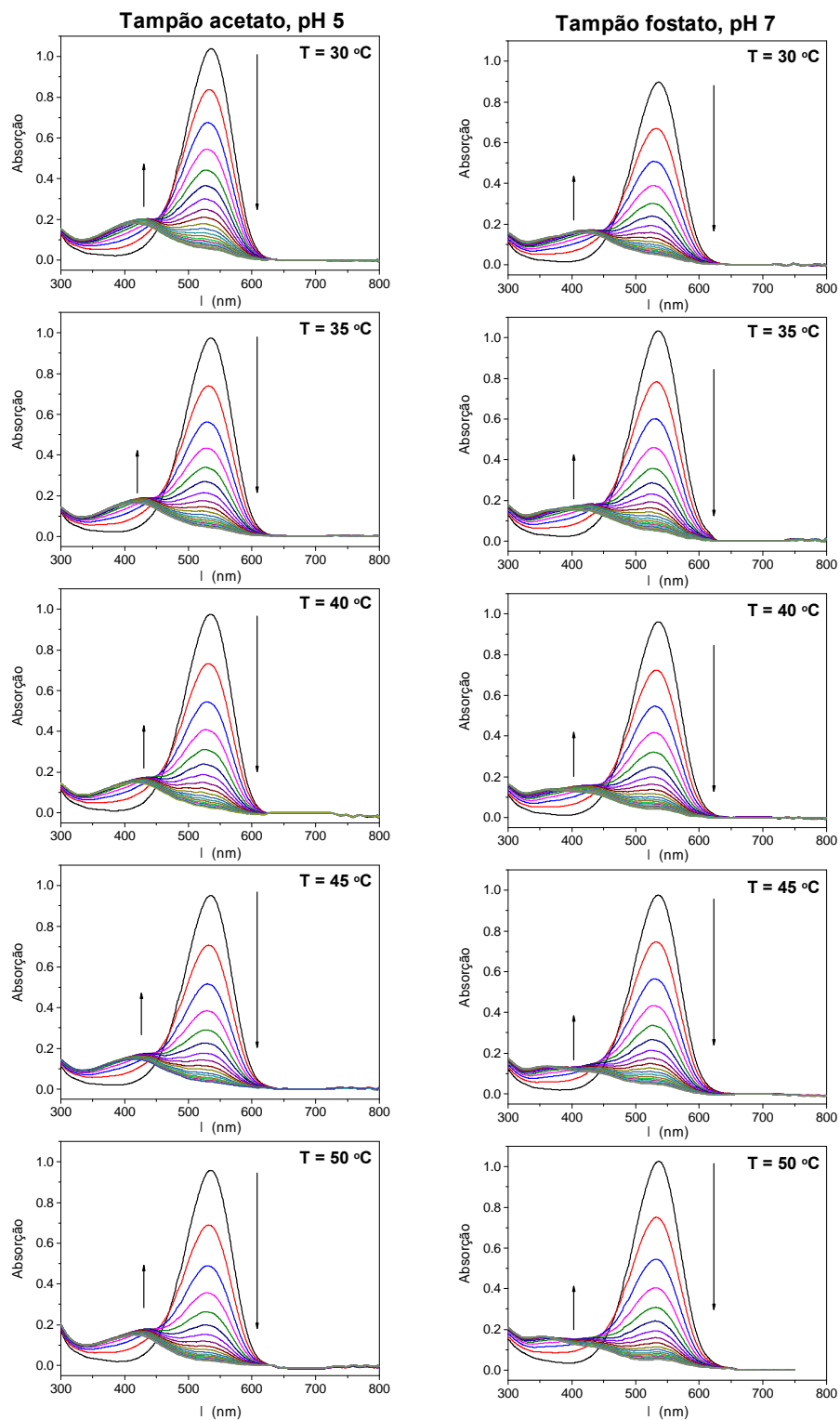


Figura 21. Cinéticas de degradação fotoquímica obtidas para Bn em diferentes temperaturas (30 –50 °C). Condições: excitação em 532 nm em tampão acetato 100 mmol L⁻¹, pH 5 ou em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, pH 7; 18 min.

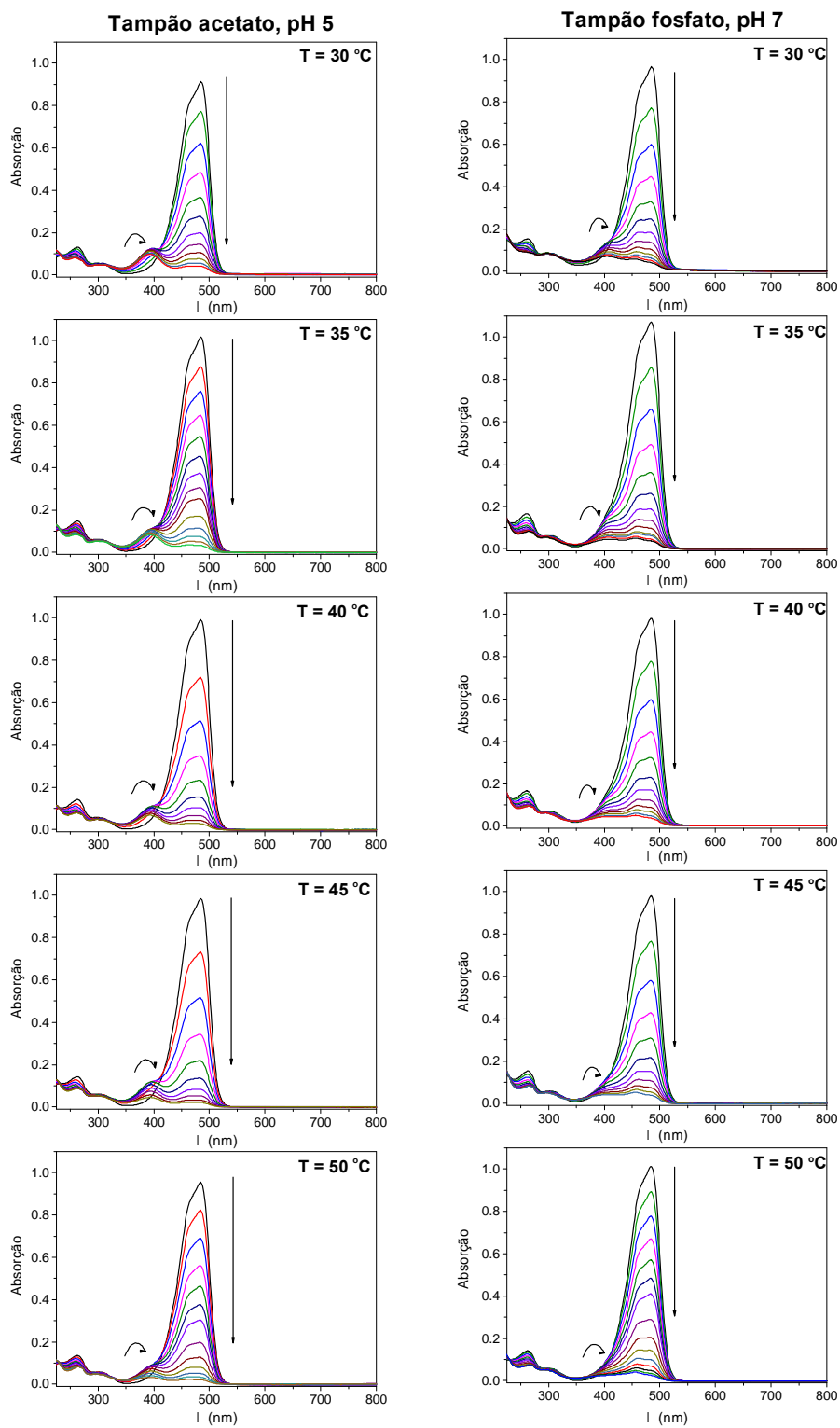


Figura 22. Cinéticas de degradação fotoquímica obtidas para BtP em diferentes temperaturas (30 –50 °C). Condições: excitação em 480 nm em tampão acetato 100 mmol L⁻¹, pH 5 ou em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, pH 7; 12 min.

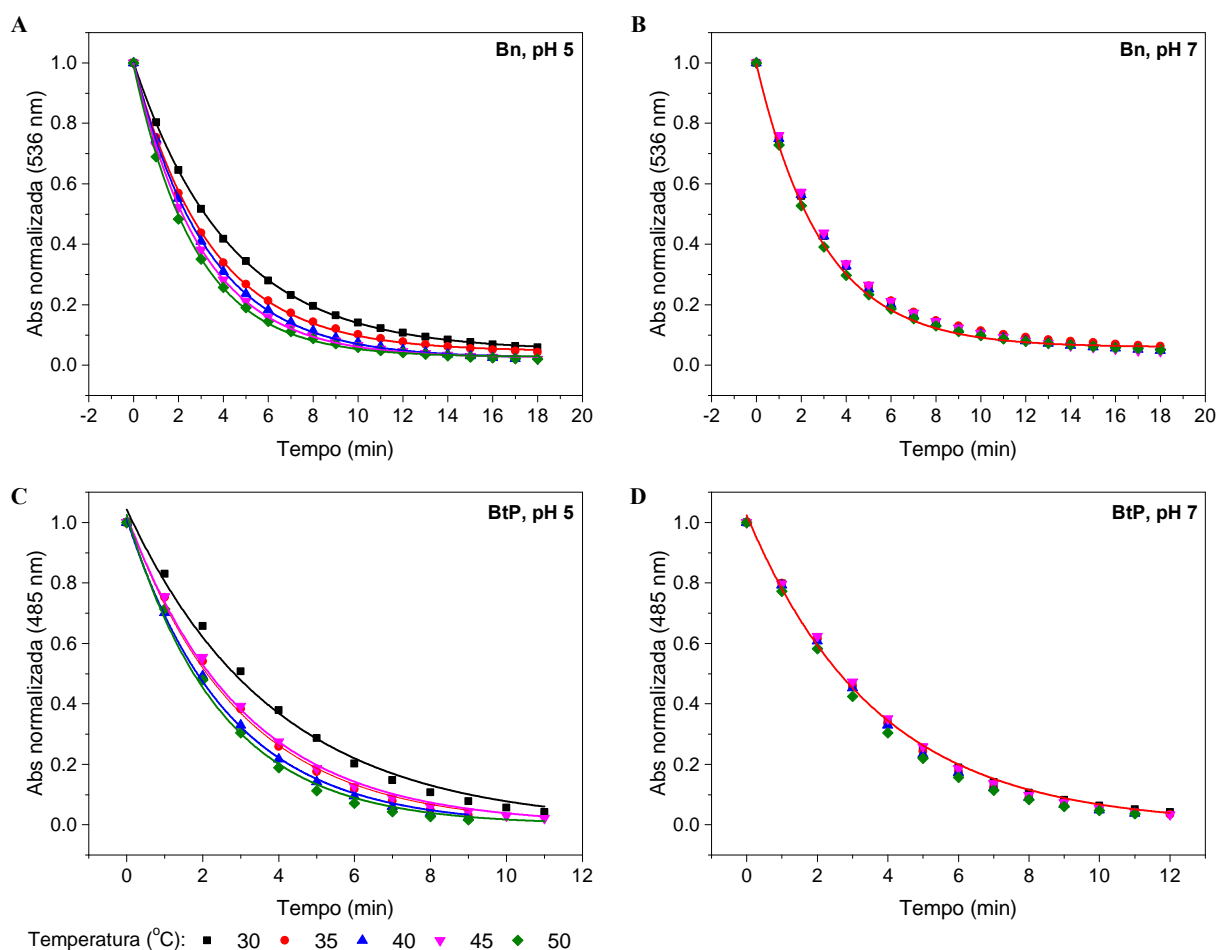


Figura 23. Cinética de decaimento da absorção de Bn ($\lambda = 536$ nm) e BtP ($\lambda = 485$ nm) em função do tempo de irradiação. As análises foram realizadas em diferentes temperaturas (30 – 50 °C) para Bn (A – pH 5, B – pH 7) e BtP (C – pH 5, D – pH 7) utilizando como solvente tampão acetato, pH 5, ou tampão fosfato, pH 7.

Experimentos-controle feitos na ausência de excitação com laser, chamados daqui para frente de controles no escuro apesar de não serem totalmente na ausência de luz dada a medida espectrofotométrica, mostram que a excitação com laser branqueia os corantes em poucos minutos (Figura 23), enquanto na sua ausência a decomposição das betalainas ocorre na escala de dias (Figura 24). Para os controles no escuro, existe uma dependência entre as constantes cinéticas observadas e a temperatura do sistema e os decaimentos obtidos também foram ajustados empregando-se a Eq. 1.

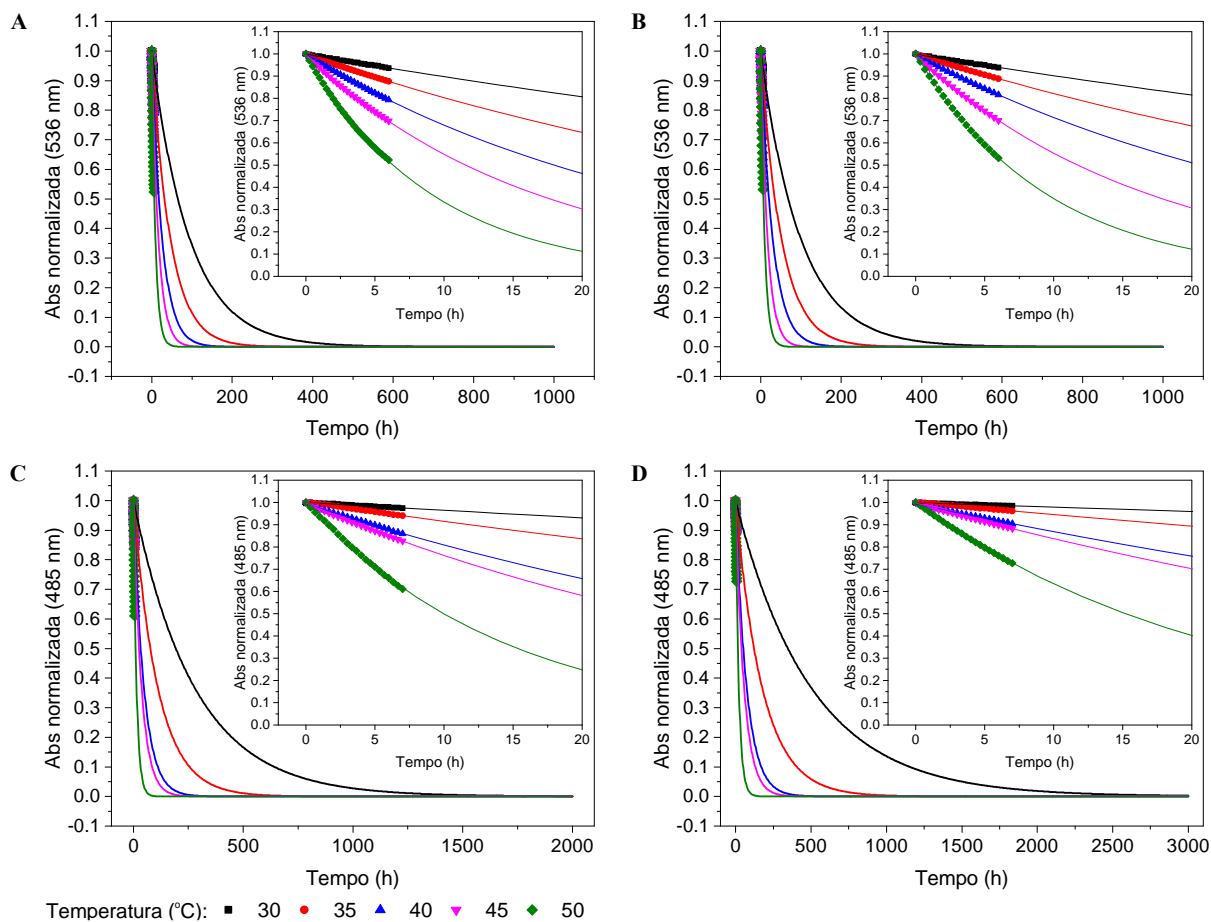
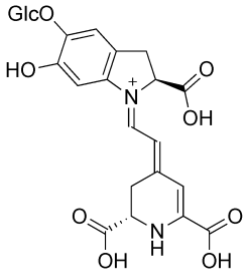
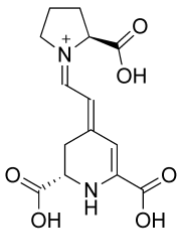


Figura 24. Cinética de decaimento de Bn ($\lambda^{\text{Abs}} = 536 \text{ nm}$) e BtP ($\lambda^{\text{Abs}} = 485 \text{ nm}$) obtida extrapolando-se o decaimento para zero empregando a Eq. 1 ($Abs_0 = 0$). As análises foram realizadas em diferentes temperaturas (30 – 50 °C) para Bn (A – pH 5, B – pH 7) e BtP (C – pH 5, D – pH 7) utilizando como solvente tampão acetato, pH 5, e em tampão fosfato, pH 7.

A Tabela 8 apresenta os valores de k_{obs} obtidos para as degradações fotoinduzida e no escuro realizadas em diversas temperaturas. As constantes cinéticas dos processos fotoquímicos são até três ordens de grandeza maiores do que àquelas obtidas na mesma temperatura para degradação dos compostos no escuro. Além disso, tanto a Bn quanto a BtP apresentaram valores de k_{obs} próximos para os pHs 5 e 7, mostrando pouca influência do pH nesse processo.

Tabela 8. Constantes cinéticas de velocidade (min^{-1}) obtidas em diferentes temperaturas (30 – 50 °C) para os processos de degradação na presença e ausência de irradiação de Bn e BtP em pH 5 e 7. Média dos valores dos experimentos em triplicata \pm o desvio padrão.

Composto	T (°C)	pH 5 ^a		pH 7 ^b	
		Laser $k_{\text{obs}} / \text{min}^{-1}$	Escuro $k_{\text{obs}} / 10^{-4} \text{min}^{-1}$	Laser $k_{\text{obs}} / \text{min}^{-1}$	Escuro $k_{\text{obs}} / 10^{-4} \text{min}^{-1}$
 <p>Betanina</p>	30	0,26 \pm 0,03	1,2 \pm 0,1	0,30 \pm 0,01	1,6 \pm 0,1
	35	0,29 \pm 0,01	2,8 \pm 0,1	0,30 \pm 0,01	3,7 \pm 0,4
	40	0,31 \pm 0,01	5,0 \pm 0,2	0,29 \pm 0,01	6,4 \pm 0,7
	45	0,32 \pm 0,01	7,3 \pm 0,6	0,30 \pm 0,05	10 \pm 0,8
	50	0,34 \pm 0,01	20 \pm 3	0,35 \pm 0,01	20 \pm 3
 <p>Indicaxantina</p>	30	0,31 \pm 0,08	0,7 \pm 0,1	0,29 \pm 0,02	0,4 \pm 0,1
	35	0,36 \pm 0,02	1,5 \pm 0,1	0,30 \pm 0,01	1,0 \pm 0,1
	40	0,37 \pm 0,01	3,5 \pm 0,3	0,30 \pm 0,02	2,1 \pm 0,1
	45	0,38 \pm 0,05	4,7 \pm 0,2	0,28 \pm 0,02	2,9 \pm 0,1
	50	0,42 \pm 0,02	12 \pm 0,5	0,30 \pm 0,01	7,2 \pm 0,4

^a Tampão acetato 100 mmol L⁻¹, ^b Tampão fosfato 100 mmol L⁻¹

A partir dos valores de k_{obs} para cada temperatura, calculou-se a energia de ativação (E_a) por meio da equação de Arrhenius (Eq. 2, Figura 25). Não foram determinados parâmetros de ativação com a equação de Eyring visto que o processo em estudo não se refere a uma única etapa elementar de reação e sim à múltiplas reações. A E_a para Bn em pH 7 não pôde ser calculada uma vez que os valores de k_{obs} não dependem da temperatura.

$$k_{obs} = Ae^{-E_a/RT} \quad \text{Eq. 2}$$

onde A é o termo pré-exponencial, R é a constante geral dos gases e T é a temperatura em K.

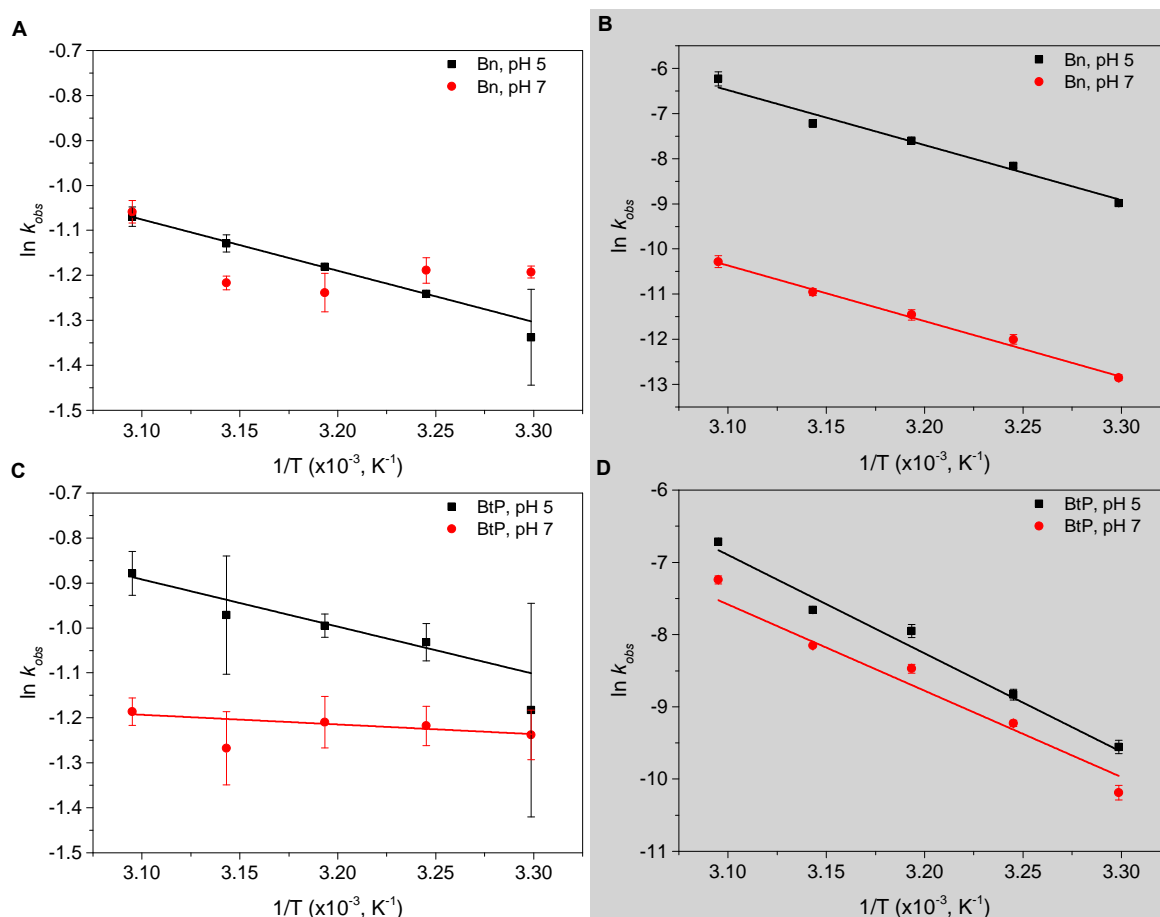


Figura 25. Gráfico de Arrhenius para a degradação fotoinduzida de Bn (A) e BtP (C) e para os processos de degradação térmica (B) e (D), respectivamente. Tampão acetato 100 mmol L^{-1} , pH 5 e tampão fosfato 100 mol L^{-1} , pH 7 foram utilizados e quando possível, a linha contínua corresponde ao ajuste linear; as regiões sombreadas indicam os intervalos de confiança de 95%.

Os valores de energia de ativação e fatores pré-exponenciais obtidos para os dois processos encontram-se na Tabela 9. Em pH 5, as E_a do processo de degradação fotoinduzida foram calculadas em 9,4 kJ mol⁻¹ para Bn e 8,7 kJ mol⁻¹ para BtP.¹¹⁴ A barreira de ativação para BtP em pH 7 é de 1,8 kJ mol⁻¹ mostrando que a sensibilidade da reação de fotodegradação em relação à temperatura é menor nesse pH quando comparada ao pH 5, o mesmo comportamento é observado para Bn cujas constantes cinéticas não apresentaram diferença significativa nas diversas temperaturas estudadas em pH 5.

Tabela 9. Energias de ativação (kJ mol⁻¹) e fatores pré-exponenciais de Arrhenius calculados a partir da equação de Arrhenius para os processos de degradação fotoquímica e térmica de Bn e BtP em pH 5 e 7

Composto	Via de degradação	E_a (kJ mol ⁻¹)		A	
		pH 5 ^a	pH 7 ^b	pH 5 ^a	pH 7 ^b
Betanina	Laser	9,4	-	11,7	-
	Escuro	91	94	3,7 x 10 ¹³	1,2 x 10 ¹²
Indicaxantina	Laser	8,7	1,8	10,6	0,6
	Escuro	111,5	110,6	2,2 x 10 ¹⁵	6,0 x 10 ¹²

^a Tampão acetato 100 mmol L⁻¹, ^b Tampão fosfato 100 mmol L⁻¹

A magnitude das E_a encontradas para os processos de fotodegradação de Bn e BtP é semelhante à E_a encontrada para processos controladas por difusão. Dentre os exemplos de reações rápidas que exibem esse comportamento estão as reações de redução com elétrons hidratados, reações entre radicais, recombinação de íons e extinção de espécies eletronicamente excitadas.¹¹⁴⁻¹¹⁷ De fato, a absorção de radiação visível gera espécies altamente energéticas que incluem os estados eletronicamente excitados (singletes ou tripletes) além de ser capaz de gerar radicais neutros e iônicos derivados dessas espécies, o que corrobora com os baixos valores de

E_a encontrados experimentalmente. Embora os estados excitados tenham tempo de vida curtos, essas espécies sofrem interações físicas e químicas umas com as outras e com uma série de outros reagentes adequados. Essas interações devem ocorrer rapidamente para serem competitivas com processos de relaxamento ao estado fundamental.

As energias de ativação obtidas para o controle escuro em pH 5 e 7 são 91 e 94 kJ mol⁻¹ para Bn, e 111,5 e 110,6 kJ mol⁻¹ para BtP. Os resultados se assemelham àqueles obtidos anteriormente no grupo e apresentam magnitude semelhante às E_a encontradas na literatura para as reações de hidrólise de iminas (40 – 90 kJ mol⁻¹)¹¹⁸, que intrinsecamente não são controladas apenas por difusão. O fator pré-exponencial de Arrhenius (A) é de cerca de 11 para Bn e BtP em pH 5 e de 0,6 para BtP em pH 7. Esse parâmetro descreve a mobilidade molecular e representa a frequência das colisões moleculares que têm orientação e energia adequada para que a reação possa acontecer. Para reações controladas por difusão, os processos intermoleculares ocorrem em cada encontro entre reagentes em solução e, por isso, apresentam frequências de colisão mais baixas.

Muitas reações fotoquímicas são sensíveis a concentração de O₂ dissolvido em solução devido a processos de fotossensibilização.¹¹⁹ Betanina e indicaxantina ao serem excitadas não populam o estado triplete excitado e, portanto, sua fotoexcitação não produz oxigênio singlete.^{83,110,120,121} Entretanto, reações de transferência de elétrons podem gerar espécies radiculares capazes de reagir com o O₂ presente durante a fotodegradação de betalainas gerando espécies reativas de oxigênio. O efeito da concentração de oxigênio nas cinéticas de fotodegradação de Bn e BtP foi investigado em tampão acetato 100 mmol L⁻¹, pH 5 a 30 °C (Figura 26 e 27). Soluções contendo o tampão escolhido foram adicionadas à cubetas de quartzo contendo um septo e através de agulhas borbulhou-se O₂ ou N₂ por 15 min. Em seguida, Bn ou BtP foram adicionadas e a fotodegradação iniciada. A Tabela 10 apresenta os valores de k_{obs} para o processo nessas duas condições além das constantes cinéticas obtidas nos controles, onde

as soluções tampão não passaram por nenhum tipo de tratamento prévio com O₂ ou N₂.

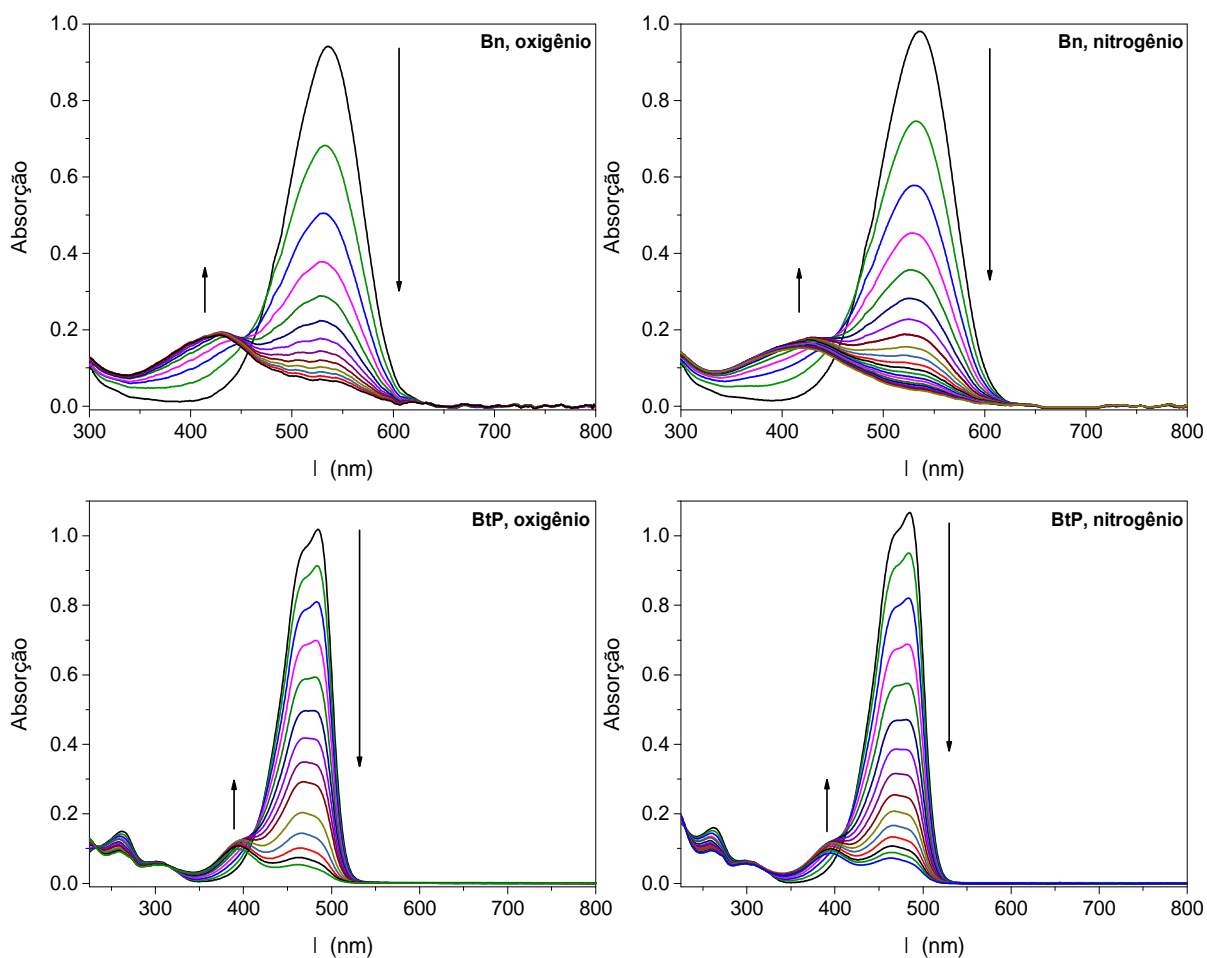


Figura 26. Cinéticas de degradação fotoquímica obtidas para Bn e BtP a 30 °C. As amostras foram solubilizadas em tampão acetato 100 mmol L⁻¹, pH 5 que foi submetido à borbulhamento com gás O₂ ou N₂ por 15 min. Condições de excitação: 532 nm para Bn e 480 nm para BtP.

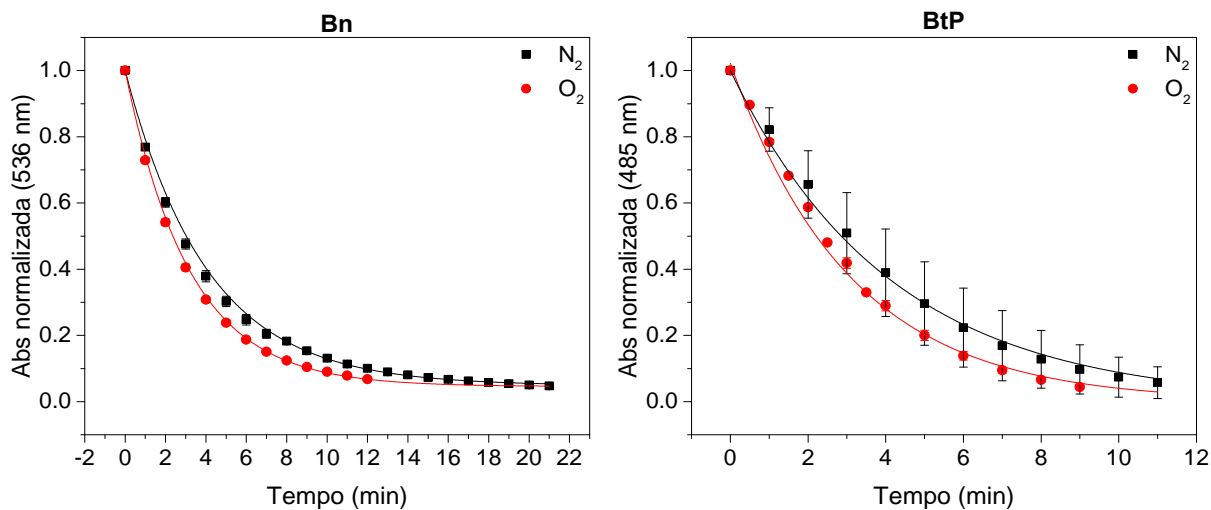


Figura 27. Cinética de decaimento da absorção de Bn ($\lambda^{Abs} = 536$ nm) e BtP ($\lambda^{Abs} = 485$ nm). As amostras foram solubilizadas em tampão acetato 100 mmol L^{-1} , pH 5 que foi submetido à borbulhamento com gás O_2 ou N_2 por 15 min.

Tabela 10. Valores de constantes cinéticas observadas obtidos a partir decaimentos de Bn e BtP irradiadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ em 532 e 480 nm, respectivamente. Os experimentos foram realizados em soluções de tampão acetato 100 mmol L^{-1} sem nenhum tipo de tratamento (controle), borbulhadas com N_2 ou com O_2 .

Composto	Condição	$k_{obs} (\text{min}^{-1})$
Betanina	Controle	$0,26 \pm 0,03$
	N_2	$0,26 \pm 0,01$
	O_2	$0,33 \pm 0,01$
Indicaxantina	Controle	$0,25 \pm 0,03$
	N_2	$0,23 \pm 0,08$
	O_2	$0,26 \pm 0,01$

Para Bn, percebeu-se um aumento de cerca de $1,3\times$ em k_{obs} com o aumento da concentração de O_2 , enquanto a amostra submetida a borbulhamento com N_2 apresentou k_{obs} semelhante ao controle. Para BtP há uma diminuição na constante média obtida a partir do borbulhamento com N_2 . Entretanto, não há diferença estatística entre os valores de k_{obs} obtidos nas três condições do estudo. Ainda que as cinéticas tenham sido realizadas em triplicata existe uma limitação intrínseca da metodologia que não permite que a concentração de O_2 ou N_2 seja minuciosamente controlada e, portanto, os resultados devem ser elaborados de forma cautelosa. Os decaimentos obtidos para Bn e BtP mostram que a presença de O_2 é capaz de aumentar as constantes de velocidade na qual a degradação fotoquímica ocorre para esses dois compostos. Para Bn, esse aumento em k_{obs} é mais evidente e, de fato, há uma diferença estatística entre as constantes observadas no controle e na presença de O_2 , o que não foi observado para BtP. A oxidação de Bn na porção catecol em $2e^-$ leva a formação de uma semiquinona que pode sofrer

rearranjo levando a descarboxilação do composto. A auto-oxidação da porção catecol é favorecida em meio oxigenado e alcalino onde oxigênio molecular é capaz de oxidar o catecol gerando radical superóxido. Ainda, a incidência de laser permite que Bn vá para o estado excitado, onde o elétron se encontra em um nível energético mais elevado o que possibilita que a transferência de elétrons seja favorecida, o que possibilita a oxidação do catecol. A ausência da porção catecol na estrutura química da BtP pode refletir em uma menor sensibilidade dessa betalaína frente a concentração de oxigênio no meio, o que condiz com os resultados obtidos para as constantes observadas.

1-3.5.1 Caracterização dos produtos de fotodegradação por espectrometria de massas

A caracterização dos produtos de fotodegradação de Bn e BtP foi realizada com intuito de investigar as possíveis vias de decomposição induzida por luz dessas duas betalaínas-modelo. Soluções aquosas contendo Bn ou BtP em concentrações próximas à $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ foram submetidas à irradiação com laser. Em seguida, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas (LCMS-ESI(+)). Os produtos de degradação fotoquímica foram comparados com aqueles obtidos na degradação térmica das betalaínas e o perfil cromatográfico para essas análises, bem como para o controle, encontra-se na Figura 28. Percebe-se que o cromatograma obtido para a corrida sem a injeção de amostra, denominada como branco, apresenta um pico em 25 min referente a impurezas da coluna, esse pico também é encontrado para as amostras de Bn e BtP degradadas por via fotoquímica que foram analisadas no mesmo dia. As amostras de Bn e BtP degradadas por via térmica foram analisadas em dias distintos e a impureza da coluna não foi observada nessas análises. De fato, os produtos de degradação térmica de BtP encontram-se, principalmente, na região entre 20 e 25 min.

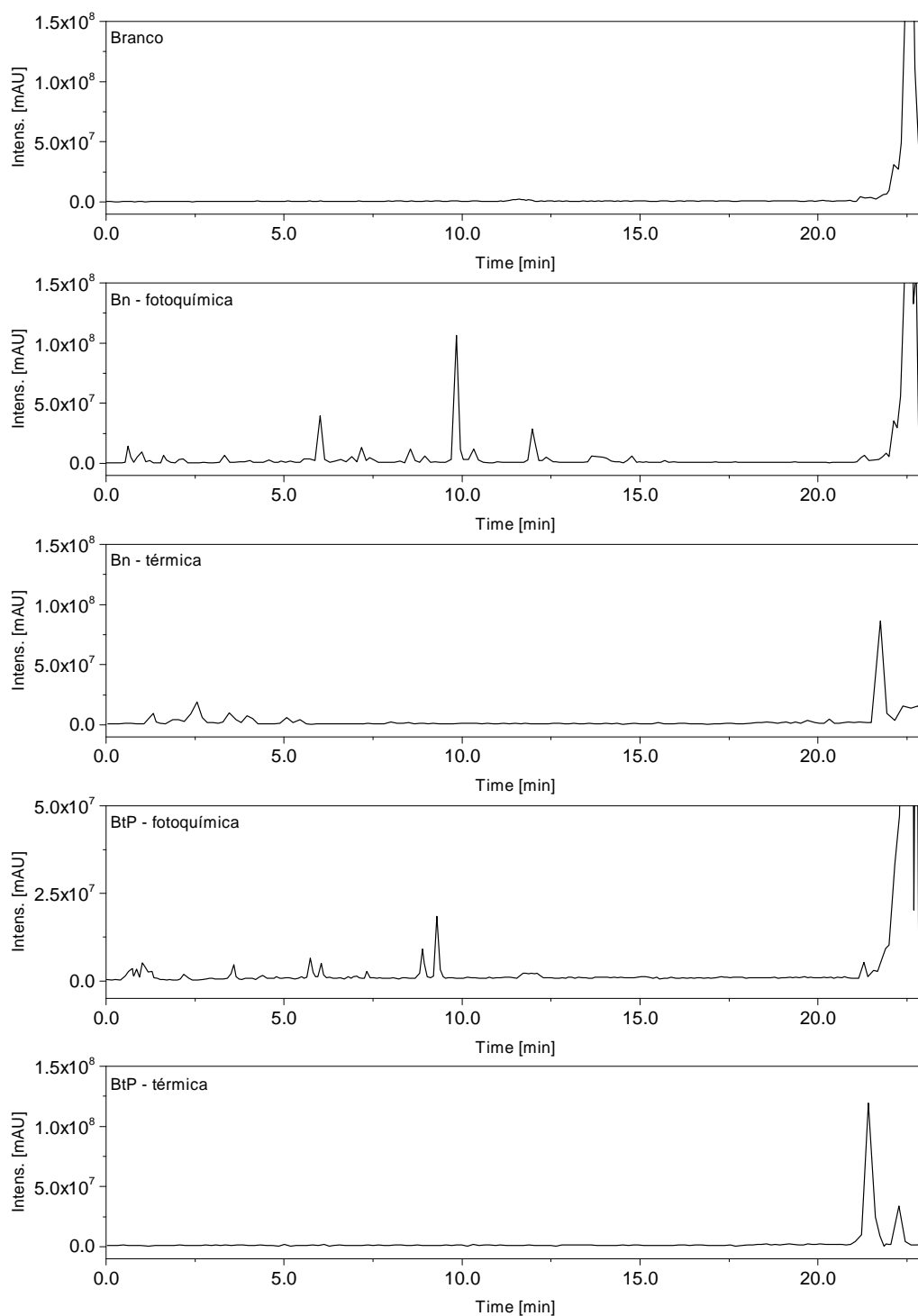


Figura 28. Perfil cromatográfico obtido para Bn e BtP degradadas por via térmica ou por irradiação luminosa e o controle (branco) obtido sem injeção de amostra para fins comparativos. A corrida com o solvente (branco) mostra a presença de sinais com $t_R > 20$ min que são observados em todas as análises dos produtos de fotodecomposição. Nas análises dos produtos de decomposição térmica não se observam essas impurezas.

