



**Betaxantinas de Aminoácidos:
Relações Estrutura-Propriedades**

LARISSA CERRATO ESTEVES

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Química

Versão corrigida da Tese defendida

Data do depósito na SPG:

29/11/2022

Página intencionalmente deixada em branco.

LARISSA CERRATO ESTEVES

**Betaxantinas de Aminoácidos:
Relações Estrutura-Propriedades**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências – Programa:
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

E79b Esteves, Larissa Cerrato
Betaxantinas de Aminoácidos: Relações Estrutura-
Propriedades / Larissa Cerrato Esteves. - São
Paulo, 2022.
221 p.

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

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



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Betaxantinas de aminoácidos: relações estrutura-propriedades"

LARISSA CERRATO ESTEVES

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. Thiago Carita Correra
IQ - USP

Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro
IQSC - USP

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (por videoconferência)
UFSCar

SÃO PAULO
16 de dezembro de 2022

Página intencionalmente deixada em branco.

Dedico essa tese à minha tia Lucinda (*i. m.*),
que sempre será minha referência de força,
generosidade e amor.

Página intencionalmente deixada em branco.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

Página intencionalmente deixada em branco.

AGRADECIMENTOS

“Life is nothing but an electron looking for a place to rest.”

Albert Szent-Györgyi, Prêmio Nobel em 1937

“...with the help of a proton.”

Leif Hammarström e coautores¹

Agradeço ao meu orientador Erick, pela oportunidade, pela confiança adquirida ao longo dos anos, pela paciência, dedicação, generosidade, e pela gentileza com que sempre me tratou. Obrigada, principalmente, pela compreensão nos momentos difíceis, e por enxergar no meu trabalho o que eu por muitas vezes, não conseguia ver.

Às amigas que fiz no laboratório e que vou levar para a vida toda, Ana Paula, Caroline e Nathana. Obrigada por todos os momentos que tornaram esse caminho mais leve e bonito. Tem um pouquinho de cada uma de vocês nessa tese.

A todos os colegas do BastosLab e do laboratório do Prof. Frank Quina. À Amanda, por todas as discussões científicas, e pela companhia noturna no laboratório.

Aos técnicos do IQ: Luciana, César, Erica, Vânia e Cristiane, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho. À Helena e ao Joca, sempre disponíveis para ajudar a resolver qualquer problema.

Aos professores Willi, Omar, Thiago Correra, Cassius e Mauricio, que mantém as portas dos seus laboratórios sempre abertas, e aos seus alunos, pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do IQ, por manter o Instituto funcionando, e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial ao Milton, por todo o auxílio para resolver questões administrativas.

À Capes, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Às minhas amigas, e aos meus amigos, em especial à Amanda, Lelaine e Vanessa, por estarem sempre ao meu lado, ainda que não fisicamente.

À minha família, pelo apoio e torcida constantes.

Ao meu pai, por acreditar, antes de mim, que eu podia chegar até aqui, e ser um grande incentivador dessa trajetória, desde o início.

À minha mãe, por absolutamente tudo, mas principalmente por não me deixar perder de vista o que realmente importa.

RESUMO

ESTEVES, L. C. **Betaxantinas de Aminoácidos: Relações Estrutura-Propriedades.** 2022. 219 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Betaxantinas são produtos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias encontradas em algumas variedades de plantas e fungos. Nessa Tese de Doutorado foram semissintetizadas vinte e uma betaxantinas derivadas de todos os aminoácidos proteínogênicos, com exceção da selenocisteína, e algumas de suas propriedades físico-químicas foram caracterizadas e comparadas entre si e com as betaxantinas-controle derivadas da dopamina, L-DOPA e pirrolidina. A elusiva betaxantina derivada da L-cisteína foi obtida pela primeira vez e apresenta um anel 2-tiazolínico. Ainda, foram isoladas e caracterizadas duas betaxantinas regioisoméricas derivadas da L-lisina. As propriedades de absorção e fluorescência, bem como a estabilidade hidrolítica de todas as betaxantinas foram determinadas. A capacidade antioxidante e o potencial redox das betaxantinas foram medidos e foram estabelecidas relações estrutura-propriedade por meio da análise de pares moleculares combinados. Porções fenol ou indol ligadas diretamente ao sistema conjugado imino-enamino de betaxantinas aumentam a capacidade antioxidante das betaxantinas que, de forma geral, é muito maior do que aquela observada para seus aminoácidos precursores e para antioxidantes padrão. A betaxantina derivada da cisteína possui uma capacidade antioxidante muito baixa, e nunca foi encontrada *in vivo*. Em contrapartida, essa betaxantina não-imínica é muito mais estável do que as demais betaxantinas derivadas de aminoácidos.

Palavras-chave – betalainas; betaxantinas; aminoácidos; semissíntese; pigmentos naturais; antioxidantes

ABSTRACT

ESTEVEES, L. C. **Amino Acid Betaxanthins: Structure-Property Relationships**. 2022. 219 p. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Betaxanthins are natural products with antioxidant and anti-inflammatory properties found in some varieties of plants and fungi. In this Doctoral Thesis, twenty-one betaxanthins derived from all proteinogenic amino acids, with the exception of selenocysteine, were semi-synthesized and some of their physicochemical properties were characterized and compared with each other and with the control betaxanthins derived from dopamine, L-DOPA and pyrrolidine. The elusive betaxanthin derived from L-cysteine was obtained for the first time and features a 2-thiazoline ring. Furthermore, two regioisomeric betaxanthins derived from L-lysine were isolated and characterized. Absorption and fluorescence properties as well as hydrolytic stability of all betaxanthins were determined. The antioxidant capacity and redox potential of betaxanthins were measured and structure-property relationships established through matched molecular pair analysis. Phenol or indole moieties linked directly to the imino-enamino conjugated system of betaxanthins increase the antioxidant capacity of betaxanthins, which, in general, is much higher than that observed for their precursor amino acids and for standard antioxidants. Cysteine-betaxanthin has a very low antioxidant capacity, and has never been found *in vivo*. In contrast, this non-iminic betaxanthin is much more stable than the other amino acid betaxanthins.

Keywords – betalains; betaxanthins; amino acids; semisynthesis; plant pigments; antioxidants

ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	L-alanina
Arg	L-arginina
Asn	L-asparagina
Asp	L-ácido aspártico
COSY	Espectroscopia de correlação, do inglês <i>correlation spectroscopy</i>
DA	dopamina
DOPA	L-3,4-di-hidroxifenilalanina, L-DOPA
$E_{p,a}$	Potencial de pico anódico
$E_{p,c}$	Potencial de pico catódico
E_s	Energia singlete
ESI	Ionização por eletrospray
Gln	L-glutamina
Glu	L-ácido glutâmico
Gly	L-glicina
HBt	Ácido betalâmico
His	L-histidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Espectrômetro de massas de alta resolução, do inglês <i>high resolution mass spectrometer</i>
Ile	L-isoleucina
k_{nr}	Constante cinética para processos não radiativos
k_{obs}	Constante cinética observada

k_r	Constante cinética para processos radiativos
J	Constante de acoplamento
Leu	L-leucina
Lys	L-lisina
Met	L-Metionina
m/z	Relação entre massa e carga
Phe	L-fenilalanina
Pro	L-prolina
Pyr	pirrolidina
RMN	Ressonância magnética nuclear
Ser	L-serina
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
t_r	Tempo de retenção
TEAC	Capacidade antirradicalar em equivalentes de Trolox, do inglês <i>Trolox equivalent antiradical capacity</i>
Thr	L-treonina
Trp	L-triptofano
Tyr	L-tirosina
Val	L-valina

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
λ^{Abs}	Comprimento de onda máximo de absorção
λ^{Em}	Comprimento de onda máximo de emissão
λ^{Ex}	Comprimento de onda máximo de excitação

Página intencionalmente deixada em branco.

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1. Absorção e fluorescência no estado estacionário	23
1.2. Betalaínas: biossíntese e propriedades gerais.....	26
1.3. Betaxantinas derivadas de aminoácidos proteínogênicos	29
1.4. A fluorescência de betaxantinas encontradas em flores.....	39
1.5. Betaxantinas são antioxidantes e agentes terapêuticos	41
1.6. Betalaínas são lábeis	47
2. Objetivos	53
3. Resultados	55
3.1. Semissíntese e caracterização de betaxantinas.....	55
3.2. Caracterização de betaxantinas por espectroscopia de RMN de ¹ H.....	62
3.3. A elusiva betaxantina-cisteína.....	65
3.4. As duas betaxantinas da L-lisina.....	69
3.5. Propriedades de absorção UV-Vis e fluorescência	71
3.6. Estabilidade hidrolítica.....	79
3.7. Propriedades antioxidantes.....	81
3.7.1. Poder redutor relativo ao ferro(III).....	83
3.7.2. Capacidade de sequestrar radicais de ABTS.....	88
3.8. Propriedades redox.....	90
4. Discussão.....	97

4.1.	Considerações sobre a semissíntese de betaxantinas	97
4.2.	As betaxantinas derivadas da L-lisina	99
4.3.	A betalaína não-imínica derivada da cisteína.....	101
4.4.	Padrão de fragmentação de betalaínas	102
4.5.	Propriedades eletrônicas de betaxantinas	110
4.6.	Betaxantinas derivadas de aminoácidos como antioxidantes.....	114
5.	Conclusões	123
6.	Parte Experimental	125
6.1.	Reagentes e solventes.....	125
6.2.	Soluções	125
6.2.1.	Gerais	126
6.2.2.	Análise cromatográfica	127
6.2.3.	Ensaio ABTS.....	127
6.2.4.	Método FRAP	128
6.3.	Semissínteses e purificações	128
6.3.1.	Obtenção de ácido betalâmico em acetato de etila.....	128
6.3.2.	Extração de ácido betalâmico para a fase aquosa	129
6.3.3.	Semissíntese de betaxantinas primárias não-fenólicas.....	129
6.3.4.	Semissíntese de Pro-Bx e Pyr-Bx	130
6.3.5.	Semissíntese de DA-Bx, DOPA-Bx e Tyr-Bx	131
6.3.6.	Semissíntese de Cys-Bx	131

6.3.7.	Purificação.....	132
6.4.	Métodos de caracterização	133
6.4.1.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	133
6.4.2.	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....	134
6.4.3.	Espectroscopia de absorção, emissão e excitação.....	134
6.4.4.	Coeficiente de absorção molar (ϵ).....	134
6.4.5.	Rendimento quântico de fluorescência	135
6.5.	Determinação da estabilidade em solução aquosa	136
6.6.	Ensaio ABTS.....	136
6.7.	Método FRAP	137
6.8.	Voltametria cíclica	137
7.	Referências.....	139
8.	Anexos.....	161
8.1.	Espectros de ESI-qTOF-MS/MS e padrões de fragmentação.....	163
8.2.	Espectros de RMN	187
8.3.	Coeficiente de absorção molar	196
8.4.	Rendimento quântico de fluorescência	200
8.5.	Estabilidade hidrolítica.....	204
8.6.	Propriedades antioxidantes.....	208
	Súmula curricular	220

Página intencionalmente deixada em branco.

1. INTRODUÇÃO

Os órgãos de flores pigmentadas por flavonoides ou betalaínas podem ser fluorescentes. Auronas e antocianinas (subclasses dos flavonoides) fluorescentes são encontradas em *Antirrhinum majus* L. e *Rhododendron indicum* (L.) Sweet, enquanto a fluorescência nas flores das variedades amarelas de *Mirabilis jalapa* L., *Lampranthus productus* N.E.Br e *Portulaca grandiflora* Hook., se origina das suas respectivas betaxantinas (subclasse das betalaínas).^{2, 3} Embora ainda não esteja claro se a fluorescência natural das plantas possui um papel na sinalização biológica ou se é simplesmente uma consequência não funcional,^{2, 4} contribuições importantes no estudo de flores intactas e no desenvolvimento de métodos de extração e quantificação de betalaínas foram feitas a partir da descoberta da emissão de fluorescência desses compostos.^{3, 5-8} Esta Tese de Doutorado trata do estudo de diversos aspectos relacionados a betaxantinas derivadas de aminoácidos proteinogênicos. Por isso, uma breve discussão sobre como medir propriedades de absorção e fluorescência é apresentada a seguir.

1.1. Absorção e fluorescência no estado estacionário

A figura de mérito mais importante no estudo de compostos fluorescentes é seu brilho, que é definido como o produto do rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FI}) e o coeficiente de absorção molar ($\Phi_{FI} \times \epsilon$).⁹ A absorção de um fóton é um processo ultrarrápido (escala de femtosegundo, 10^{-15} s) que induz a transição de uma molécula do seu estado eletrônico fundamental para um estado eletronicamente excitado. O ϵ (em $L mol^{-1} cm^{-1}$) da espécie irradiada, a sua concentração em solução (c ; $mol L^{-1}$) e o caminho óptico percorrido pela luz na amostra (b ; cm) se relacionam com a razão entre a intensidade da luz incidente e transmitida (Lei de Beer-Lambert, Eq. 1). O coeficiente de

absorção molar é proporcional à eficiência na absorção de luz pelas moléculas da amostra, e valores altos de ϵ estão relacionados a transições permitidas.¹⁰

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \epsilon bc \quad \text{Eq. 1}$$

Espécies eletronicamente excitadas eventualmente retornam ao seu estado fundamental por meio de processos radiativos (emissão de luz) e processos não radiativos. Fluorescência e fosforescência são os processos radiativos mais comuns e diferem quanto à sua duração. Enquanto a fluorescência ocorre, virtualmente, durante a irradiação, a fosforescência pode durar muito mais tempo dada a sua proibição por spin, *i.e.*, estado excitado tripleto decaindo a um estado fundamental singlete. Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão podem ser ilustrados por um diagrama de Jablonski (Figura 1).