A análise de massas da amostra de Bn degradada por irradiação é apresentada nas Figuras 29 e 30 e contém propostas para as estruturas químicas dos íons moleculares e fragmentos de acordo com as m/z obtidas. A fragmentação utilizando ion-trap em várias etapas, possibilitou a obtenção dos íons moleculares para os fragmentos dos produtos identificados. Para a maioria dos casos foi encontrado um mesmo padrão de fragmentação onde os fragmentos MS^2 correspondem ao íon protonado $[M_p - 162,05]^+$. Essa perda de 162,05 Da corresponde à perda da glicose presente nos fragmentos de origem como mostrado detalhadamente na Figura 28. Dessa forma, a Figura 30 contendo produtos de fotodegradação de Bn apresenta apenas a m/z obtida na fragmentação MS^2 que corresponde ao padrão já mostrado nas estruturas químicas da Figura anterior.

Observam-se fundamentalmente reações de oxidação e descarboxilação que podem ou não estar associadas. Quando ocorre oxidação de $2e^-$ e a perda de $2H^+$ no anel piperídínico observa-se a formação de piridinas conhecidas como neobetalaínas. Esse processo pode estar associado a descarboxilação e tanto as neobetalaínas dipicolínicas quanto as picolínicas foram observadas, embora nossos dados não permitam inferir inequivocamente qual grupo carboxílico foi eliminado. A mesma coisa pode acontecer na porção ciclo-DOPA. A oxidação leva à formação de um indol e esse processo pode ou não estar associada a descarboxilação. A diferença no caso da ciclo-DOPA é a presença de um grupo catecol que pode ser oxidado à semiquinona (processo de $1e^-$) ou quinona (processo de $2e^-$) criando centros eletrofílicos na porção pirrolidínica do anel (Esquema 9). Quando isso ocorre, pode-se inferir que o ataque da água leve a hidroxilação. Contudo, considerando a importância do oxigênio no processo e a necessidade de processos redox que envolvem espécies radicalares, não é possível descartar a formação de radicais hidroxila no sistema. Nos processos envolvendo a oxidação tanto da porção norte quanto sul da betanina, a força motriz é a aromatização do sistema.¹²²

Diversos derivados de neobetanina (neoBn, m/z 549) foram identificados como produtos

de fotodecomposição nas análises, entretanto o íon molecular de origem não foi detectado. Para Bn a desidrogenação é resultado da oxidação da porção fenólica livre que dá origem ao radical semiquinona, o qual é posteriormente oxidado a quinona, e sofre a descarboxilação em C-2 cujo rearranjo resulta em descarboxilação oxidativa (m/z 505). A consecutiva descarboxilação em C-17 leva a formação do Bn bidescarboxilada (m/z 461) e ainda que a descarboxilação tripla seja possível, não foram identificados íons moleculares com essas modificações. Ciclo-DOPA-5-*O*- β -D-glicosilada ($[M+H]^+$, m/z 358) e seu derivados descarboxilados e hidratados também foram identificados, o que sugere a hidrólise da imina como possível via de degradação, porém, ácido betalâmico (m/z 212), o aldeído precursor das betalaínas, não foi identificado. A fotodegradação de Bn, magenta, leva a formação de produtos amarelos que absorvem luz na região de 350 – 450 nm. A formação de derivados de neobetanina e produtos descarboxilados concorda com o aparecimento das bandas de absorção na região observadas nos experimentos cinéticos, já que a diminuição da deslocalização dos elétrons π leva a um deslocamento hipsocrômico no espectro de absorção.

A degradação térmica de Bn realizada no escuro ocorre, majoritariamente, pelas vias de hidrólise e descarboxilação não oxidativa o que difere dos produtos obtidos para o processo fotoinduzido onde as vias oxidativas se destacam. Além disso, a elucidação de produtos hidroxilados nas posições C-2 e/ou C-3 para a fotodegradação de Bn concorda com a proposta de possíveis mecanismos envolvendo a perda de elétrons e prótons.

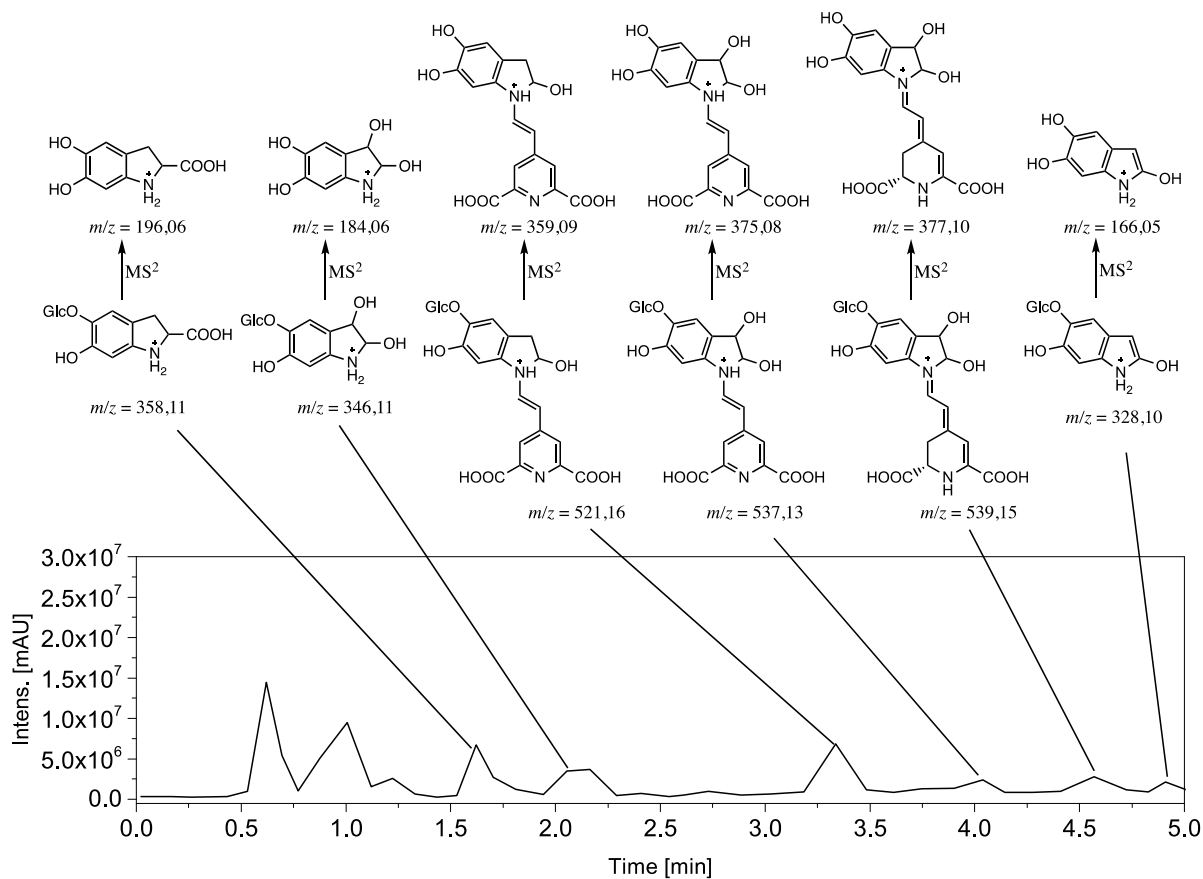


Figura 29. Perfil cromatográfico da amostra de Bn irradiada ($\lambda = 532$ nm) no intervalo de 0 - 5 min de análise e caracterização dos produtos de fotodegradação por espectrometria de massas.

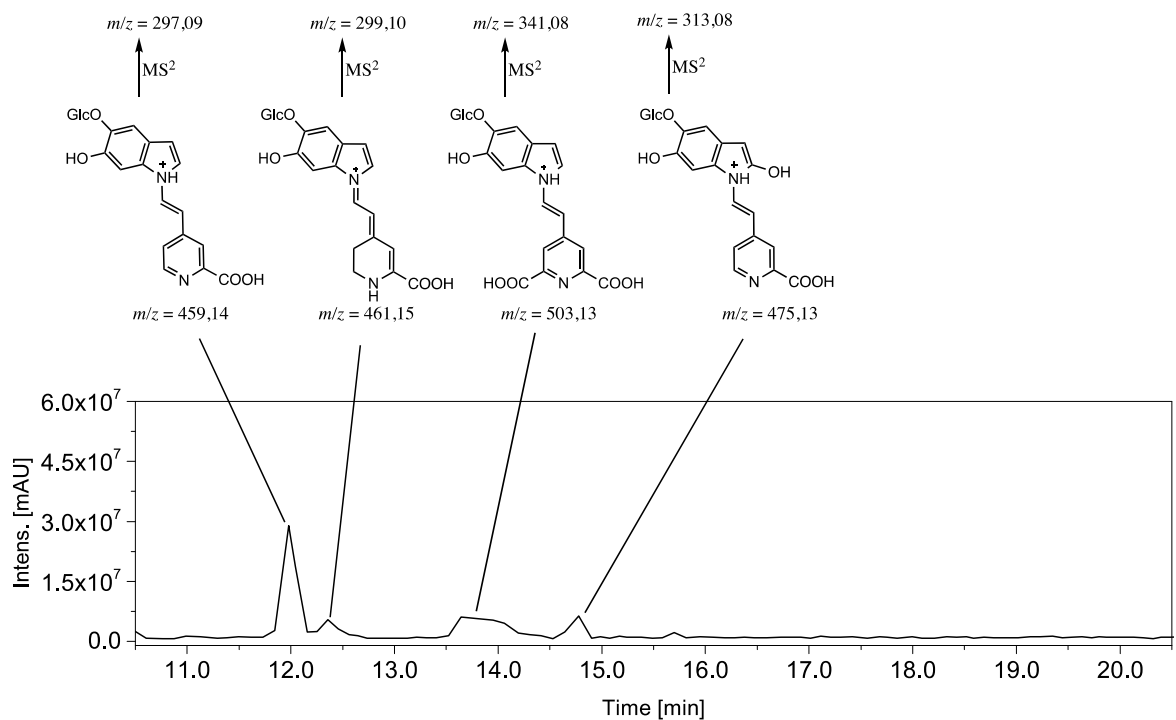
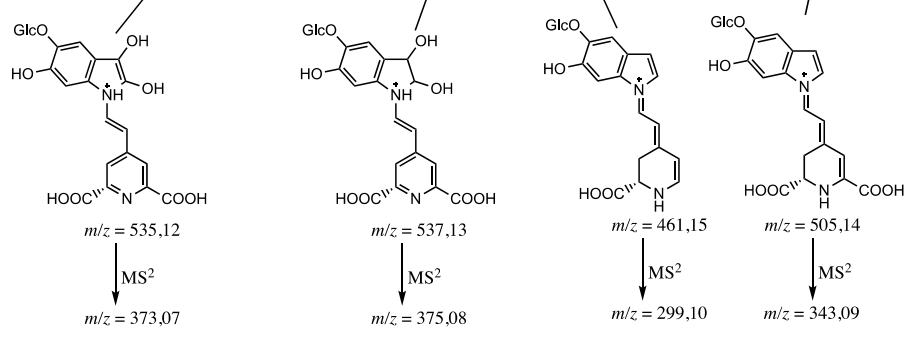
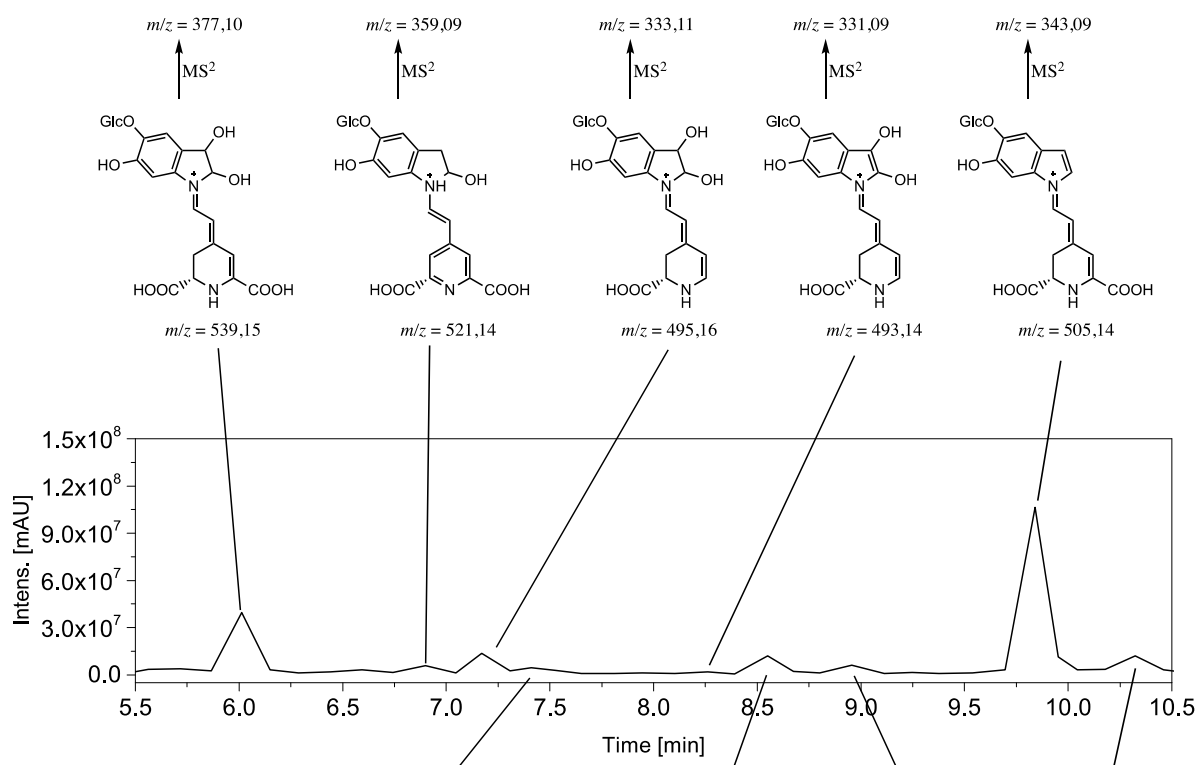


Figura 30. Perfil cromatográfico da amostra de Bn irradiada ($\lambda = 532$ nm) no intervalo de 5,5 a 10 min e entre 10,5 e 20,5 min de análise e caracterização dos produtos de fotodegradação por espectrometria de massas.

Os produtos da fotodegradação de BtP se assemelham àqueles propostos para Bn e encontram-se elucidados na Figura 31. A ausência do grupo catecol glicosilado diminuiu a variedade de possíveis produtos e, assim os padrões de fragmentação dos produtos (MS^2) diferem daquele obtido para Bn sendo o processo de descarboxilação predominante na fragmentação dos produtos resultando em íons moleculares protonados com perda de fragmento com m/z 44. Assim como para Bn, derivados descarboxilados e hidratados foram identificados para a estrutura duplamente desidrogenada (neindicaxantina) apesar do íon molecular de origem (m/z 307) não ter sido encontrado. Em particular, não se observam produtos com duas hidroxilas na pirrolidina, sugerindo que a hidroxilação na posição C-3 é iônica e assistida pela conjugação ao grupo CO da quinona, visto que produtos contendo uma porção pirrolina (2,3-di-hidro-1*H*-pirrol) são formados.

A degradação térmica realizada no escuro de BtP mostra a via de hidrólise e descarboxilação não oxidativa são as vias de degradação majoritária já que os principais produtos gerados são: ácido betalâmico, L-prolina e o derivado monodescarboxilado. A análise de espectrometria de massas dos produtos não permite diferenciar isômeros diretamente¹²³ porém é possível propor estruturas químicas a partir das análises de fragmentação. Além disso, a espectrometria de massas pode ser usada como ferramenta para elucidação dos mecanismos envolvidos na degradação fotoinduzida das betalaínas estudadas. A comparação entre os produtos das degradações fotoquímica e térmica mostra que para esta última a via de hidrólise e descarboxilação oxidativa é predominante.

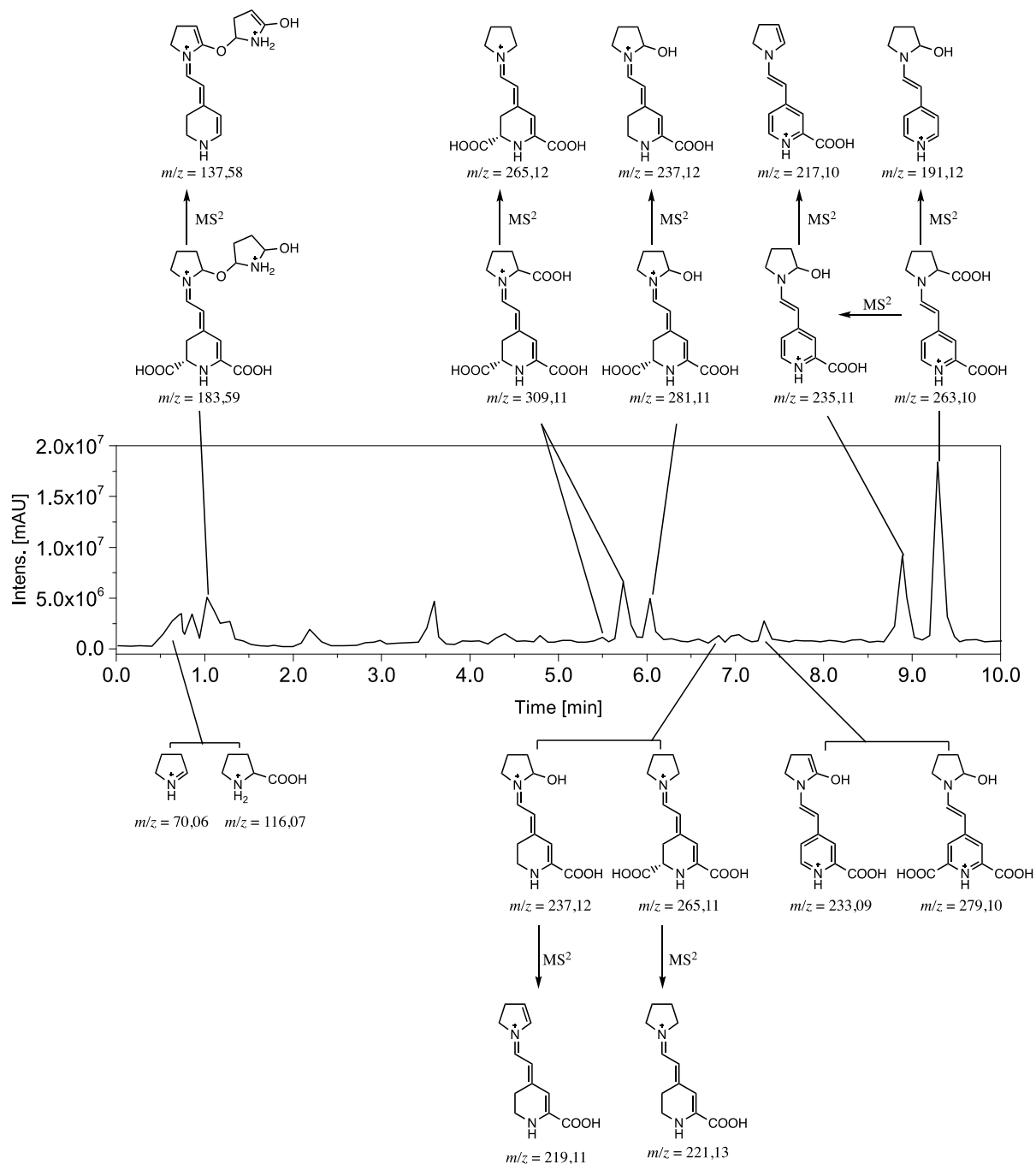
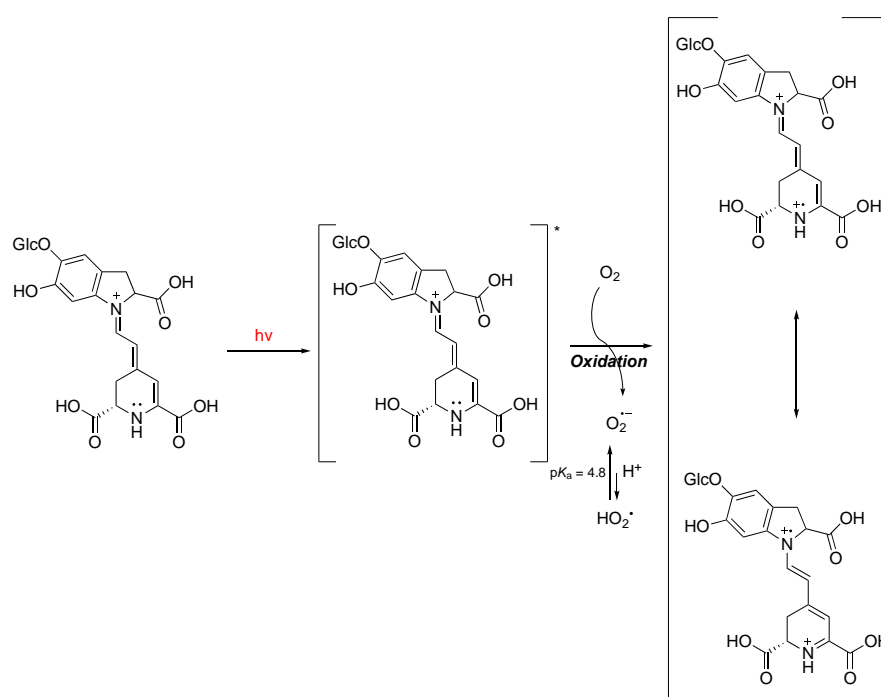


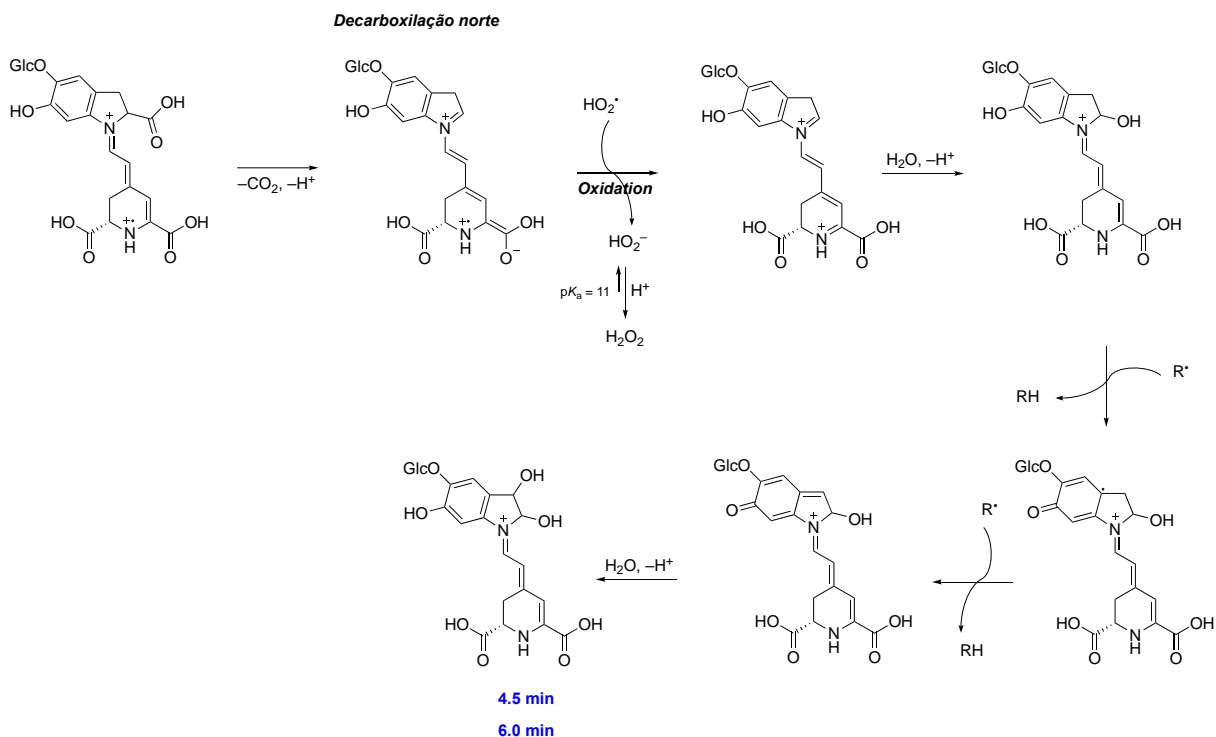
Figura 31. Perfil cromatográfico da amostra de BtP irradiada ($\lambda = 480$ nm) no intervalo de 0 – 10.5 min de análise e caracterização dos produtos de fotodegradação por espectrometria de massas.

A análise dos produtos de fotodegradação mostra maior prevalectimento dos derivados betalaínicos e neobetalaínicos oxidados e descarboxilados e os produtos elucubrados para degradação fotoinduzida de Bn e BtP sugerem que o processo ocorre através de vias oxidativas,

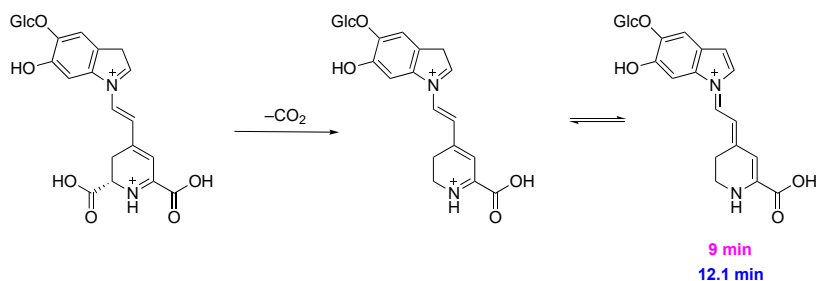
que podem envolver a formação de radicais livres e que se alinham aos valores de energia de ativação calculados para os processos de fotodegradação. Os Esquemas abaixo ilustram as possíveis vias para formação dos produtos cujas estruturas foram elucidadas na espectrometria de massas e cujo possível mecanismo e explicação foi comentado anteriormente. Bn foi utilizada como exemplo e a participação do oxigênio no processo foi considerada. Reações similares às apresentadas aqui podem ser consideradas para neoBn resultando assim nos derivados neobetalaínicos já mencionados.



Esquema 8 Irradiação de uma molécula de Bn que vai para o estado excitado (Bn^*) e em seguida é oxidada ao seu derivado cátion radical, cujas estruturas de ressonância estão apresentadas.



Esquema 9 Descarboxilação norte de Bn seguida de hidroxilação na posição C-2. Os processos oxidativos envolvendo o catecol podem resultar na dupla hidroxilação.



Esquema 10 Descarboxilação sul de Bn levando ao derivado di-decarboxilado.

1-3.6. Influência de antioxidantes

Antioxidantes possuem a capacidade de desativação de radicais livres e são candidatos possíveis para prevenção ou retardo do processo de fotodegradação das betalaínas, caso esse processo envolva a formação de espécies oxidantes ou radicalares. Essa hipótese foi testada acompanhando a cinética de fotodegradação das betalaínas na presença de ácido ascórbico (AscH), trolox ou EDTA. A contribuição relativa das duas variáveis independentes (luz e

temperatura) sobre a degradação de Bn e BtP foi determinada monitorando-se a cinética de decomposição ligando e desligando a irradiação com laser durante o processo. Nestes experimentos, foram adquiridos espectros de absorção das soluções das betalaínas a 30 °C na presença (10 ou 100 equiv) ou na ausência (controle) dos compostos antioxidantes (Anexo 9 e Anexo 10). A reação foi inicialmente monitorada por 6 min em intervalos de 1 min e em seguida foi iniciada a irradiação com laser que teve duração de 1 min; 532 nm para Bn ou 480 nm para BtP. Esse ciclo foi repetido três vezes e as cinéticas de decaimento são apresentadas na Figura 32.

Observa-se que a 30 °C a irradiação ($t = 7, 13$ e 19 min) provoca uma queda pronunciada da concentração de betalaína em solução. A magnitude desse efeito acompanha a concentração de betalaína, i.e., a variação na absorção após irradiação é maior quando a concentração de betalaína é mais alta. Embora os períodos de irradiação sejam muito mais curtos do que os períodos de escuro, a decomposição das betalaínas foi muito mais rápida comparada ao experimento feito totalmente no escuro. Os estudos realizados com AscH e trolox mostram que a fotodegradação de Bn e BtP na presença desses compostos é retardada, e maiores quantidades de betalaínas são preservadas. A magnitude desse efeito é proporcional à concentração de antioxidante, sendo 100 equiv (linha azul) capaz de proteger Bn e BtP do processo de fotodegradação em maior extensão do que 10 equiv (linha vermelha). De fato, experimentos controle de irradiação ininterrupta de Bn na presença de AscH mostraram uma diminuição nas constantes de velocidade de reação em função da concentração (Tabela 19, Anexo 11). O mesmo efeito não foi observado para EDTA, que para as duas concentrações estudadas apresentou um perfil de degradação semelhante ao controle (linha preta).

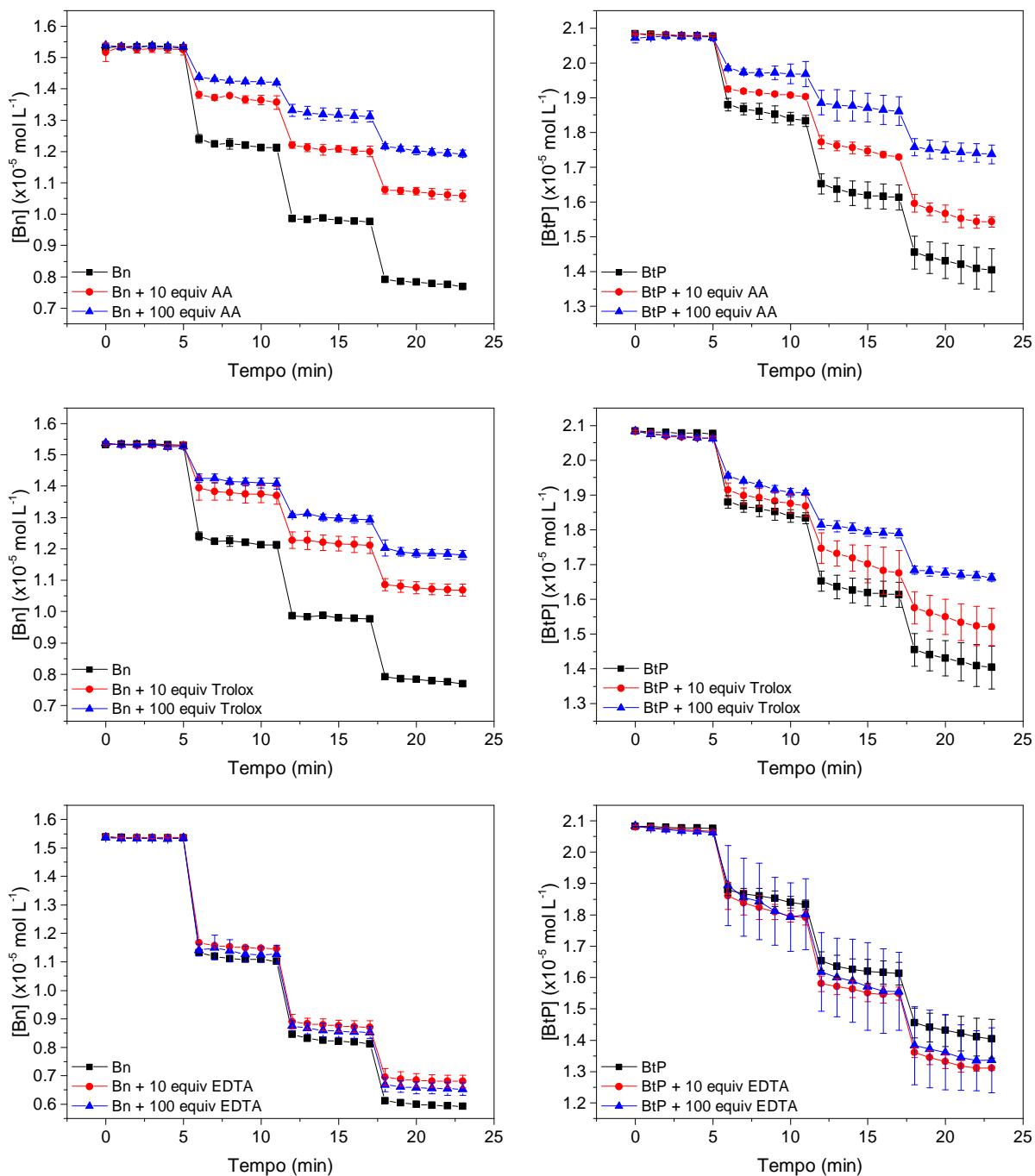


Figura 32. Cinética de decaimento da absorção de Bn ($\lambda = 536 \text{ nm}$) e BtP ($\lambda = 485 \text{ nm}$) para os experimentos de alternância de temperatura e irradiação de luz realizados na ausência ou presença (10 ou 100 equiv) de antioxidantes. Foram utilizados ácido ascórbico, Trolox e EDTA e Bn e BtP foram mantidas no escuro por 5 min e em seguida irradiadas em 532 ou 480 nm, respectivamente, por 1 min. Esse ciclo foi repetido três vezes e a temperatura foi mantida a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por todo o processo.

As concentrações iniciais e finais das betalainas foram utilizadas para cálculo da taxa

de degradação de cada experimento (Figura 33). Nos estudos feitos com AscH e Trolox, a taxa de fotodegradação de Bn foi diminuída em cerca de 20% na presença de 10 equiv dos compostos e em cerca de 28% na presença de 100 equiv, para ambos os antioxidantes. Enquanto as amostras irradiadas na presença de EDTA se mantiveram iguais ao controle independente da concentração. Na presença de 10 equiv de AscH ou Trolox, a taxa de fotodegradação de BtP foi diminuída em cerca de 6% enquanto na presença de 100 equiv a taxa de fotodegradação diminuiu em cerca de 16% para AscH e em cerca de 12% para Trolox. Os experimentos realizados com EDTA mostraram taxa de degradação igual ao controle, independente da concentração de antioxidante utilizada. Os resultados mostram que AscH e Trolox retardam a fotodegradação de ambas as betalaínas estudadas, mas em maior extensão para Bn do que para BtP. Contudo, o efeito da concentração dos antioxidantes é mais pronunciado para BtP do que para Bn.

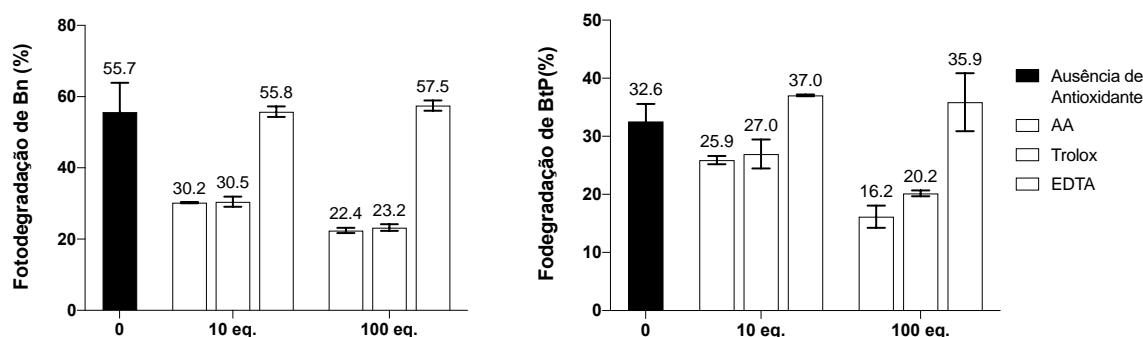
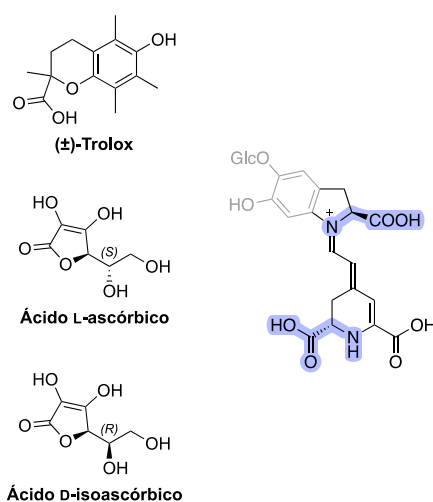


Figura 33. Porcentagem de betalaína degradada após processo de fotodegradação. Os experimentos foram realizados na ausência de antioxidantes ou presença de 10 ou 100 equiv de ácido ascórbico, Trolox e EDTA para Bn (A) ou BtP (B). Menores porcentagens demonstram maior proteção contra fotodegradação.

A desativação de radicais livres por antioxidantes de quebra de cadeia pode ocorrer por meio de transferência de elétrons únicos (SET, single electron transfer) ou transferência de elétron acoplada a próton (PCET, proton-coupled electron transfer).¹²⁴ Ácido ascórbico e

Trolox podem agir tanto como doadores de elétrons como de átomo de hidrogênio e as diferenças encontradas para a capacidade antioxidante desses compostos empregando o branqueamento de ABTS^{•+} não deve ser considerada como uma medida absoluta de potencial antioxidante.¹²⁵ Os dados da literatura sobre a estabilização de betanina por ácido isoascórbico indicam que esse antioxidante é mais eficiente que o ácido ascórbico, seu diastereômero cuja única diferença estrutural é a configuração do carbono assimétrico exocíclico.¹⁰⁷ Esse dado sugere, portanto, que a interação entre o antioxidante e a betanina deve importar para evitar a sua decomposição. Embora não seja claro como a interação entre betanina e esses antioxidantes ocorra, um fato importante é que estamos sempre tratando de compostos quirais e, embora Trolox seja comercializado como mistura racêmica, a formação de complexos moleculares desses antioxidantes com as betalainas pode ser fundamental para a atividade antioxidante. Para resolver essa questão, considerando-se os potenciais de redução em um elétron extrapolados para pH 7 do ácido ascórbico (300 mV vs. SHE) comparado aos 480 mV vs SHE para o Trolox, a vitamina C tenderia a ser oxidada mais espontaneamente pelas betalainas.¹²⁶



Esquema 11. Estrutura genérica da betanina e indicaxantina ressaltando seus centros assimétricos, do Trolox, comercializado como uma mistura racêmica, e dos diastereoisômeros ácido ascórbico e ácido isoascórbico.