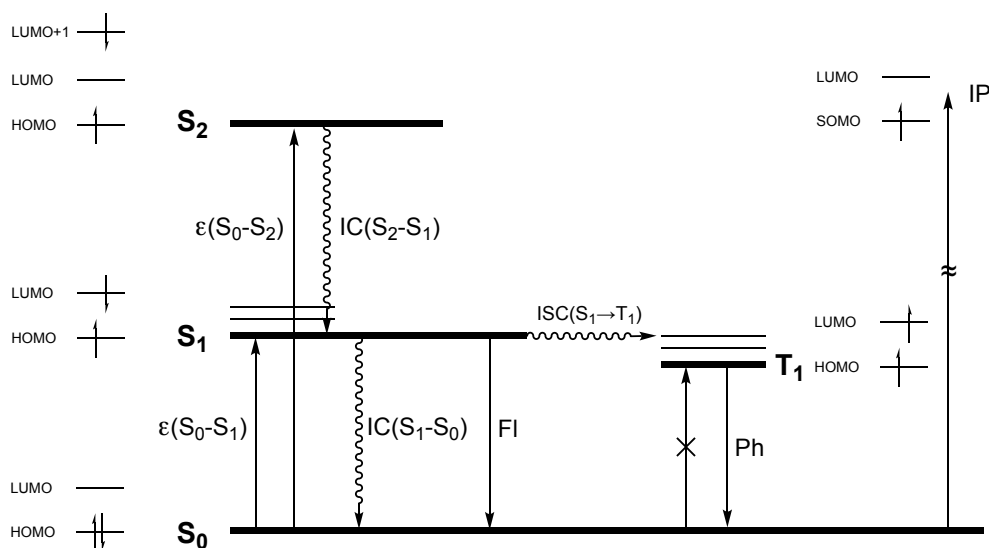


Figura 1. Diagrama de Jablonski. Quando um composto fluorescente absorve luz ele pode ser excitado para estados eletrônicos de energia mais alta que não se restringem ao S₁. Contudo, sua emissão geralmente ocorre do estado S₁ e concorre com a conversão interna (IC) entre os estados com multiplicidade singlete, um processo não radiativo. Além disso, a emissão concorre em alguns casos com a população de estados tripletes, processo chamado de cruzamento intersistemas (ISC) e que normalmente envolve interseções cônicas relacionadas a acoplamento spin-orbital de forma a superar a proibição da inversão do spin do elétron. Assim, os tempos de vida de espécies excitadas singlete são frequentemente menores que 10⁻⁸ s, enquanto os valores para espécies tripleto variam, tipicamente, de μs a segundos.¹¹ O potencial de ionização (IP) é a energia necessária para abstrair um elétron da espécie no estado fundamental.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) é uma medida de eficiência do processo de emissão em relação ao número de fótons absorvidos e é, portanto, menor ou igual a 1. Substâncias com os valores de Φ_{Fl} , próximos a 1, como as rodaminas, apresentam emissão de fluorescência mais intensa. O rendimento quântico de fluorescência pode ser determinado diretamente usando um espectrômetro de fluorescência equipado com esfera de integração¹² ou através de medidas relativas a um padrão secundário para o qual o Φ_{Fl} é conhecido. O padrão escolhido deve ter perfis de absorção e emissão similares ao da amostra e as soluções de ambos devem ter absorção inferior a 0,1 para evitar efeitos de filtro interno. O valor de Φ_{Fl} pode ser determinado a partir da medida das emissões de fluorescência de uma amostra e do padrão para os quais as absorções no comprimento de onda de excitação são conhecidas, bem como os índices de refração (n_D) das suas soluções, empregando-se a Eq. 2. Uma outra maneira é realizar uma série de medidas com o padrão e a amostra em uma certa faixa de absorção e comparar os coeficientes angulares das retas obtidas quando se correlaciona a área sobre a curva de emissão e a absorção no comprimento de onda de excitação (Eq. 3).¹³

$$\Phi_{Fl} = \Phi_{Fl}^r \frac{A^r}{A} \frac{E}{E^r} \left(\frac{n_D}{n_D^r} \right)^2 \quad \text{Eq. 2}$$

$$\Phi_{Fl} = \Phi_{Fl}^r \frac{\alpha}{\alpha^r} \left(\frac{n_D}{n_D^r} \right)^2 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde, A é o valor da absorção da solução, E é o valor da área sob a curva de emissão, α é o coeficiente angular do ajuste linear do gráfico de área sob a curva de emissão vs. absorção no comprimento de onda de excitação, n_D é o índice de refração do solvente, e o sobrescrito r se refere aos valores do padrão de referência de fluorescência.

Comparando-se os espectros de absorção e emissão normalizados para máximo 1 é possível estimar a energia do estado singlete (E_S ou $E_{0,0}$) de uma molécula (Figura 2). Além disso, a diferença entre os comprimentos de onda máximo de absorção (λ^{Abs}) e de emissão (λ^{Em}) de um composto permite determinar quanta energia foi utilizada em processos não radiativos no estado excitado e é denominada deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$; nm ou cm^{-1}).¹¹

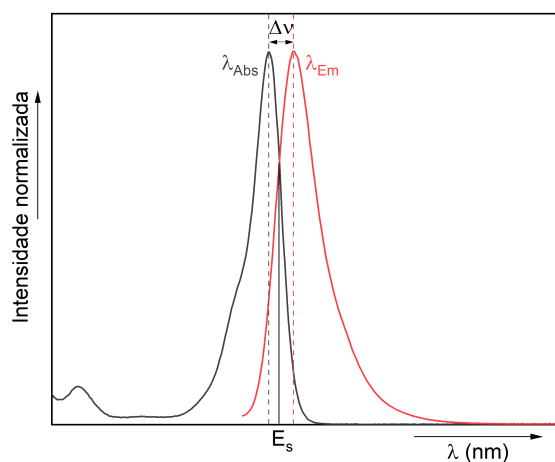


Figura 2. Exemplos genéricos de espectros de absorção, em cinza escuro, e de emissão de fluorescência, em vermelho. As linhas tracejadas indicam os máximos de absorção (λ^{Abs}) e emissão (λ^{Em}). O deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$), diferença entre os máximos de emissão e absorção, e ponto de intersecção, que corresponde a energia singlete (E_S) também estão representados na figura.

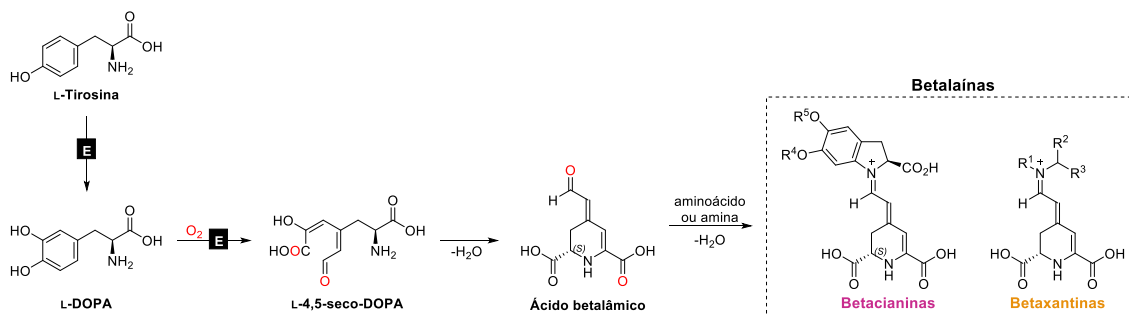
1.2. Betalaínas: biossíntese e propriedades gerais

As cores de frutos e flores abrangem todo o espectro visível, exceto o branco e o preto absolutos, além de pigmentos que absorvem radiação ultravioleta e infravermelho. Para as espécies capazes de ver, esses pigmentos dão beleza ao planeta e são importantes na comunicação entre espécies. No caso de plantas e animais, cores e contraste atraem polinizadores e dispersores de sementes. Antocianinas são os pigmentos não fotossintetizantes mais abundantes das angiospermas, responsáveis pela maior parte das cores vermelho, azul e roxo em flores e frutos. Betalaínas, cujas cores variam do amarelo ao magenta, substituem as antocianinas em grande parte das plantas pertencentes à ordem

Caryophyllales¹⁴⁻¹⁶ e são encontradas também em alguns fungos basidiomicetos¹⁷ e na bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*¹⁸.

Betalaínas naturais são divididas em betacianinas e betaxantinas. Betacianinas têm coloração magenta e são formadas a partir da condensação entre ácido betalâmico e ciclo-DOPA ou seus derivados glicosilados. Em betaxantinas, outros aminoácidos ou aminas substituem a ciclo-DOPA dando origem a compostos de cor amarela.¹⁹ Betalaínas são frequentemente encontradas como misturas de betacianinas e betaxantinas em suas fontes naturais. A combinação desses pigmentos em diferentes proporções nos organismos vivos é responsável pelas suas cores entre o laranja e o magenta, passando pelo vermelho.²⁰ A beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) é a principal fonte de betanina, uma betacianina, e a indicaxantina (betaxantina da L-Prolina) é obtida principalmente dos frutos da opuntia (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.).^{21, 22} Além de suas propriedades corantes naturais, que atraíram o interesse da indústria alimentícia, para o uso desses pigmentos como corantes para alimentos⁸, as betalaínas possuem alto potencial como antioxidantes, superior à de muitos flavonoides, do ácido ascórbico, da vitamina E, e de seu análogo Trolox.^{8, 23-25}

A biossíntese de betalaínas ocorre a partir da L-tirosina, e pode ser resumida em quatro etapas, das quais duas requerem catálise enzimática (Esquema 1). A L-tirosina é convertida à L-DOPA, por meio de uma reação de hidroxilação, catalisada por uma enzima do citocromo P450. O anel da L-DOPA sofre uma reação de clivagem oxidativa pela enzima L-DOPA 4,5-dioxigenase (DODA) para formação de L-4,5-seco-DOPA. A ciclização de L-4,5-seco-DOPA ocorre espontaneamente sob condições aquosas ácidas, para formação de ácido betalâmico, a partir do qual resultam as betalaínas.²⁶



Esquema 1. Biossíntese simplificada de betalainas. A formação das duas classes de betalainas ocorre de forma espontânea, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a partir do acoplamento do ácido betalâmico com derivados de ciclo-DOPA e aminoácidos ou aminas. A letra “E” sobre as setas indica transformações enzimáticas.