Como controle, utilizou-se EDTA, um conhecido redutor de sacrifício capaz de agir como doador de elétrons para espécies eletronicamente excitadas e que poderia reduzir betalaínas oxidadas.¹²⁷ A não efetividade desse composto em retardar a degradação desses compostos sugere que EDTA não consegue reduzir intermediários originados pela oxidação da betanina em $1e^-$ e que os processos de oxidação são quimicamente irreversíveis. De fato, a hipótese apresentada para os mecanismos de formação dos produtos oxidados envolve a transferência de ambas as espécies e concorda com os resultados obtidos na presença de antioxidantes.

1-3.6.1 Alternância entre períodos de claro e escuro

Os experimentos realizados ligando e desligando o laser (Figura 32) também mostraram que após a primeira irradiação, a degradação no escuro era acelerada quando comparada a degradação no escuro anterior à irradiação. O efeito não tem a mesma magnitude dos experimentos realizados com irradiação ininterrupta, mas sugere que a fotodegradação gera espécies reativas que promovem a degradação de betalaínas. Para entender melhor esse fenômeno, Bn foi irradiada em 532 nm por 1, 2 ou 3 min a 30 °C e, após a irradiação, a cinética de decomposição foi monitorada por 60 min no escuro. Os experimentos foram realizados para amostras de Bn na presença e ausência de 10 equiv de ácido ascórbico em tampão acetato pH 5 e em tampão fosfato pH 7. A Figura 34 mostra as cinéticas de decaimentos obtidos a partir do máximo de absorção da Bn ($\lambda^{Abs} = 536$ nm) em função do tempo. Para os dois pHs estudados percebe-se uma diminuição na absorção máxima de Bn em função do tempo quando comparados ao controle que não foi submetido a irradiação (preto). Essa diminuição é proporcional ao tempo de irradiação e ocorre em maior extensão para as amostras irradiadas por 3 min (magenta) do que para as amostras irradiadas por 1 min (vermelho). Ainda, a degradação observada após irradiação ocorre em maior extensão em pH 5 do que em pH 7. Na

presença de 10 equiv de AscH o tempo de irradiação torna-se irrelevante e os decaimentos são estatisticamente iguais para amostras irradiadas por 1, 2 ou 3 min. Esse comportamento é observado nos dois pHs estudados.

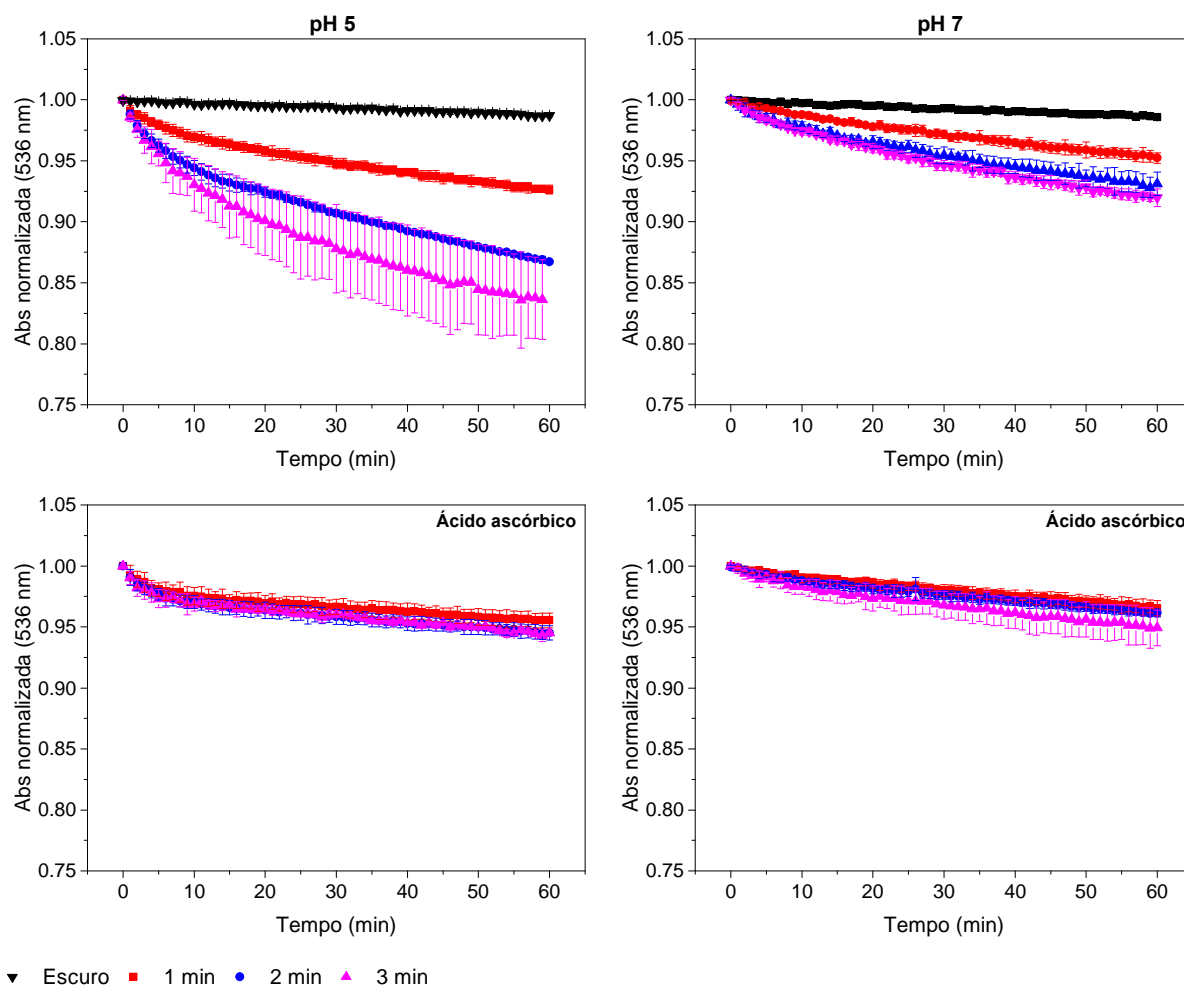


Figura 34. Cinética de decaimento da absorção de amostras de Bn após 1, 2 ou 3 min de irradiação ($\lambda = 532$ nm). Os espectros de absorção foram adquiridos a cada 1 min por 60 min mantendo a temperatura a 30 °C e sem agitação da solução na cubeta.

Diferentemente do aplicado as cinéticas de degradação fotoinduzida ou no escuro, um modelo monoexponencial não se ajustou aos dados experimentais e as constantes cinéticas observadas (k_{obs}) foram calculadas através do ajuste não-linear com uma função biexponencial (Eq. 3):

$$Abs = Abs_0 + A_1 e^{-k_{obs1}t} + A_2 e^{-k_{obs2}t} \quad \text{Eq. 3}$$

onde Abs_0 é o coeficiente linear, A_1 é o termo pré-exponencial e t é o tempo.

Uma função biexponencial lida com dois processos de primeira ordem ocorrendo em paralelo ou em sequência. A constante mais alta se refere ao processo mais rápido e a mais baixa ao mais lento e a caracterização desses eventos requer um estudo mecanístico aprofundado. Não se percebe uma tendência nos valores de k_{obs} obtidos em função do tempo de irradiação para ambos os pHs e o acompanhamento cinético por apenas 1 h foi menor que duas meias-vidas de Bn, fazendo com que haja maior incerteza no ajuste. Os valores das constantes cinéticas obtidas encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Constantes cinéticas observadas (k_{obs1} e k_{obs2}) obtidas a partir do ajuste da variação da absorção de Bn submetida a irradiação com laser em 532 nm por 1, 2 ou 3 min a 30 °C em função do tempo.

Tempo de irradiação	k_{obs} (min ⁻¹)	k_{obs} (min ⁻¹)	
		pH 5 ^a	pH 7 ^b
1 min	k_{obs1}	0,30 ± 0,08	0,19 ± 0,10
	k_{obs2}	0,013 ± 0,002	0,007 ± 0,005
2 min	k_{obs1}	0,25 ± 0,05	0,47 ± 0,27
	k_{obs2}	0,008 ± 0,006	0,012 ± 0,003
3 min	k_{obs1}	0,27 ± 0,08	0,35 ± 0,12
	k_{obs2}	0,020 ± 0,012	0,014 ± 0,003

^a Tampão acetato 100 mmol L⁻¹, ^b Tampão fosfato 100 mmol L⁻¹

Ácido ascórbico e seus sais, têm sido amplamente utilizados como aditivos na indústria alimentícia pois são capazes de atuar na preservação da coloração dos alimentos e estender seu tempo de prateleira. De acordo com o relatório internacional sobre aditivos alimentares da OMS, ácidos de graus alimentício como, ácido ascórbico, láctico e cítrico, são adicionados ao aditivo Beetroot Red (E162), composto majoritariamente por Bn, como agentes controladores

de pH e estabilizantes. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo exato de ação desses compostos na estabilização dos pigmentos. Nossos resultados mostram que os processos de fotodegradação de Bn e BtP ocorrem por vias oxidativas rápidas e que alguns antioxidantes são capazes de retardar esses processos. Considerando que para os antioxidantes usados (EDTA, Trolox e AscH), os requerimentos termodinâmicos para evitar processos de degradação fotoinduzida são atendidos (potenciais redox tornam a redução de Bn e seus derivados que são oxidantes fracos espontânea). Assim, a ausência de efeito em alguns casos, como por exemplo EDTA, pode estar relacionada a fatores cinéticos.

Considerando as diversas variáveis envolvidas na proteção das betalainas ao dano fotoinduzido, testamos o efeito da encapsulação em lipossomas sobre a fotodecomposição de Bn. Foram preparadas cSUVs de DMPC (3 mg mL^{-1}) contendo Bn ($50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) em seu interior e no meio externo em tampão acetato pH 5. As amostras passaram por um processo de extrusão utilizando uma membrana de $100 \text{ } \mu\text{m}$ ($21\times$, $T = 30 \text{ } ^\circ\text{C}$) conforme protocolo descrito no Capítulo 1 e irradiadas em seguida. A Figura 35 apresenta a cinética de absorção e de decaimento obtida para a fotodegradação de Bn encapsulada em vesículas de DMPC.

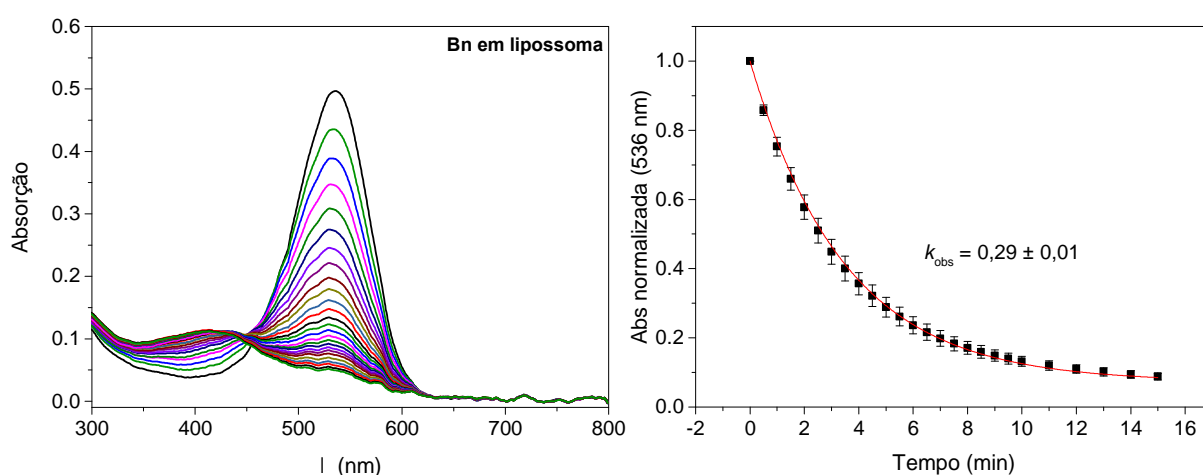


Figura 35. Cinética de absorção e de decaimento ($\lambda = 536 \text{ nm}$) de Bn encapsulada em lipossomas a $30 \text{ } ^\circ\text{C}$. A amostra foi preparada a partir da hidratação de filmes de DMPC (3 mg mL^{-1}) com soluções de Bn

(50 mmol L⁻¹) em tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 5 e foram extrusadas por uma membrana de 100 µm antes de serem submetidas a irradiação ($\lambda = 532$ nm)

A constante de velocidade de fotodegradação nessas condições foi obtida através do ajuste de uma função monoexponencial aos dados apresenta um valor de $0,29 \pm 0,01$ min⁻¹. Ao compararmos com a constante de velocidade obtida para Bn em solução nas mesmas condições de pH e temperatura ($k_{obs} = 0,26 \pm 0,03$ min⁻¹) e com o valor do controle em pH 5 na ausência de irradiação ($1,2 \cdot 10^{-4}$ min⁻¹) percebe-se que a encapsulação de Bn em lipossomas em DMPC não influencia no processo de fotodegradação. De fato, a solução de estudo contém Bn dentro das vesículas e em solução (fora das vesículas) e a constante cinética observada é resultado da degradação que ocorre em ambos os ambientes. Entretanto, o confinamento de moléculas de Bn dentro dos lipossomas não parece modificar a estabilidade da betalaína frente à luz.

1-3.7. Mecanismos de fotodegradação

As constantes de velocidade para processos fotoinduzidos dependem de vários fatores químicos e ambientais, incluindo as propriedades de absorção de luz e intensidade da irradiação. Alterações na configuração do sistema, como por exemplo diferentes fontes de luz, potência da fonte e transmitância do frasco reacional podem desempenhar um papel decisivo na determinação da dose de luz entregue às moléculas receptoras.¹²⁸ A variação da energia do pulso do laser foi utilizada para identificação da dependência do número de fótons na degradação fotoinduzida. Entretanto, esse experimento só pôde ser realizado para BtP, visto que sua irradiação foi realizada utilizando um laser Quantel Brilliant acoplado à um oscilador paramétrico óptico (OPO) capaz de modular a energia do pulso e o comprimento de onda de excitação. Nesse sistema era possível realizar excitações em 532 nm, entretanto a conversão realizada pelo OPO tem eficiência de conversão energética de até 40% e, portanto, a potência utilizada nesse sistema é intrinsecamente mais baixa do que a utilizada no sistema de irradiação

de Bn. Sendo assim, não foi possível acompanhar a fotodegradação de Bn usando diferentes energias de pulso.

O comportamento da constante de fotodegradação da BtP em função da energia do pulso do laser foi investigado em duas temperaturas distintas, 30 e 45 °C, e para cada temperatura foram obtidas as cinéticas de decaimento de BtP ($\lambda^{Abs} = 485 \text{ nm}$). A Figura 36 contém a variação decaimentos usados na obtenção desses parâmetros para as duas temperaturas enquanto a Tabela 12 correlaciona as k_{obs} obtidas para cada energia de pulso e potência testada. Os valores de energia de pulso e potências foram medidos com a utilização de um medidor de energia Coherent FieldMax II antes do início dos experimentos.

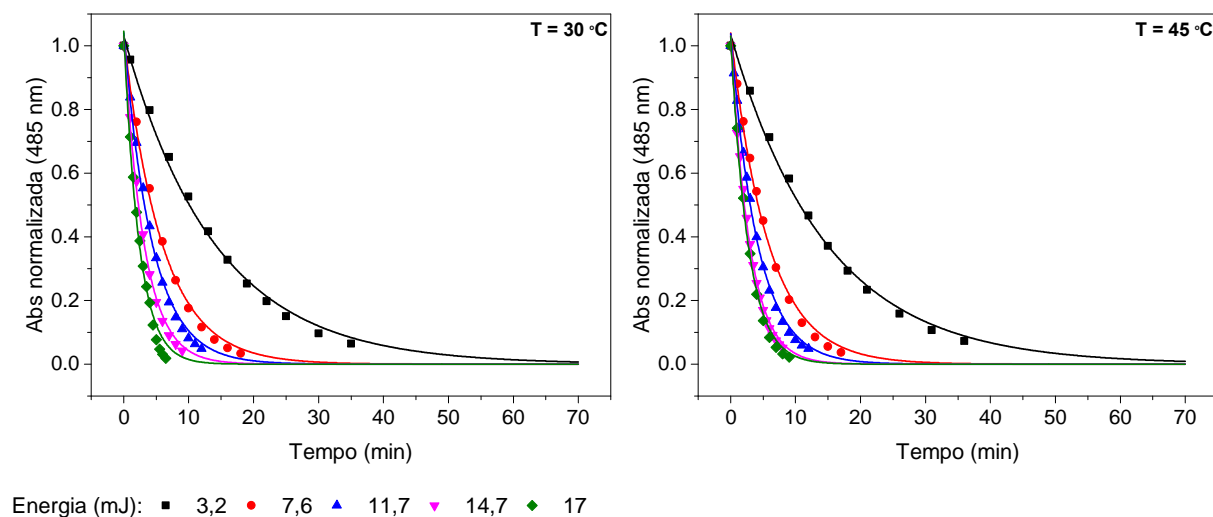


Figura 36. Cinética de decaimento da absorção para degradação fotoquímica de BtP ($\lambda = 480 \text{ nm}$) obtidos com diferentes potências do laser a 30 °C. As linhas contínuas se referem ao ajuste de uma função exponencial aos dados considerando-se o termo $y_0 = 0$.

Tabela 12. Energias de pulso, número de fótons e constantes de velocidade (30 e 45 °C) para fotodegradação de BtP em pH 5

Energia do pulso (mJ)	Potência (mW)	$k_{obs} (\text{min}^{-1})$, T = 30 °C	$k_{obs} (\text{min}^{-1})$, T = 45 °C
3,2	26	0,06	0,06

7,6	74	0,16	0,16
11,7	115	0,21	0,22
14,7	146	0,31	0,31
17	170	0,34	0,35

Conforme mostrado na Figura 37 percebe-se que a variação da temperatura do sistema (em 15 °C) não afeta as constantes observadas para as duas temperaturas, o que ressalta a baixa sensibilidade à temperatura das reações de degradação fotoquímica das betalaínas estudadas. Além disso uma correlação linear positiva é encontrada entre as duas variáveis (k_{obs} e energia) sugerindo que a fotodegradação de BtP tem dependência estequiométrica com a quantidade de fótons.

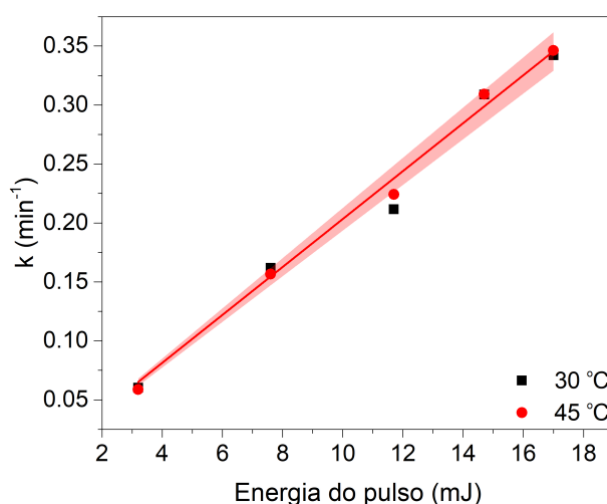


Figura 37. Constante de velocidade observada para fotodegradação da BtP em pH 5 em função da energia do pulso do laser ($\lambda = 480$ nm, 2,5 Hz). Os experimentos foram realizados em tampão acetato 100 mmol L⁻¹, pH 5 e em duas temperaturas distintas, 30 e 45 °C.

Outra forma de se obter informações sobre o mecanismo das reações envolvidas no processo de fotodegradação é a investigação do efeito isotópico cinético (EIC). A fotodegradação de Bn foi acompanhada em água ou óxido de deutério como solventes. A constante cinética de velocidade de fotodegradação para Bn em água (k_{H}) é 0,397 min⁻¹ (valor em pH 7 em tampão fosfato: 0,30 min⁻¹, Tabela 8) enquanto a constante de velocidade para o

mesmo processo em D₂O (k_D) é 0,473 min⁻¹ resultando em um efeito isotópico k_H/k_D reflete a magnitude do efeito isotópico inverso de 0,84.¹²⁹ O fato da reação ser mais rápida em D₂O não pode ser explicado por argumentos típicos de efeito de solvente sobre a relaxação de estados excitados, como o utilizado para explicar o maior tempo de vida de oxigênio singlete em D₂O em comparação com a H₂O, por exemplo.¹³⁰ Contudo, esses efeitos podem ser racionalizados em termos da importância de pré-equilíbrios para o processo em estudo, sejam eles no estado fundamental ou eletronicamente excitado.¹³¹

Efeitos isotópicos de solvente (EIS) normais são o produto de efeitos isotópicos cinéticos do solvente (EICS) e de efeitos isotópicos de equilíbrio do solvente (EIES). Contudo, EIS inverso é quase sempre dominado por EIES com equilíbrios mais deslocados para o produto em D₂O comparado a H₂O. Quando um EIES precede a etapa limitante da reação e descreve o comportamento de um equilíbrio rápido, ele se manifesta no EIS.¹³² Para um processo simples de duas etapas, ou seja, equilíbrio (K_{eq}) seguido da etapa lenta (k), o valor de k_{obs} é determinado por:

$$k_{obs}^{D_2O} = K_{eq}^{D_2O} \times k^{D_2O} \quad \text{Eq. 1}$$

O fator de fracionamento do (H/D)₃O⁺ que é 0,69 e, por isso, o pK_a de grande parte dos ácidos de Brønsted monoproticos é 0,48 unidades mais altas em D₂O do que em H₂O. Assim, em meio neutro, não se espera que a mudança de solvente afete o estado de protonação dos grupos carboxílicos das betalaínas (pK_a ~ 3,5). Outra possibilidade pode estar relacionada ao fato que efeitos isotópicos inversos também se manifestam quando ocorre mudança na hibridização do centro de reação de sp^2 para sp^3 como resultado do aumento da força da vibração fora do plano conforme o estado de transição se aproxima. Contudo, essa linha de argumentação não faz sentido com o sistema em estudo e tampouco a argumentação que processos radicalares envolvendo abstração de hidrogênio na betalaína seriam desacelerados se

há troca de H por D na molécula, conforme observado para processos de peroxidação lipídica no qual lipídios que trocam H por D reagem mais lentamente com radicais alquil-peroxil.¹³³

1-3.8. Conclusões

Existe uma dependência entre a velocidade de fotodegradação das betalaínas e irradiância e, portanto, para altas concentrações de fótons a decomposição fotoinduzida é muito mais rápida do que a decomposição térmica. Dessa forma, há a indicação de que a fotólise seja a via mais relevante de decomposição desses pigmentos e de que deve ser ponderada quando se considera o uso de betalaínas como aditivos colorantes em produtos que exijam tempos de prateleira longos. O processo fotoinduzido utiliza luz visível que promove a transição $\pi - \pi^*$ e favorece a ionização que para BtP só é possível no sistema 1,7-diazeheptametínico enquanto para Bn deve ocorrer em paralelo à oxidação do grupo catecol, cuja oxidação em $2e^-$ está vinculada à hidroxilação na posição C-3 da ciclo-DOPA.

O efeito dos antioxidantes na fotodegradação parece estar relacionado a interações específicas entre antioxidantes quirais e betalaínas, que também são compostos quirais, abrindo o caminho para a investigação do efeito de interações supramoleculares sobre a cinética de redução por antioxidantes. Ainda, o fato de EDTA não reduzir intermediários oxidados de betalaínas indica que a decomposição destes é muito rápida, fato confirmado pelas E_a medidas que são compatíveis com processo de formação de elétron solvatado e processos controlados por difusão. Embora os experimentos de fotodegradação tenham sido feitos em condições aceleradas os resultados indicam que betalaínas submetidas a irradiação com luz visível geram espécies reativas e reações em cadeia que podem afetar não só sua persistência em um determinado meio ou formulação quanto promover reações com outros compostos químicos.

1-3.9. Parte experimental

1-3.10. Reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados não foram purificados previamente exceto quando indicado. *Solventes*: isopropanol (Merck, ACS $\geq 99,5\%$), acetato de etila (Merck, ACS $\geq 99,5\%$), diclorometano (Merck, ACS $\geq 99,5\%$) e óxido de deutério (99,9% de átomos de D). *Ácidos e bases*: ácido clorídrico (HCl, Merck, ACS 37%), ácido fórmico (Sigma-Aldrich, grau HPLC, 98 – 100%) hidróxido de sódio (NaOH, Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) e hidróxido de amônio (NH₄OH, Merck, 28% NH₃ em H₂O). *Sais*: fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), formato de sódio (Sigma-Aldrich, grau LC-MS). *Demais reagentes*: L-prolina (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$), Trolox (Sigma-Aldrich, 97%), ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, BioXtra, $\geq 99\%$), EDTA (Sigma-Aldrich, ACS reagente). *Fase estacionária para cromatografia*: sephadex LH-20 e sílica octadecil funcionalizada (200 – 400 mesh).

1-3.11. Soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura (18 M Ω cm⁻¹, 25 °C) obtidas a partir de um sistema milliQ da Millipore.

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

Solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹: 8,28 mL de HCl 37% (d = 1,2 g mL⁻¹) foram dissolvidos em balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água.

Tampão fosfato 100 mmol L⁻¹: a solução foi preparada pela dissolução de 1,2 g fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) a um balão de 100 mL. O pH foi ajustado utilizando HCl ou NaOH 1,0 mol L⁻¹ para 3 ou 7 e em seguida o volume de 100 mL foi completado com água.

Tampão acetato 100 mmol L⁻¹: a solução foi preparada pela dissolução de 573 µL ácido acético a um balão de 100 mL. O pH foi ajustado utilizando NaOH 1,0 mol L⁻¹ para 5 e em seguida o volume de 100 mL foi completado com água.

1-3.12. Sínteses e purificações

Betanina e indicaxantina foram obtidas e purificadas conforme Capítulo I desta Tese.

1-3.13. Degradação térmica e fotoinduzida

O estudo de degradação de betanina e indicaxantina foi realizado em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7 ou em tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 5 em cubeta de quartzo de volume interno de 1500 µL (10 × 4 mm, Hellma) termostaticada (± 1 ° C) com um banho termostático Lauda RP845. A decomposição térmica foi monitorada em função do tempo por espectrofotometria UV-Vis (200 - 800 nm) com temperaturas entre 30 e 50 °C utilizando um espectrofotômetro de absorção Varian Cary 50 Bio com porta cubeta termostaticada.

Os experimentos de fotodegradação foram realizados com soluções de absorvância próxima à 1,0 e sob agitação magnética. Betanina foi irradiada em 532 nm utilizando um laser de Nd:YAG Quantel Q-smart 850 com frequência de pulso de 1 Hz e potência de $2,7 \pm 0,2$ W. Espectros de absorção (300 – 800 nm) foram coletados a cada 1 min utilizando um espectrofotômetro Avantes equipado com fibra ótica. Indicaxantina foi irradiada em 480 nm utilizando um laser de Nd:YAG Quantel Brilliant com frequência de pulso de 2,5 Hz e potência de $0,16 \pm 0,030$ W. Os espectros de absorção foram adquiridos em função do tempo utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV1800. Soluções estoque de ácido ascórbico, Trolox e EDTA (1 mmol L⁻¹) foram preparadas e usadas para a preparação de soluções de trabalho em tampão acetato pH 5 ou tampão fosfato pH 7.

1-3.14. Ensaios cinéticos

A variação da absorção de betanina ($\lambda = 536$ nm) e indicaxantina ($\lambda = 485$ nm) foi registrada em função do tempo e ajustada a um modelo cinético de primeira ordem, empregando-se funções monoexponenciais ou biexponenciais conforme necessário.

1-3.15. Análise dos produtos de degradação por espectrometria de massas

Os produtos provenientes da degradação térmica e fotoquímica foram analisados por HPLC-MS/MS utilizando um equipamento de alta resolução Bruker q-ToF maxis 3G. As amostras foram preparadas com concentrações aproximadas de 1×10^{-4} mol L⁻¹ e foram decompostas termicamente utilizando uma estufa de secagem e esterilização Solab SL-100 (60 °C). O tempo de exposição variou de acordo com a amostra e está detalhado na parte experimental. A decomposição fotoquímica dos compostos de interesse foi realizada utilizando os mesmos parâmetros de irradiação citados em cubeta de quartzo de volume interno de 1500 μ L (10 \times 4 mm, Hellma) termostaticada. Os produtos de degradação foram analisados por meio de HPLC-MS-ESI(+) em um cromatógrafo líquido Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas de baixa resolução Amazon Speed ETD (Bruker Daltonics). As amostras foram analisadas em uma coluna de fase reversa (Ascentis C18, 250 \times 2,1 mm; 5 μ m; Supelco) utilizando o seguinte método cromatográfico: 2 – 20 % de B em 20 min, sendo o solvente A 0,05% ácido fórmico/água e o solvente B 0,05% ácido fórmico/acetonitrila com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 30 °C.

Capítulo 3

Efeito de pigmentos naturais sobre o dano celular fotoinduzido

1-4.1. Introdução

A exposição da pele, olhos e cabelo à luz solar está associada a diversos processos fisiológicos importantes como a síntese de vitamina D, visão e regulação do ritmo circadiano.¹³⁴⁻¹³⁷ Contudo, em certas condições, a exposição excessiva à luz pode ter efeitos deletérios para a saúde que estão vinculados ao estresse oxidativo. Em particular nos olhos, cujas células têm alta atividade metabólica e composição lipídica diferenciada, a exposição contínua à luz está associada a danos oxidativos que podem levar a doenças oftalmológicas.^{138,139} O epitélio pigmentar da retina (RPE) é atingido diretamente pela luz e, por isso, é rico em células fotorreceptoras capazes de converter sinais luminosos em impulsos nervosos enviados ao cérebro para interpretação pelo nervo óptico (Figura 38).¹⁴⁰ O ponto focal mais importante do olho é chamado de mácula, região da retina rica em fotorreceptores e que tem caráter fundamental na visão central e na acuidade visual. De forma simplificada, ao atingir a retina, a luz promove a isomerização de *cis*-retinal, um derivado da oxidação de β -caroteno, em *trans*-retinal, processo que está associado à fototransdução visual através de enzimas, em especial a opsina.

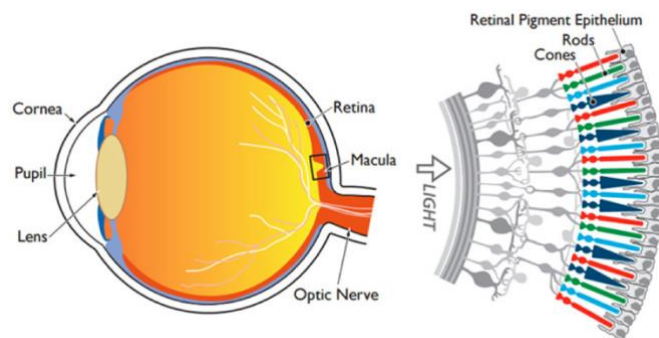
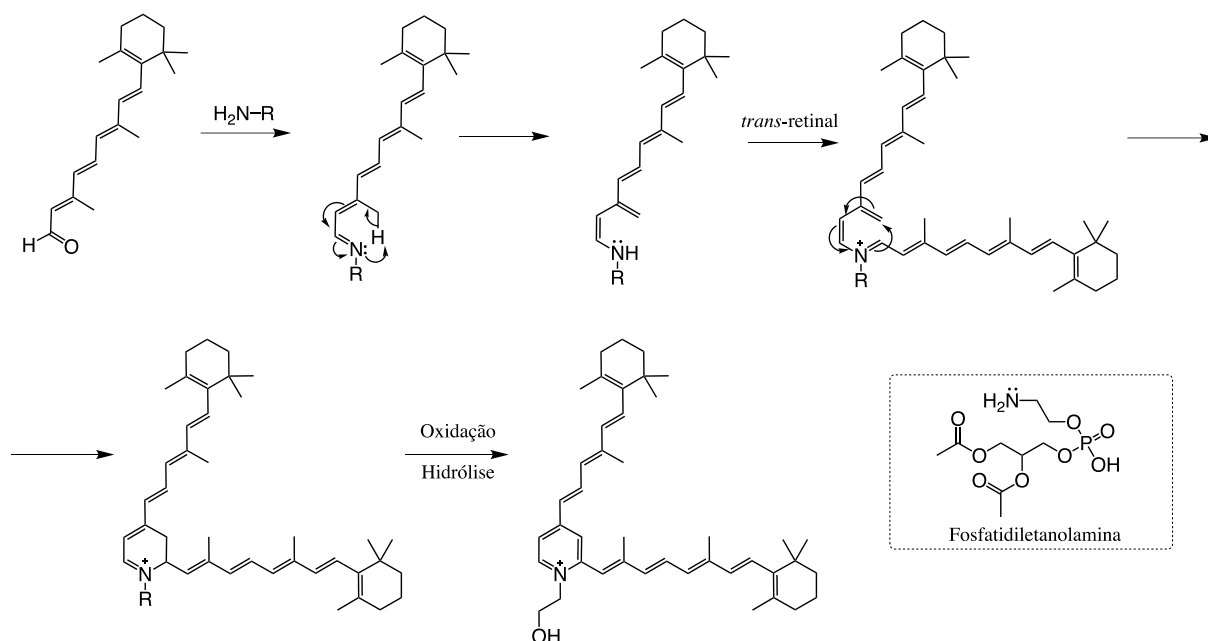


Figura 38 Ilustração de um olho humano e seus compartimentos fundamentais, bem como a posição da mácula e uma ampliação mostrando a presença do epitélio pigmentar da retina, dos cones e dos bastonetes.¹⁴¹

A degeneração da mácula é a principal causa de cegueira irreversível em idosos e está associada a diversos fatores ambientais e fisiológicos, incluindo o acúmulo de pigmentos do tipo lipofuscina nas células do RPE.^{141,142} A2E (*N*-retinilideno-*N*-retiniletanolamina) e seus isômeros são derivados do retinal que presentes na lipofuscina da mácula^{143–147} cuja formação está relacionada a problemas na regeneração do *trans*-retinal pelo aparelho visual e ao acúmulo de fosfatidiletanolamina (PE), um fosfolípido abundante nas membranas celulares.^{148,149} A reação entre essas espécies produz o *N*-retinilideno-PE (NRPE), um intermediário que reage com uma segunda molécula de *trans*-retinal para formar A2-PE cuja hidrólise leva ao A2E (Esquema 12).¹⁵⁰

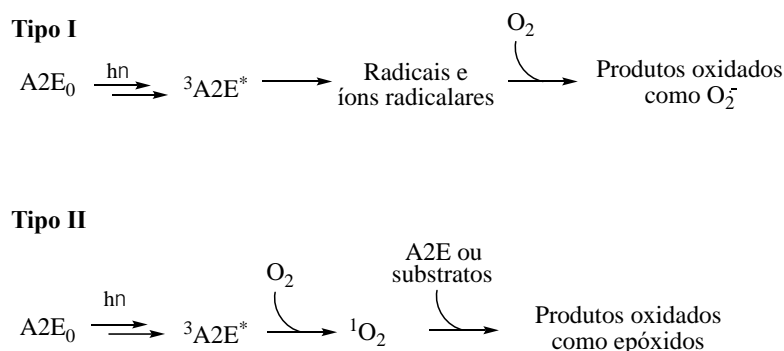
A lipofuscina da retina contém A2E e é resistente à degradação por lisossomas e proteassomas e seu acúmulo está ligado a diversos tipos de degeneração da retina.¹⁴⁹ A2E tende a se acumular no RPE causando dano, principalmente, pelas suas propriedades tensoativa e atividade como fotossensibilizador do tipo I (oxidação via radicalar) e tipo II (oxidação via oxigênio singlete) (Esquema 13).^{119,151–155} A estrutura química do A2E apresenta duas cadeias carbônicas hidrofóbicas e uma cabeça polar carregada positivamente que conferem ao composto caráter anfifílico e promove a sua intercalação em membranas celulares.



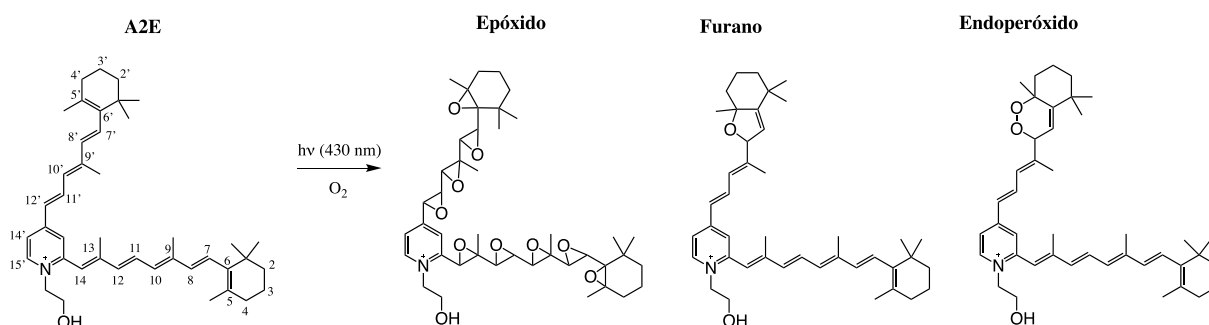
Esquema 12. Biossíntese de A2E a partir da reação entre *trans*-retinal e fosfatidiletanolamina. O processo possui múltiplas etapas e é finalizado com a hidrólise do fosfatidiléster para formação de A2E.

Quando irradiado com luz azul na presença de oxigênio molecular, A2E gera o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e oxigênio singlete (1O_2 , $\Phi_\Delta = 1,2 \times 10^{-3}$, $\lambda^{EX} = 420 \text{ nm}$, acetona-d₆).¹⁵¹ O oxigênio singlete pode reagir com as ligações duplas em ambas as cadeias laterais do A2E formando epóxidos de A2E altamente reativos. A análise desses epóxidos por espectrometria de massas revela uma distribuição de picos com relação m/z variando de forma monotônica em 16 unidades em um intervalo entre m/z 592,4513 (A2E) até a oxidação das suas nove duplas ligações m/z 736,4056.¹⁵⁵⁻¹⁵⁹ A dupla ligação na posição 5 do anel hexenil é a mais favorável para a epoxidação inicial graças ao efeito indutivo das metilas na posição 1. A adição de um átomo de oxigênio nesta na posição gera um epóxido que pode sofrer rearranjo para formação de um 2,5-di-hidrofurano, processo favorecido no ambiente ácido do lisossomo (pH entre 4,5 e 5).^{144,149} Na presença do gerador térmico de 1O_2 , o endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno, A2E é convertido em um 5,8-endoperóxido em uma reação de cicloadição [4+2].¹⁶⁰ O Esquema 14

apresenta a estrutura química do A2E e alguns possíveis produtos de foto-oxigenação.



Esquema 13. Reações de oxidação fotossensibilizadas do tipo I e do tipo II mediadas por A2E.



Esquema 14. Estruturas químicas de A2E e de alguns produtos de foto-oxigenação: epóxidos, furanos e endoperóxidos que são caracterizados por massas pelo padrão $[M + n16]^+$, $n > 1$.