O sistema conjugado 1,7-diaza-heptametínio presente nas betalainas é responsável, de forma geral, pela cor, emissão de fluorescência e pelas propriedades antioxidantes desses compostos.^{8,25} No entanto, mudanças estruturais na porção superior desses compostos, proveniente dos aminoácidos ou aminas, podem modular essas propriedades, inclusive a estabilidade das betalainas, que são compostos sujeitos à hidrólise, descarboxilação e oxidação.²⁷⁻²⁹ Betalainas naturais são menos estáveis que corantes sintéticos e as suas cores e outras propriedades são afetadas por fatores externos, como ácidos e bases fortes, luz intensa, alta temperatura e presença de oxigênio, que podem acelerar o processo de degradação desses compostos.¹⁹ Apesar dessa desvantagem, as betalainas são estáveis em uma faixa de pH mais ampla do que as antocianinas e podem ser estabilizadas por encapsulação.^{14,30}

Qualquer um dos 220 aminoácidos encontrados em plantas pode, potencialmente, dar origem a betaxantinas.³¹ De acordo com Khan e Giridhar, 75 betalainas já foram identificadas a partir de fontes naturais, sendo 32 delas betaxantinas.¹⁶ A primeira betaxantina derivada de um aminoácido proteínogênico foi identificada há quase 60 anos²² e, embora 19 betaxantinas provenientes desses aminoácidos já tenham sido identificadas e alguns estudos para investigar as propriedades desses compostos já tenham

sido realizados, não existe na literatura um estudo sistemático das propriedades desses compostos puros, e sua possível relação com a estrutura desses compostos. Nas próximas seções será apresentada uma breve revisão sobre as fontes naturais dessas betaxantinas e sua identificação nessas fontes, e um compilado dos dados disponíveis na literatura sobre algumas de suas propriedades como, emissão de fluorescência, potencial antioxidante e sua estabilidade.

1.3. Betaxantinas derivadas de aminoácidos proteínogênicos

Nos estudos iniciais de identificação do perfil de betalaínas encontrados em fontes naturais, técnicas como eletroforese, cromatografia de camada delgada (TLC),^{21, 22, 32, 33} majoritariamente utilizadas, e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)³⁴ eram empregadas. Técnicas como LC-MS e a utilização de padrões de betalaínas semissintetizadas a partir do ácido betalâmico permitiram a identificação de um número muito maior de betalaínas. Além disso, o uso dessas técnicas permitiu investigar de forma mais detalhada o perfil dos pigmentos em fontes naturais estudadas anteriormente e descobrir betalaínas em fontes nas quais elas não haviam sido reportadas ainda.^{20, 35-39}

Indicaxantina (Pro-Bx) é uma das betaxantinas naturais mais conhecidas e estudadas. Ela foi a primeira betaxantina a ser isolada e identificada, a partir de extratos aquosos do fruto da opuntia [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.; Figura 3(b)], no qual está presente majoritariamente.²² A estrutura de Pro-Bx foi confirmada por meio de análise de RMN de ¹H que demonstrou que ela consiste em uma mistura de dois estereoisômeros (*E/Z*),⁴⁰ e de LC-HRMS com *m/z* de 309,1080.^{36, 41} Os primeiros dados de RMN de ¹³C da Pro-Bx só foram reportados mais de vinte anos depois, obtidos a partir de Pro-Bx isolada da opuntia e derivados de experimentos de gHSQC e gHMQC, nos quais foram identificados quatro isômeros de Pro-Bx.⁴² Além da opuntia, Pro-Bx já foi encontrada em

diversas outras fontes naturais, como nas flores de maravilha e primavera, nas beterrabas amarela e vermelha e na acelga.^{20, 32, 36, 37, 39}

A partir de extratos aquosos de beterraba vermelha [*Beta vulgaris* L; Figura 3(a)], foram isoladas e caracterizadas as betaxantinas Gln-Bx e Glu-Bx, denominadas vulgaxantina I e vulgaxantina II, respectivamente.²¹ Essas betaxantinas foram encontradas também em extratos de beterraba amarela [*B. vulgaris*; Figura 3(a)] analisados por HPLC, além de Pro-Bx e ácido betalâmico.^{33, 34}

Asp-Bx (miraxantina-II) e DA-Bx (miraxantina-V) foram isoladas e identificadas a partir de extratos de flores de maravilha [*Mirabilis jalapa* L.; Figura 3(d)], além das betaxantinas já identificadas anteriormente, Pro-Bx e Gln-Bx. DA-Bx foi obtida em quantidade suficiente para que sua estrutura fosse confirmada por análise de RMN de ¹H³² e RMN de ¹³C, a partir dos quais foram identificados quatro isômeros de DA-Bx.⁴² Além disso, análise de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-TOF-MS) forneceu um *m/z* de 347,1264, e os fragmentos de íons de *m/z* 303, *m/z* 301, *m/z* 257 e *m/z* 255 (*Collision Induced Dissociation*, CID), completaram a caracterização estrutural de DA-Bx.^{35, 43}

DOPA-Bx foi isolada e caracterizada das pétalas de flores da planta com folhas de língua (*tongue-leaf plant*, *Glottiphyllum longum* N.E.Br.; Figura 3(k)).⁴⁴ Resultados obtidos posteriormente por análises de HPLC determinaram que a DOPA-Bx é o único pigmento presente nas flores dessa espécie.⁴⁵ Essa betaxantina também é o único pigmento encontrado nas flores amarelas do cacto-margarida (*Lampranthus productus* N.E.Br.; Figura 3(e)).³ Essa composição única de pigmento não é comum entre as fontes naturais de betaxantinas, nas quais geralmente são encontradas misturas de pigmentos.

His-Bx, conhecida como muscaurina VII, foi identificada pela primeira vez em extratos do píleo (chapéu) de cogumelos de agário-das-moscas [*Amanita muscaria*; Figura 3(l)].⁴⁶ Em uma outra investigação do perfil dos pigmentos presentes no agário-das-moscas, realizada por HPLC acoplado a espectrometria massas, foi reportada a presença de Ala-Bx, DOPA-Bx, Phe-Bx, Ser-Bx, Thr-Bx e Trp-Bx.¹⁷

Tyr-Bx e Gly-Bx foram identificadas nas pétalas de flores de onze-horas [*Portulaca grandiflora* Hook.; Figura 3(i)] e denominadas portulacaxantina II e III, respectivamente. Ainda nas pétalas dessas flores foram encontradas as betaxantinas já conhecidas, DA-Bx, Gln-Bx e DOPA-Bx.^{31, 47} O espectro de RMN de ¹H de Tyr-Bx apresentou sinais típicos de ácido betalâmico e tirosina, confirmando a estrutura dessa betaxantina.³¹ Espectros de massas obtidos posteriormente confirmaram a identidade desses compostos.³⁷

A análise das betaxantinas presentes em culturas de “hairy roots” de beterraba amarela (*Beta vulgaris* var. *lutea*) permitiram a identificação de Asn-Bx (vulgaxantina III) e Leu-Bx (vulgaxantina IV), como novas betaxantinas naturais.⁴⁸ Análises de espectrometria de massas forneceram os valores de *m/z* de 326 para Asn-Bx³⁷ e de 325 para Leu-Bx.³⁶ Ainda, as betaxantinas Tyr-Bx e Gln-Bx, identificadas como majoritárias, e His-Bx, Pro-Bx, DOPA-Bx e Glu-Bx também foram encontradas.⁴⁸

As betaxantinas DA-Bx e Trp-Bx foram identificadas em duas variedades de flores de Celosia, a crista-de-galo [*Celosia argentea* var. *cristata* (L.) Kuntze; Figura 3(g)] e a crista plumosa [*Celosia plumosa* Hort. ex Burvenich; Figura 3(h)]. Esse foi o primeiro relato da ocorrência de Trp-Bx. A análise de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-TOF-MS) forneceu um *m/z* de 398,1327, e os fragmentos de íons de *m/z* 211 e *m/z* 188 (CID) confirmaram a estrutura de Trp-Bx.³⁵

A análise de extratos de opuntia e beterraba amarela por HPLC-MS permitiram uma melhor separação e identificação da mistura de betalaínas presentes nessas plantas. Na beterraba amarela, Gln-Bx foi o composto majoritário encontrado, e na opuntia, a Pro-Bx foi a betalaína encontrada majoritariamente, confirmando resultados obtidos anteriormente.^{22, 33} Leu-Bx, DA-Bx e Trp-Bx foram detectadas pela primeira vez em beterrabas amarelas. Quatro betaxantinas, encontradas tanto na opuntia quanto na beterraba amarela foram reportadas como naturais pela primeira vez: Ile-Bx, Phe-Bx, Ser-Bx e Val-Bx. A identidade das betaxantinas foi confirmada por HPLC-MS.³⁶ Met-Bx também foi reportada como uma betalaína genuína pela primeira vez nos frutos da opuntia. A análise HPLC-MS (m/z de 343), e a comparação do tempo de retenção com o composto de referência semissintetizado a partir do ácido betalâmico e da L-metionina, confirmaram a identidade dessa betaxantina.³⁸