Os epóxidos são anéis de três membros tensionados que contém átomos de carbono eletrofílicos que favorecem a sua reação com nucleófilos biológicos como o DNA e grupos tióis e amino em proteínas.^{154,157,161,162} De fato, os epóxidos de A2E induzem lesões oxidativas no DNA como, por exemplo, a formação de 8-oxoguaninas. A oxidação de A2E pode levar à formação de compostos carbonílicos altamente reativos e com boa difusibilidade.^{158,163}

Carotenoides provenientes da dieta, como a luteína e zeaxantina, acumulam na mácula e tem a função de prevenir o dano oxidativo fotoinduzido. Sua concentração está relacionada a um menor acúmulo de lipofuscina e a uma menor ocorrência e progressão da degeneração macular. Esses compostos absorvem 40% da intensidade de luz que atinge o RPE (λ^{Abs} (etanol)

= 445 nm, $\epsilon = 144.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e 451 nm, $\epsilon = 145.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para, respectivamente)^{44,164-166} e não produzem oxigênio singlete via fotossensibilização visto que a energia do primeiro estado singlete excitado do oxigênio, $^1\Delta_g$, é 94,3 kJ mol⁻¹ é mais alta que a energia triplete do β -caroteno (86,7 kJ mol⁻¹).⁴⁵ Esse mesmo argumento energético explica porque carotenoides atuam como sequestradores (*quencher*s) de oxigênio singlete;¹⁶⁷ luteína, por exemplo, suprime oxigênio singlete com uma constante cinética k_q de $8,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹⁶⁸

O efeito de diversos antioxidantes sobre o dano induzido por A2E foi estudado *in vitro* e *in vivo*.¹⁶⁹⁻¹⁷³ Sabe-se, por exemplo, que as vitaminas C e E suprimem a epoxidação de A2E,¹⁷⁴ mas o conhecimento sobre o efeito de pigmentos de plantas com potencial antioxidante é limitado. Antocianinas são flavonóides encontrados em frutas e no vinho e que se acumulam no cérebro, fígado e tecidos oculares de animais.¹⁸ Sua alta eficiência em sequestrar radicais deve-se à sua estrutura fenólica conjugada em um núcleo flavílio. Antocianinas tem sido utilizadas em diversas aplicações, incluindo a proteção de células de RPE contra dano fotoinduzido.^{4,27,175,176}

Antocianinas são substituídas por betalaínas na maioria das espécies de plantas da ordem Caryophyllales.¹⁷⁷ Os rendimentos quânticos de cruzamento entre sistemas de betalaínas são muito baixos e, portanto, seu primeiro estado triplete excitado é acessível apenas por fotossensibilização.^{83,120} Seu estado excitado singlete decai principalmente por conversão interna e em algumas betaxantinas também por fluorescência. Betanina, sequestra oxigênio singlete dando origem a seu derivado descarboxilado com uma constante de velocidade de supressão de $1,20 \pm 0,15 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que é comparável à α -terpineno ($k_q = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹⁷⁸ um supressor usado como referência nos estudos com oxigênio singlete.¹⁷⁹ Recentemente, betalaínas mostraram-se alvos promissores como bioativos devido à capacidade antioxidante e antirradicalar característica do seu sistema eletrônico conjugado e capacidade de doação de elétrons. *In vivo*, a concentração de betalaínas no plasma pode ser suficiente, dependendo da

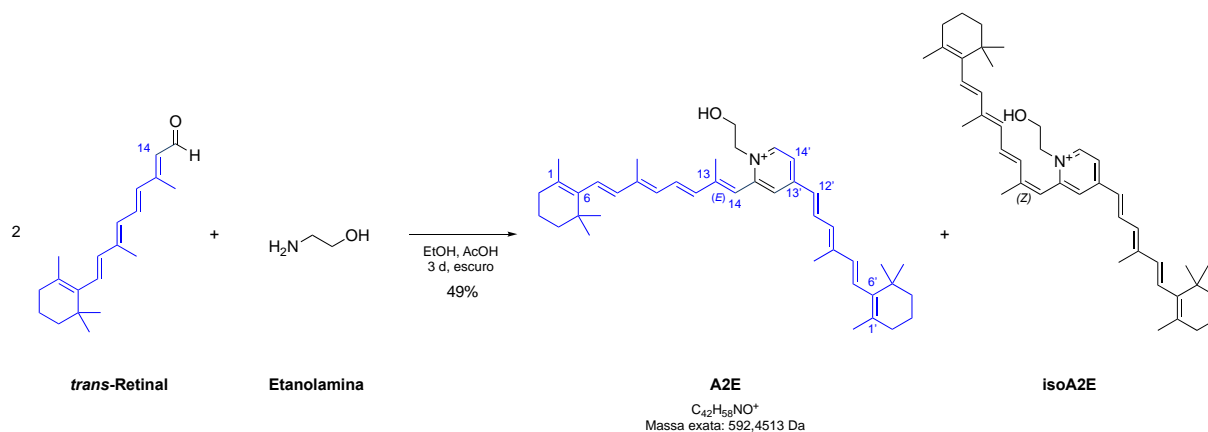
dieta, para promover a incorporação desses compostos em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e células vermelhas, protegendo-as contra o dano oxidativo e hemólise.^{180,181}

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos com o estudo da interação entre A2E e betalaínas *in vitro* e em células da linhagem ARPE-19. O efeito de betalaínas modelo sobre a formação de epóxidos de A2E foram investigados por espectrometria de massas e o mecanismo de interação entre os compostos foi inferido pelos resultados de experimentos de supressão de fluorescência.

1-4.2. Resultados e discussão

1-4.3. Obtenção de A2E e de pigmentos naturais

Para investigar o efeito de pigmentos naturais sobre a fotodegradação de células da retina é necessário preparar A2E dada a sua ação como fotossensibilizador. Embora a preparação consista em uma única etapa, a purificação do A2E não é simples e requer o uso de um sistema cromatográfico automatizado. O A2E (*N*-retinilideno-*N*-retiniletanolamina) foi preparado com rendimento de 49% seguindo o procedimento descrito por Parish e colaboradores.¹⁸² *trans*-Retinal e etanolamina foram solubilizados em etanol acidificado com ácido acético e a reação foi mantida sob agitação e protegida da luz por 3 dias à temperatura ambiente (Esquema 15). A análise cromatográfica da mistura ao final desse período revelou a presença de A2E e de seu isômero iso-A2E em uma proporção estequiométrica de 13:1, além de *trans*-retinal que não reagiu e vários subprodutos (Figura 38a).



Esquema 15. Preparação de A2E e iso-A2E em etanol através da reação entre *trans*-retinal (2 equiv) e etanolamina (1 equiv) na presença de ácido acético (1 equiv).

A reação entre *trans*-retinal e etanolamina ocorre através da formação de uma base Schiff, seguida por tautomerização imina-enamina através de deslocamento [1,6] de hidrogênio. Em seguida, uma nova base de Schiff é formada a partir da reação com outra molécula de *trans*-retinal. Este intermediário sofre um rearranjo [3,3]-sigmatrópico seguido de autooxidação para

produzir A2E, uma estrutura contendo duas cadeias laterais derivadas do retinal que se estendem a partir de um anel piridínio. A2E é um composto instável e, por isso, foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em condição de fase reversa e em escala semipreparativa (Figura 39).

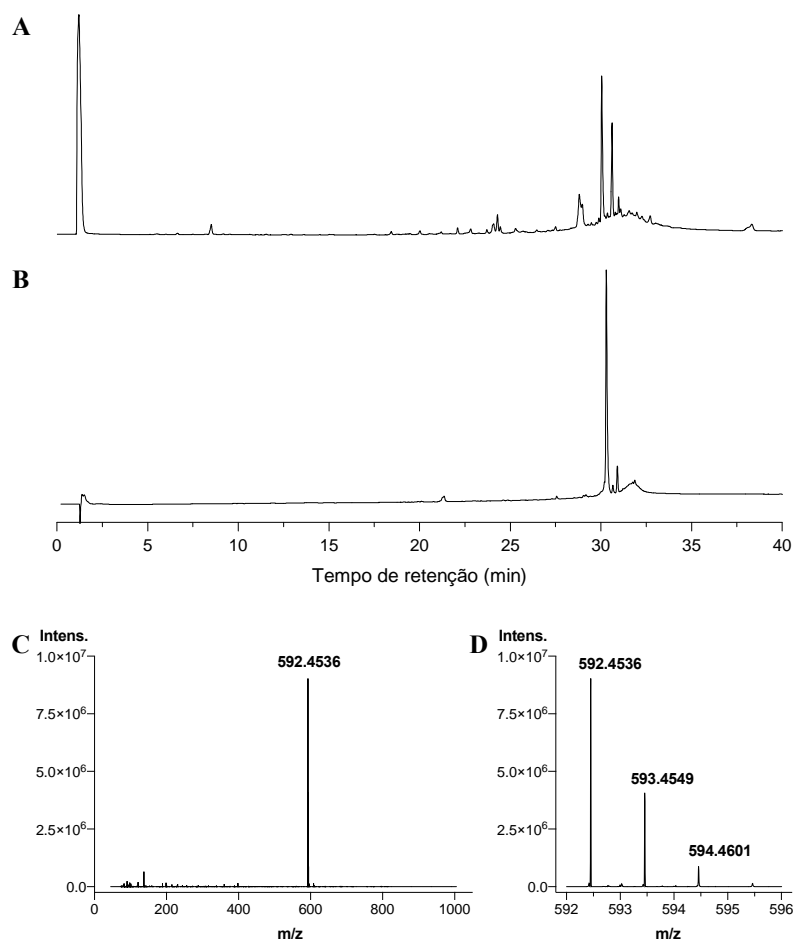


Figura 39. Análise do A2E por HPLC-PDA-qTOF-ESI(+)-MS. Cromatogramas obtidos para a reação bruta (A) e para a amostra purificada (B) mostrando um pico principal em 30,8 min relacionado a A2E e o espectro de absorção. (C) Espectrometria de massas de A2E purificado. O espectro de massas obtido por infusão direta em modo positivo mostra um pico de íon molecular principal relacionado a A2E e seu padrão isotópico (D).

Foi obtida uma solução contendo majoritariamente A2E ($t_R = 30$ min) e seu isômero iso-A2E ($t_R = 30,8$ min) que foi caracterizada através de infusão direta por espectrometria de massa de alta resolução com ionização por eletrospray operando em modo positivo [HRMS-

ESI(+)]. Observou-se um sinal com m/z 592,4536 compatível com o valor esperado para o íon molecular do A2E (m/z 592,4513; erro: 3,9 ppm) e que apresenta o padrão isotópico esperado (Figura 38b). A presença de iso-A2E na amostra não compromete o seu uso no estudo visto que este estereoisômero foi detectado em células do epitélio da retina isoladas de olhos humanos e existe evidência substancial de que o processo de fotoisomerização do A2E ocorre *in vitro* e *in vivo*.¹⁴⁴ Além disso, há sinais próximos ao limite de detecção da técnica na faixa de m/z entre 80 e 400 e um sinal com m/z 608,4463 compatível com esperado para o íon $[M_{A2E} + 16]^+$, que é um produto de foto-oxidação comum do A2E.⁴³

A mistura de A2E/iso-A2E também foi analisada por RMN de ^1H (Figura 40) e os dados estão de acordo com os relatados na literatura (Tabela 13).¹⁸² Os hidrogênios das ligações π do sistema conjugado estão mais desblindados devido ao deslocamento de elétrons e apresentam deslocamentos químicos entre 6,0 e 8,5 ppm. Além disso, o nitrogênio carregado positivamente desblinda os H13', H14' e H15' devido ao seu efeito retirador de elétrons. A ampliação da região entre 8,7 e 6,0 ppm mostra os sinais correspondentes aos H7 (*d*), H8 (*d*), H11 (*dd*), H12 (*d*), H14 (*s*) e H14' (*dd*) de ambas as cadeias laterais e aos dubletos que correspondem aos H10', H13' e H15'. Nota-se que há sobreposições no sinal do duplo dubleto referente ao H11 e no sinal do hidrogênio H10 (6,27 ppm) enquanto os outros sinais apresentam-se bem definidos. O hidrogênio H7 ($^3J_{7,8} = 16,1$ Hz) apresenta uma forte interação com H8 ($^3J_{8,7} = 16,1$ Hz), enquanto H7' ($^3J_{7',8'} = 16,1$ Hz) interage fortemente com H8' ($^3J_{8',7'} = 16,1$ Hz) ambos a partir de um acoplamento vicinal. O mesmo tipo de acoplamento é observado para os hidrogênios H11 ($^3J_{11,12} = 15,2$ Hz e $^3J_{11,10} = 11,3$ Hz) e H12 ($^3J_{12,11} = 15,2$ Hz) e para H10' ($^3J_{10',11'} = 11,6$ Hz), H11' ($^3J_{11',10'} = 11,6$ Hz e $^3J_{11',12'} = 15,2$ Hz) e H12' ($^3J_{12',11'} = 15,2$ Hz). A magnitude das constantes de acoplamento obtidas para os hidrogênios das posições 7, 8, 11 e 12 em ambas as cadeias laterais sugere que as duplas ligações se encontram na sua configuração *E*, o que condiz com os dados reportados na literatura em análises de correlações ROESY para o composto. O

isômero de A2E denominado como iso-A2E, é caracterizado pela configuração *Z* na ligação dupla C13 – C14 e apesar de semelhantes, os espectros de ¹H-RMN de A2E e iso-A2E não são idênticos. O que explica a sobreposição de sinais na região de H13, já que amostra purificada contém ambos estereoisômeros.

Na região entre 5,8 e 0,6 ppm é possível observar uma sobreposição de sinais para os H4 e H4', H2 e H2', e H9 o que dificultou o cálculo das integrais. Nota-se a presença de dois tripletos em 4,54 e 3,92 ppm referentes aos grupos metílenos ligados ao nitrogênio do anel piridínico e ao oxigênio, respectivamente, ambos apresentando constante de acoplamento de 5,0 Hz. Na região do espectro de deslocamento químico entre 2,3 e 0,9 ppm encontram-se os sinais correspondentes aos H1 (*s*), H2 (*m*), H3 (*m*), H4 (*m*) e H5 (*s*) para ambos os anéis descendentes do retinal e presentes nas extremidades das cadeias laterais. Os singletos referentes aos grupos metila presentes em H9, H9' e H13 também foram observados na região entre 2,18 e 2,05. Foram atribuídos também alguns sinais referentes as impurezas presentes no sistema, tais como, ácido acético utilizado na síntese do fotossensibilizador ($\delta = 1,99$ ppm) e contaminações do solvente utilizado na limpeza do tubo de RMN ($\delta = 5,49; 2,33; 1,29$ e $0,90$). A Tabela 13 apresenta os valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento obtidos.

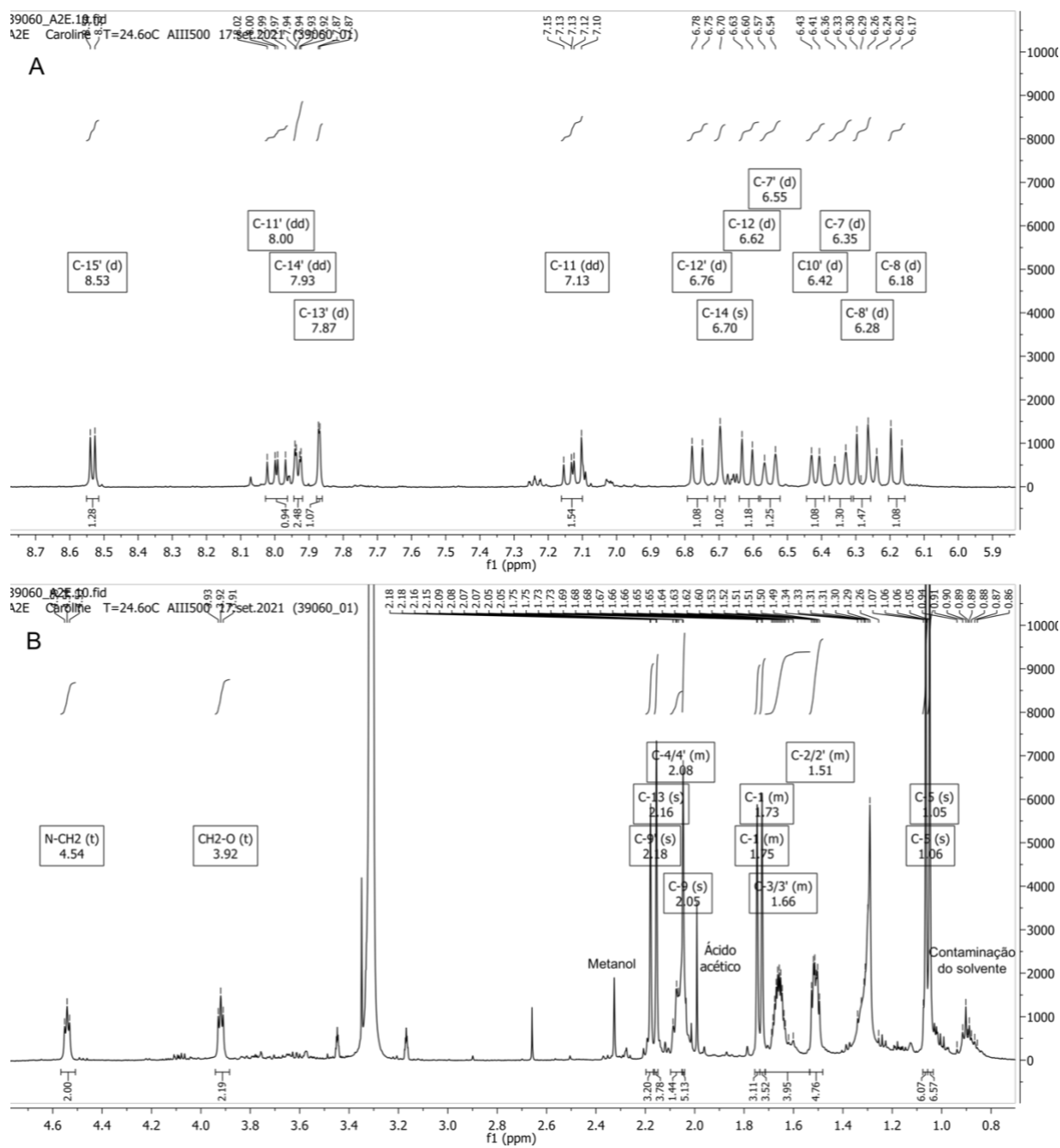
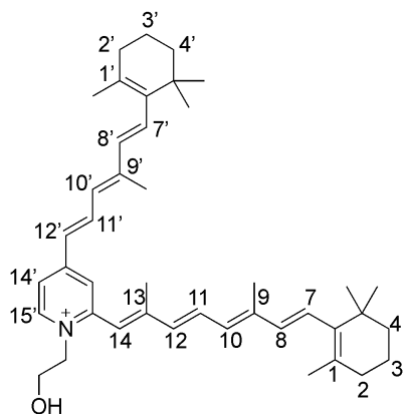


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da mistura A2E/iso-A2E em CD_3OD .

Tabela 13. Atribuição dos sinais obtidos nos experimentos de 1H-RMN de A2E em CD₃OD adquirido em um equipamento Bruker AIII 500 MHz, e comparação com resultado obtido na literatura nas mesmas condições experimentais (s: singlete, d: dubleto, dd: duplo dubleto, m: multiplete, *: sobreposição de sinais).

Posição do ¹ H	δ _H (ppm)	δ _H (ppm) ¹⁸²
1 e 1'	1,75 e 1,73 (s, 6H)	1,75 e 1,77 (s, 6H)
2 – 2'	1,51 (m, 4H)*	1,53 (m, 4H)
3 / 3'	1,66 (m, 4H)	1,68 (m, 4H)
4 e 4'	2,08 (m, 4H) *	2,10 (m, 4H)
5 – 5'	1,06 e 1,05 (s, 12H) *	1,09 e 1,10 (s, 12H)
CH ₂ – O	3,92 (t, J = 5,0 Hz, 2H)	3,94 (t, J = 5,0 Hz, 2H)
N – CH ₂	4,54 (t, J = 5,0 Hz, 2H)	4,56 (t, J = 5,0 Hz, 2H)
7	6,35 (d, J = 16,1 Hz, 1H)	6,37 (br d, J = 16,0 Hz, 1H)
7'	6,53 (d, J = 16,1 Hz, 1 H)	6,57 (br d, J = 16,5 Hz, 1H)
8	6,18 (d, J = 16,1 Hz, 1H)	6,20 (d, J = 16,0 Hz, 1H)
8'	6,28 (d, J = 16,1 Hz, 1H)	6,30 (d, J = 16,5 Hz, 1H)
9	2,05 (s, 4H) *	2,07 (s, 3H)



9'	2,18 (s, 3H)	2,20 (s, 3H)
10	6,27 *	6,27 (J = 11,5 Hz, 1H)
10'	6,42 (d, J = 11,6 Hz, 1H)	6,43 (d, J = 11,5 Hz, 1H)
11	7,13 (dd, J = 11,3 Hz e 15,2 Hz, 1H)	7,15 (dd, J = 11,0 Hz e 15,0 Hz, 1H)
11'	8,00 (dd, J = 11,6 Hz e 15,2 Hz, 1H)	8,00 (dd, J = 11,5 Hz e 15,5 Hz, 1H)
12	6,62 (d, J = 15,2 Hz, 1H)	6,53 (d, J = 15,5 Hz, 1H)
12'	6,76 (d, J = 15,2 Hz, 1H)	6,78 (d, J = 15,0 Hz, 1H)
13	2,16 (s, 4H) *	2,19 (s, 3H)
13'	7,87 (d, J = 2,1 Hz, 1H)	7,89 (d, J = 0,8 Hz, 1H)
14	6,70 (s, 1H)	6,61 (s, 1H)
14'	7,93 (dd, J = 6,8 Hz e 1,9 Hz, 2H) *	7,95 (dd, J = 0,8 Hz e 7,0 Hz, 1H)
15'	8,53 (d, J = 6,8 Hz, 1H)	8,55 (d, J = 7,0 Hz, 1H)

Investigou-se a interação de A2E com betanina (Bn), indicaxantina (BtP) e cianidina-3-*O*-glicosídeo (Ant), cujos detalhes para a obtenção são detalhados no capítulo I desta Tese. Resumidamente, betanina foi obtida através de precipitação do suco de beterraba vermelha utilizando isopropanol como antissolvente. O precipitado contendo Bn, açúcares e compostos polares foi purificado por cromatografia líquida utilizando sílica C18 e Sephadex LH-20 (eluente: H₂O). Indicaxantina foi semissintetizada a partir do acoplamento aldimínico entre ácido betalâmico (HBt), obtido a partir da hidrólise alcalina do suco de beterraba, e L-prolina. O composto foi purificado por um processo de HPLC em condição de fase reversa e escala semi-preparativa, seguida de cromatografia em coluna usando Sephadex LH-20. A caracterização da amostra foi feita por ressonância magnética nuclear (¹H) e mostrou a presença de 4 estereoisômeros (*E,E*, *Z,E*, *Z,Z* e *E,E*), sendo *E,E* e *Z,E* os dois majoritários. Não há evidências na literatura que comprovem diferentes atividades biológicas para os estereoisômeros de BtP e, portanto, os experimentos foram realizados com a mistura isomérica. Cianidina-3-*O*-glicosídeo foi utilizada como controle visto que há relatos na literatura que demonstram a capacidade desse composto em proteger células da retina dos processos de foto-oxidação e fotodegradação induzidos por A2E.¹⁸³ O composto foi obtido a partir da casca da jabuticaba segundo protocolo desenvolvido por Liu e colaboradores onde uma mistura etanol-água-HCl (70:30:0,01 v/v) foi utilizada para extração do pigmento. A purificação envolveu diversas etapas onde realizou-se processos de extração líquido-líquido além de cromatografia em coluna de troca iônica (Amberlite XAD7HP) e de separação por tamanho (Sephadex LH-20). A caracterização da amostra foi realizada por HRMS-ESI(+) e ressonância magnética nuclear (¹H) e mostrou que o extrato final obtido continha cianidina-3-*O*-glicosídeo e também sua forma aglicona. Os experimentos foram realizados com a amostra contendo a mistura de ambos os compostos.

1-4.4. Estudo da interação entre A2E e pigmentos naturais

A interação entre A2E e os pigmentos naturais foi investigada em solução aquosa pH 5 através de ensaios de espectrofotometria de absorção e de supressão da fluorescência do A2E pelos pigmentos naturais de acordo com o método de Stern-Volmer. Os espectros de absorção e fluorescência de Bn, BtP e Ant foram adquiridos na ausência de A2E e considerados como controle (Figura 41). Apenas para BtP é possível observar uma banda de emissão relevante na região de 500 a 650 nm, enquanto os outros dois pigmentos não são fluorescentes.

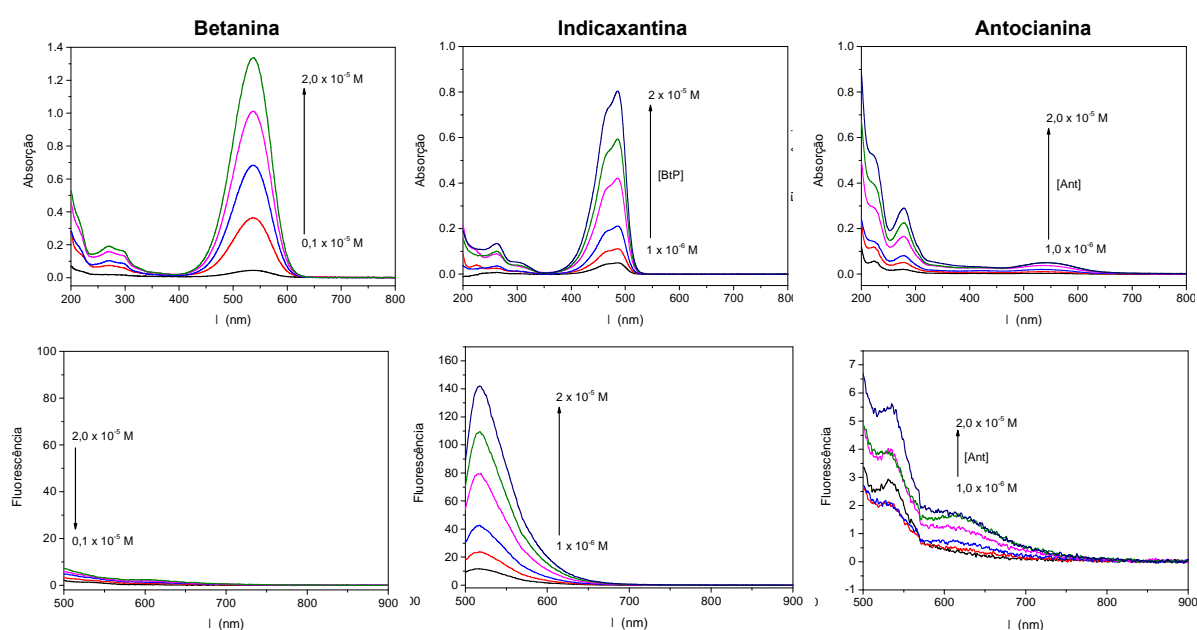


Figura 41 Espectros de absorção e emissão de Bn, BtP e Ant nas concentrações utilizadas nos experimentos de Stern-Volmer. Os espectros mostrados foram adquiridos na ausência de A2E mas usando as mesmas condições experimentais ($\lambda^{EX} = 400 \text{ nm}$, $f^{EX} = 20 \text{ nm}$, $f^{EM} = 20 \text{ nm}$).

Nos experimentos de Stern-Volmer a concentração de A2E (fluoróforo) foi fixada em $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração dos pigmentos naturais (supressores) foi variada entre 1 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. A emissão de A2E foi acompanhada em 620 nm ($\lambda^{EX} = 400 \text{ nm}$, $f^{EX} = 20 \text{ nm}$, $f^{EM} = 20 \text{ nm}$) e o efeito da concentração do supressor sobre a relação entre as intensidades de fluorescência de A2E na ausência (F_0) e na presença (F) dos pigmentos naturais foi analisada

(Figura 42). Detalhes conceituais sobre o método de Stern-Volmer que podem ser úteis na análise dos dados são apresentados no Box 1.

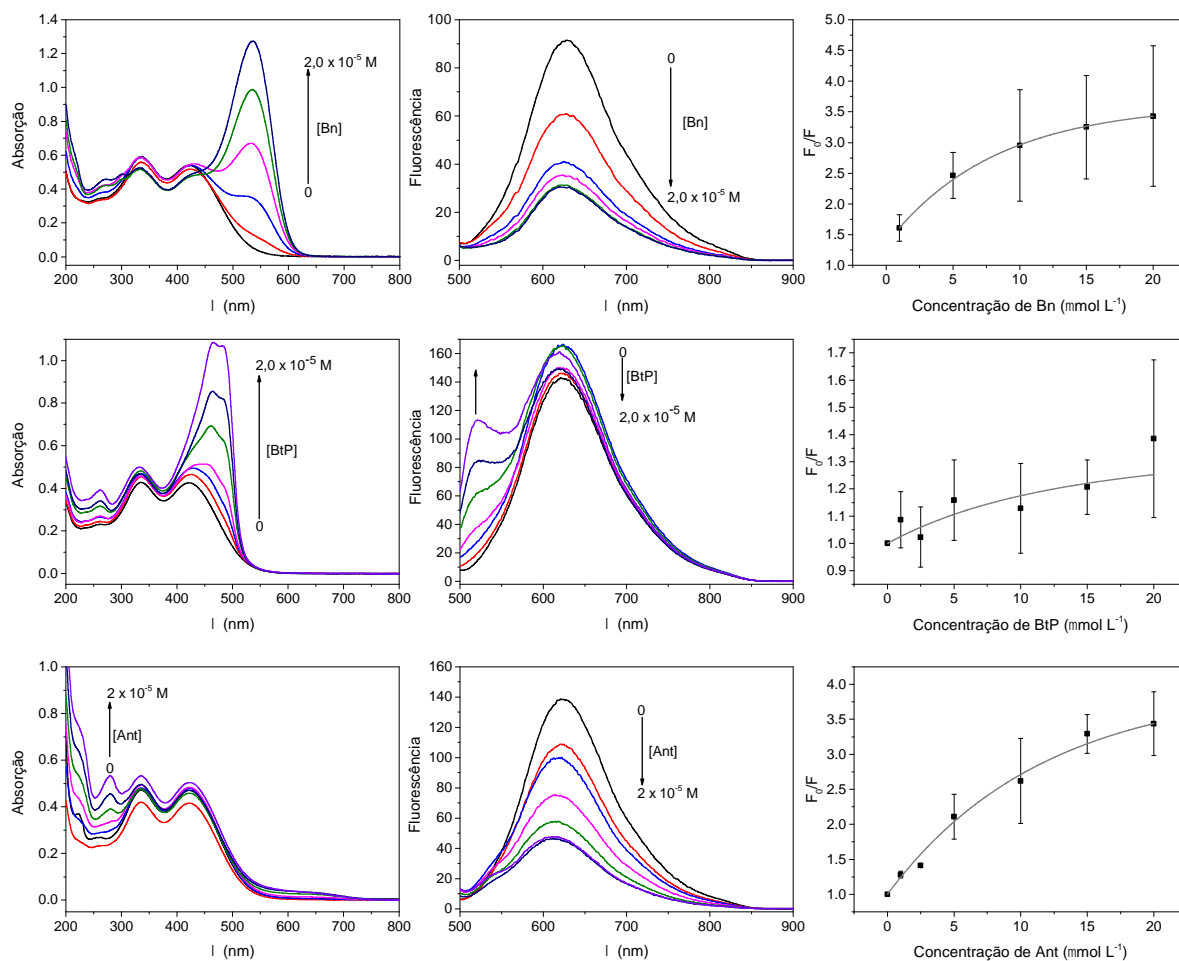
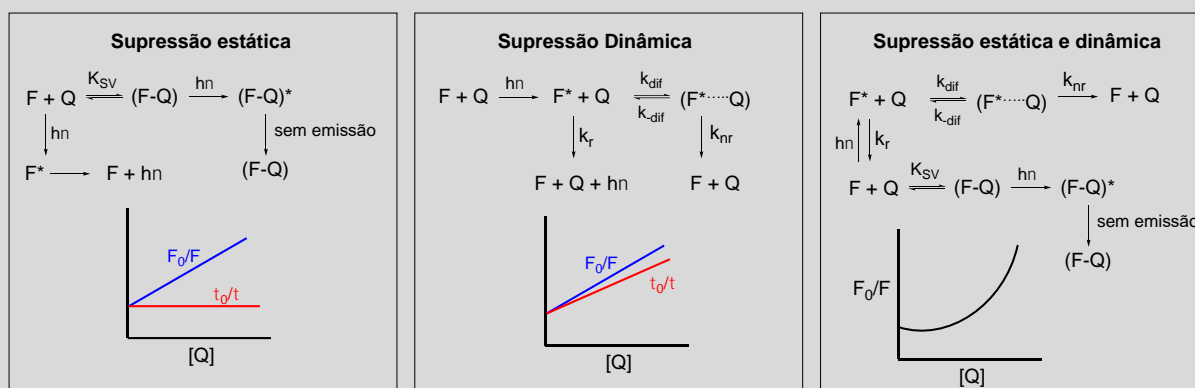


Figura 42. Espectros de absorção e emissão ($\lambda^{EX} = 400$ nm) de solução aquosa de A2E, em pH 5, na ausência e na presença de diferentes concentrações de Bn, BtP e Ant (1 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e gráfico Stern-Volmer construído a partir das intensidades de fluorescência obtidas nos espectros de emissão. Para BtP o gráfico de Stern-Volmer foi construído a partir da segunda-derivada dos espectros de emissão.

Box 1. Detalhamento conceitual do método de Stern-Volmer.

Diversos tipos de interação podem ser responsáveis pela supressão de fluorescência e essas processos são classificados como supressão dinâmica, estática ou por ambas (Esquema 16). Na supressão estática há uma interação entre o corante fluorescente e o supressor no estado fundamental com a formação de um complexo não fluorescente. No processo dinâmico, o

corante fluorescente eletronicamente excitado interage com o supressor levando à sua desativação não radiativa. As equações 4 e 5 descrevem a supressão estática e dinâmica, respectivamente, em termos do efeito da concentração do supressor (Q) sobre a variação da intensidade de fluorescência do composto em estudo.



Esquema 16. Tipos de supressão de fluorescência de um fluoróforo (F) por um sequestrador (Q , *quencher*).¹⁸⁴

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Eq. 4}$$

$$\frac{F_0}{F} = k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Eq. 5}$$

onde F é a intensidade de fluorescência na presença de supressor e F_0 na ausência de supressor, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, k_q é a constante bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor e $[Q]$ a concentração do supressor.

A fração de corante fluorescente acessível ao supressor pode ser determinada considerando-se que uma população está acessível ao supressor e uma outra está inacessível. Na presença do supressor, há uma diminuição da fluorescência para a população de fluoróforo acessível e em altas concentrações de supressor essa população tende a zero. Assim, a fluorescência registrada em uma concentração de supressor definida pode ser relacionada com a constante de Stern-Volmer a partir da seguinte equação:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a \times K_{SV}[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad \text{Eq. 6}$$

onde f_a é a fração da população de fluoróforos acessíveis ao supressor, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ a concentração do supressor.

Alterações nos espectros de absorção e fluorescência com a adição de supressor podem indicar interações entre as duas espécies químicas além de refletirem a natureza desse fenômeno. Bn e BtP não alteram o máximo de absorção de A2E na faixa de concentração estudada, mas a indicaxantina fluoresce quando excitada em 400 nm, como pode ser observado na (Figura 42). Enquanto as betalainas estão em suas formas aniônicas em pH 5, essa condição pouco ácida favorece a forma de base quinoidal ($\lambda^{Abs} \sim 520$ nm) e chalcona ($\lambda^{Abs} \sim 330$ nm) das antocianinas.¹⁸⁵ A fotoisomerização *cis-trans* de chalconas de antocianina é muito eficiente ($\phi_{trans-cis}^{366\text{ nm}} = 0,48$) e a maioria dos derivados não é fluorescente.^{186,187} A adição de Ant provoca o aparecimento de uma banda de absorção larga ao redor de 650 nm, diferente do observado para Ant na ausência de A2E (Figura 41) e que pode indicar a formação de um complexo de transferência de carga.

Os espectros de absorção da mistura A2E-Ant sugerem interação entre esses dois compostos com formação de uma espécie com maior grau de deslocalização de carga e menor diferença de energia de HOMO e LUMO. Sabe-se que antocianinas e copigmentos (espécies que na natureza absorvem radiação UV) formam complexos moleculares responsáveis por uma mudança ou incremento na cor da antocianina. Embora a copigmentação de antocianinas seja mais favorecida em meio ácido ($\text{pH} < 3$), a literatura mostra que *cis* e *trans* chalconas também copigmentam.^{188,189} Copigmentos naturais, como o ácido ferúlico, apresentam sistemas ricos em elétrons π capazes de interagir com os cátions flavílios que apresentam maior deficiência de elétrons devido à sua carga formal positiva. Essa interação normalmente produz um efeito batocrômico e hiperacrômico no espectro de absorção da antocianina. A natureza dessa interação

pode ser proposta considerando as estruturas químicas de A2E e Ant que são passíveis de ligações de hidrogênio. Além disso, as cadeias laterais com alta densidade eletrônica de A2E podem servir como doadoras para o núcleo deficiente de elétrons da Ant, formando assim um complexo de transferência de carga.

Todos os pigmentos suprimem a fluorescência do A2E, mas a instabilidade e tendência de agregação desse composto em meio aquoso¹⁵¹ dificultam a realização do experimento e a análise de dados. A emissão da indicaxantina também é um fator que aumenta a complexidade da análise. Como não é possível com os equipamentos disponíveis no IQ-USP estudar a supressão da fluorescência do A2E por análise de tempo de vida ($\tau_{A2E}(S_1) = 4 \text{ ns}$, HCCl_3)¹⁹⁰ vamos discutir os resultados obtidos no estado estacionário de forma cautelosa. O perfil dos gráficos de Stern-Volmer obtidos para a supressão de fluorescência de A2E pelos 3 pigmentos naturais propostos não apresentam uma tendência linear, mas sim uma curva de saturação característica da distribuição do corante fluorescente em um sistema heterogêneo. Esse resultado pode ser explicado pela criação de microambientes como resultado da agregação de A2E em meio aquoso, evento capaz de diminuir a interação fluoróforo-supressor. Para a BtP, a diminuição da intensidade de fluorescência do A2E ocorre de forma mais sutil e a análise dos dados é comprometida pela fluorescência do supressor em 520 nm. Os dois compostos absorvem luz entre 350 e 500 nm e a excitação realizada em 400 nm para obtenção dos espectros de emissão não é seletiva, limitando a aplicação do método a partir das intensidades de fluorescência. Ainda, a interação entre A2E e BtP leva a supressão de fluorescência de ambos os compostos o que reflete nos espectros de emissão e interfere na obtenção dos parâmetros de supressão. Para tentar separar as bandas de emissão do A2E e da BtP, o gráfico de Stern-Volmer mostrado para a interação de A2E e BtP foi feito utilizando a segunda derivada da emissão em função do comprimento de onda ($d^2F/d\lambda^2$) (Anexo 15).

O perfil não linear e crescente da supressão nos levou a analisar os dados considerando-

se que o sistema contém microambientes nos quais o A2E e o supressor interagem de forma diferente. A relação entre $F_0/\Delta F$ e o inverso da concentração dos supressores é apresentada na Figura 43. Para Bn e Ant, observa-se uma dependência linear na qual o coeficiente linear se refere ao inverso da fração de A2E acessível (f_a) para supressão e o coeficiente angular se refere ao inverso de ($f_a \times K_{SV}$) (Box 1). Para BtP, a sobreposição das bandas de emissão inviabilizou a análise.

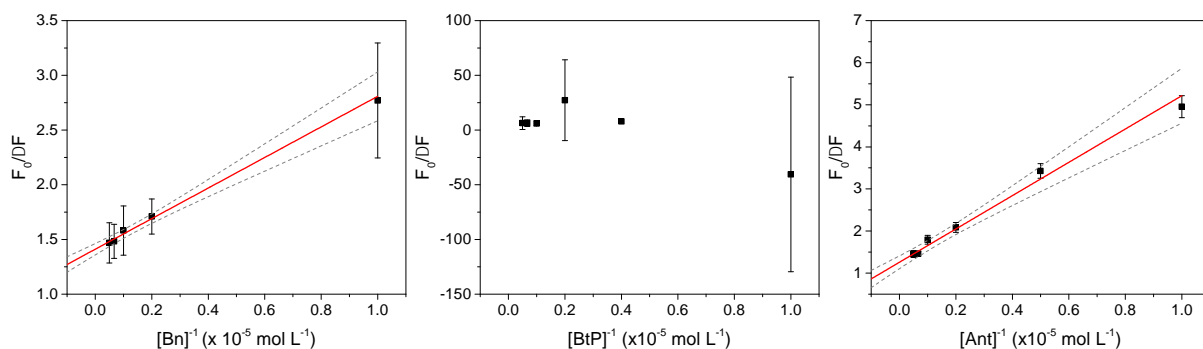


Figura 43. Gráfico de Stern-Volmer modificado para o processo de supressão seletiva dos fluoróforos acessíveis de A2E por Bn, BtP e Ant.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos na regressão linear e os parâmetros de Stern-Volmer calculados a partir dos coeficientes angulares e lineares. A fração de A2E acessível para supressão (f_a) foi calculada em 71% para Bn e 80% para Ant. Ainda, a constante de Stern-Volmer, também denominada como constante de associação do complexo, é cerca de três vezes maior para a Ant do que para a Bn. Os resultados obtidos a partir dos espectros de absorção para Ant, apontam a formação de um complexo entre A2E e Ant que contribui para a componente estática da função que descreve a supressão. Esse é um resultado inicialmente surpreendente considerando-se que A2E é um cátion piridínio e Bn é um ânion e Ant é, nesse pH, predominantemente neutra.