Ala-Bx foi identificada e reportada pela primeira vez como uma betalaína natural nos pecíolos de acelga [*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla*; Figura 3(c)]. No total, dezenove betaxantinas foram identificadas por LC-MS nos pecíolos de acelga, em comparação com betaxantinas de referência semissintetizadas. DA-Bx e Gln-Bx foram as betaxantinas majoritárias encontradas nessa fonte.³⁷

Nas flores da perpétua [ou amaranto-globoso, *Gomphrena globosa* L.; Figura 3(f)], His-Bx foi identificada como o pigmento predominante e a Arg-Bx foi reportada como uma betaxantina natural pela primeira vez. Já nas flores da primavera [*Bougainvillea spectabilis* Willd.; Figura 3(j)], DOPA-Bx é a betaxantina majoritária, e Lys-Bx foi observada naturalmente pela primeira vez. A comparação dos espectros de massas e dos tempos de retenção com betaxantinas de referência semissintetizadas confirmaram a identidade das betaxantinas reportadas.²⁰ No entanto, como a lisina possui

em sua estrutura um grupo α -NH₂ e um grupo ε -NH₂, a sua reação com ácido betalâmico resulta em dois adutos, ambos com m/z 340, mas com máximos de absorção e tempos de retenção diferentes. Embora o tempo de retenção do pigmento identificado como Lys-Bx coincida com apenas um dos picos identificados na análise cromatográfica do padrão de Lys-Bx semissintetizado, a estrutura exata desse pigmento permanece desconhecida.^{20, 39}

A Thr-Bx foi a última das betaxantinas estudadas nesse trabalho a ser reportada como uma betalaína natural. Uma nova investigação da composição de betalaínas nas beterrabas vermelha e amarela, na acelga amarela e no fruto da opuntia por meio de análises de HPLC-MS revelou a presença de um número muito maior de betaxantinas nessas fontes do que havia sido reportado até o momento. Na beterraba vermelha, além de Gln-Bx, Glu-Bx e Pro-Bx, já identificadas anteriormente, vinte e uma outras betaxantinas foram encontradas, incluindo a Thr-Bx. Na análise da beterraba amarela, as mesmas betaxantinas encontradas na variedade vermelha foram identificadas. Em ambas as variedades, as betaxantinas majoritárias são as mesmas: Gln-Bx e DA-Bx. Essa similaridade na composição enfatiza a proximidade da relação filogenética entre essas duas variedades de beterrabas. Uma observação interessante é que, ao contrário do que se pode intuir pela coloração das beterrabas, a beterraba vermelha possui uma quantidade maior de betaxantinas (cerca de 2 vezes maior) do que a beterraba amarela.³⁹

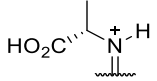
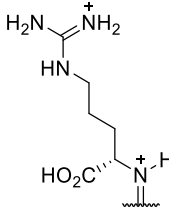
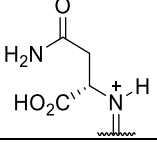
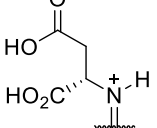
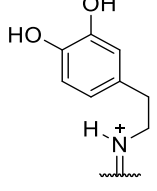
Apesar das técnicas que permitem análises mais precisas da composição dos pigmentos presentes em fontes naturais, ainda não foi reportada uma betaxantina derivada do aminoácido cisteína, que já foi utilizado para preservar betalaínas em cortes de beterrabas frescas.⁴⁹ Algumas tentativas de semissíntese a partir de ácido betalâmico e cisteína foram realizadas.^{43, 47, 50} No entanto, não existe, até o momento, uma elucidação da estrutura da betaxantina obtida a partir da reação de ácido betalâmico com a cisteína.

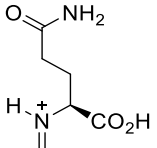
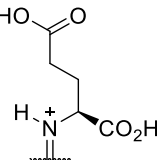
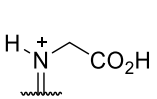
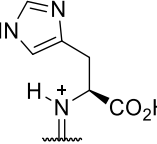
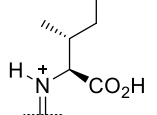
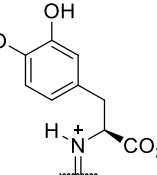
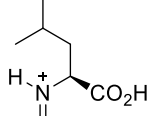
A Tabela 1 apresenta um resumo das fontes naturais nas quais as betaxantinas estudadas nesse trabalho foram encontradas até o momento, suas estruturas e os métodos pelos quais elas já foram caracterizadas.

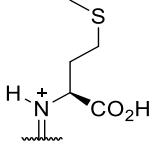
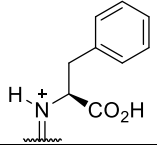
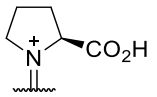
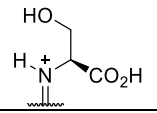
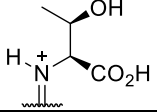
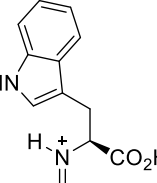


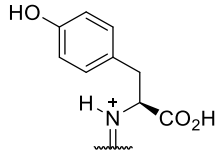
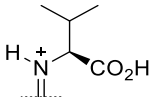
Figura 3. Fontes de betaxantinas. **(a)** Beterrabas vermelha, amarela e listrada (*Beta vulgaris* L.); **(b)** Fruto da opuntia (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.); **(c)** Acelga colorida (*Beta vulgaris* var. *cicla* (L.) Voss); **(d)** Maravilha (*Mirabilis jalapa* L.); **(e)** Cacto margarida (*Lampranthus productus* N.E.Br.); **(f)** Perpétua ou amaranto globoso (*Gomphrena globosa* L.); **(g)** Crista de galo (*Celosia argentea* var. *cristata* (L.) Kuntze); **(h)** Crista plumosa (*Celosia plumosa* Hort. ex Burvenich); **(i)** Onze-horas (*Portulaca grandiflora* Hook.); **(j)** Primavera (*Bougainvillea spectabilis* Willd.); **(k)** Planta com folhas de língua (*tongue-leaf plant*; *Glottiphyllum longum* N.E.Br.); **(l)** Agário das moscas (*Amanita muscaria*); **(m)** Rivina (*Rivina humilis* L.); **(n)** Quinoa (*Chenopodium quinoa*); **(o)** Djulis (*Chenopodium formosanum*); **(p)** Uluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). As referências das imagens estão na Tabela Anexo 1.

Tabela 1. Fontes de betaxantinas naturais, suas estruturas simplificadas e métodos pelos quais já foram caracterizadas.

Betaxantinas	Estrutura	Fontes ^a	Ref. Caracterização
<ul style="list-style-type: none"> • Ala-Bx • Alanina-betaxantina 		<u>Acelga</u> , ³⁷ agário-das-moscas, ¹⁷ beterraba amarela e vermelha, opuntia ³⁹ e djulis. ⁴¹	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁷ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Arg-Bx • Arginina-betaxantina 		<u>Perpétua</u> , ²⁰ opuntia, ⁵² beterraba amarela, vermelha e listrada, ⁵¹ e uluco. ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • MS²⁰ • HRMS⁵¹
<ul style="list-style-type: none"> • Asn-Bx • Asparagina-betaxantina • Vulgaxantina III 		<u>Raízes de beterraba amarela (hairy roots)</u> , ⁴⁸ acelga, ³⁷ beterraba amarela, vermelha ³⁹ e listrada ⁵¹ e uluco. ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁷ • HRMS⁵¹
<ul style="list-style-type: none"> • Asp-Bx • Ácido aspártico-betaxantina • Miraxantina II 		<u>Maravilha</u> , ³² agário-das-moscas, ⁴⁶ acelga, ³⁹ opuntia, ⁵² beterraba amarela, vermelha e listrada, ⁵¹ djulis, ⁴¹ uluco ⁵³ e rivina. ⁵⁴	<ul style="list-style-type: none"> • UV-Vis³² • MS³⁹ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • DA-Bx • Dopamina-betaxantina • Miraxantina V 		<u>Maravilha</u> , ³² onze-horas, ³¹ crista-de-galo e crista plumosa, ³⁵ beterraba amarela, ³⁶ vermelha ³⁹ e listrada, ⁵¹ acelga, ³⁷ quinoa, ⁵⁵ djulis, ⁴¹ uluco ⁵³ e rivina. ⁵⁴	<ul style="list-style-type: none"> • UV-Vis e RMN de ¹H³² • RMN de ¹H e RMN ¹³C⁴² • MS/MS^{35, 43} • HRMS^{35, 51} • HRMS/MS⁴¹