Tabela 14. Coeficiente linear e angular obtidos na regressão linear dos gráficos de Stern-Volmer modificados e constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e fração de fluoróforos acessíveis (f_a) calculadas

Pigmento	Coef. linear	Coef. angular	K_{SV} (10^5 mol L^{-1})	f_a (%)
Bn	1,41	1,40	0,99	71
Ant	1,25	4,15	3,31	80

1-4.5. Efeito de pigmentos naturais sobre a foto-oxidação de A2E *in vitro*

Soluções aquosas de A2E ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença e na ausência de cada um dos pigmentos (faixa de concentração: $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 1 mmol L^{-1}) foram irradiadas por 15 min com um sistema composto por uma lâmpada fluorescente Philips Special Blue (F20T12/BBY, 420 – 470 nm, 20 W, $\text{PPFD}^1 = 130 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) e uma placa de acrílico de 6,4 mm (filtro UV) e os produtos formados foram caracterizados através de análise por espectrometria de massa de baixa resolução com infusão direta, na faixa de m/z entre 50 e 1000 com ionização por electrospray operando em modo positivo [MS-ESI(+)]. Esses experimentos foram realizados durante estágio BEPE no laboratório da Profa. Elizabeth Gaillard na Northern Illinois University.

Devido à complexidade e grande volume de dados obtidos, escolheu-se acompanhar apenas a influência dos pigmentos naturais na fotoproteção de A2E e nos produtos de fotooxigenação. Esses produtos abrangem uma série de compostos contendo porções de oxigênio como peróxidos cíclicos, epóxidos e furanos e apresentam incrementos de m/z de 16 unidades mostrando um padrão $[M + 16n]^+$ ($592,4513 + 15,9949n$) e, portanto, para n até 6 se localizam na região entre m/z 600 e 700 do espectro de massas.^{10,11,45} A Figura 44 apresenta os espectros de massas para a região de 550 a 700 Da para amostras contendo A2E irradiado na

¹ Densidade do fluxo de fótons fotossintéticos é a medida do número de fótons em um certo intervalo de comprimento de onda (banda de onda) que incide por unidade de tempo e de área dividido pelo número de Avogadro.¹⁹⁶

presença 1 mmol L^{-1} dos pigmentos naturais antioxidantes. Percebe-se que, para todos os pigmentos testados, há um aumento na intensidade do sinal referente ao íon molecular do A2E ($m/z = 592,45$) indicando a capacidade desses compostos em prevenir a foto-oxidação de A2E no sistema estudado. Entretanto, percebe-se também que na presença dos pigmentos, há um aumento na intensidade dos picos relacionados aos produtos de fotooxigenação (m/z entre 600 e 700).

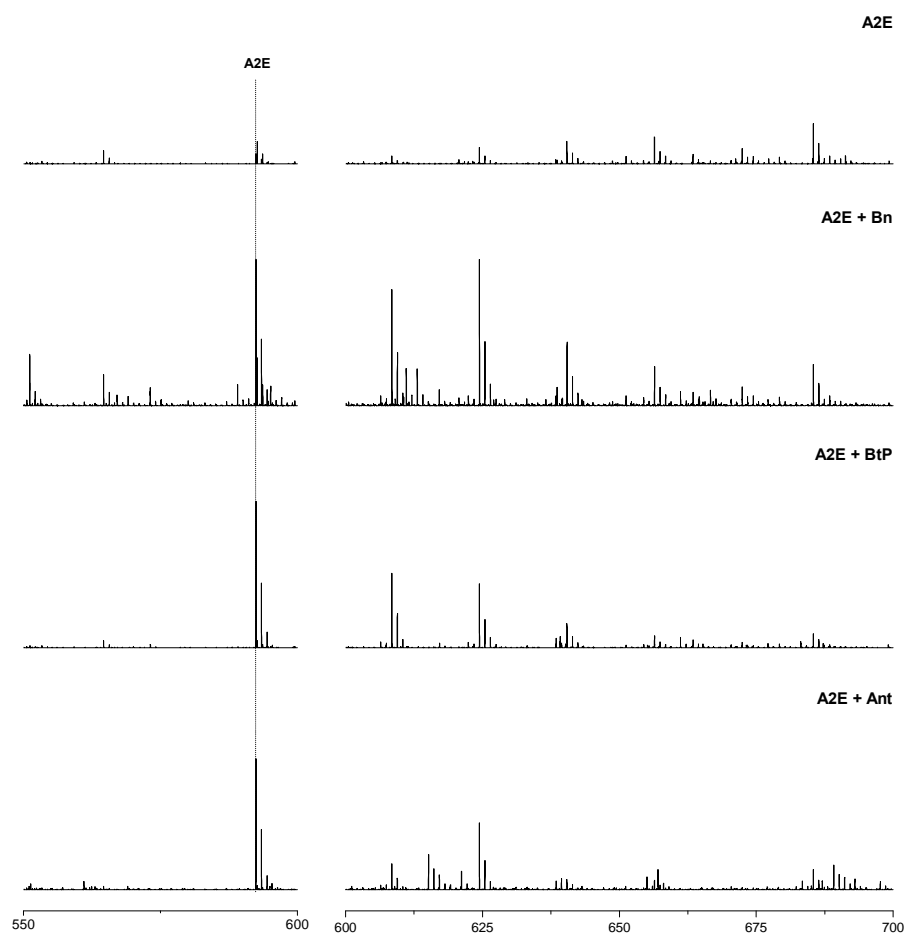


Figura 44. Espectros de massa obtidos para amostras de A2E ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) irradiadas com luz azul (15 min) na presença de Bn, BtP e Ant (1 mmol L^{-1}).

A variação da intensidade do sinal referente ao A2E em função da concentração dos pigmentos é mostrada na Figura 45, assim como a intensidade do sinal da amostra controle de A2E não irradiado (●). Em todos os experimentos, a ausência de pigmento natural leva ao

desaparecimento do sinal de A2E. Conforme a concentração de pigmento é aumentada, a intensidade do sinal do A2E aumenta com uma tendência sigmoide característica de experimentos dose-resposta, tornando possível calcular as concentrações de pigmentos naturais para quais 50% do A2E máximo era protegido do efeito de foto-oxidação (EC_{50}). A EC_{50} de Bn, BtP e Ant são respectivamente: $457 \mu\text{mol L}^{-1}$, $463 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $6,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Essa diferença nos valores de betalaínas e antocianinas pode ser relacionada com os dados obtidos para interação de A2E e pigmentos naturais por absorção e fluorescência visto que Ant foi o único composto que apresentou evidências de formação de complexo A2E-Ant no estado fundamental. A formação desse complexo pode ser responsável por uma interação mais efetiva capaz de proteger o A2E dos processos ocasionados pela irradiação com luz azul.

A proteção do A2E contra o efeito da luz azul pode se conectar a dois parâmetros distintos: efeito óptico pelo alto coeficiente de absorvidade molar das betalaínas coloridas; e/ou como consequência de suas conhecidas propriedades antioxidantes. A excitação está localizada na faixa entre 420 e 470 nm e há variados graus de sobreposição das bandas de absorção de A2E e dos pigmentos naturais que faz com que tais compostos sejam capazes de agir como filtros ópticos diminuindo assim a quantidade de fótons que incidem nas moléculas de A2E, em particular a BtP. Entretanto, esse efeito deve apresentar menor magnitude para Ant já que no pH estudado as antocianinas se encontram na forma hemiacetal-chalcona que apresenta um baixo coeficiente de atenuação molar em seu máximo de absorção ($\lambda^{\text{Abs}} = 520 \text{ nm}$) sendo esperado maior relevância da capacidade desse composto em doar átomos de hidrogênio e agir como supressor de oxigênio singlete.^{28,191}

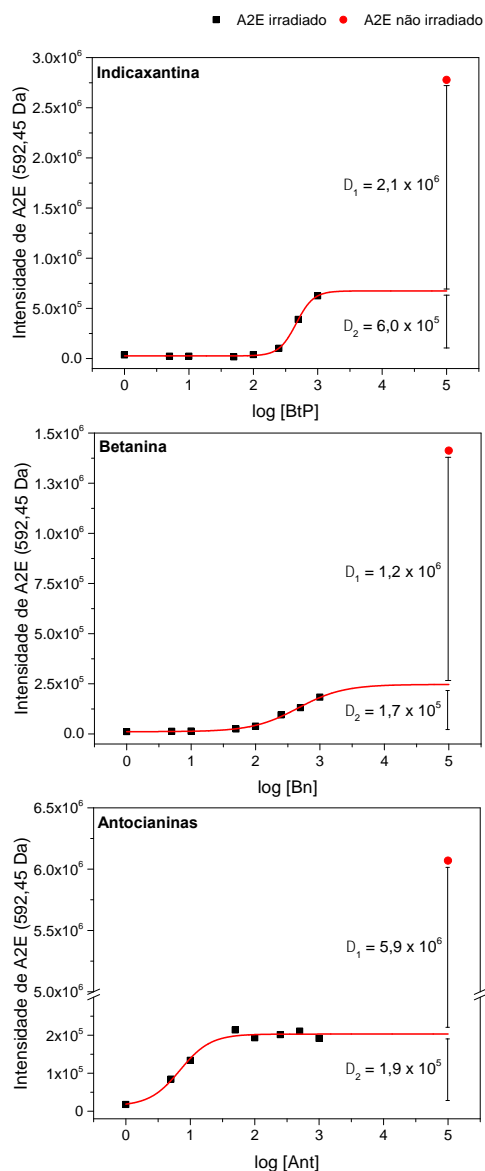


Figura 45. Alterações na intensidade do pico molecular de A2E (m/z 592,45) em função da concentração (em escala log) de pigmentos naturais e ajuste sigmoidal (linha vermelha) adquirida a partir das análises MS-ESI (+). A intensidade do pico de uma amostra de A2E não irradiada foi adicionada ao gráfico para fins comparativos (●).

Para todos os pigmentos estudados, a intensidade do íon-molecular do A2E atinge um platô de intensidade máxima, a partir do qual o aumento da concentração de pigmento natural não leva à uma maior quantidade de A2E no meio. Quando comparado a intensidade obtida para o pico molecular do A2E de uma amostra não irradiada, percebe-se uma grande

discrepância entre as intensidades das duas condições analisadas. Esse resultado sugere que pode haver a formação de complexos entre o A2E e os pigmentos naturais menos ionizáveis que o A2E sozinho. Esse efeito foi amplamente estudado com sais de amônio e piridínio e a formação de pares iônicos e interação com solvente diminuem a intensidade do sinal.¹⁹² Essa questão é importante para destacar que a intensidade dos sinais não deve ser analisada de forma absoluta e que somente as variações são relevantes. Desta forma, a intensidade dos sinais dos produtos de fotooxigenação com n até 6 foram normalizadas pela intensidade do sinal do A2E e os resultados foram comparados para cada pigmento (Figura 46).

Observa-se que com os dados normalizados a fotooxigenação do A2E resulta em produtos com n entre 1 e 6 com máximo em $n \sim 4$. Na presença de todos os pigmentos observa-se que a intensidade relativa é muito menor e que os produtos tendem a valores de n menores, sugerindo que a reação tem menor extensão. A ordem de eficiência parece ser $Bn < Ant < BtP$ considerando-se que a normalização permita comparar os dados de forma direta.

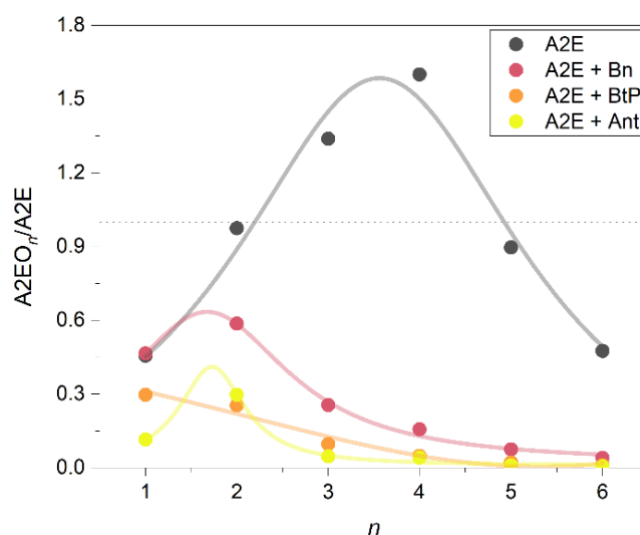


Figura 46. Intensidade do sinal do espectro de massas correspondente a $m/z (592,4513 + 15,9949n)$ para n entre 1 e 6 normalizada pela intensidade do sinal com $m/z 592,4513$ (A2E). As linhas contínuas são os resultados de ajustes não lineares com uma função Lorentziana.

1-4.6. Otimização das condições de incubação e irradiação do A2E em células da retina

Células do epitélio pigmentar da retina (RPE) incubadas com A2E são utilizadas como modelo nos estudos dos processos foto-oxidativos que ocorrem nessa região *in vivo*.^{155,172,193} Embora existam diversas metodologias de incubação de células com A2E na literatura,^{148,194} optou-se por utilizar o procedimento no qual a concentração de A2E intracelular se aproximava das concentrações medidas no RPE humano, que varia de 34 a 134 ng de A2E/10⁵ células em olhos saudáveis. Dessa forma, inicialmente, células de retina da linhagem ARPE-19 foram incubadas por 6 h com uma solução 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de A2E em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, pH 6,8 a 7,2 em condições normais de pCO₂) sem soro fetal bovino (SFB).¹⁷⁶ Devido à sua baixa solubilidade em água, a solução estoque de A2E foi preparada em DMSO e os experimentos foram realizados mantendo-se a concentração final de DMSO no meio de incubação abaixo de 1% (v/v). Ainda, foram realizados controles com células incubadas com DMSO sem A2E.

Após a etapa de incubação, as células foram lavadas com PBS e irradiadas com luz azul na faixa entre 420 e 470 nm por 1 h com uma lâmpada Philips Special Blue. A etapa de lavagem visou eliminar eventuais compostos vindos do DMEM que pudessem absorver luz azul e os controles negativos foram mantidos no escuro durante a realização do experimento. A viabilidade celular (indicativo de células que morreram durante o processo) foi determinada através do ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia na capacidade de células viáveis em reduzir enzimaticamente o MTT e produzir cristais de formazan violeta que absorvem luz em 570 nm. A Figura 47 mostra a porcentagem de células viáveis nas condições estudadas, onde percebe-se uma diminuição da viabilidade celular de cerca de 20% para as células incubadas com DMSO e de aproximadamente 55% das células incubadas com A2E. Contudo, a diferença na viabilidade de

células incubadas com A2E que foram irradiadas com luz azul ou mantidas no escuro não é significativa. Dessa forma, o efeito observado está provavelmente relacionado à capacidade tensoativa do composto capaz de interagir e danificar a membrana das células diminuindo, conseqüentemente, a porcentagem de células viáveis.

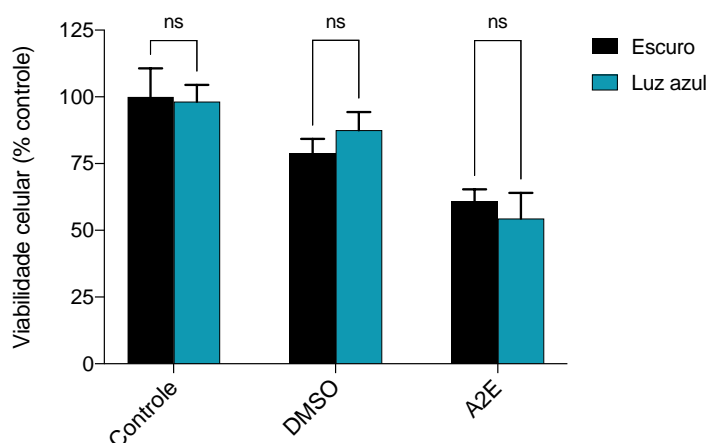


Figura 47. Porcentagem de células viáveis obtida através do ensaio MTT. ARPE-19 foi incubada com DMEM (controle), DMSO (<1% v/v) e A2E (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 6h. As barras indicam o resultado da comparação das médias e desvios com o teste ANOVA/Tukey com um intervalo de confiança de 95%.

A concentração de A2E na etapa de incubação variada para testar se a ação fotossensibilizante seria predominante para doses menores do composto como resultado da diminuição da ação tensoativa. Para tanto, foram realizados ensaios MTT e experimentos de microscopia óptica com células incubadas com diferentes concentrações de A2E (0,1 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A Figura 48 mostra que o aumento da concentração de A2E diminui a viabilidade celular; entretanto, ainda que concentrações empregadas sejam menores, há pouca ou nenhuma diferença entre a viabilidade de células mantidas no escuro e células submetidas a irradiação com luz azul.

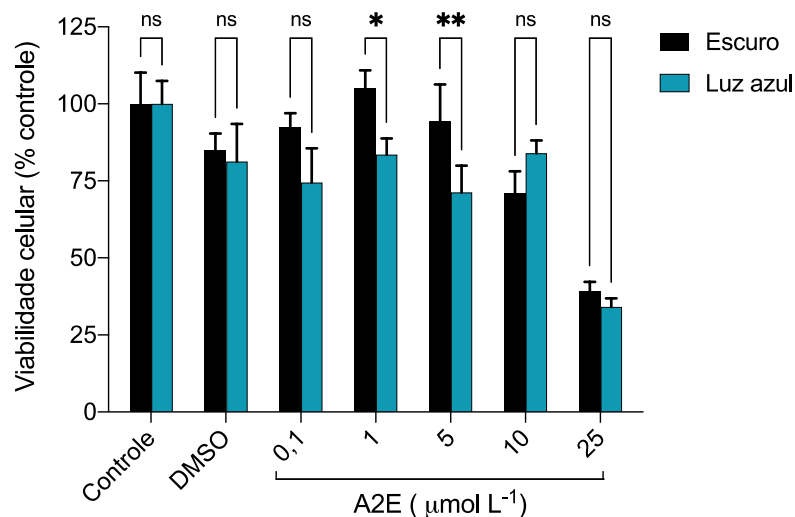


Figura 48. Porcentagem de células viáveis obtida através do ensaio MTT. ARPE-19 foi incubada com DMEM, DMSO (<1%, v/v) e A2E (0,1 – 25 μmol L⁻¹) por 6h. As barras indicam o resultado da comparação das médias e desvios com o teste ANOVA/Tukey com um intervalo de confiança de 95%. * *p* entre 0,02 e 0,04, ** *p* < 0,005, *N* = 3.

Considerando-se que o ensaio MTT é uma medida indireta de viabilidade, foram adquiridas imagens das células após a irradiação para tentar entender se havia alguma modificação morfológica associada à presença de A2E, PBS e os efeitos da luz azul. O experimento de microscopia óptica foi realizado utilizando um equipamento FLoid Cell Imaging Station com objetiva de fluorita de plano 20×. As células foram analisadas inicialmente após a etapa de incubação com diferentes concentrações A2E (0,1 a 25 μmol L⁻¹) por 6 h (Figura 49). Os resultados mostram que células incubadas com A2E com concentrações iguais ou maiores do que 5 μmol L⁻¹ apresentaram quantidades crescentes de grânulos escuros que devem estar associados ao A2E, embora a inclusão e agregação de fragmentos resultantes de injúria celular não podem ser descartadas. Notou-se também a perda da morfologia hexagonal característica da monocamada epitelial organizada da ARPE-19 quando as células foram incubadas com 25 μmol L⁻¹ de A2E, onde é evidente a diminuição do número de células presentes no poço com o aumento de espaços vazios e a presença de vasículas tipo blebs na

membrana que poderiam sugerir a ocorrência de apoptose, embora o mecanismo de morte celular não tenha sido investigado em detalhes. A hipótese relacionada a este fenômeno é de que A2E compromete a integridade de membranas fazendo com que haja uma perda de adesão celular. A análise das células incubadas com A2E e mantidas em PBS por 1h no escuro mostram que até mesmo as células controle se tornaram arredondadas indicando uma menor aderência das células na superfície de cultivo (Figura 50). Esse fenômeno está relacionado a condições de cultivo não ideais nas quais o estresse ambiental interfere nos resultados obtidos no ensaio MTT uma vez que células desaderidas podem ser retiradas durante as etapas de lavagem e, portanto, não serem contabilizadas.

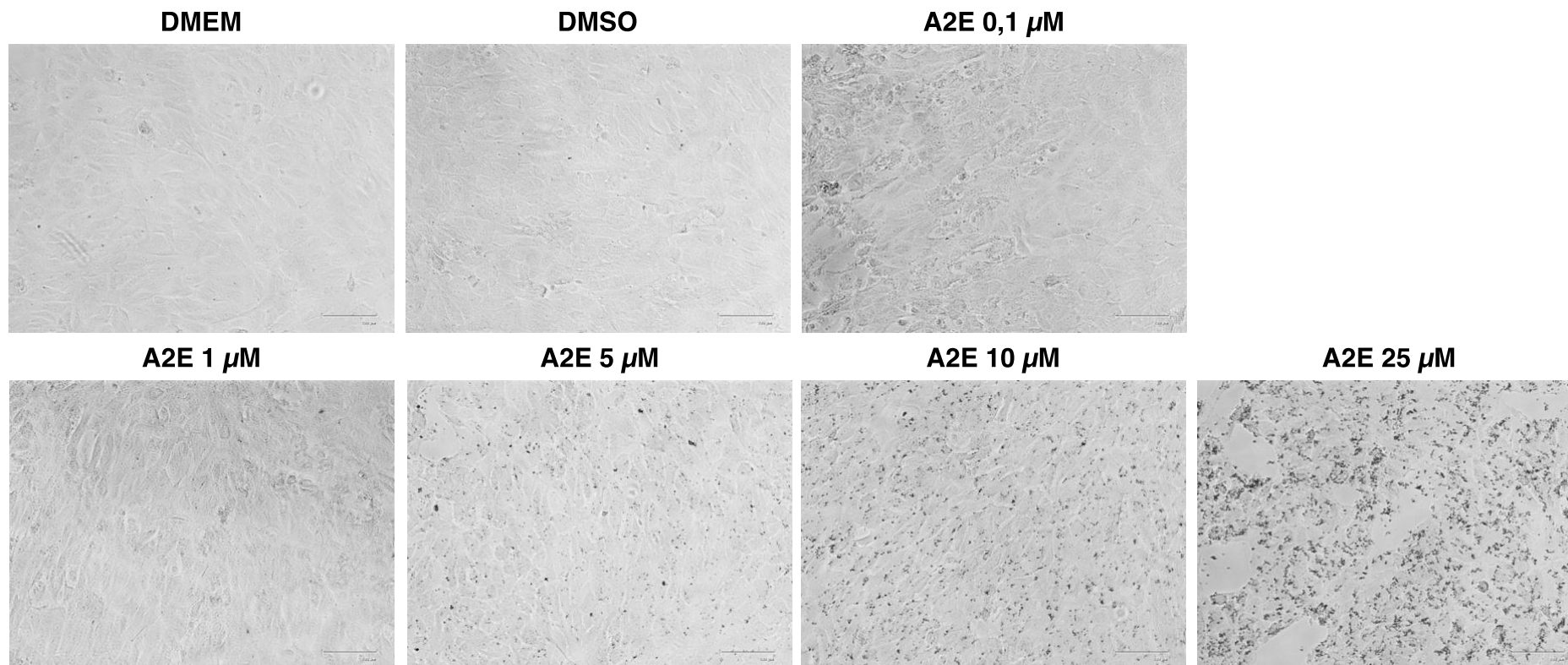


Figura 49. Imagens de microscopia óptica de células ARPE-19 incubadas por 6 h usando DMEM, DMSO (<1% v/v) e A2E em diversas concentrações (0,1 – 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em DMEM. A microscopia óptica foi realizada por uma FLoid Cell Imaging Station para adquirir as imagens usando uma objetiva de fluorita de plano 20x.

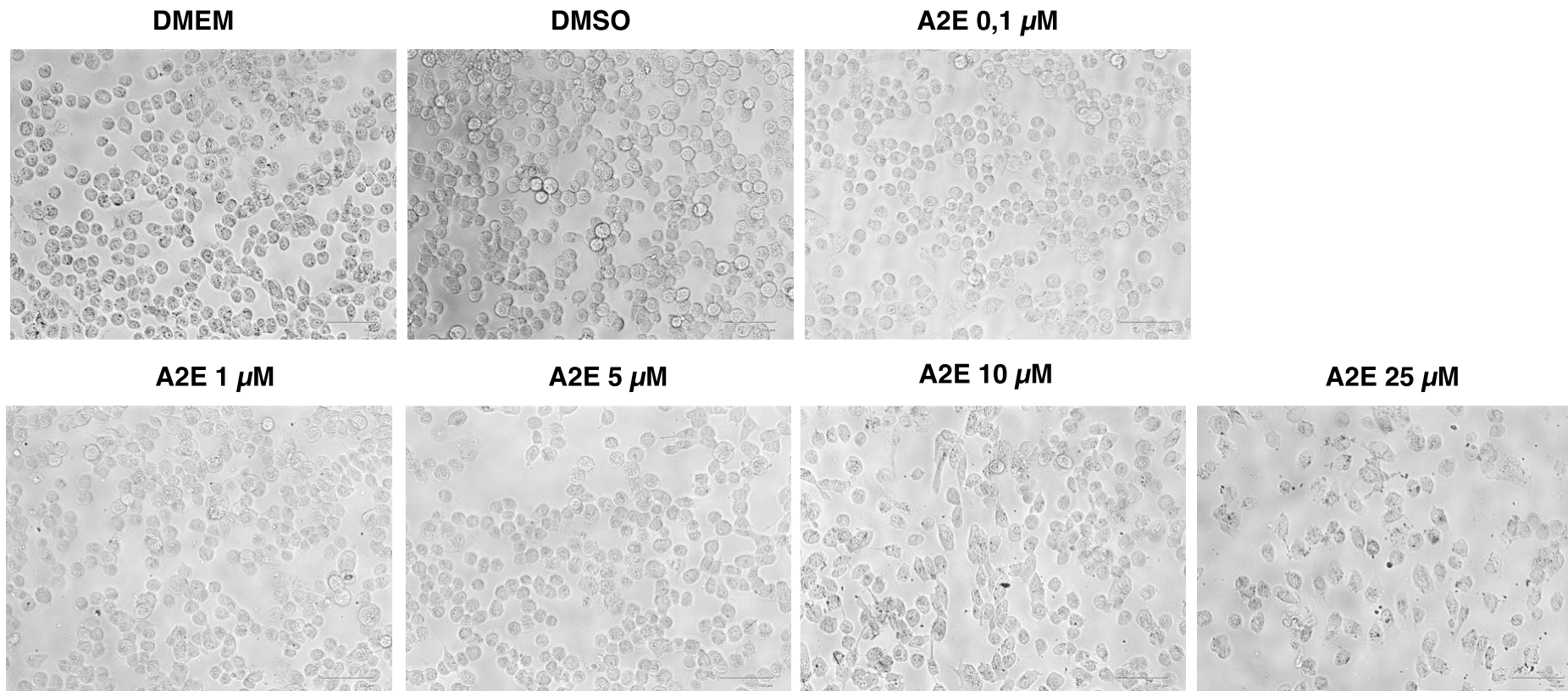


Figura 50. Imagens de microscopia óptica de células ARPE-19 incubadas por 6 h usando DMEM, DMSO (<1% v/v) e A2E em diversas concentrações (0,1 – 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em DMEM e após 1h mantidas em PBS no escuro. A microscopia óptica foi realizada por uma FLoid Cell Imaging Station para adquirir as imagens usando uma objetiva de fluorita de plano 20x.

Os resultados experimentais mostraram que o protocolo de incubação e irradiação de A2E utilizado não era adequado aos estudos de fotossensibilização. Visando um menor efeito tensoativo do A2E nas células, DMEM/F12 contendo 1% de SFB foi utilizado na etapa de incubação que possui macromoléculas lipofílicas essenciais para o crescimento celular e que, conseqüentemente, diminuem a disponibilidade de A2E em contato direto com as células. Além disso, o tempo de incubação de A2E foi diminuído para 2 h.

A viabilidade celular em função da dose de luz incidida ($28 - 230 \text{ J cm}^{-2}$) é apresentada na Figura 51. Para que fosse possível variar a dose de luz utilizando o mesmo tempo de exposição usado nos experimentos em PBS foi necessário utilizar um sistema LED BioLambda ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$, 30 min) acoplado à uma caixa de controle térmico que manteve a temperatura da irradiação à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo o experimento. Células controle foram mantidas na estufa, protegidas da luz, durante o período da etapa de irradiação.

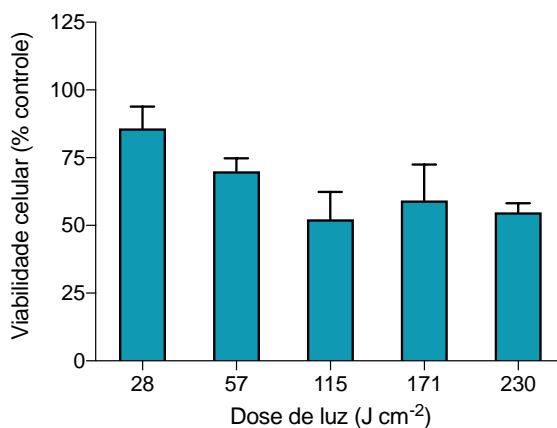


Figura 51. Viabilidade de células ARPE-19 em função de doses de luz ($28 - 230 \text{ J cm}^{-2}$) para células incubadas previamente com A2E ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2 h) em DMEM/F12 contendo 1% de SFB.

A viabilidade das células incubadas com a mesma concentração de A2E ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2 h) diminuiu em função da dose de luz incidida até 115 J cm^{-2} , evidenciando a ação da luz no sistema. Entretanto, a partir dessa dose de luz (115 a 230 J cm^{-2}), a viabilidade celular não

diminuiu se manteve constante em 52 ± 10 % de células viáveis. Esse resultado pode ser explicado considerando-se que o SFB pode limitar a quantidade de A2E internalizada pelas células. Assim, o sistema atinge seu limite de dano possível com uma dose de luz de 115 J cm^{-2} . A porcentagem de células viáveis também foi avaliada em função da concentração de A2E ($5 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) para células submetidas a uma dose de luz azul de 115 J cm^{-2} (Figura 52). Embora a viabilidade diminua com o aumento da concentração do composto não há diferença significativa entre os resultados com células irradiadas e mantidas no escuro.

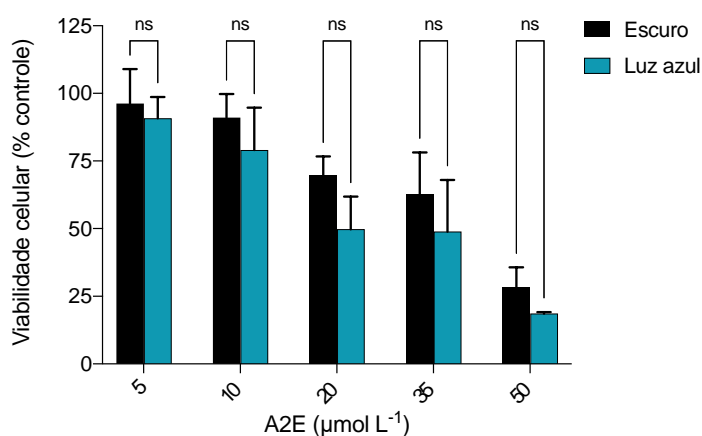


Figura 52. Viabilidade de células submetidas à diferentes concentrações de A2E ($5 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DMEM/F12/1% SFB mantidas no escuro ou irradiadas com uma dose de 115 J cm^{-2} .

Embora a literatura indique as concentrações ideais para o uso de A2E no meio de cultura de células, há poucos relatos que mostram imagens de contraste de fase das células após a incubação com A2E ou dos controles mantidos no escuro. Além disso, o cultivo celular pode abranger variáveis concomitantes aos procedimentos de cultura das células que podem influenciar os experimentos de captação de A2E. Ainda que diversos parâmetros tenham sido testados para otimizar o protocolo de incubação e irradiação de células ARPE-19, nenhum deles forneceu diferenças estatísticas significativas entre o controle no escuro e as células irradiadas. A discrepância entre os resultados descritos na literatura empregando esses procedimentos e os nossos dados nos motivou a relatar nessa Tese os detalhes da otimização do sistema.

As condições experimentais para realizar os experimentos de incubação e irradiação foram estabelecidas após verificar-se que a troca do meio de cultura antes da incubação com A2E que antecede a etapa de irradiação afetava os resultados (Figura 53). Quando as células foram cultivadas em DMEM/F12/10% SFB e o meio de cultura foi trocado 4 h antes da incubação com A2E ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2h) a viabilidade celular não se alterou em relação ao controle sem A2E. É importante ressaltar que a incubação com A2E envolve uma segunda troca do meio para DMEM/F12/1% SFB; a redução do SFB visa aumentar a disponibilidade do A2E para incorporação na célula sem comprometer o suprimento de nutrientes. Entretanto, quando as células foram incubadas diretamente com A2E em DMEM/F12/1% SFB sem a troca do meio (Cond. 2) a viabilidade diminuí em relação ao controle. Não se espera que a mudança de 10% para 1% SFB reduza os nutrientes do meio a ponto de comprometer a viabilidade celular; contudo, o aumento da quantidade de SFB deve explicar esse resultado, possivelmente por diminuir o efeito tensoativo do A2E. A atividade de algum possível fotossensibilizador no meio não é relevante visto que os dados se referem a experimentos feitos no escuro.

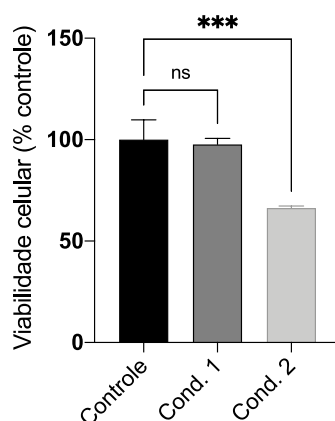


Figura 53. Porcentagem de células viáveis obtidas através do ensaio MTT. No controle, as células não foram incubadas com A2E enquanto para as condições 1 e 2 as células foram submetidas à tratamento com A2E $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 h. Na condição 1, as células foram estabilizadas por 4 h em DMEM/F12/10% antes do tratamento com o fotossensibilizador, enquanto para a condição 2 as células

não foram estabilizadas em novo meio. Nenhum grupo foi submetido à irradiação.

Dessa forma, para realizar os experimentos na presença de antioxidantes naturais o meio de cultura das células ARPE-19 (DMEM/F12/10% SFB) foi trocado 4 h antes da incubação com A2E por 2 h ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em meio DMEM/F12/1% SFB. A irradiação com luz azul foi feita com uma utilizando uma dose de luz azul de 115 J cm^{-2} (30 min) em $450 \pm 30 \text{ nm}$ a temperatura constante de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

1-4.7. Efeito de pigmentos naturais antioxidantes na viabilidade de células incubadas com A2E

O efeito de pigmentos naturais antioxidantes sobre o dano foto-oxidativo induzido por A2E em células da retina foi avaliado. O sistema contendo A2E permanece com as células ARPE-19 100% viáveis no escuro, mas a viabilidade reduz para cerca de 60% com irradiação com luz azul (115 J cm^{-2}). Os pigmentos foram incubados em diferentes etapas do procedimento, conforme mostrado na Tabela 15, e a viabilidade celular foi determinada com MTT. Independente da etapa de adição estudada, uma solução estoque dos pigmentos em água foi utilizada para produzir soluções de trabalho nas concentrações e meios de incubação indicados. O meio de cultura antigo foi trocado por essas soluções de trabalho contendo 50 ou $500 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de pigmentos naturais e deu-se prosseguimento ao experimento.

Tabela 15. Condições experimentais utilizadas nos testes de efeito dos pigmentos naturais na proteção contra o dano foto-oxidativo induzido por A2E

Adição dos pigmentos	Tempo de incubação	Concentração de pigmento ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Meio de incubação
Antes da incubação com A2E	10 min	50 e 500	DMEM/F12 + 1% SFB
	4 h	50 e 500	DMEM/F12 + 1% SFB
	24 h	50	DMEM/F12 + 1% SFB
Depois da incubação	6 h	50 e 500	DMEM/F12 + 1% SFB

com A2E	24 h	50	DMEM/F12 + 1% SFB
Durante a irradiação	30 min	50 e 500	PBS

Os resultados obtidos foram agrupados por pigmento e apresentam a viabilidade celular obtida nas diversas condições experimentais utilizadas, bem como, os resultados obtidos apenas para A2E em cada experimento para fins comparativos (Figura 54). Testes ANOVA/Tukey com um intervalo de confiança de 95% foram realizados para todos os experimentos e mostraram que independente da concentração, etapa de adição ou tempo de incubação utilizados não há diferença significativa (não apresentada) entre as amostras incubadas com pigmentos quando comparadas àquelas incubadas apenas com A2E. O ensaio MTT usa como princípio a atividade mitocondrial das células que é refletida na conversão do sal tetrazólio MTT em sal de formazan. Esse ensaio é baseado no envolvimento das mitocôndrias em tarefas como sinalização, diferenciação e morte celular. Entretanto, é um ensaio colorimétrico pouco específico além de ser menos preciso na detecção de alterações no número de células quando comparado a outros ensaios. Além disso, a presença de outros compostos químicos, utilizados no processo de incubação, pode gerar interferências nos resultados. Sendo assim, devido a baixa capacidade do ensaio em detectar pequenas alterações na viabilidade celular, foi necessário usar outras abordagens experimentais para verificação dos efeitos dos pigmentos naturais no sistema modelo escolhido.

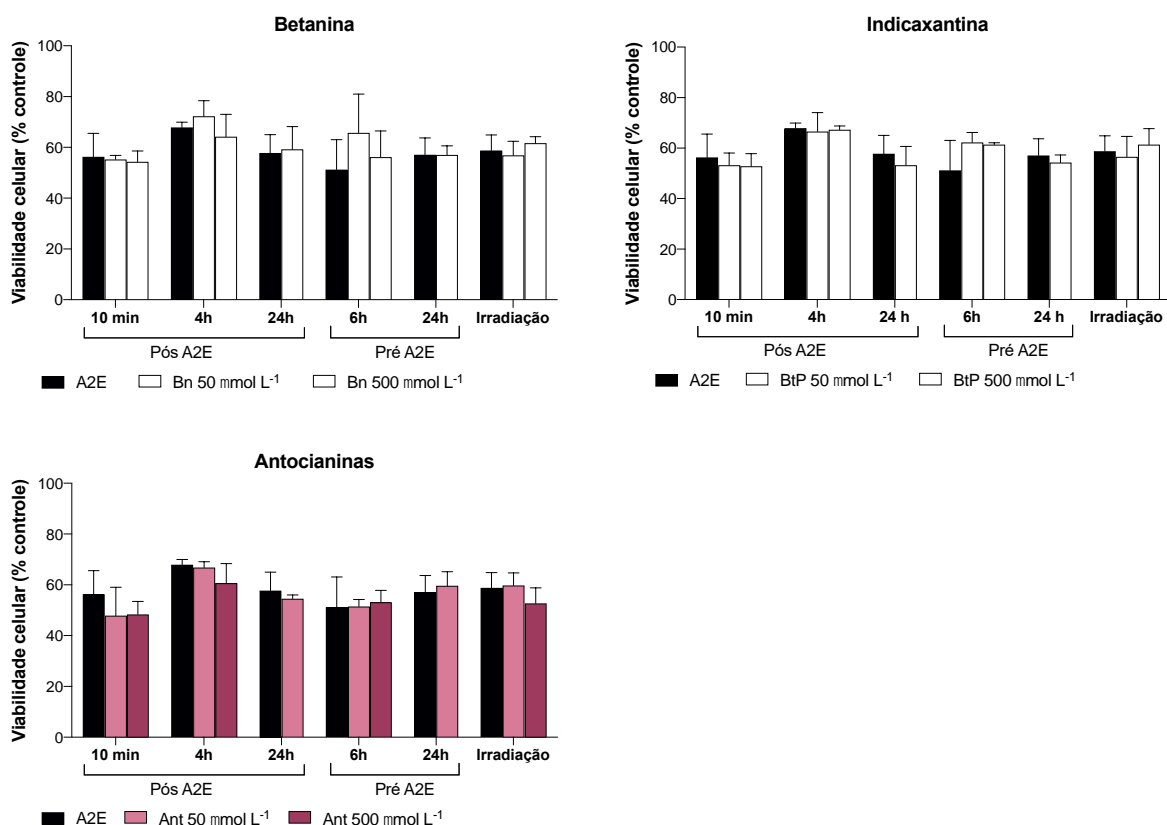


Figura 54. Viabilidade de células ARPE-19 incubadas com DMEM/F12/10% SFB (controle), betanina (Bn), indicaxantina (BtP) ou antocianinas (Ant) e submetidas a irradiação com luz azul (115 J cm^{-2}). O tratamento com pigmentos naturais foi realizado utilizando nas condições explicitadas na Tabela 15.