<ul style="list-style-type: none"> • Gln-Bx • Glutamina-betaxantina • Vulgaxantina I 		<p><u>Beterraba vermelha</u>,²¹ <u>maravilha</u>,³² <u>agário-das-moscas</u>,⁴⁶ <u>onze-horas</u>,³¹ <u>raízes de beterraba amarela (hairy roots)</u>,⁴⁸ <u>beterraba amarela</u>³⁶ e <u>listrada</u>,⁵¹ <u>opuntia</u>,³⁶ <u>acelga</u>,³⁷ <u>perpétua</u> e <u>primavera</u>,²⁰ <u>djulis</u>,⁴¹ <u>uluco</u>⁵³ e <u>rivina</u>.⁵⁴</p>	<ul style="list-style-type: none"> • UV-Vis e IR²¹ • MS³⁶ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Glu-Bx • Ácido glutâmico-betaxantina • Vulgaxantina II 		<p><u>Beterraba vermelha</u>,²¹ <u>agário-das-moscas</u>,⁴⁶ <u>raízes de beterraba amarela (hairy roots)</u>,⁴⁸ <u>acelga</u>,³⁷ <u>opuntia</u>,³⁹ <u>beterraba amarela</u> e <u>listrada</u>,⁵¹ <u>djulis</u>,⁴¹ <u>uluco</u>⁵³ e <u>rivina</u>.⁵⁴</p>	<ul style="list-style-type: none"> • UV-Vis e IR²¹ • MS³⁷ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Gly-Bx • Glicina-betaxantina • Portulacaxantina III 		<p><u>Onze-horas</u>,³¹ <u>acelga</u>,³⁷ <u>beterraba amarela</u> e <u>vermelha</u>³⁹ e <u>djulis</u>.⁴¹</p>	<ul style="list-style-type: none"> • UV-Vis³¹ • MS³⁷ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • His-Bx • Histidina-betaxantina • Muscaurina VII 		<p><u>Agário-das-moscas</u>,⁴⁶ <u>raízes de beterraba amarela (hairy roots)</u>,⁴⁸ <u>acelga</u>,³⁷ <u>opuntia</u>,³⁸ <u>perpétua</u> e <u>primavera</u>,²⁰ <u>beterraba amarela</u>, <u>vermelha</u>³⁹ e <u>listrada</u>,⁵¹ <u>djulis</u>⁴¹ e <u>uluco</u>.⁵³</p>	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁷ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Ile-Bx • Isoleucina-betaxantina 		<p><u>Beterraba amarela</u> e <u>opuntia</u>,³⁶ <u>acelga</u>,³⁷ <u>perpétua</u>,²⁰ <u>beterraba vermelha</u>³⁹ e <u>listrada</u>,⁵¹ <u>djulis</u>⁴¹ e <u>uluco</u>.⁵³</p>	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁶ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • DOPA-Bx • DOPA-betaxantina • Dopaxantina 		<p><u>Planta com folhas de língua (tongue-leaf plant)</u>,⁴⁴ <u>onze-horas</u>,³¹ <u>raízes de beterraba amarela (hairy roots)</u>,⁴⁸ <u>cacto-margarida</u>,⁴⁵ <u>primavera</u>,²⁰ <u>agário-das-moscas</u>,¹⁷ <u>beterraba amarela</u> e <u>vermelha</u>, <u>acelga</u>,³⁹ <u>quinoa</u>,⁵⁵ <u>djulis</u>⁴¹, <u>uluco</u>⁵³ e <u>rivina</u>.⁵⁴</p>	<ul style="list-style-type: none"> • UV-Vis⁴⁴ • MS²⁰ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Leu-Bx • Leucina-betaxantina • Vulgaxantina IV 		<p><u>Raízes de beterraba amarela (hairy roots)</u>,⁴⁸ <u>beterraba amarela</u>,³⁹ <u>opuntia</u>,³⁶ <u>acelga</u>,³⁷ <u>primavera</u>,²⁰ <u>beterraba vermelha</u> e <u>listrada</u>,⁵¹ <u>djulis</u>⁴¹ e <u>uluco</u>.⁵³</p>	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁶ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹

<ul style="list-style-type: none"> • Lys-Bx • Lisina-betaxantina 	Desconhecida	<u>Perpétua</u> e <u>primavera</u> , ²⁰ beterraba amarela e vermelha e <u>acelga</u> , ³⁹ e <u>uluco</u> . ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • MS²⁰ • MS/MS⁵⁶
<ul style="list-style-type: none"> • Met-Bx • Metionina-betaxantina 		<u>Opuntia</u> , ³⁸ beterraba amarela e vermelha, <u>acelga</u> , ³⁹ <u>djulis</u> ⁴¹ e <u>uluco</u> . ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • MS/MS³⁸ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Phe-Bx • Fenilalanina-betaxantina 		<u>Beterraba amarela</u> e <u>opuntia</u> , ³⁶ <u>acelga</u> , ³⁷ <u>primavera</u> , ²⁰ <u>agário-das-moscas</u> , ¹⁷ <u>beterraba vermelha</u> , ³⁹ <u>djulis</u> ⁴¹ e <u>uluco</u> . ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁶ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Pro-Bx • Prolina-betaxantina • Indicaxantina 		<u>Opuntia</u> , ²² <u>maravilha</u> , ³² <u>agário-das-moscas</u> , ⁴⁶ raízes de <u>beterraba amarela (hairy roots)</u> , ⁴⁸ <u>beterraba amarela</u> , ³⁶ <u>acelga</u> , ³⁷ <u>primavera</u> , ²⁰ <u>beterraba vermelha</u> , ³⁹ <u>quinoa</u> , ⁵⁵ <u>djulis</u> , ⁴¹ <u>uluco</u> ⁵³ e <u>rivina</u> . ⁵⁴	<ul style="list-style-type: none"> • UV-Vis e IR²² • RMN de ¹H^{22, 40} • RMN de ¹H e RMN de ¹³C⁴² • MS³⁶ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Ser-Bx • Serina-betaxantina 		<u>Beterraba amarela</u> e <u>opuntia</u> , ³⁶ <u>acelga</u> , ³⁷ <u>agário-das-moscas</u> , ¹⁷ <u>beterraba amarela, vermelha</u> ³⁹ e <u>listrada</u> , ⁵¹ <u>djulis</u> ⁴¹ e <u>uluco</u> . ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁶ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Thr-Bx • Treonina-betaxantina 		<u>Beterraba amarela e vermelha</u> , e <u>acelga</u> , ³⁹ <u>agário-das-moscas</u> , ¹⁷ <u>djulis</u> ⁴¹ e <u>uluco</u> . ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁹ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Trp-Bx • Triptofano-betaxantina 		<u>Crista-de-galo</u> e <u>crista plumosa</u> , ³⁵ <u>acelga</u> , ³⁷ <u>perpétua</u> e <u>primavera</u> , ²⁰ <u>agário-das-moscas</u> , ¹⁷ <u>opuntia</u> , ³⁹ <u>beterraba amarela, vermelha e listrada</u> ⁵¹ e <u>djulis</u> . ⁴¹	<ul style="list-style-type: none"> • MS/MS³⁵ • HRMS^{35, 51} • HRMS/MS⁴¹

<ul style="list-style-type: none"> • Tyr-Bx • Tirosina-betaxantina • Portulacaxantina II 		<p><u>Onze-horas</u>,³¹ raízes de beterraba amarela (<i>hairy roots</i>),⁴⁸ acelga,³⁷ primavera,²⁰ opuntia,³⁹ beterraba amarela, vermelha e listrada,⁵¹ djulis,⁴¹ uluco⁵³ e rivina.⁵⁴</p>	<ul style="list-style-type: none"> • UV-Vis e RMN de ¹H 200 MHz (CD₃CD)³¹ • MS³⁷ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹
<ul style="list-style-type: none"> • Val-Bx • Valina-betaxantina 		<p><u>Beterraba amarela</u> e <u>opuntia</u>,³⁶ acelga,³⁷ beterraba vermelha e listrada,⁵¹ djulis⁴¹ e uluco.⁵³</p>	<ul style="list-style-type: none"> • MS³⁶ • HRMS⁵¹ • HRMS/MS⁴¹

^a As fontes sublinhadas indicam as fontes nas quais as betaxantinas foram reportadas pela primeira vez. A Tabela Anexo 1 apresenta os nomes científicos das fontes de betaxantinas.