A limitação do método MTT para determinar os efeitos mais sutis da irradiação sobre as células nos levou a analisar o efeito dos pigmentos sobre a genotoxicidade do A2E, que foi decrita por Sparrow e colaboradores.^{157,174} A fotossensibilização de A2E promove o dano oxidativo no DNA das células do RPE com a formação de espécies como 8-oxo-guanina contribuindo assim para a aceleração de sua senescência.^{157,174} O ensaio Cometa é um método capaz de medir a quebra de fitas-simples de DNA em células eucarióticas e é amplamente utilizado nos estudos de dano e reparo de DNA. A capacidade dos pigmentos naturais em prevenir ou reparar o dano no DNA foi analisada utilizando o ensaio Cometa. A2E ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi incubando por 2 h em DMEM/F12 contendo 1% SFB e, em seguida, o meio de cultura foi substituído por PBS contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Bn, BtP ou Ant. A placa foi irradiada

utilizando uma dose de luz azul $34,5 \text{ J cm}^{-2}$ e deu-se prosseguimento ao protocolo do ensaio Cometa com colaboração do prof. Dr. Fabio Forti e da doutoranda Jessica Farias. O protocolo utilizado foi baseado na metodologia descrita por Sparrow et. al onde o composto protetor era incubado no momento da irradiação, isto é, quando as espécies reativas de oxigênio são geradas.

Os resultados foram obtidos após 30 min e 4 h da etapa de irradiação e graficados em função do momento de cauda para cada condição (Figura 55). O momento de cauda é definido como o produto do comprimento da cauda e da fração do DNA total na cauda e foi calculado automaticamente pelo software Komet 6.0 utilizando uma média para as 50 células selecionadas para medição. Controles negativos foram realizados no escuro com ARPE-19 sem nenhum tipo de tratamento e na presença de A2E/pigmento e mostraram a não-toxicidade deste sistema na ausência de luz. Controles positivos foram realizados a partir de irradiação com luz ultravioleta (UVC, 6 J m^{-2}) e apresentaram dano ao DNA após 30 min e reparo após 4 h.

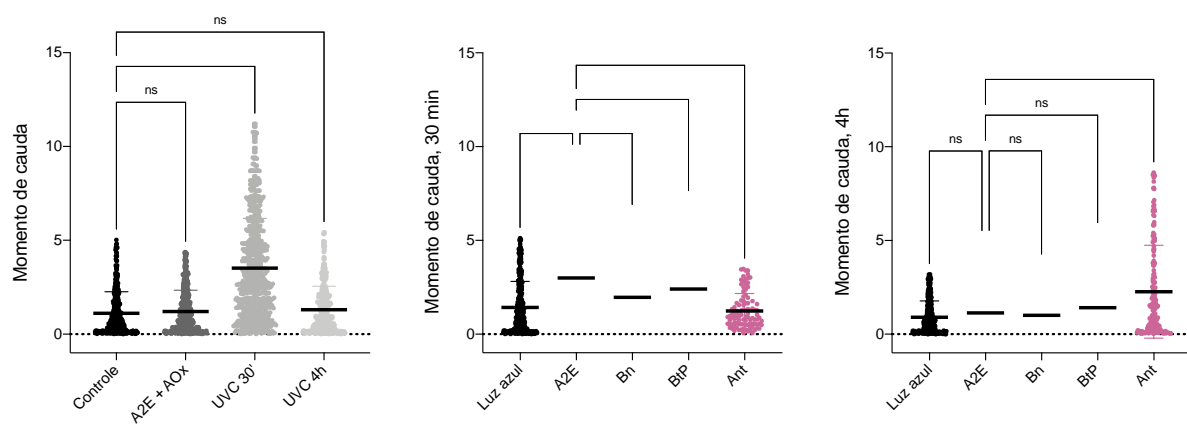


Figura 55. Momento de cauda de DNA obtidos no ensaio Cometa para controles positivos e negativos e para amostras submetidas à A2E na presença e ausência de pigmento ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) após 30 min ou 4 h da etapa de irradiação.

As células incubadas com A2E apresentaram um maior momento de cauda do DNA quando comparadas ao controle de células submetidas apenas à irradiação com luz azul após 30 min da irradiação. Na presença de Bn e BtP é notável um momento de cauda de menor

magnitude quando comparados a A2E. Enquanto Ant apresentou média do momento de cauda igual à do controle obtido com luz azul tendo sido capaz de evitar ou reverter o dano no DNA causado por A2E após 30 min da etapa de irradiação. O reparo do dano no DNA foi analisado a partir do momento de cauda obtido para as amostras após 4 h da etapa de irradiação com luz azul. Células incubadas com A2E, A2E/Bn e A2E/BtP tiveram o DNA reparado apresentando momento de cauda equivalente ao controle, enquanto células incubadas A2E/Ant apresentaram um momento de cauda significativamente maior do que àquele observado no controle e para o mesmo tratamento após 30 min da etapa de irradiação.

Os resultados mostram que o momento de cauda relacionado a lesões no DNA foi reduzido na presença dos três pigmentos testados após 30 min da etapa de irradiação. A porcentagem de redução é de 38% para Bn, 24% para BtP e de 61% para Ant. Esses resultados indicam o potencial desses compostos para proteção de células da retina submetidas ao estresse oxidativo fotoinduzido por A2E. O momento de cauda do DNA também foi analisado após 4 h da etapa de irradiação para verificar a capacidade de reparo do DNA. Percebe-se que não há diferença significativa entre as amostras submetidas à luz azul, A2E, e A2E na presença de Bn ou BtP, mostrando a capacidade dessas células em promover o reparo necessário para retornar a homeostase celular. Para Ant percebeu-se um aumento no momento de cauda após 4 h da etapa de irradiação o que diverge dos resultados obtidos após 30 min, onde a fragmentação do DNA se manteve similar ao controle com luz azul.

1-4.8. Conclusões

Betanina e indicaxantina são antioxidantes coloridos e foram testadas pela primeira vez no combate ao estresse oxidativo gerado por A2E. Os experimentos também foram realizados com cianidina-3-glucosídeo, e os resultados *in vitro* mostraram a capacidade desses três compostos em proteger A2E da foto-oxidação provocada por luz azul, restringindo também a formação de produtos oxidados de alta toxicidade. Esse aumento progressivo de A2E intacto coincide com o aumento da concentração dos pigmentos naturais no estudo. O dano no DNA de células ARPE-19 causado pela iluminação de A2E é reparado após 4 h da etapa de irradiação. Na presença das betalaínas estudadas, um menor dano é observado indicando a capacidade desses compostos em agir na prevenção, retardamento ou reparo do dano ao DNA. Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desses compostos nesse sistema, visto que os ensaios cometas não fornecem informações mais específicas. Os experimentos realizados utilizando o ensaio MTT não foram eficientes para demonstrar a ação dos pigmentos evidenciando assim, uma limitação desse procedimento no sistema modelo escolhido, cuja alterações em nível celular devem ser analisadas por um método mais específico.

1-4.9. Parte experimental

1-4.10. Reagentes e solventes

DMSO (Merck, HPLC grade $\geq 99.7\%$), etanolamina (ACS reagent, $\geq 99\%$), all trans-retinal ($\geq 98\%$), ácido acético (ACS, $\geq 99.7\%$), ácido fórmico (reagent grade, $\geq 95\%$), ácido trifluoroacético ($\geq 99\%$), cloreto de sódio ($\geq 99,5\%$), cloreto de potássio ($\geq 99\%$), fosfato de sódio dibásico ($\geq 99\%$), fosfato de sódio monobásico ($\geq 99\%$), fosfato de potássio monobásico ($\geq 99\%$), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, 98%), HEPES ($\geq 99,5\%$). DMEM/F12, solução de tripsina/EDTA (0,25% m/v com EDTA $5,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), solução penicilina-estreptomicina (10.000 U mL^{-1}), Trypan Blue e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos estéreis na ThermoFisher. Ácido clorídrico concentrado (HCl, Synth, 36,5-38%), hidróxido de sódio (NaOH, Merck) e hidróxido de amônio (NH_4OH , Merck, 27%) foram utilizados para ajuste do pH ou hidrólise quando necessários.

1-4.11. Síntese, extração e purificação

1-4.11.1 A2E

Trans retinal ($352 \mu\text{mol}$, 100 mg) e etanolamina ($155 \mu\text{mol}$, $9,4 \mu\text{L}$) foram solubilizados em etanol anidro (3 mL) na presença de ácido acético ($155 \mu\text{mol}$, $8,9 \mu\text{L}$). A reação foi mantida sob agitação, no escuro e selada à temperatura ambiente por 3 dias. A mistura foi concentrada a vácuo à temperatura ambiente e o resíduo foi purificado usando em equipamento HPLC Prominence Shimadzu com detector PDA (254 e 430 nm). A etapa de purificação foi conduzida à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ usando uma coluna C18 Kinetex (Phenomenex, $100 \times 4,60 \text{ mm}$, $2,6 \mu\text{m}$) empregando as seguintes condições de fase móvel: 75 – 95% B em 30 min, 95% B in 10 min (solvente A: água MilliQ com 0,1% TFA; solvente B: metanol). A2E foi coletado aos 30 min e o solvente evaporado a partir do uso de evaporação sob pressão reduzida com Rotavapor Büchi e um

liofilizador (Labconco Freezone, vácuo a 0,090 mbar). A amostra seca foi solubilizada em DMSO e sua concentração determinada pelo espectro de absorção UV-Vis ($\epsilon_{439\text{ nm}} = 36,900\text{ mol}^{-1}\text{ L cm}^{-1}$ em etanol) ⁴¹ usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-2600. A amostra purificada foi caracterizada por HRMS-ESI(+) através de infusão direta e por ¹H-RMN.

1-4.11.2 Pigmentos naturais antioxidantes

As sínteses e preparações dos antioxidantes naturais utilizados nos experimentos deste Capítulo estão descritas de forma detalhada no Capítulo I dessa Tese. As amostras purificadas foram caracterizadas por HPLC-MS/ESI(+) utilizando um HPLC Shimadzu acoplado à um q-ToF Maxis 3G Bruker Daltonics e/ou por ¹H-RMN.

1-4.12. Métodos de caracterização

1-4.12.1 Espectroscopia de absorção molecular

Espectros de absorção foram adquiridos na região de 200 a 800 nm em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50 ou em um equipamento Shimadzu UV 1800.

1-4.12.2 Espectrometria de massas de alta resolução

Os experimentos foram conduzidos em um espectrômetro de massas Bruker Maxis Plus QTOF e os dados foram coletados no modo de alta resolução. Uma calibração externa com formato de sódio (10 mmol L^{-1}) foi realizada no início de cada experimento. E as seguintes condições foram utilizadas: fonte de ionização com sonda electrospray ajustada com potencial capilar de 4,5 kV, energia de colisão de 30 eV, pressão do gás nebulizador de 0,4 bar, fluxo de gás de secagem de $4,0\text{ L min}^{-1}$ e temperatura da fonte de 210 °C. As amostras foram introduzidas no espectrofotômetro através de infusão direta a um fluxo constante de 3 mL min^{-1} e os resultados adquiridos foram tratados com a utilização do programa Compass Data

Analysis. Quando necessário, foi calculado o erro experimental (ppm) utilizando a equação mostrada abaixo.

$$Erro = \frac{x_o - x_t}{x_t} \times 10^6$$

Onde x_o é valor experimental observado e x_t é o valor teórico.

1-4.12.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de RMN de ¹H foram adquiridos em um equipamento Bruker AIII 500 MHz equipado com uma sonda de 5 mm TXI. Os dados experimentais para A2E foram obtidos em metanol-OD e tratados utilizando o software MestreNova a partir do sinal de decaimento de indução livre (FID).

1-4.13. Estudo da interação entre A2E e pigmentos naturais

Para determinação do efeito da adição de pigmentos naturais nos espectros de emissão e absorção de A2E, a concentração de A2E foi mantida fixa na cubeta ($V_f = 500 \mu\text{L}$) em $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a partir da solução estoque de $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em etanol. A concentração dos pigmentos foi variada de $0,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a partir de uma solução estoque de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em água (pH 5). O ajuste do pH foi realizado com HCl 1 mol L^{-1} . As medidas de absorção e fluorescência foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm em um espectrofotômetro Varian Cary Bio 50 e em um espectrofluorímetro Varian Eclipse, respectivamente. Para cada concentração de Bn foram adquiridos espectros de absorção em uma faixa de varredura de 250 – 800 nm e espectros de emissão seguindo as seguintes condições: $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$, $f_{exc} = 20 \text{ nm}$, $f_{em} = 20 \text{ nm}$, tensão da fotomultiplicadora 600 V.

Tabela 16. Concentrações de pigmentos naturais utilizadas nos estudos de supressão de fluorescência de A2E

Número de equivalentes	Concentração final de pigmento (mol L⁻¹)
0,04	1,0 x 10 ⁻⁶
0,2	5,0 x 10 ⁻⁶
0,4	1,0 x 10 ⁻⁵
0,6	1,5 x 10 ⁻⁵
0,8	2,0 x 10 ⁻⁵

1-4.14. Cultura de células ARPE-19

1-4.14.1 Cultivo celular

Células do epitélio pigmentar da retina da linhagem ARPE-19 foram obtidas comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantidas em cultura à 37 °C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) foi utilizado como meio de cultura e suplementado com soro fetal bovino (SFB, 10% v/v), NaHCO₃ (1,2 g L⁻¹), HEPES (15 mmol L⁻¹), penicilina (100 µg mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg mL⁻¹). O meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias e ao atingir 90% de confluência as células foram repicadas utilizando Tripsina/EDTA (0,25% m/v), centrifugadas (1000 xg, 3 min) e condicionadas em um novo frasco de cultivo celular. ARPE-19 foi utilizada com passagens entre 8 e 25 para todos os experimentos.

1-4.15. Exposição de células ARPE-19 a A2E

Células ARPE-19 foram desaderidas das garrafas de cultivo (25 ou 75 cm²) utilizando

uma solução de Tripsina/EDTA (0,25% m/v) e, em seguida, homogeneizadas em meio DMEM/F12 completo. As células foram com contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer na presença Trypan Blue para diferenciação de células viáveis e inviáveis. Uma alíquota da suspensão de células foi adicionada entre a grade de contagem da câmara e a lamínula de forma a preencher todo o volume disponível e analisada por microscopia óptica. A concentração de células foi determinada utilizando a equação abaixo

$$C = \frac{N_c}{N_q} \times 10^4$$

onde C é a concentração de células (células mL⁻¹), N_c é o número de células contadas e N_q é o número de quadrantes.

Soluções de concentração igual a 1,25 x 10⁵ células mL⁻¹ foram utilizadas para depositá-las em placas estéreis de 96 poços (100 µL, 1,25 x 10⁴ células por poço). Após 24h, as células foram lavadas 1x com PBS pH 7,4 e incubadas com A2E em concentrações e por tempos de incubação especificados para cada experimento presente em Resultados e Discussões. Após etapa de incubação as células foram lavadas 1x com PBS pH 7,4 e mantidas no meio de cultura contendo 10% SFB para, em seguida, serem submetidas ao processo de irradiação. A Tabela 17 apresenta as concentrações de A2E, tempo de incubação, meio de incubação e fonte de irradiação utilizados nos experimentos.

1-4.16. Tratamento com pigmentos naturais

O efeito de Bn, BtP e Ant foi estudado utilizando três abordagens diferentes onde a etapa de tratamento com os pigmentos naturais foi variada. Foram testadas concentrações de 50 e/ou 500 µmol L⁻¹ para cada condição. Quando testados antes da etapa de incubação com A2E, os pigmentos foram incubados por 6 ou 24 h. Quando foram adicionados após a etapa de incubação com A2E, os compostos foram incubados por 10 min, 4 h ou 24 h. E, por último, ao

serem incubados durante o processo de irradiação, os pigmentos naturais ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) permaneceram por 30 min em contato com as células em uma solução de PBS. Independente da etapa de adição dos pigmentos naturais, soluções estoque desses compostos foram preparadas e utilizadas para o preparo de soluções de trabalho na concentração desejada e no meio escolhido para incubação. Os meios de cultura foram substituídos pelos meios de incubação em todos os casos e deu-se então prosseguimento ao procedimento experimental.

Tabela 17. Condições de incubação de A2E utilizadas nos ensaios com ARPE-19

Concentração de A2E ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Tempo de incubação (h)	Meio de incubação	Fonte de irradiação
0,1	6	DMEM	Philips Special Blue
1	6	DMEM	Philips Special Blue
5	6	DMEM	Philips Special Blue
10	6	DMEM	Philips Special Blue
25	6	DMEM	Philips Special Blue
5	2	DMEM/F12 + 1% SFB	LED Biolambda
10	2	DMEM/F12 + 1% SFB	LED Biolambda
20	2	DMEM/F12 + 1% SFB	LED Biolambda
35	2	DMEM/F12 + 1% SFB	LED Biolambda
50	2	DMEM/F12 + 1% SFB	LED Biolambda

1-4.17. Irradiação com luz azul

O processo de irradiação de células ARPE-19 com luz azul foi executado utilizando duas fontes de luz distintas. No primeiro, foram utilizadas duas lâmpadas de bilirrubina Philips Special Blue através de um filtro acrílico de 0,25 polegadas. A densidade do fluxo de fótons

fotossintético (PPFD) foi medida usando um sensor quântico LI-190SA (400 – 700) e foi mantida entre 118 e 130 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ para todos os experimentos. Durante o tempo de irradiação, a temperatura foi mantida constante a 25 ± 2 °C e o tempo de irradiação variou para cada experimento, conforme especificado nos Resultados e Discussão. Na segunda configuração experimental, a irradiação foi feita através de um irradiador BioLambda equipado com LED ($\lambda_{\text{max}} = 450$ nm) acoplado à uma ThermoBox responsável por manter a temperatura em 37 °C durante o período de irradiação. As doses utilizadas foram calculadas a partir da equação mostrada abaixo e encontram-se na Tabela 18 junto com a potência do LED e os tempos de irradiação utilizados.

$$D = \frac{P}{A} \times t$$

onde D é a dose obtida em J cm^{-2} , P é a potência em mW, A é área do detector e t o tempo de irradiação (s)

O tempo de irradiação foi mantido constante em 30 min para os experimentos realizados com as diferentes doses de luz azul através do irradiador LED BioLambda. A dose de luz foi variada através da variação da potência e a temperatura foi mantida a 37 °C para todos os experimentos. Experimentos controle foram mantidos na estufa protegidos da luz pelo mesmo período que os experimentos irradiados.

Tabela 18. Condições de irradiação utilizadas nos experimentos de variação de dose de luz azul onde o tempo de irradiação foi mantido em 30 min

Condição	Dose (J cm^{-2})	P/A (mW cm^{-2})
1	28,75	15,97
2	57,50	31,94
3	115,85	64,36
4	173,80	96,55
5	231,70	128,72

1-4.18. Viabilidade celular, ensaio MTT

MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) foi pesado e solubilizado em PBS para preparo da solução estoque de concentração igual a 5 mg mL⁻¹. Soluções de trabalho contendo 10% v/v foram preparadas em DMEM/F12 contendo 1% SFB para uso imediato e adicionadas nos poços da placa de cultura (100 µL por poço) contendo células tratadas. Após incubação por 2h 30min à 37 ° C, o meio foi removido e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorção da solução roxa resultante foi medida em 570 e 600 nm com um leitor de placas Multiskan SkyHigh.

1-4.19. Genotoxicidade, ensaio cometa

Células ARPE-19 foram plaqueadas em uma placa de 24 poços estéril na concentração de $1,8 \times 10^5$ células por poço e após 24h tratadas com A2E (20 µmol L⁻¹, 2h, DMEM/F12 contendo 1% SFB). Em seguida, as células foram lavadas 1x com PBS, os AOx (50 mmol L⁻¹, PBS) foram adicionados aos poços de cultura e as placas irradiadas (34,5 J cm⁻², 30 min). Após o tratamento, as células foram removidas da placa por tripsinização e imediatamente misturadas com 0,5% (m/v) de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C. A mistura foi espalhada em lâminas de microscópio pré-tratadas com uma fina camada de 1,5% (m/v) de agarose; proteínas e membranas celulares foram removidas por incubação em solução de lise a 4°C por 24 horas. As lâminas foram expostas a tampão alcalino contendo 300 mmol L⁻¹ NaOH e 1 mmol L⁻¹ EDTA em água (pH > 13) por 30 min e submetidas à eletroforese (25 V cm⁻¹ e 300 mA por 30 min). Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (tampão Tris 0,4 mol L⁻¹, pH 7,5), secas e fixadas com etanol 99% por 5 min.¹⁹⁵ O núcleo da célula foi corado com brometo de etídio (20 µg mL⁻¹) e analisado com um microscópio de fluorescência (Olympus BX51, conjunto de filtro verde) usando o software Komet 6.0. Os resultados da fragmentação

do DNA foram expressos como o momento da cauda. Os momentos de cem caudas foram analisados em duplicata para cada grupo em um total de dois experimentos independentes. As células mantidas no escuro foram utilizadas como controle negativo enquanto células irradiadas com luz UVC (6 J m^{-2}) foram utilizadas como controle positivo.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

Conclusões

Nessa Tese de Doutorado foram apresentados os estudos sobre combinações de pigmentos naturais, efeito da luz na estabilidade betalaínas e uso de betalaínas no combate ao estresse foto-oxidativo causado por A2E em células da retina. No Capítulo 1 foram realizados os estudos de obtenção de pigmentos naturais da classe das betalaínas, antocianinas e carotenoides, cuja utilização se estendeu em outros capítulos. Esses compostos foram combinados a partir de vesículas unilamelares de DMPC de forma a gerar amostras coloridas que absorvem entre 350 e 650 nm e cuja cor pode ser modulada em função da concentração dos pigmentos utilizados. Além disso, essas vesículas contendo pigmentos naturais também possuem capacidade antioxidante apreciável. No Capítulo 2 foram realizados os estudos de degradação induzida por luz de betanina e indicaxantina. Os resultados mostraram a maior susceptibilidade desses composto a degradação induzida por luz do que por temperatura no sistema estudado. Além disso, pela primeira vez os produtos de fotodegradação foram identificados por espectrometria de massas e o mecanismo de degradação proposto como um mecanismo radicalar autocatalítico. O Capítulo 3 apresenta os estudos realizados com A2E, o fotossensibilizador majoritário da lipofuscina da retina. Os resultados mostraram a capacidade das betalaínas estudadas em proteger A2E da oxidação fotoinduzida além de serem capazes de diminuir a genotoxicidade de A2E em células da retina.

Referências

- (1) Burdock, G. A. *Encyclopedia of Food and Color Additives*; CRC Press, 2014. <https://doi.org/10.1201/9781498711081>.
- (2) Branen, L. A. (University I. *Food Additives*; Taylor & Francis, 2005.
- (3) Benucci, I.; Lombardelli, C.; Mazzocchi, C.; Esti, M. Natural Colorants from Vegetable Food Waste: Recovery, Regulatory Aspects, and Stability—A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2022**, *21* (3), 2715–2737. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12951>.
- (4) de Mejia, E. G.; Zhang, Q.; Penta, K.; Eroglu, A.; Lila, M. A. The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2020**, *11* (1), 145–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051729>.
- (5) Nigg, J. T.; Lewis, K.; Edinger, T.; Falk, M. Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder or Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms, Restriction Diet, and Synthetic Food Color Additives. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **2012**, *51* (1), 86-97.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2011.10.015>.
- (6) Oplatowska-Stachowiak, M.; Elliott, C. T. Food Colors: Existing and Emerging Food Safety Concerns. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (3), 524–548. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.889652>.
- (7) Lucas, C. D.; Hallagan, J. B.; Taylor, S. L. The Role of Natural Color Additives in Food

Allergy; 2001; pp 195–216. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(01\)43005-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(01)43005-1).

- (8) Delgado-Vargas, F.; Jimenez, A. R.; Paredes-Lopez, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains--Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40* (3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>.
- (9) Alappat, B.; Alappat, J. Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics. *Molecules* **2020**, *25* (23), 5500. <https://doi.org/10.3390/molecules25235500>.
- (10) Pucker, B.; Singh, H. B.; Kumari, M.; Khan, M. I.; Brockington, S. F. The Report of Anthocyanins in the Betalain-Pigmented Genus *Hylocereus* Is Not Well Evidenced and Is Not a Strong Basis to Refute the Mutual Exclusion Paradigm. *BMC Plant Biol.* **2021**, *21* (1), 297. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03080-9>.
- (11) Stafford, H. A. Anthocyanins and Betalains: Evolution of the Mutually Exclusive Pathways. *Plant Sci.* **1994**, *101* (2), 91–98. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90244-5](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90244-5).
- (12) Kimler, L.; Mears, J.; Mabry, T. J.; Rösler, H. ON THE QUESTION OF THE MUTUAL EXCLUSIVENESS OF BETALAINS AND ANTHOCYANINS. *Taxon* **1970**, *19* (6), 875–878. <https://doi.org/10.2307/1218301>.
- (13) Tanaka, Y.; Sasaki, N.; Ohmiya, A. Biosynthesis of Plant Pigments: Anthocyanins, Betalains and Carotenoids. *Plant J.* **2008**, *54* (4), 733–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>.
- (14) Stintzing, F. C.; Carle, R. Functional Properties of Anthocyanins and Betalains in Plants, Food, and in Human Nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15* (1), 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.004>.
- (15) Sakuta, M. Diversity in Plant Red Pigments: Anthocyanins and Betacyanins. *Plant Biotechnol. Rep.* **2014**, *8* (1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0294-z>.

- (16) Castañeda-Ovando, A.; de Lourdes Pacheco-Hernández, M.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. Chemical Studies of Anthocyanins: A Review. *Food Chem.* **2009**, *113* (4), 859–871. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>.
- (17) Tena, N.; Martín, J.; Asuero, A. G. State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability, and Therapeutic Effect in Human Health. *Antioxidants* **2020**, *9* (5). <https://doi.org/10.3390/antiox9050451>.
- (18) Kalt, W.; Blumberg, J. B.; McDonald, J. E.; Vinqvist-Tymchuk, M. R.; Fillmore, S. A. E.; Graf, B. A.; O’Leary, J. M.; Milbury, P. E. Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (3), 705–712. <https://doi.org/10.1021/jf071998l>.
- (19) Kalt, W.; Cassidy, A.; Howard, L. R.; Krikorian, R.; Stull, A. J.; Tremblay, F.; Zamora-Ros, R. Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. *Adv. Nutr.* **2019**. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz065>.
- (20) Miyake, S.; Takahashi, N.; Sasaki, M.; Kobayashi, S.; Tsubota, K.; Ozawa, Y. Vision Preservation during Retinal Inflammation by Anthocyanin-Rich Bilberry Extract: Cellular and Molecular Mechanism. *Lab. Invest.* **2012**, *92* (1), 102–109. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.132>.
- (21) Lima, A. de J. B.; Corrêa, A. D.; Saczk, A. A.; Martins, M. P.; Castilho, R. O. Anthocyanins, Pigment Stability and Antioxidant Activity in Jabuticaba [*Myrciaria Cauliflora* (Mart.) O. Berg]. *Rev. Bras. Frutic.* **2011**, *33* (3), 877–887. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000300023>.
- (22) Rodrigues, S.; Fernandes, F. A. N.; de Brito, E. S.; Sousa, A. D.; Narain, N. Ultrasound Extraction of Phenolics and Anthocyanins from Jabuticaba Peel. *Ind. Crops Prod.* **2015**,

69, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.059>.

- (23) He, J.; Giusti, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, *1* (1), 163–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>.
- (24) Wrolstad, R. E.; Durst, R. W.; Lee, J. Tracking Color and Pigment Changes in Anthocyanin Products. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16* (9), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.019>.
- (25) Takeoka, G. R.; Dao, L.; Harden, L.; Pantoja, A.; Kuhl, J. C. Antioxidant Activity, Phenolic and Anthocyanin Contents of Various Rhubarb (*Rheum* Spp.) Varieties. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48* (1), 172–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03174.x>.
- (26) Einbond, L. S.; Reynertson, K. A.; Luo, X.-D.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J. Anthocyanin Antioxidants from Edible Fruits. *Food Chem.* **2004**, *84* (1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00162-6).
- (27) Kähkönen, M. P.; Heinonen, M. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (3), 628–633. <https://doi.org/10.1021/jf025551i>.
- (28) Quina, F. H. F. H.; BASTOS, E. L. E. L. Chemistry Inspired by the Colors of Fruits, Flowers and Wine. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2018**, *90* (1 suppl 1), 681–695. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170492>.
- (29) Kanner, J.; Harel, S.; Granit, R. Betalains - A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (11), 5178–5185. <https://doi.org/10.1021/jf010456f>.
- (30) Azeredo, H. M. C. Betalains: Properties, Sources, Applications, and Stability - A Review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44* (12), 2365–2376.

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>.
- (31) Stintzing, F. C.; Conrad, J.; Klaiber, I.; Beifuss, U.; Carle, R. Structural Investigations on Betacyanin Pigments by LC NMR and 2D NMR Spectroscopy. *Phytochemistry* **2004**, *65* (4), 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.029>.
- (32) Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. Colorant Properties and Stability of Amaranthus Betacyanin Pigments. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (11), 4491–4495. <https://doi.org/10.1021/jf980457g>.
- (33) Trezzini, G. F.; Zrýb, J. P. Characterization of Some Natural and Semi-Synthetic Betaxanthins. *Phytochemistry* **1991**, *30* (6), 1901–1903. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85036-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85036-Y).
- (34) Stintzing, F. C.; Carle, R. Betalains – Emerging Prospects for Food Scientists. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18* (10), 514–525. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.012>.
- (35) Esatbeyoglu, T.; Wagner, A. E.; Schini-Kerth, V. B.; Rimbach, G. Betanin-A Food Colorant with Biological Activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59* (1), 36–47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400484>.
- (36) da Silva, D. V. T.; dos Santos Baião, D.; de Oliveira Silva, F.; Alves, G.; Perrone, D.; Del Aguila, E. M.; Flosi Paschoalin, V. M. Betanin, a Natural Food Additive: Stability, Bioavailability, Antioxidant and Preservative Ability Assessments. *Molecules* **2019**, *24* (3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030458>.
- (37) Allegra, M.; Ianaro, A.; Tersigni, M.; Panza, E.; Tesoriere, L.; Livrea, M. A. Indicaxanthin from Cactus Pear Fruit Exerts Anti-Inflammatory Effects in Carrageenin-Induced Rat Pleurisy. *J. Nutr.* **2014**, *144* (2), 185–192. <https://doi.org/10.3945/jn.113.183657>.
- (38) Piattelli, M.; Minale, L.; Prota, G. Isolation, Structure and Absolute Configuration of

- Indicaxanthin. **1964**, *20* (1955), 2325–2329. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)97621-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)97621-5).
- (39) Impellizzeri, G.; Piattelli, M. Biosynthesis of Indicaxanthin in *Opuntia Ficus-Indica* Fruits. *Phytochemistry* **1972**, *11* (8), 2499–2502. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88524-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88524-6).
- (40) Mortensen, A. Carotenoids and Other Pigments as Natural Colorants. *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78* (8), 1477–1491. <https://doi.org/10.1351/pac200678081477>.
- (41) Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant Activity of Carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24* (6), 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X).
- (42) Hirschberg, J. Carotenoid Biosynthesis in Flowering Plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4* (3), 210–218. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00163-1).
- (43) Frank, H. A.; Cogdell, R. J. Carotenoids in Photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63* (3), 257–264.
- (44) *The Photochemistry of Carotenoids*; Frank, H. A., Young, A. J., Britton, G., Cogdell, R. J., Eds.; Advances in Photosynthesis and Respiration; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 2004; Vol. 8. <https://doi.org/10.1007/0-306-48209-6>.
- (45) Santabarbara, S.; Agostini, A.; Casazza, A. P.; Zucchelli, G.; Carbonera, D. Carotenoid Triplet States in Photosystem II: Coupling with Low-Energy States of the Core Complex. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2015**, *1847* (2), 262–275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.11.008>.
- (46) Maoka, T. Carotenoids as Natural Functional Pigments. *J. Nat. Med.* **2020**, *74* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>.
- (47) Vishnevetsky, M. Carotenoid Sequestration in Plants: The Role of Carotenoid-Associated Proteins. *Trends Plant Sci.* **1999**, *4* (6), 232–235. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01414-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01414-4).

- (48) Cazzonelli, C. I. Carotenoids in Nature: Insights from Plants and Beyond. *Funct. Plant Biol.* **2011**, 38 (11), 833. <https://doi.org/10.1071/FP111192>.
- (49) Havaux, M. Carotenoid Oxidation Products as Stress Signals in Plants. *Plant J.* **2014**, 79 (4), 597–606. <https://doi.org/10.1111/tpj.12386>.
- (50) Fiedor, J.; Burda, K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* **2014**, 6 (2), 466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.
- (51) Zhang, L.-X.; Cooney, R. V.; Bertram, J. S. Carotenoids Enhance Gap Junctional Communication and Inhibit Lipid Peroxidation in C3H/10T1/2 Cells: Relationship to Their Cancer Chemopreventive Action. *Carcinogenesis* **1991**, 12 (11), 2109–2114. <https://doi.org/10.1093/carcin/12.11.2109>.
- (52) Mortensen, A.; Skibsted, L. H. Importance of Carotenoid Structure in Radical-Scavenging Reactions. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45 (8), 2970–2977. <https://doi.org/10.1021/jf970010s>.
- (53) Wybraniec, S.; Nowak-Wydra, B.; Mizrahi, Y. ¹H and ¹³C NMR Spectroscopic Structural Elucidation of New Decarboxylated Betacyanins. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (11), 1725–1728. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.01.046>.
- (54) Guimond, N.; Mayer, P.; Trauner, D. Development of an Iron(II)-Catalyzed Aerobic Catechol Cleavage and Biomimetic Synthesis of Betanidin. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, 20 (31), 9519–9523. <https://doi.org/10.1002/chem.201403436>.
- (55) Pagano, A. P. E. Efeito de Interações Intermoleculares Sobre as Propriedades Fotofísicas de Betalaínas, Universidade de São Paulo, 2017.
- (56) Steiner, U.; Schliemann, W.; B??hm, H.; Strack, D. Tyrosinase Involved in Betalain Biosynthesis of Higher Plants. *Planta* **1999**, 208 (1), 114–124. <https://doi.org/10.1007/s004250050541>.

- (57) Schliemann, W.; Kobayashi, N.; Strack, D. The Decisive Step in Betaxanthin Biosynthesis Is a Spontaneous Reaction1. *Plant Physiol.* **1999**, *119* (4), 1217–1232. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1217>.
- (58) Stintzing, F. C.; Kugler, F.; Carle, R.; Conrad, J. First ¹³C-NMR Assignments of Betaxanthins. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89* (5), 1008–1016. <https://doi.org/10.1002/hlca.200690077>.
- (59) Wang, E.; Yin, Y.; Xu, C.; Liu, J. Isolation of High-Purity Anthocyanin Mixtures and Monomers from Blueberries Using Combined Chromatographic Techniques. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1327*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.070>.
- (60) Sánchez-Ilárduya, M. B.; Sánchez-Fernández, C.; Vilorio-Bernal, M.; López-Márquez, D. M.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F. Mass Spectrometry Fragmentation Pattern of Coloured Flavanol-Anthocyanin and Anthocyanin-Flavanol Derivatives in Aged Red Wines of Rioja. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2012**, *18* (2), 203–214. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00190.x>.
- (61) Delazar, A.; Khodaie, L.; Afshar, J.; Nahar, L.; Sarker, S. Isolation and Free-Radical-Scavenging Properties of Cyanidin 3-O-Glycosides from the Fruits of *Ribes Biebersteinii* Berl. *Acta Pharm.* **2010**, *60* (1), 1–11. <https://doi.org/10.2478/v10007-010-0007-x>.
- (62) Hojnik, M.; Škerget, M.; Knez, Ž. Extraction of Lutein from Marigold Flower Petals – Experimental Kinetics and Modelling. *LWT - Food Sci. Technol.* **2008**, *41* (10), 2008–2016. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2007.11.017>.
- (63) Lin, J.-H. Lutein Production from Biomass: Marigold Flowers versus Microalgae. *Bioresour. Technol.* **2015**, *184*, 421–428. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.09.099>.
- (64) Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D. B.; Godoy, H. T. Assessment of the Saponification

- Step in the Quantitative Determination of Carotenoids and Provitamins A. *Food Chem.* **1990**, *35* (3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90032-Y](https://doi.org/10.1016/0308-8146(90)90032-Y).
- (65) Khachik, F.; Chang, A.-N. Total Synthesis of (3R,3'R,6'R)-Lutein and Its Stereoisomers. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (10), 3875–3885. <https://doi.org/10.1021/jo900432r>.
- (66) Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- (67) Gulsen, D.; Li, C.-C.; Chauhan, A. Dispersion of DMPC Liposomes in Contact Lenses for Ophthalmic Drug Delivery. *Curr. Eye Res.* **2005**, *30* (12), 1071–1080. <https://doi.org/10.1080/02713680500346633>.
- (68) Prabhu, S.; Ortega, M.; Ma, C. Novel Lipid-Based Formulations Enhancing the in Vitro Dissolution and Permeability Characteristics of a Poorly Water-Soluble Model Drug, Piroxicam. *Int. J. Pharm.* **2005**, *301* (1–2), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.032>.
- (69) Zylberberg, C.; Matosevic, S. Pharmaceutical Liposomal Drug Delivery: A Review of New Delivery Systems and a Look at the Regulatory Landscape. *Drug Deliv.* **2016**, *23* (9), 3319–3329. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>.
- (70) Has, C.; Sunthar, P. A Comprehensive Review on Recent Preparation Techniques of Liposomes. *J. Liposome Res.* **2020**, *30* (4), 336–365. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>.
- (71) Patil, Y. P.; Jadhav, S. Novel Methods for Liposome Preparation. *Chem. Phys. Lipids* **2014**, *177*, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>.
- (72) Elkholy, N. S.; Shafaa, M. W.; Mohammed, H. S. Biophysical Characterization of Lutein

or Beta Carotene-Loaded Cationic Liposomes. *RSC Adv.* **2020**, *10* (54), 32409–32422.

<https://doi.org/10.1039/d0ra05683a>.

- (73) Trouillas, P.; Sancho-García, J. C.; De Freitas, V.; Gierschner, J.; Otyepka, M.; Dangles, O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (9), 4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>.
- (74) Girod, P.-A.; Zryd, J.-P. Biogenesis of Betalains: Purification and Partial Characterization of Dopa 4,5-Dioxygenase from *Amanita Muscaria*. *Phytochemistry* **1991**, *30* (1), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84119-D](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84119-D).
- (75) Wyler, H.; Dreiding, A. S. Deuterierung von Betanidin Und Indicaxanthin, (E/Z)-Stereoisomerie in Betalainen. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67* (7), 1793–1800. <https://doi.org/10.1002/hlca.19840670717>.
- (76) Ahmadiani, N.; Robbins, R. J.; Collins, T. M.; Giusti, M. M. Molar Absorptivity (ϵ) and Spectral Characteristics of Cyanidin-Based Anthocyanins from Red Cabbage. *Food Chem.* **2016**, *197*, 900–906. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.032>.
- (77) Brouillard, R.; Lang, J. The Hemiacetal–Cis -Chalcone Equilibrium of Malvin, a Natural Anthocyanin. *Can. J. Chem.* **1990**, *68* (5), 755–761. <https://doi.org/10.1139/v90-119>.
- (78) Bowen-Forbes, C. S.; Zhang, Y.; Nair, M. G. Anthocyanin Content, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anticancer Properties of Blackberry and Raspberry Fruits. *J. Food Compos. Anal.* **2010**, *23* (6), 554–560. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.012>.
- (79) Pina, F.; Melo, M. J.; Laia, C. A. T.; Parola, A. J.; Lima, J. C. Chemistry and Applications of Flavylium Compounds: A Handful of Colours. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (2), 869–908. <https://doi.org/10.1039/C1CS15126F>.
- (80) Grohmann, F. L.; Csemesz, F.; Szögyi, M. Stabilization of Small Unilamellar DMPC-Liposomes by Uncharged Polymers. *Colloid Polym. Sci.* **1998**, *276* (1), 66–71.

<https://doi.org/10.1007/s003960050210>.

- (81) Moreira, P. F.; Giestas, L.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L.; Lima, J. C. Ground- and Excited-State Proton Transfer in Anthocyanins: From Weak Acids to Superphotoacids. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107* (21), 4203–4210. <https://doi.org/10.1021/jp027260i>.
- (82) Wendel, M.; Nizinski, S.; Tuwalska, D.; Starzak, K.; Szot, D.; Prukala, D.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G. Time-Resolved Spectroscopy of the Singlet Excited State of Betanin in Aqueous and Alcoholic Solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (27), 18152–18158. <https://doi.org/10.1039/c5cp00684h>.
- (83) Wendel, M.; Szot, D.; Starzak, K.; Tuwalska, D.; Prukala, D.; Pedzinski, T.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G. Photophysical Properties of Indicaxanthin in Aqueous and Alcoholic Solutions. *Dye. Pigment.* **2015**, *113*, 634–639. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.09.036>.
- (84) Brouwer, A. M. Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (12), 2213–2228. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>.
- (85) Freitas-Dörr, B. C.; Machado, C. O.; Pinheiro, A. C.; Fernandes, A. B.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Lopes-Ferreira, M.; Abdellah, M.; Sá, J.; Russo, L. C.; et al. A Metal-Free Blue Chromophore Derived from Plant Pigments. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (14), eaaz0421. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz0421>.
- (86) Gonçalves, L. C. P. Betalaínas: Semissíntese, Capacidade Antirradicalar e Aplicação Como Sondas Em Sistemas Biológicos, Universidade Federal do ABC, 2012.
- (87) Miller, N. J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. A. Antioxidant Activities of Carotenes and Xanthophylls. *FEBS Lett.* **1996**, *384* (3), 240–

242. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00323-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00323-7).

- (88) Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Betalain Stability and Degradation - Structural and Chromatic Aspects. *J. Food Sci.* **2006**, *71* (4), 41–50. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x>.
- (89) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26* (9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- (90) HAN, D.; KIM, S. J.; KIM, S. H.; KIM, D. M. Repeated Regeneration of Degraded Red Beet Juice Pigments in the Presence of Antioxidants. *J. Food Sci.* **1998**, *63* (1), 69–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15678.x>.
- (91) Sutor-świeży, K.; Antonik, M.; Proszek, J.; Nemzer, B.; Pietrzkowski, Z.; Popena, Ł.; Świergosz, T.; Wybraniec, S. Dehydrogenation of Betacyanins in Heated Betalain-Rich Extracts of Red Beet (*Beta Vulgaris* L.). *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031245>.
- (92) ELBE, J. H.; MAING, I.-Y.; AMUNDSON, C. H. COLOR STABILITY OF BETANIN. *J. Food Sci.* **1974**, *39* (2), 334–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb02888.x>.
- (93) Wybraniec, S.; Michałowski, T. New Pathways of Betanidin and Betanin Enzymatic Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (17), 9612–9622. <https://doi.org/10.1021/jf2020107>.
- (94) Wybraniec, S.; Starzak, K.; Skopińska, A.; Szaleniec, M.; Słupski, J.; Mitka, K.; Kowalski, P.; Michałowski, T. Effects of Metal Cations on Betanin Stability in Aqueous-Organic Solutions. *Food Sci. Biotechnol.* **2013**, *22* (2), 353–363. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0088-7>.
- (95) Miyagawa, Y.; Fujita, H.; Adachi, S. Kinetic Analysis of Thermal Degradation of

- Betanin at Various PH Values Using Deconvolution Method. *Food Chem.* **2021**, *361* (March), 130165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130165>.
- (96) Esteves, L. C.; Pinheiro, A. C.; Pioli, R. M.; Penna, T. C.; Baader, W. J.; Correra, T. C.; Bastos, E. L. Revisiting the Mechanism of Hydrolysis of Betanin. *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94* (5), 853–864. <https://doi.org/10.1111/php.12897>.
- (97) SIMON, P.; DRDAK, M.; ALTAMIRANO, R. Influence of Water Activity on the Stability of Betanin in Various Water/Alcohol Model Systems. *Food Chem.* **1993**, *46* (2), 155–158. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90029-F](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90029-F).
- (98) Quina, F. H.; Moreira, P. F.; Vautier-Giongo, C.; Rettori, D.; Rodrigues, R. F.; Freitas, A. A.; Silva, P. F.; Maçanita, A. L. Photochemistry of Anthocyanins and Their Biological Role in Plant Tissues. *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81* (9), 1687–1694. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-08-09-28>.
- (99) Blandamer, M. J.; Engberts, J. B. F. N.; Gleeson, P. T.; Reis, J. C. R. Activity of Water in Aqueous Systems; A Frequently Neglected Property. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (5), 440. <https://doi.org/10.1039/b400473f>.
- (100) Pagano, A. P. E.; Khalid, N.; Kobayashi, I.; Nakajima, M.; Neves, M. A.; Bastos, E. L. Microencapsulation of Betanin in Monodisperse W/O/W Emulsions. *Food Res. Int.* **2018**, *109*, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.053>.
- (101) Gandía-Herrero, F.; Cabanes, J.; Escribano, J.; García-Carmona, F.; Jiménez-Atiénzar, M. Encapsulation of the Most Potent Antioxidant Betalains in Edible Matrixes as Powders of Different Colors. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (18), 4294–4302. <https://doi.org/10.1021/jf400337g>.
- (102) Wybraniec, S. Formation of Decarboxylated Betacyanins in Heated Purified Betacyanin Fractions from Red Beet Root (*Beta Vulgaris* L.) Monitored by LC-MS/MS. *J. Agric.*

Food Chem. **2005**, 53 (9), 3483–3487. <https://doi.org/10.1021/jf048088d>.

- (103) SAPERS, G. M.; HORNSTEIN, J. S. VARIETAL DIFFERENCES IN COLORANT PROPERTIES AND STABILITY OF RED BEET PIGMENTS. *J. Food Sci.* **1979**, 44 (4), 1245–1248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb03490.x>.
- (104) Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Impact of Thermal Treatment on Color and Pigment Pattern of Red Beet (*Beta Vulgaris* L.) Preparations. *J. Food Sci.* **2006**, 69 (6), C491–C498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10994.x>.
- (105) SINGER, J. W.; ELBE, J. H. DEGRADATION RATES OF VULGAXANTHINE I. *J. Food Sci.* **1980**, 45 (3), 489–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb04082.x>.
- (106) ATTOE, E. L.; VON ELBE, J. H. Photochemical Degradation of Betanine and Selected Anthocyanins. *J. Food Sci.* **1981**, 46 (6), 1934–1937. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04522.x>.
- (107) BILYK, A.; KOLODIJ, M. A.; SAPERS, G. M. Stabilization of Red Beet Pigments with Isoascorbic Acid. *J. Food Sci.* **1981**, 46 (5), 1616–1617. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04233.x>.
- (108) Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Betalain Stability and Degradation - Structural and Chromatic Aspects. *J. Food Sci.* **2006**, 71 (4), 41–50. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x>.
- (109) Attoe, E. L.; von Elbe, J. H. Degradation Kinetics of Betanine in Solutions As Influenced by Oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30 (4), 708–712. <https://doi.org/10.1021/jf00112a021>.
- (110) von Elbe, J. H.; Attoe, E. L. Oxygen Involvement in Betanine Degradation—Measurement of Active Oxygen Species and Oxidation Reduction Potentials. *Food Chem.* **1985**, 16 (1), 49–67. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(85\)90019-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(85)90019-6).
- (111) PASCH, J. H.; von ELBE, J. H. Betanine Stability in Buffered Solutions Containing

- Organic Acids, Metal Cations, Antioxidants, or Sequestrants. *J. Food Sci.* **1979**, *44* (1), 72–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb10007.x>.
- (112) Herbach, K. M.; Rohe, M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Structural and Chromatic Stability of Purple Pitaya (*Hylocereus Polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) Betacyanins as Affected by the Juice Matrix and Selected Additives. *Food Res. Int.* **2006**, *39* (6), 667–677. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.004>.
- (113) Moßhammer, M. R.; Rohe, M.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Stability of Yellow-Orange Cactus Pear (*Opuntia Ficus-Indica* [L.] Mill. Cv. 'Gialla') Betalains as Affected by the Juice Matrix and Selected Food Additives. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *225* (1), 21–32. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0378-x>.
- (114) Logan, S. R. Arrhenius Activation Energy of Reactions That Are Almost Diffusion-Controlled. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **1977**, *73*, 592. <https://doi.org/10.1039/f19777300592>.
- (115) Gordon, S.; Hart, E. J.; Matheson, M. S.; Rabani, J.; Thomas, J. K. Reactions of the Hydrated Electron. *Discuss. Faraday Soc.* **1963**, *36*, 193. <https://doi.org/10.1039/df9633600193>.
- (116) North, A. M. Diffusion-Controlled Reactions. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1966**, *20* (3), 421. <https://doi.org/10.1039/qr9662000421>.
- (117) Elliot, A. J.; McCracken, D. R.; Buxton, G. V.; Wood, N. D. Estimation of Rate Constants for Near-Diffusion-Controlled Reactions in Water at High Temperatures. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, *86* (9), 1539. <https://doi.org/10.1039/ft9908601539>.
- (118) Jencks, W. P. General Acid-Base Catalysis of Complex Reactions in Water. *Chem. Rev.* **1972**, *72* (6), 705–718. <https://doi.org/10.1021/cr60280a004>.
- (119) Baptista, M. S.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; Ghogare, A. A.; Greer, A.; Hamblin, M. R.;

- Lorente, C.; Nunez, S. C.; Ribeiro, M. S.; Thomas, A. H.; et al. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93* (4), 912–919. <https://doi.org/10.1111/php.12716>.
- (120) Wendel, M.; Nizinski, S.; Tuwalska, D.; Starzak, K.; Szot, D.; Prukala, D.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G. Time-Resolved Spectroscopy of the Singlet Excited State of Betanin in Aqueous and Alcoholic Solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (27), 18152–18158. <https://doi.org/10.1039/C5CP00684H>.
- (121) Niziński, S.; Wendel, M.; Rode, M. F.; Prukala, D.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdziński, G. Photophysical Properties of Betaxanthins: Miraxanthin V – Insight into the Excited-State Deactivation Mechanism from Experiment and Computations. *RSC Adv.* **2017**, *7* (11), 6411–6421. <https://doi.org/10.1039/C6RA28110A>.
- (122) Sjödin, M.; Styring, S.; Wolpher, H.; Xu, Y.; Sun, L.; Hammarström, L. Switching the Redox Mechanism: Models for Proton-Coupled Electron Transfer from Tyrosine and Tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3855–3863. <https://doi.org/10.1021/ja044395o>.
- (123) Penna, T. C.; Cervi, G.; Rodrigues-Oliveira, A. F.; Yamada, B. D.; Lima, R. Z. C.; Menegon, J. J.; Bastos, E. L.; Correra, T. C. Development of a Photoinduced Fragmentation Ion Trap for Infrared Multiple Photon Dissociation Spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2020**, *34* (S3). <https://doi.org/10.1002/rcm.8635>.
- (124) Agarwal, R. G.; Coste, S. C.; Groff, B. D.; Heuer, A. M.; Noh, H.; Parada, G. A.; Wise, C. F.; Nichols, E. M.; Warren, J. J.; Mayer, J. M. Free Energies of Proton-Coupled Electron Transfer Reagents and Their Applications. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (1), 1–49. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00521>.
- (125) Boulebd, H. Comparative Study of the Radical Scavenging Behavior of Ascorbic Acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and Theoretical Study. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1201*,

127210. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127210>.
- (126) Steenken, S.; Neta, P. One-Electron Redox Potentials of Phenols. Hydroxy- and Aminophenols and Related Compounds of Biological Interest. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (18), 3661–3667. <https://doi.org/10.1021/j100215a033>.
- (127) Heelis, P. F.; Parsons, B. J.; Phillips, G. O.; McKellar, J. F. THE PHOTOREDUCTION OF FLAVINS BY AMINO ACIDS AND EDTA. A CONTINUOUS AND FLASH PHOTOLYSIS STUDY. *Photochem. Photobiol.* **1979**, *30* (3), 343–347. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07366.x>.
- (128) Menzel, R. (Universität P. *Photonics: Linear and Nonlinear Interactions of Laser Light and Matter (Advanced Texts in Physics)*); Springer, 2007.
- (129) Davis, C. A.; McNeill, K.; Janssen, E. M.-L. Non-Singlet Oxygen Kinetic Solvent Isotope Effects in Aquatic Photochemistry. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52* (17), 9908–9916. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01512>.
- (130) Hewitt, J. T.; Concepcion, J. J.; Damrauer, N. H. Inverse Kinetic Isotope Effect in the Excited-State Relaxation of a Ru(II)–Aquo Complex: Revealing the Impact of Hydrogen-Bond Dynamics on Nonradiative Decay. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12500–12503. <https://doi.org/10.1021/ja4037498>.
- (131) Kuimova, M. K.; Yahioglu, G.; Ogilby, P. R. Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (1), 332–340. <https://doi.org/10.1021/ja807484b>.
- (132) Fernandez, P. L.; Murkin, A. S. Inverse Solvent Isotope Effects in Enzyme-Catalyzed Reactions. *Molecules* **2020**, *25* (8), 1933. <https://doi.org/10.3390/molecules25081933>.
- (133) Witting, P. K.; Bowry, V. W.; Stocker, R. Inverse Deuterium Kinetic Isotope Effect for Peroxidation in Human Low-Density Lipoprotein (LDL): A Simple Test for Tocopherol-

- Mediated Peroxidation of LDL Lipids. *FEBS Lett.* **1995**, *375* (1–2), 45–49.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01172-B](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01172-B).
- (134) Robinson, J. K. Sun Exposure, Sun Protection, and Vitamin D. *JAMA* **2005**, *294* (12), 1541. <https://doi.org/10.1001/jama.294.12.1541>.
- (135) Humble, M. B. Vitamin D, Light and Mental Health. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2010**, *101* (2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.08.003>.
- (136) Tähkämö, L.; Partonen, T.; Pesonen, A.-K. Systematic Review of Light Exposure Impact on Human Circadian Rhythm. *Chronobiol. Int.* **2019**, *36* (2), 151–170. <https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1527773>.
- (137) LeGates, T. A.; Fernandez, D. C.; Hattar, S. Light as a Central Modulator of Circadian Rhythms, Sleep and Affect. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15* (7), 443–454. <https://doi.org/10.1038/nrn3743>.
- (138) W.M., A.-Z. Recent Developments in Age-Related Macular Degeneration: A Review. *Clin. Interv. Aging* **2017**, *12*, 1313–1330. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2147/CIA.S143508>.
- (139) Bhutto, I.; Luty, G. Understanding Age-Related Macular Degeneration (AMD): Relationships between the Photoreceptor/Retinal Pigment Epithelium/Bruch's Membrane/Choriocapillaris Complex. *Mol. Aspects Med.* **2012**, *33* (4), 295–317. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.04.005>.
- (140) Kaarniranta, K.; Tokarz, P.; Koskela, A.; Paterno, J.; Blasiak, J. Autophagy Regulates Death of Retinal Pigment Epithelium Cells in Age-Related Macular Degeneration. *Cell Biol. Toxicol.* **2017**, *33* (2), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9371-8>.
- (141) Jager, R. D.; Mieler, W. F.; Miller, J. W. Age-Related Macular Degeneration <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0801537>.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0801537>.

- (142) Bressler, N. M. Age-Related Macular Degeneration Is the Leading Cause of Blindness . . . *JAMA* **2004**, *291* (15), 1900. <https://doi.org/10.1001/jama.291.15.1900>.
- (143) Fishkin, N. E.; Sparrow, J. R.; Allikmets, R.; Nakanishi, K. Isolation and Characterization of a Retinal Pigment Epithelial Cell Fluorophore: An All-Trans-Retinal Dimer Conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (20), 7091–7096. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501266102>.
- (144) Adler, L.; Boyer, N. P.; Anderson, D. M.; Spraggins, J. M.; Schey, K. L.; Hanneken, A.; Ablonczy, Z.; Crouch, R. K.; Koutalos, Y. Determination of N-Retinylidene-N-Retinyethanolamine (A2E) Levels in Central and Peripheral Areas of Human Retinal Pigment Epithelium. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (11), 1983–1990. <https://doi.org/10.1039/c5pp00156k>.
- (145) Sparrow, J. R.; Fishkin, N.; Zhou, J.; Cai, B.; Jang, Y. P.; Krane, S.; Itagaki, Y.; Nakanishi, K. A2E, a Byproduct of the Visual Cycle. *Vision Res.* **2003**, *43* (28), 2983–2990. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(03\)00475-9](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(03)00475-9).
- (146) Liu, Z.; Ueda, K.; Kim, H. J.; Sparrow, J. R. Photobleaching and Fluorescence Recovery of RPE Bisretinoids. *PLoS One* **2015**, *10* (9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138081>.
- (147) Sparrow, J. R. Lipofuscin of the Retinal Pigment Epithelium. *Atlas of Fundus Autofluorescence Imaging* **2007**, 3–16. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71994-6_1.
- (148) Finnemann, S. C.; Leung, L. W.; Rodriguez-Boulan, E. The Lipofuscin Component A2E Selectively Inhibits Phagolysosomal Degradation of Photoreceptor Phospholipid by the Retinal Pigment Epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (6), 3842–3847. <https://doi.org/10.1073/pnas.052025899>.
- (149) Nociari, M. M.; Kiss, S.; Rodriguez-Boulan, E. Lipofuscin Accumulation into and

Clearance from Retinal Pigment Epithelium Lysosomes: Physiopathology and Emerging Therapeutics. In *Lysosomes - Associated Diseases and Methods to Study Their Function*; InTech, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69304>.

- (150) Liu, J.; Itagaki, Y.; Ben-Shabat, S.; Nakanishi, K.; Sparrow, J. R. The Biosynthesis of A2E, a Fluorophore of Aging Retina, Involves the Formation of the Precursor, A2-PE, in the Photoreceptor Outer Segment Membrane. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (38), 29354–29360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910191199>.
- (151) Kanofsky, J. R.; Sima, P. D.; Richter, C. Singlet-Oxygen Generation from A2E¶. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77* (3), 235. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)077<0235:sogfa>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)077<0235:sogfa>2.0.co;2).
- (152) Ben-Shabat, S.; Parish, C. A.; Hashimoto, M.; Liu, J.; Nakanishi, K.; Sparrow, J. R. Fluorescent Pigments of the Retinal Pigment Epithelium and Age-Related Macular Degeneration. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (12), 1533–1540. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00314-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00314-6).
- (153) Zhou, J.; Jang, Y. P.; Kim, S. R.; Sparrow, J. R. Complement Activation by Photooxidation Products of A2E, a Lipofuscin Constituent of the Retinal Pigment Epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (44), 16182–16187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604255103>.
- (154) De Soma; Sakmar, T. P. Interaction of A2E with Model Membranes. Implications to the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *J. Gen. Physiol.* **2002**, *120* (2), 147–157. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028566>.
- (155) Sparrow, J. R.; Zhou, J.; Ben-Shabat, S.; Vollmer, H.; Itagaki, Y.; Nakanishi, K. Involvement of Oxidative Mechanisms in Blue-Light-Induced Damage to A2e-Laden RPE. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43* (4), 1222–1227.
- (156) Ben-Shabat, S.; Itagaki, Y.; Jockusch, S.; Sparrow, J. R.; Turro, N. J.; Nakanishi, K.

- Formation of a Nonaoxirane from A2E, a Lipofuscin Fluorophore Related to Macular Degeneration, and Evidence of Singlet Oxygen Involvement. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41* (5), 814–817. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020301\)41:5<814::AID-ANIE814>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020301)41:5<814::AID-ANIE814>3.0.CO;2-2).
- (157) Sparrow, J. R.; Vollmer-Snarr, H. R.; Zhou, J.; Jang, Y. P.; Jockusch, S.; Itagaki, Y.; Nakanishi, K. A2E-Epoxides Damage DNA in Retinal Pigment Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (20), 18207–18213. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300457200>.
- (158) Wu, Y.; Yanase, E.; Feng, X.; Siegel, M. M.; Sparrow, J. R. Structural Characterization of Bisretinoid A2E Photocleavage Products and Implications for Age-Related Macular Degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (16), 7275–7280. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913112107>.
- (159) Jang, Y. P.; Matsuda, H.; Itagaki, Y.; Nakanishi, K.; Sparrow, J. R. Characterization of Peroxy-A2E and Furan-A2E Photooxidation Products and Detection in Human and Mouse Retinal Pigment Epithelial Cell Lipofuscin. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (48), 39732–39739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504933200>.
- (160) Kim, S. R.; Jockusch, S.; Itagaki, Y.; Turro, N. J.; Sparrow, J. R. Mechanisms Involved in A2E Oxidation. *Exp. Eye Res.* **2008**, *86* (6), 975–982. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.03.016>.
- (161) Boulton, M.; Rózanowska, M.; Rózanowski, B.; Wess, T. The Photoreactivity of Ocular Lipofuscin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3* (8), 759–764. <https://doi.org/10.1039/b400108g>.
- (162) Sparrow, J. R.; Zhou, J.; Cai, B. DNA Is a Target of the Photodynamic Effects Elicited in A2E-Laden RPE by Blue-Light Illumination. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44* (5), 2245–2251. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0746>.

- (163) Wang, Z.; Keller, L. M. M.; Dillon, J.; Gaillard, E. R. Oxidation of A2E Results in the Formation of Highly Reactive Aldehydes and Ketones. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82* (5), 1251. <https://doi.org/10.1562/2006-04-01-RA-864>.
- (164) Craft, N. E.; Soares, J. H. Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and .Beta.-Carotene in Organic Solvents. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40* (3), 431–434. <https://doi.org/10.1021/jf00015a013>.
- (165) Vidolova, A.; Bulgarian, P.; Popova, A. V. SPECTRAL CHARACTERISTICS AND SOLUBILITY OF Beta-CAROTENE AND ZEAXANTHIN IN ... **2017**, No. April.
- (166) Landrum, J. T.; Bone, R. Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *385* (1), 28–40. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2171>.
- (167) Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W. Chemistry of Singlet Oxygen. X. Carotenoid Quenching Parallels Biological Protection. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (17), 5216–5218. <https://doi.org/10.1021/ja00720a036>.
- (168) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24* (2), 663–677. <https://doi.org/10.1063/1.555965>.
- (169) Moine, E.; Brabet, P.; Guillou, L.; Durand, T.; Vercauteren, J.; Crauste, C. New Lipophenol Antioxidants Reduce Oxidative Damage in Retina Pigment Epithelial Cells. *Antioxidants* **2018**, *7* (12), 197. <https://doi.org/10.3390/antiox7120197>.
- (170) Bian, Q.; Gao, S.; Zhou, J.; Qin, J.; Taylor, A.; Johnson, E. J.; Tang, G.; Sparrow, J. R.; Gierhart, D.; Shang, F. Lutein and Zeaxanthin Supplementation Reduces Photooxidative Damage and Modulates the Expression of Inflammation-Related Genes in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53* (6), 1298–1307. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.024>.

- (171) Jang, Y. P.; Zhou, J.; Nakanishi, K.; Sparrow, J. R. Anthocyanins Protect Against A2E Photooxidation and Membrane Permeabilization in Retinal Pigment Epithelial Cells¶. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *81* (3), 529–536. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2005.tb00221.x>.
- (172) Alaimo, A.; Di Santo, M. C.; Domínguez Rubio, A. P.; Chaufan, G.; García Liñares, G.; Pérez, O. E. Toxic Effects of A2E in Human ARPE-19 Cells Were Prevented by Resveratrol: A Potential Nutritional Bioactive for Age-Related Macular Degeneration Treatment. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94* (2), 553–572. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02637-w>.
- (173) Kim, D.; Choi, Y.; Shim, J.; Choi, Y.; Kim, Y.; Kim, M.; Kim, M. Suppressive Effect of *Arctium Lappa* L. Leaves on Retinal Damage Against A2E-Induced ARPE-19 Cells and Mice. *Molecules* **2020**, *25* (7), 1737. <https://doi.org/10.3390/molecules25071737>.
- (174) Sparrow, J. R.; Vollmer-Snarr, H. R.; Zhou, J.; Jang, Y. P.; Jockusch, S.; Itagaki, Y.; Nakanishi, K. A2E-Epoxides Damage DNA in Retinal Pigment Epithelial Cells. Vitamin E and Other Antioxidants Inhibit A2E-Epoxide Formation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (20), 18207–18213. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300457200>.
- (175) Olivas-Aguirre, F. J.; Rodrigo-García, J.; Martínez-Ruiz, N. D. R.; Cárdenas-Robles, A. I.; Mendoza-Díaz, S. O.; Álvarez-Parrilla, E.; González-Aguilar, G. A.; De La Rosa, L. A.; Ramos-Jiménez, A.; Wall-Medrano, A. Cyanidin-3-O-Glucoside: Physical-Chemistry, Foodomics and Health Effects. *Molecules* **2016**, *21* (9), 1–30. <https://doi.org/10.3390/molecules21091264>.
- (176) Yacout, S. M.; Gaillard, E. R. The Anthocyanins, Oenin and Callistephin, Protect RPE Cells Against Oxidative Stress. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *38* (1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/php.12683>.

- (177) Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R.; Paredes-López, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40* (3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>.
- (178) Wilkinson, F.; Brummer, J. G. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1981**, *10* (4), 809–999. <https://doi.org/10.1063/1.555655>.
- (179) Wendel, M.; Nizinski, S.; Gierszewski, M.; Prukala, D.; Sikorski, M.; Starzak, K.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G. Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Betanin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15* (7), 872–878. <https://doi.org/10.1039/C6PP00037A>.
- (180) Allegra, M.; Furtmüller, P. G.; Jantschko, W.; Zederbauer, M.; Tesoriere, L.; Livrea, M. A.; Obinger, C. Mechanism of Interaction of Betanin and Indicaxanthin with Human Myeloperoxidase and Hypochlorous Acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332* (3), 837–844. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.031>.
- (181) Tesoriere, L.; Attanzio, A.; Allegra, M.; Gentile, C.; Livrea, M. A. Indicaxanthin Inhibits NADPH Oxidase (NOX)-1 Activation and NF-KB-Dependent Release of Inflammatory Mediators and Prevents the Increase of Epithelial Permeability in IL-1 β -Exposed Caco-2 Cells. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111* (3), 415–423. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002663>.
- (182) Parish, C. A.; Hashimoto, M.; Nakanishi, K.; Dillon, J.; Sparrow, J. Isolation and One-Step Preparation of A2E and Iso-A2E, Fluorophores from Human Retinal Pigment Epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (25), 14609–14613. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14609>.
- (183) Wang, Y.; Kim, H. J.; Sparrow, J. R. Quercetin and Cyanidin-3-Glucoside Protect

- against Photooxidation and Photodegradation of A2E in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Exp. Eye Res.* **2017**, *160*, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.04.010>.
- (184) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, 2006.
- (185) Lapidot, T.; Harel, S.; Akiri, B.; Granit, R.; Kanner, J. PH-Dependent Forms of Red Wine Anthocyanins as Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (1), 67–70. <https://doi.org/10.1021/jf980704g>.
- (186) Sadilova, E.; Carle, R.; Stintzing, F. C. Thermal Degradation of Anthocyanins and Its Impact on Color and in Wfroantioxidant Capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51* (12), 1461–1471. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700179>.
- (187) Torskangerpoll, K.; Andersen, Ø. M. Colour Stability of Anthocyanins in Aqueous Solutions at Various PH Values. *Food Chem.* **2005**, *89* (3), 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.002>.
- (188) Oliveira, J.; Azevedo, J.; Seco, A.; Mendoza, J.; Basílio, N.; de Freitas, V.; Pina, F. Copigmentation of Anthocyanins with Copigments Possessing an Acid-Base Equilibrium in Moderately Acidic Solutions. *Dye. Pigment.* **2021**, *193*, 109438. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109438>.
- (189) Gençdağ, E.; Özdemir, E. E.; Demirci, K.; Görgüç, A.; Yılmaz, F. M. Copigmentation and Stabilization of Anthocyanins Using Organic Molecules and Encapsulation Techniques. *Curr. Plant Biol.* **2022**, *29*, 100238. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2022.100238>.
- (190) Yakovleva, M. A.; Feldman, T. B.; Arbukhanova, P. M.; Borzenok, S. A.; Kuzmin, V. A.; Ostrovsky, M. A. Estimation of Fluorescence Lifetime of Lipofuscin Fluorophores Contained in Lipofuscin Granules of Retinal Pigment Epithelium of Human Cadaver Eyes without Signs of Pathology. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2017**, *472* (1), 19–22.

<https://doi.org/10.1134/S1607672917010069>.

- (191) De Rosso, V. V.; Morán Vieyra, F. E.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D.; Moran Vieyra, F. E.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D. Singlet Oxygen Quenching by Anthocyanin's Flavylum Cations. *Free Radic. Res.* **2008**, *42* (10), 885–891. <https://doi.org/10.1080/10715760802506349>.
- (192) Holčapek, M.; Volná, K.; Jandera, P.; Kolářová, L.; Lemr, K.; Exner, M.; Círka, A. Effects of Ion-Pairing Reagents on the Electrospray Signal Suppression of Sulphonated Dyes and Intermediates. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39* (1), 43–50. <https://doi.org/10.1002/jms.551>.
- (193) Sparrow, J. R.; Nakanishi, K.; Parish, C. A. The Lipofuscin Fluorophore A2E Mediates Blue Light-Induced Damage to Retinal Pigmented Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41* (7), 1981–1989.
- (194) Sparrow, J. R.; Parish, C. A.; Hashimoto, M.; Nakanishi, K. A2E, a Lipofuscin Fluorophore, in Human Retinal Pigmented Epithelial Cells in Culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1999**, *40* (12), 2988–2995.
- (195) Magalhães, Y. T.; Farias, J. O.; Monteiro, L. F.; Forti, F. L. Measuring the Contributions of the Rho Pathway to the DNA Damage Response in Tumor Epithelial Cells; 2018; pp 339–355. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8612-5_23.
- (196) Thimijan, R. W.; Heins, R. D. Photometric, Radiometric, and Quantum Light Units of Measure: A Review of Procedures for Interconversion. *Hortscience* **1983**, *18*, 818–822.

1-7. Súmula curricular

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Caroline de Oliveira Machado

Local e data de nascimento: São Paulo, 31 de maio de 1992.

EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo – Instituto de Química – Bacharel em Química Ambiental

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

ETEC Getúlio Vargas – Técnico em Química

ATIVIDADES ACADÊMICAS

Estágio de monitoria acadêmica

Período: 1º semestre/2016

Disciplina: QFL 1221 – Química Orgânica I

Curso: Bacharelado em Química

Supervisor: Cassius Stevani

PUBLICAÇÕES

Artigos completos publicados em períodos

Soares, D. M. M.; Gonçalves, L. C. P.; **Machado, C. O.**; Esteves, L. C.; Stevani, C. V; Oliveira, C. C.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Adachi, F. M. M.; Hotta, C. T.; et al. Reannotation of Fly Amanita L-DOPA Dioxygenase Gene Enables Its Cloning and Heterologous Expression. *ACS Omega* **2022**, 7 (18), 16070–16079.

Pinheiro, A. C.; Fazzi, R. B.; Esteves, L. C.; **Machado, C. O.**; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Hattori, Y.; Sa, J.; da Costa Ferreira, A. M.; Bastos, E. L. A Bioinspired Nitron Precursor to a Stabilized Nitroxide Radical. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *168*, 110–116.

Freitas-Dörr, B. C.; **Machado, C. O.**; Pinheiro, A. C.; Fernandes, A. B.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Lopes-Ferreira, M.; Abdellah, M.; Sá, J.; Russo, L. C.; et al. A Metal-Free Blue Chromophore Derived from Plant Pigments. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (14)

Gonçalves, L. C. P., Lopes, N. B., Augusto, F. A., Pioli, R. M., **Machado, C. O.**, Freitas-Dörr, B. C., Suffredini, H. B. and Bastos, E. L.. Phenolic betalain as antioxidants: meta means more Pure and Applied Chemistry, vol. 92, no. 2, 2020, pp. 243-253

Pavliuk, M.V., Fernandes, A.B., Abdellah, M., Fernandes, D. L. A., **Machado, C. O.**, Rocha, I., Hattori, Y., Paun, C., Bastos, E. L., Sá, J. Nano-hybrid plasmonic photocatalyst for hydrogen production at 20% efficiency. *Sci Rep* **7**, 8670 (2017).

Gonçalves, L. C. P.; Marcato, A. C.; Rodrigues, A. C. B.; Pagano, A. P. E.; Freitas, B. C.; **Machado, C. O.**; Nakashima, K. K.; Esteves, L. C.; Lopes, N. B.; Bastos, E. L. Betalainas: das Cores das Beterrabas à Fluorescência das Flores. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, *7* (1), 292-309.

Capítulos de livros

Bastos, E.L. and **Machado, C. O.** (2017). Recent Advances in Acid–Base and Solvation Properties of Metal Phenolates. In *PATAI'S Chemistry of Functional Groups*, Z. Rappoport (Ed.).

Trabalhos publicados em anais de congressos

Machado, C. O., Freitas-Dörr, B. C., Pinheiro, A. C., Rodrigues, A. C., B., Abdelah, M., Bastos, E. L, Sá, J.. Structure-photophysical properties relationship of synthetic betalains. IUPAC 2017, 2017, São Paulo. Anais da 40a RASBQ, 2017.

Machado, C. O., Pagano, A. P. E., Bastos, E. L.. Combination of plants pigments:

photophysical and redox consequences. ACS Meeting. 2019.

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

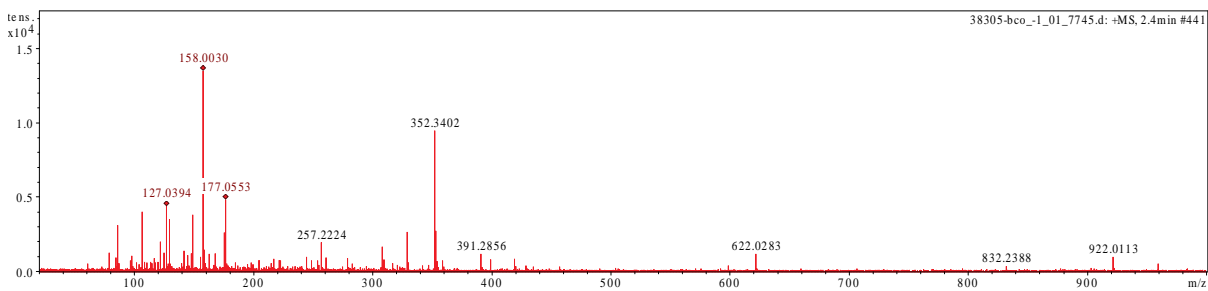
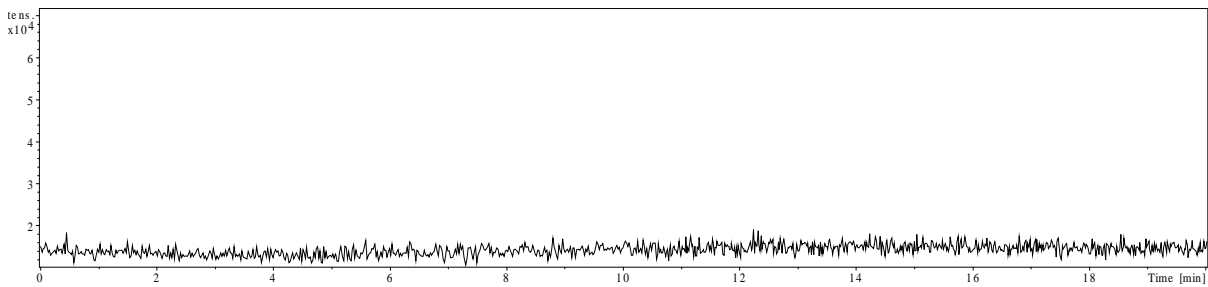
Estágios de Pesquisa

Novembro/2016 a dezembro/2016: Ångström Laboratoriet, Universidade de Uppsala (Suécia)
sob orientação do Prof. Dr. Jacinto Sá.