1.4. A fluorescência de betaxantinas encontradas em flores

Betaxantinas são mais fluorescentes que betacianinas e, embora o rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FI}) desses pigmentos seja baixo (inferior a 0,01), pétalas das variedades amarelas das flores onze-horas (*Portulaca grandiflora* Hook.), maravilha (*Mirabilis jalapa* L.) e do cacto-margarida (*Lampranthus productus* N.E.Br.) emitem luz verde quando irradiadas com luz azul.^{3, 5, 57}

O sistema 1,7-diaza-heptametínio é o cromóforo de todas as betalainas.^{3, 57} Trata-se de um sistema imino-enamino conjugado que lembra aquele de corantes polimetínicos como as cianinas. Algumas características dos aminoácidos ou amins precursores das betaxantinas podem aumentar ou diminuir a fluorescência desses compostos. De forma geral, grupos retiradores de densidade eletrônica aumentam a fluorescência de betaxantinas, como observado para a miraxantina I, derivada da metionina sulfóxido, e que possui o maior rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_{FI} = 0,0084$)⁵⁸ reportado para betaxantinas até o momento (DA-Bx: $\Phi_{FI} = 0,003$; Gln-Bx: $\Phi_{FI} = 0,0073$ e Pro-Bx: $\Phi_{FI} = 0,0053$).⁵⁹⁻⁶¹

A presença do grupo ácido carboxílico nas betaxantinas derivadas da L-DOPA e da tirosina aumentam a intensidade da emissão de fluorescência com relação aos seus pares descarboxilados.⁸ Um efeito similar é observado para as betalainas semissintéticas derivadas de cumarinas. A substituição do grupo metila (doador de elétrons) na cBeet120 pelo grupo retirador de elétrons trifluorometila na cBeet151 aumenta seu rendimento quântico ($\Phi_{FI} = 0,021$) em comparação ao determinado para a cBeet120 ($\Phi_{FI} = 0,006$).⁶² Em contrapartida, grupos doadores de elétrons parecem ter um efeito contrário sobre a emissão de fluorescência de betaxantinas, como observado pela redução na intensidade da emissão relativa da DOPA-Bx, em comparação à Phe-Bx.⁸

Além disso, outras considerações estruturais também podem ser levadas em consideração com relação aos diferentes grupos presentes nas betaxantinas, como a habilidade em formar ligações de hidrogênio intramoleculares. A presença dessas ligações na miraxantina I poderia suprimir movimentos de torções das ligações centrais dessa molécula, tornando-a mais rígida, o que explicaria a diminuição da perda de energia pela via não-radiativa observada para essa molécula e confirmada pelo seu rendimento quântico de fluorescência superior.⁵⁸ O mesmo foi observado para betacianinas nas quais a presença de ligações de hidrogênio intramoleculares aumentaram o tempo de vida do estado S_1 .⁶³

Estudos realizados com Pro-Bx, Gln-Bx e DA-Bx por meio de espectroscopia de absorção transiente mostram que a conversão interna S_1-S_0 e a fluorescência são os únicos canais de desativação para o estado excitado S_1 , que é desativado principalmente pela via não radiativa, visto que os rendimentos quânticos de fluorescência desses compostos são baixos, com uma pequena contribuição da fluorescência. Ou seja, não ocorre competição do cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$ e nem formação de fotoprodutos. O aumento da viscosidade do solvente resulta em um aumento tanto no tempo de meia-vida do estado S_1 quanto no Φ_{FI} . Esses resultados sugerem que a desativação do estado S_1 ocorre por uma intersecção cônica para o estado fundamental e que o cruzamento da superfície potencial depende de relaxação vibracional. Além disso, os Φ_{FIS} desses compostos *in vivo* podem ser maiores do que os obtidos para os compostos purificados, devido ao confinamento local.⁵⁹⁻⁶¹

Nas plantas, as cores atuam como sinalizadores para comunicação com outras espécies, como por exemplo, na atração de animais polinizadores e dispersores de sementes. No entanto, a relevância da emissão de fluorescência na sinalização de plantas

ainda é uma questão em debate.⁶⁴ Por outro lado, essa propriedade das betalaínas tem sido explorada em outros aspectos. O uso de detectores de fluorescência na identificação e quantificação de betalaínas em misturas complexas de extratos de plantas após a separação cromatográfica foi a primeira aplicação da fluorescência desses compostos, e permitiu a determinação de traços de betaxantinas em plantas de coloração branca.⁶ A reação entre ácido betalâmico e aminas fluorescentes permite a obtenção de pseudo-betalaínas mais fluorescentes que as naturais, como no caso da cBeet120, formada a partir do acoplamento de ácido betalâmico e 7-amino-4-metilcumarina, que foi utilizada como sonda fluorescente na detecção de eritrócitos infectados por *Plasmodium* spp., o agente causador da malária.⁶⁵ A propriedade de fluorescência natural de betaxantinas foi também aplicada no modelo animal *Caenorhabditis elegans*, em que após sete dias de incubação desses animais com betalaínas, pela localização da emissão de fluorescência, foi possível determinar que a betalaína foi acumulada no sistema digestivo, o que indica que ela foi incorporada no organismo por meio da alimentação.⁶⁶

1.5. Betaxantinas são antioxidantes e agentes terapêuticos

O aumento gradual dos níveis de oxigênio na atmosfera obrigou os organismos vivos primordiais a fixar em seu código genético códons para aminoácidos capazes de enfrentar os desafios impostos pelas espécies reativas de oxigênio às suas células. Ou seja, propriedades funcionais, além de propriedades estruturais, foram decisivas durante a finalização do código genético universal. Os aminoácidos triptofano, tirosina, metionina, e cisteína, por exemplo, são mais reativos frente a radicais peroxila do que os aminoácidos que apareceram mais cedo, como fenilalanina, ácido glutâmico e prolina.⁶⁷ Assim, a diversificação do repertório de aminoácidos forneceu aos organismos vivos as ferramentas necessárias para se adaptar ao estresse biótico e abiótico, e também suas

cores.⁶⁸ Pigmentos naturais biossintetizados a partir de aminoácidos frequentemente possuem atividades antioxidantes, e são aplicados como aditivos seguros para alimentos e cosméticos. As betalaínas são pigmentos nos quais os aminoácidos são incorporados de forma direta durante a biossíntese, sem sofrer descarboxilação, desaminação, ou outras grandes mudanças, exceto pelo grupo amino que se torna parte do sistema conjugado imina-enamina. Ou seja, a semelhança estrutural com seus aminoácidos precursores é mantida nesses compostos.⁶⁹

Antioxidantes são, de forma geral, compostos capazes de diminuir níveis elevados de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, prevenindo a atividade prejudicial que o acúmulo descontrolado dessas espécies pode gerar em organismos vivos. Esses compostos são um grupo heterogêneo de moléculas capazes de reduzir o estresse oxidativo de diferentes maneiras. Os antioxidantes de quebra de cadeia (*chain breakers*) interagem diretamente com as espécies radicais, formando espécies mais estáveis e menos prejudiciais para as células, finalizando as reações em cadeia. Os antioxidantes também podem atuar na prevenção do estresse oxidativo, por exemplo, por meio da quelação de metais, especialmente ferro e cobre que participam da reação de Fenton, ou da regulação de enzimas responsáveis pela formação de radicais. Compostos capazes de regenerar antioxidantes biológicos ou de absorver luz UV também atuam na prevenção do estresse oxidativo. Ainda, compostos capazes de reparar o dano oxidativo causado em biomoléculas também são considerados como compostos antioxidantes.⁷⁰