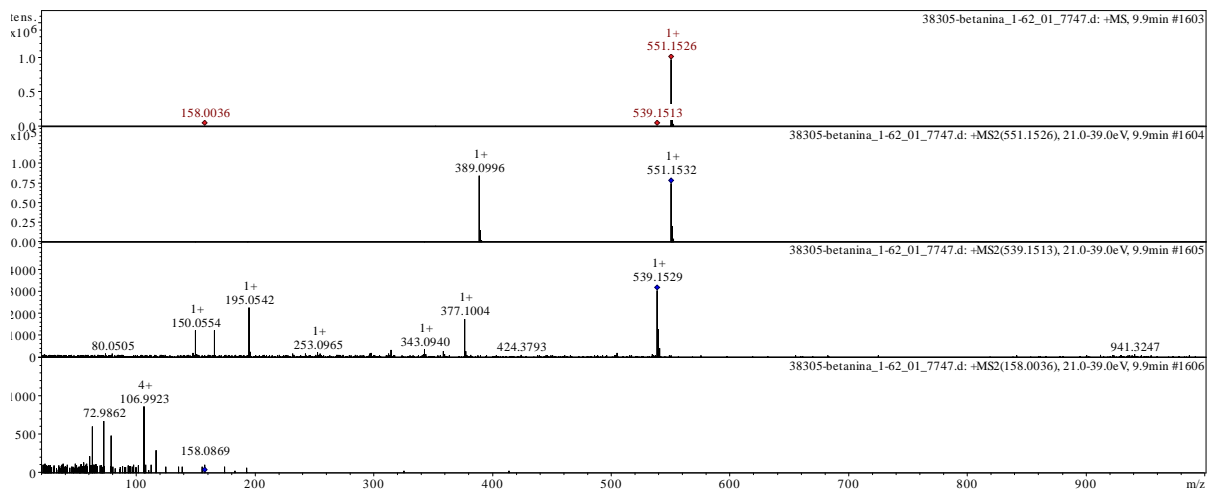
Maior/2019 a janeiro/2020: Northern Illinois University (EUA) sob orientação da Prof. Dra.
Elizabeth Gaillard

Anexos

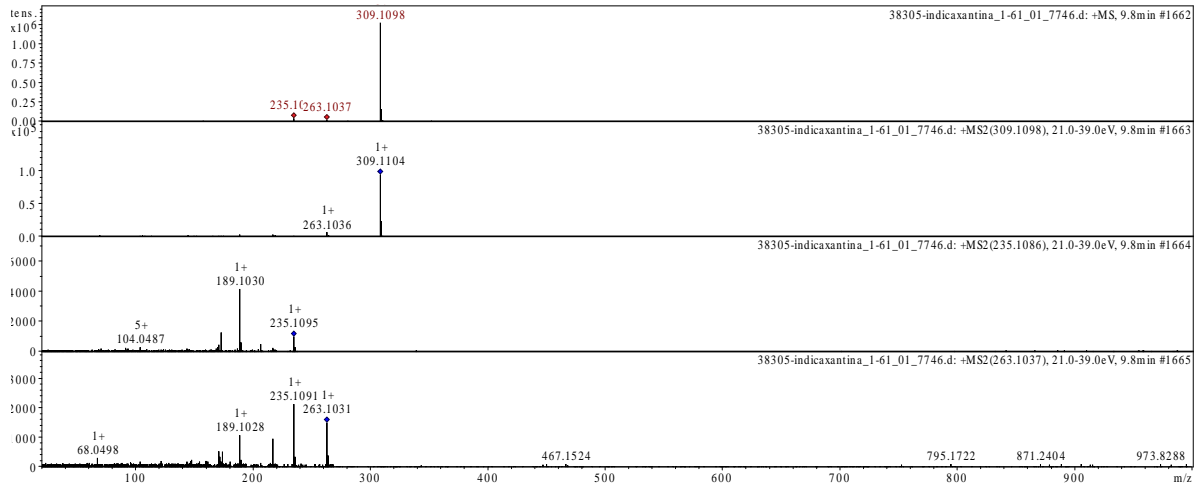
Branco



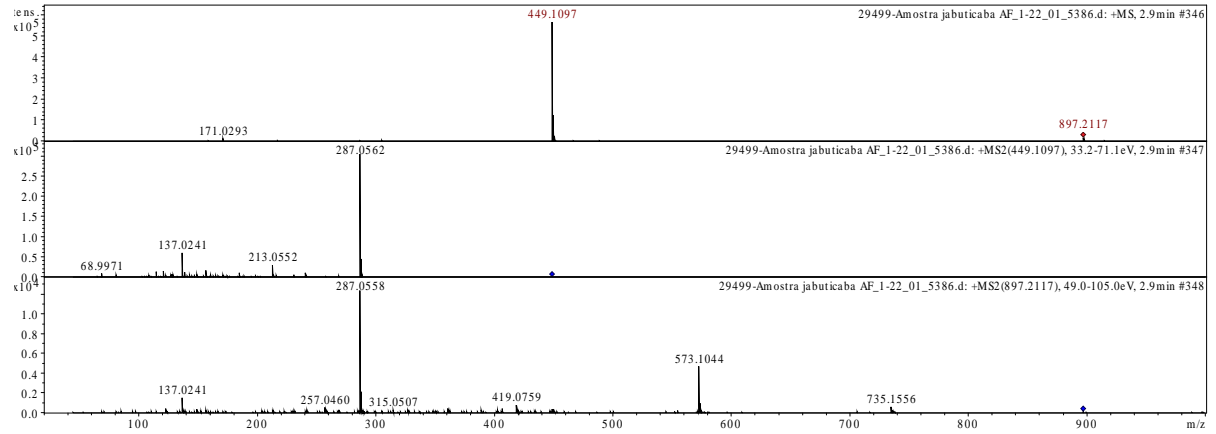
Anexo 1. MS branco



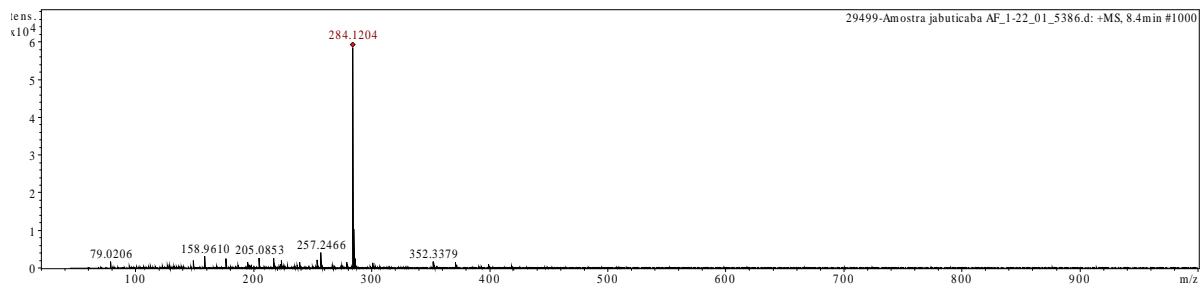
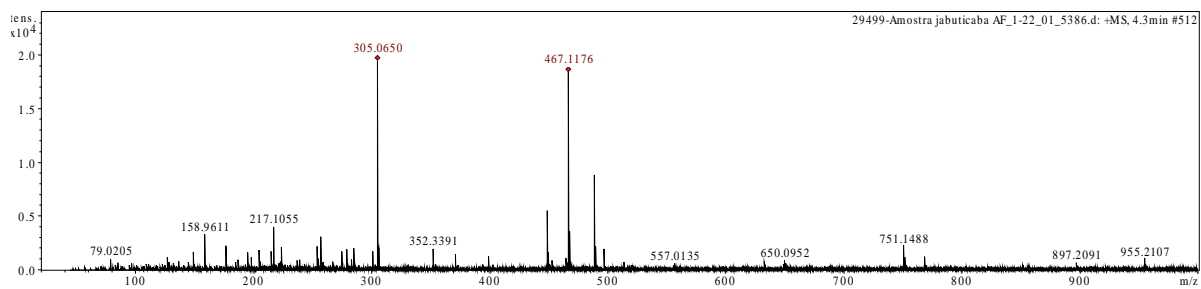
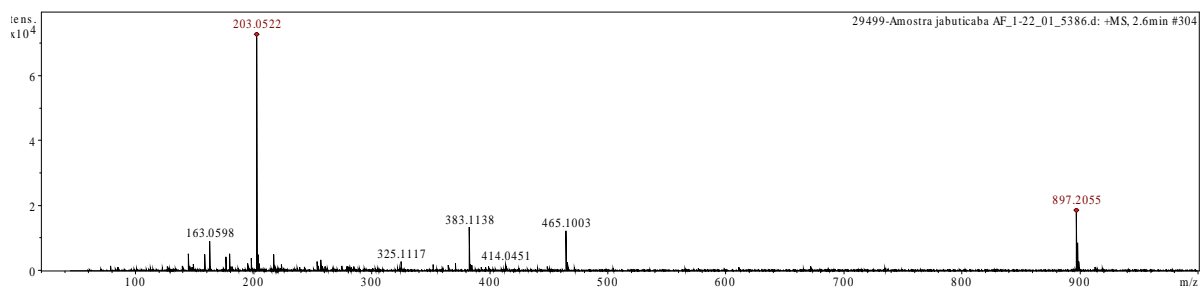
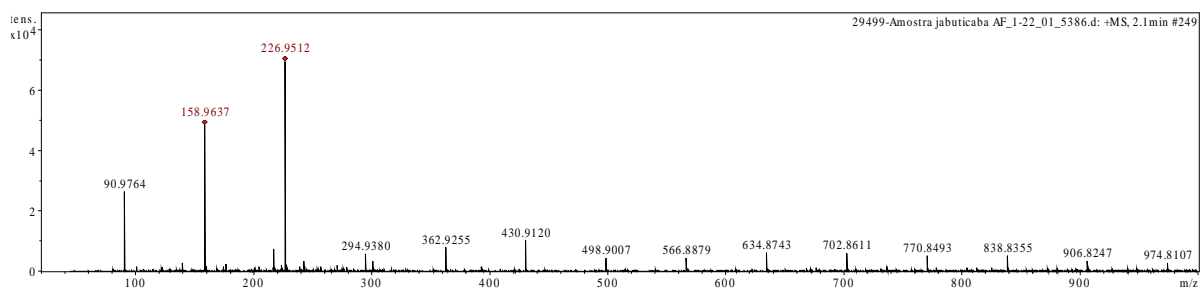
Anexo 2. MS² betanina



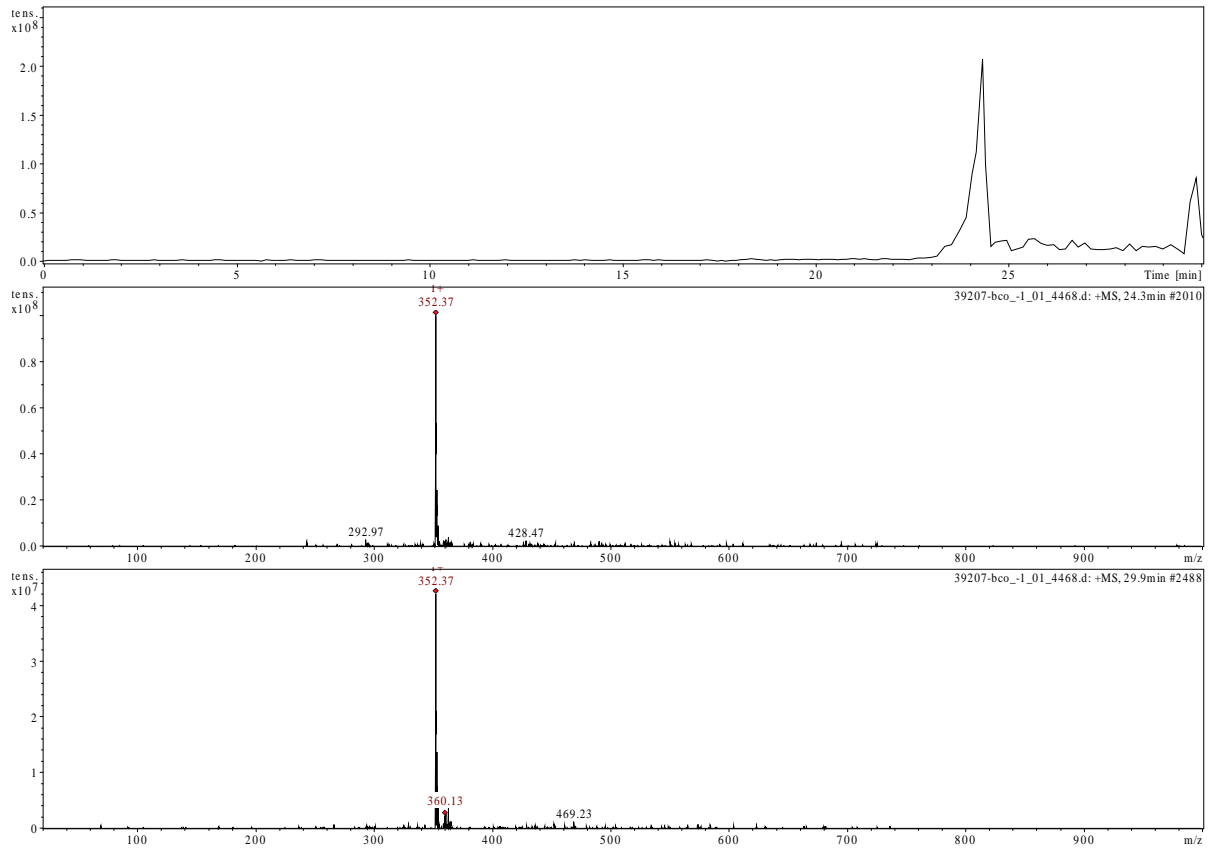
Anexo 3. MS² indicaxantina



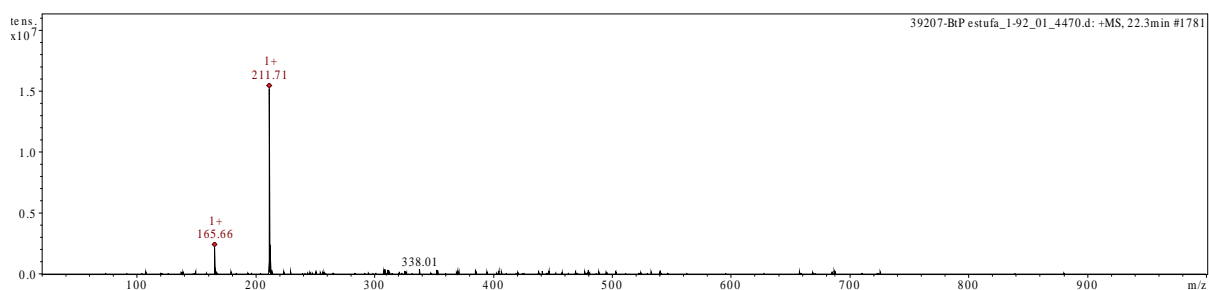
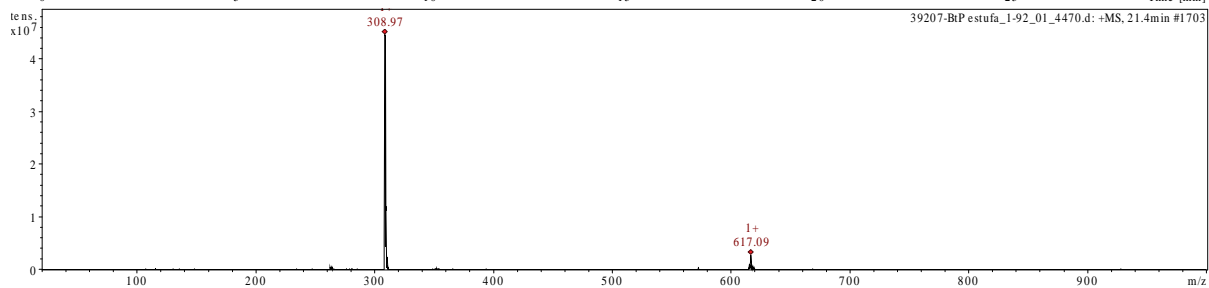
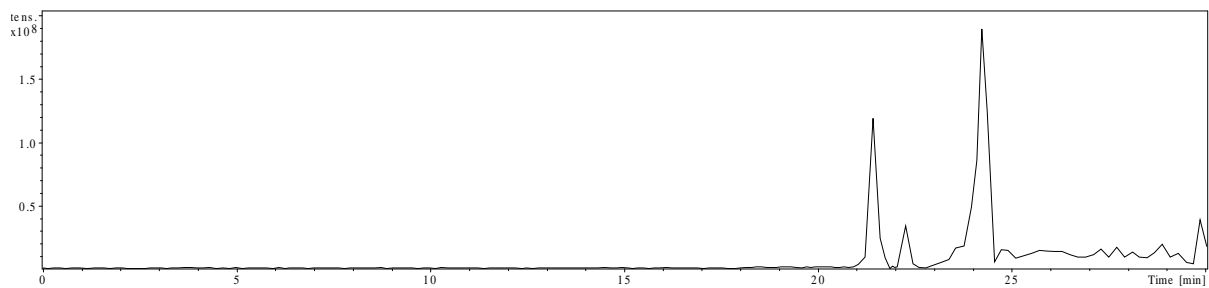
Anexo 4. MS² de antocianina



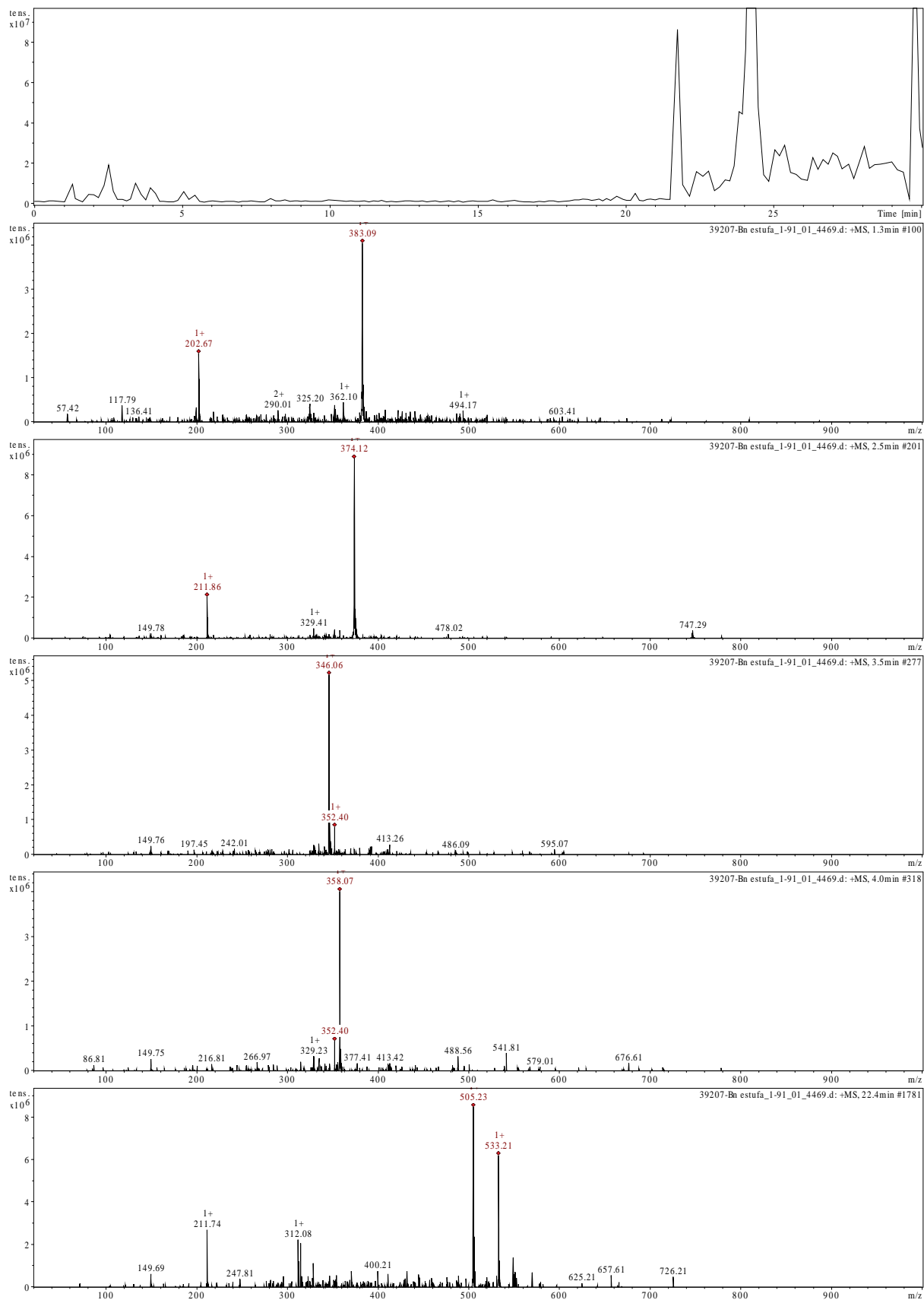
Anexo 5. MS antocianina outros picos



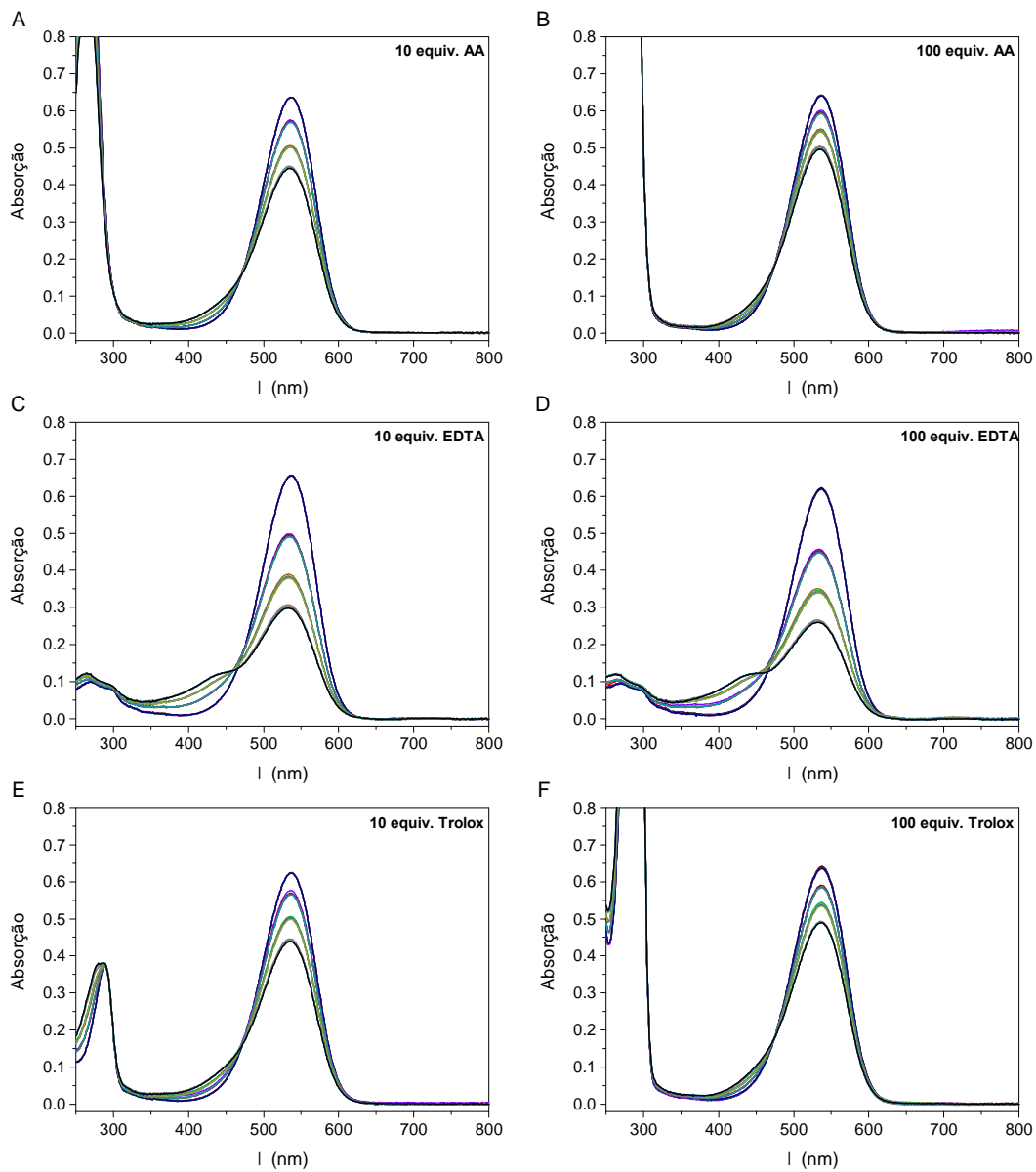
Anexo 6. Espectrometria de massas de baixa resolução de uma corrida sem injeção considerada como controle das amostras de Bn e BtP degradadas termicamente.



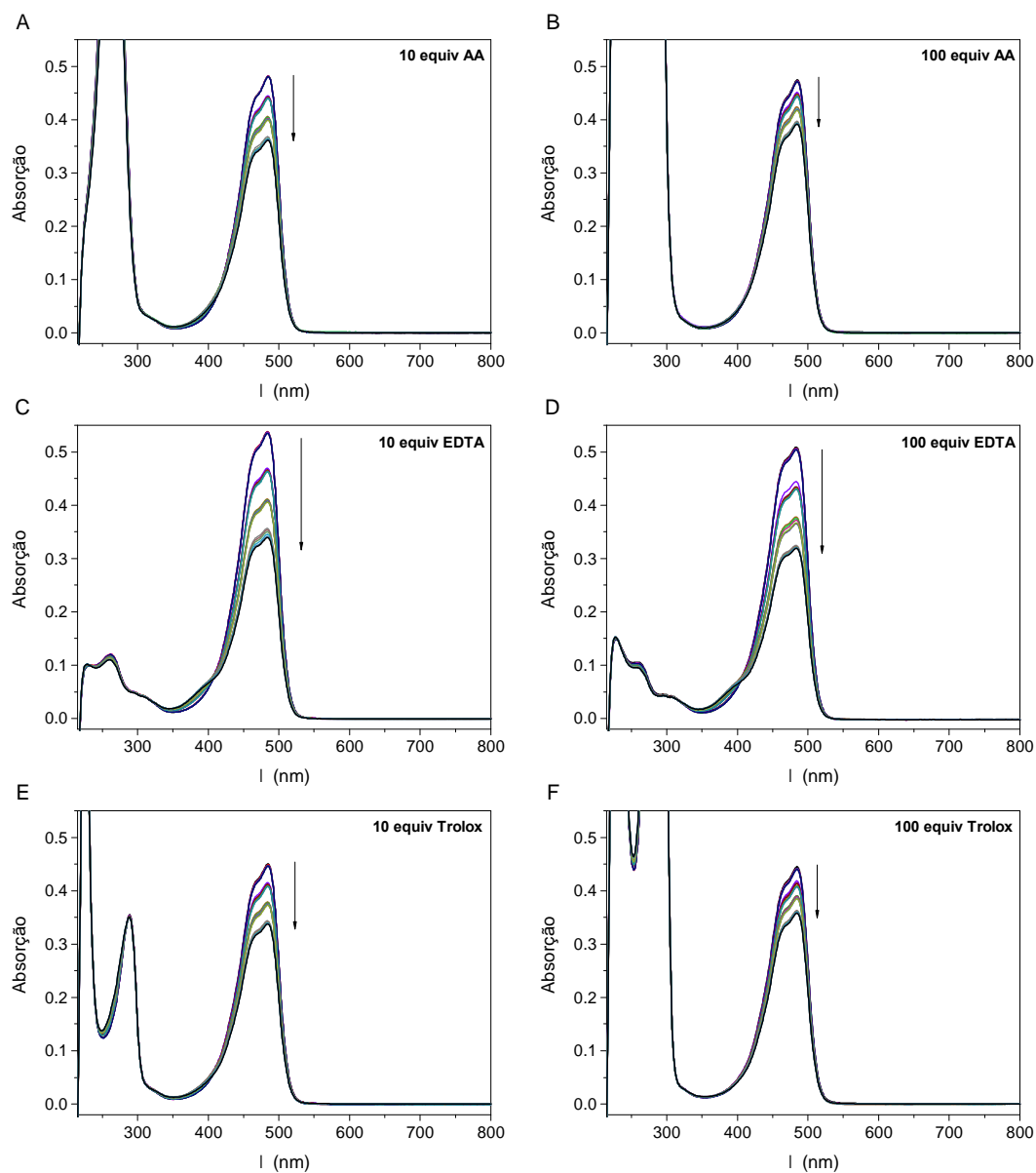
Anexo 7. Espectrometria de massas de baixa resolução de BtP submetida a degradação térmica



Anexo 8. Espectrometria de massas de baixa resolução de Bn submetida a degradação térmica



Anexo 9. Cinética de alternância entre períodos claros e escuro obtidas para Bn na presença de 10 ou 100 equiv. dos antioxidantes: ácido ascórbico, EDTA e Trolox, respectivamente. Os experimentos foram realizados em TpAcO^- , pH 5.



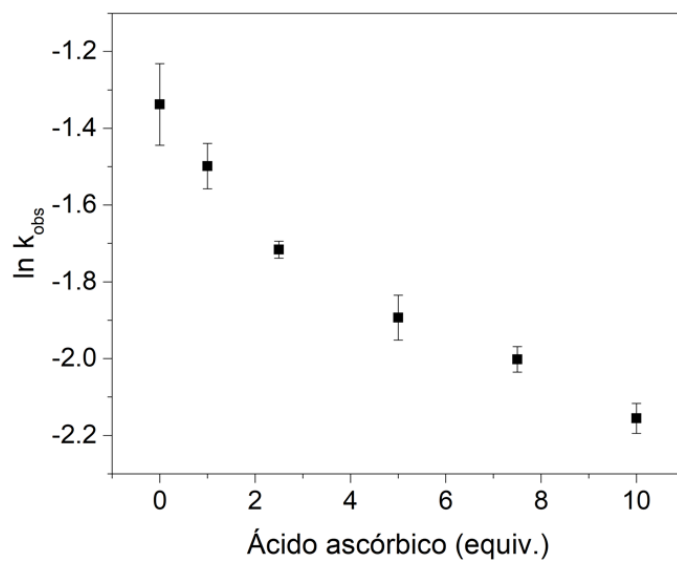
Anexo 10. Cinética de alternância entre períodos claros e escuro obtidas para BtP na presença de 10 ou 100 equiv. dos antioxidantes: ácido ascórbico, EDTA e Trolox, respectivamente. Os experimentos foram realizados em TpAcO^- , pH 5.

Tabela 19 Constantes de velocidade de reação para degradação fotoquímica de Bn e BtP na presença (10 equiv) ou ausência de ácido ascórbico.

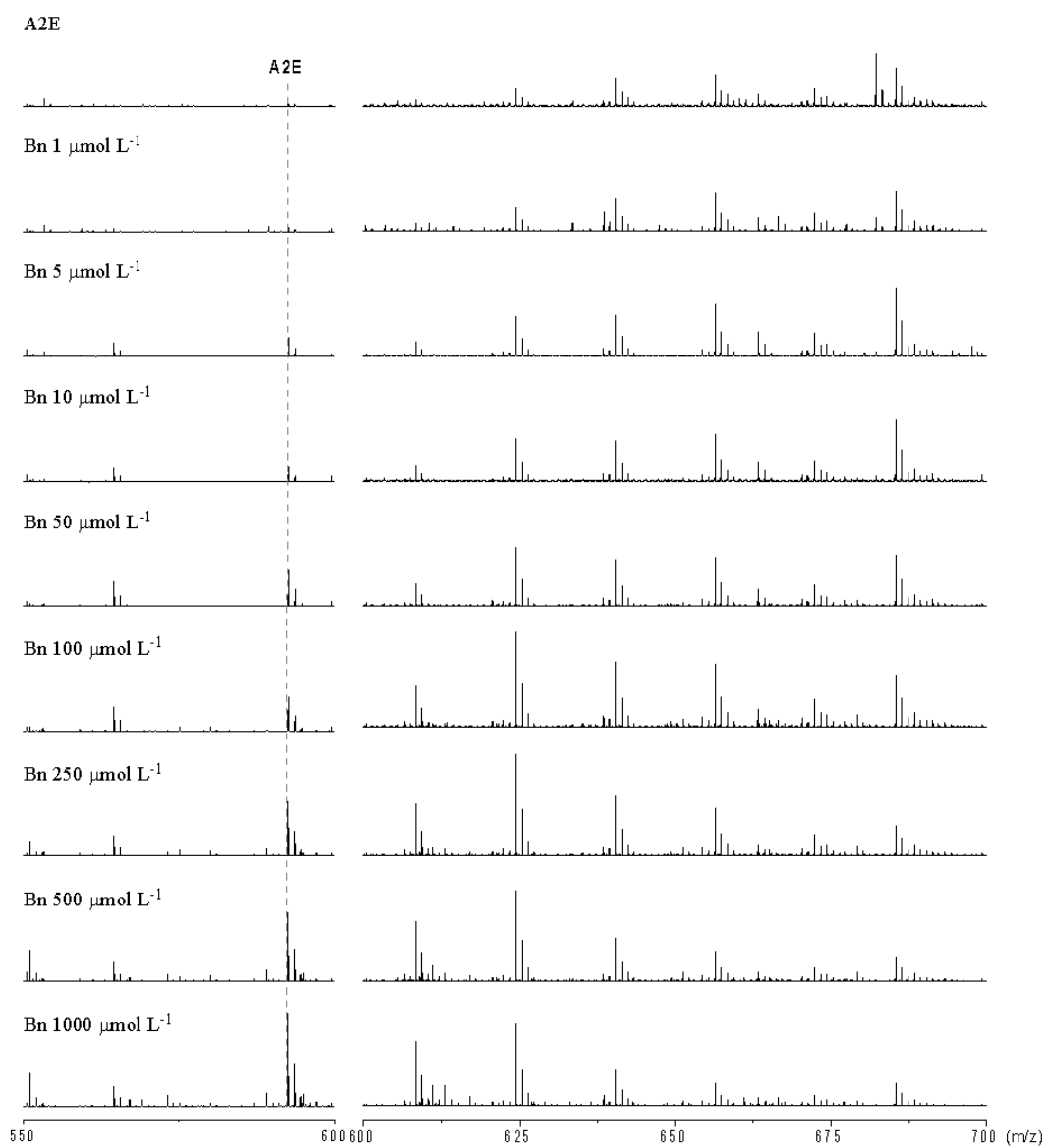
Composto	Eq. de AscH	k (min^{-1})	
		pH 5 ^a	pH 7 ^b
Betanina	0	$0,26 \pm 0,027$	$0,30 \pm 0,0040$

	10	$0,11 \pm 0,0046$	$0,12 \pm 0,0030$
Indicaxantina	0	$0,31 \pm 0,078$	$0,29 \pm 0,016$
	10	$0,24 \pm 0,0018$	$0,13 \pm 0,0073$

^a Tampão acetato 100 mmol L⁻¹, ^b Tampão fosfato 100 mmol L⁻¹

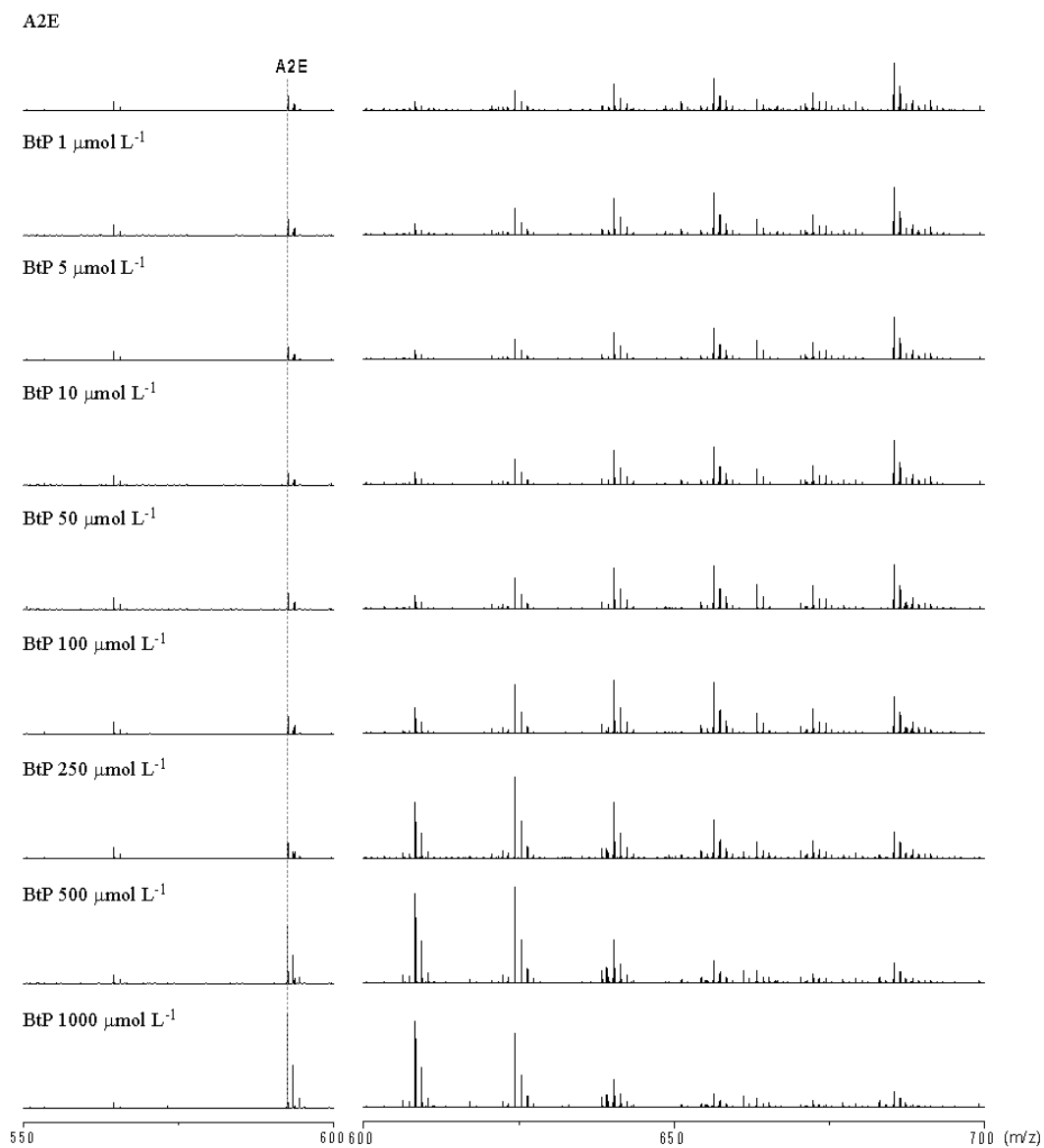


Anexo 11. Variação da constante de velocidade de degradação fotoinduzida de Bn em função da quantidade em equivalentes de ácido ascórbico

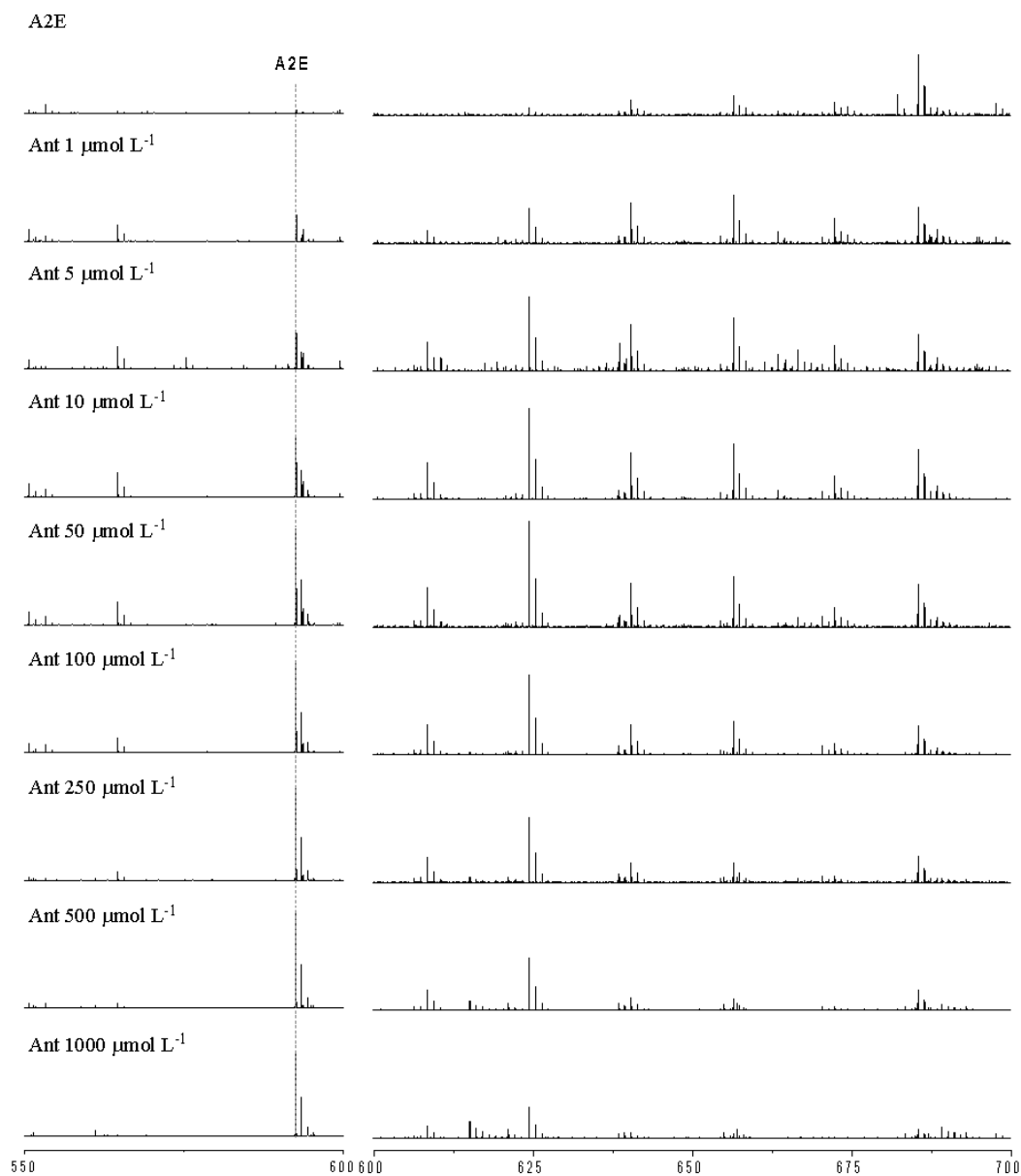


Anexo 12 Espectro de massas de A2E foto-oxidado na ausência e presença de Bn (1 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Os experimentos foram realizados em soluções aquosas utilizando uma lâmpada Philips Special Blue e PPFD de 130 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

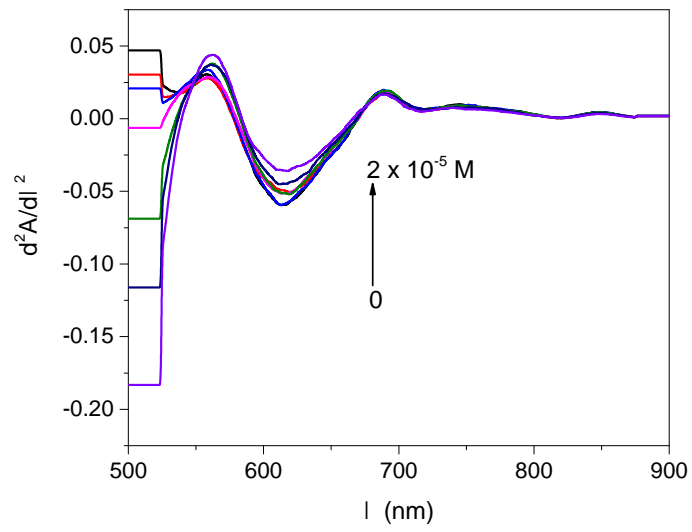


Anexo 13. Espectro de massas de A2E foto-oxidado na ausência e presença de BtP (1 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os experimentos foram realizados em soluções aquosas utilizando uma lâmpada Philips Special Blue e PFD de $130 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.



Anexo 14 Espectro de massas de A2E foto-oxidado na ausência e presença de Ant (1 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Os experimentos foram realizados em soluções aquosas utilizando uma lâmpada Philips Special Blue e PPFD de 130 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.



Anexo 15 Segunda derivada dos espectros de emissão de A2E na presença de diferentes concentrações de BtP ($1 - 20 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).