A maioria dos estudos sobre capacidade antioxidante de betalaínas são baseados em ensaios de sequestro de radicais ABTS ou DPPH, e FRAP, e demonstram que, de forma geral, as betalaínas possuem capacidade antioxidante superior à de antioxidantes conhecidos, como ácido ascórbico, ácido gálico e Trolox. No entanto, boa parte desses

estudos demonstram o potencial antioxidante e os benefícios das propriedades nutricionais de extratos de betalaínas, ou seja, misturas de betalaínas e não betalaínas purificadas.⁷¹ O conteúdo de antioxidantes em alimentos e capacidade antioxidante total relacionada a esse conteúdo são aspectos importantes da qualidade e funcionalidade dos alimentos, e são usadas na promoção do consumo de alimentos com alto potencial antioxidante. Como betalaínas são antioxidantes, a medida da capacidade antioxidante total de produtos que contém betalaínas é relevante.⁵¹ Contudo, a presença de outros compostos presentes nas fontes analisadas que podem interferir nos resultados não pode ser descartada. Além disso, o uso de extratos de betalaínas pode estar relacionado a baixa disponibilidade desses compostos em fontes naturais e/ou a dificuldade na obtenção desses compostos em quantidades suficientes para realização dos ensaios necessários mesmo por meio de procedimentos de semissíntese. A análise de compostos purificados permite a caracterização do real papel de cada um desses compostos, além de correlações com suas estruturas.

Escribano e colaboradores foram os primeiros a investigar a capacidade antiradicalar de betalaínas, a partir de extratos de betacianinas (mistura de betanina e betanidina) e betaxantinas (mistura de Gln-Bx e Glu-Bx, vulgaxantina I e II, respectivamente) presentes na beterraba vermelha, e concluíram que as betacianinas possuem uma capacidade de sequestrar radicais ABTS consideravelmente maior do que as betaxantinas. Os autores também mostraram que essa capacidade é fortemente afetada pelo pH do meio, que é maior em meios neutros e básicos.²³ Esse estudo despertou o interesse na atividade antioxidante desses compostos, e diversos outros estudos foram realizados para investigar essa propriedade das betalaínas, a partir de extratos de

beterraba,^{51, 72, 73} frutos da opuntia^{8, 74-77} e flores da crista plumosa (*C. argentea* var. *plumosa*).⁷⁸

Estudos sobre a relação entre as estruturas de betalaínas naturais e pseudo-naturais e suas capacidades de sequestrar radicais demonstraram que, embora exista uma relação entre a presença de grupos hidroxila fenólicos na estrutura das betalaínas e sua capacidade antioxidante, existe também uma “atividade intrínseca” que não está relacionada à presença de aromaticidade ou grupos hidroxila na estrutura das betalaínas, mas que pode estar associada ao sistema de ressonância no 1,7-diaza-heptametínio, e ser comum a todas as betalaínas.⁷⁴ A presença de grupos hidroxila na molécula aumenta a capacidade antioxidante das betalaínas, como reportado para DA-Bx (TEAC = 5,8), que possui dois grupos hidroxila, e um valor de TEAC superior ao encontrado para o galato de epigallocatequina (TEAC = 4,8), um eficiente antioxidante extraído do chá verde.^{79, 80} A extensão da conjugação da porção betalâmica com um anel aromático também aumenta a capacidade antioxidante de betalaínas, enquanto a presença de carga positiva em betaxantinas derivadas de aminas secundárias diminui o valor do TEAC obtido para essas betalaínas em comparação com betaxantinas primárias de estrutura semelhante.⁸

De forma geral, o pH possui um efeito significativo na capacidade antioxidante das betalaínas, para as quais ocorre um aumento nos valores de TEAC obtidos a partir de pH 5,5, em comparação com os valores obtidos em meio ácido, entre pH 3,5 e 5, nos quais os valores se mantêm muito similares. Essa dependência do pH sugere a existência de um equilíbrio de protonação que afeta a capacidade antioxidante desses compostos. Embora alguns grupos possuam efeitos significativos sobre a capacidade antioxidante das betalaínas, um efeito similar do pH é observado para todas elas, independente da natureza da amina ou aminoácido precursor.^{8, 74}

A capacidade do ácido betalâmico, unidade estrutural comum a todas as betalaínas, em sequestrar radicais ABTS é equivalente a do antioxidante resveratrol⁸¹ e similar a das betalaínas com as estruturas mais simples.^{8, 74} Esses resultados demonstram que a capacidade antiradical das betalaínas está relacionada ao sistema conjugado proveniente da porção betalâmica dessas moléculas. Além disso, foi encontrado um valor de pK_a de 6,8 para o ácido betalâmico, que pode estar relacionado com o efeito do pH na capacidade das betalaínas em sequestrar radicais das betalaínas.²⁵

Embora Sekiguchi e coautores tenham semissintetizado dezenove betaxantinas derivadas de aminoácidos proteínogênicos, apenas a atividade antioxidante de Pro-Bx e DA-Bx foi determinada.⁵⁰ Gln-Bx demonstrou possuir maior potencial antioxidante que Pro-Bx em três ensaios diferentes: ABTS, DPPH e FRAP. Em um ensaio para determinar as propriedades de sequestro de radicais hidroxila (HORSA), Gln-Bx apresentou uma atividade para sequestrar radicais hidroxila 31,4% maior que a indicaxantina.⁸² Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que apontam que a presença do grupo imino carregado positivamente na indicaxantina pode diminuir a capacidade antioxidante da molécula.^{8, 82}

A capacidade antioxidante de nove betaxantinas derivadas de aminoácidos proteínogênicos e uma pseudo-natural foi testada por métodos *in vitro* e *in vivo*, no modelo animal *C. elegans*. Embora os efeitos antioxidantes observados *in vitro* e *in vivo* não se relacionem quantitativamente, apenas duas betaxantinas estudadas (Glu-Bx e Val-Bx) falharam em diminuir o estresse oxidativo no ensaio *in vivo*. O efeito antioxidante também foi relacionado com o aumento do tempo de vida do *C. elegans*. As betalaínas com os maiores efeitos antioxidantes *in vivo* também foram as que mais aumentaram a vida do *C. elegans*, o que, de acordo com os autores é devido à redução do estresse

oxidativo e à ativação dos fatores de transcrição DAF-16/FOXO e SKN-1/Nrf2. Esses fatores estão relacionados à longevidade e às vias de resistência de estresse oxidativo. Tanto betalaínas naturais quanto pseudo-naturais apresentaram efeitos positivos.⁸³

A absorção e a biodisponibilidade são questões importantes quando se considera o potencial efeito de antioxidantes dietéticos sobre a saúde. A biodisponibilidade de betalaínas foi demonstrada por meio do consumo de suco de beterraba e de frutos de opuntia frescos.^{76, 84} Betanina e indicaxantina, presentes na beterraba e na opuntia, foram detectadas na corrente sanguínea após a ingestão desses alimentos e extratos de LDL isolados após a ingestão demonstraram que ambas as betalaínas foram incorporadas nas lipoproteínas e podem estar envolvidas na proteção de LDL contra modificações oxidativas induzidas *ex-vivo*.

A suplementação de curto prazo da alimentação de pessoas saudáveis com frutos da opuntia comparada com a suplementação com vitamina C, o único outro componente antioxidante encontrado nesses frutos além das betalaínas, melhora consideravelmente o status de estresse oxidativo de indivíduos saudáveis, constatado pela redução de marcadores de dano oxidativo de lipídeos no plasma, concentrações mais altas dos principais antioxidantes plasmáticos e melhora no estado redox dos eritrócitos. A suplementação em doses comparáveis com vitamina C aumenta a defesa antioxidante de forma geral, mas não afeta significativamente o estresse oxidativo.⁸⁵

Um extenso trabalho já foi realizado na investigação da atividade biológica de indicaxantina (Pro-Bx),⁸⁶ que não está relacionada apenas às suas propriedades redutoras e antioxidantes,^{75, 76, 87} mas que inclui também propriedades anti-inflamatórias, efeitos antitumorais e antiproliferativos e efeitos neuromoduladores. Indicaxantina é, inclusive, capaz de permear a barreira hematoencefálica, se acumular no cérebro de ratos, e modular

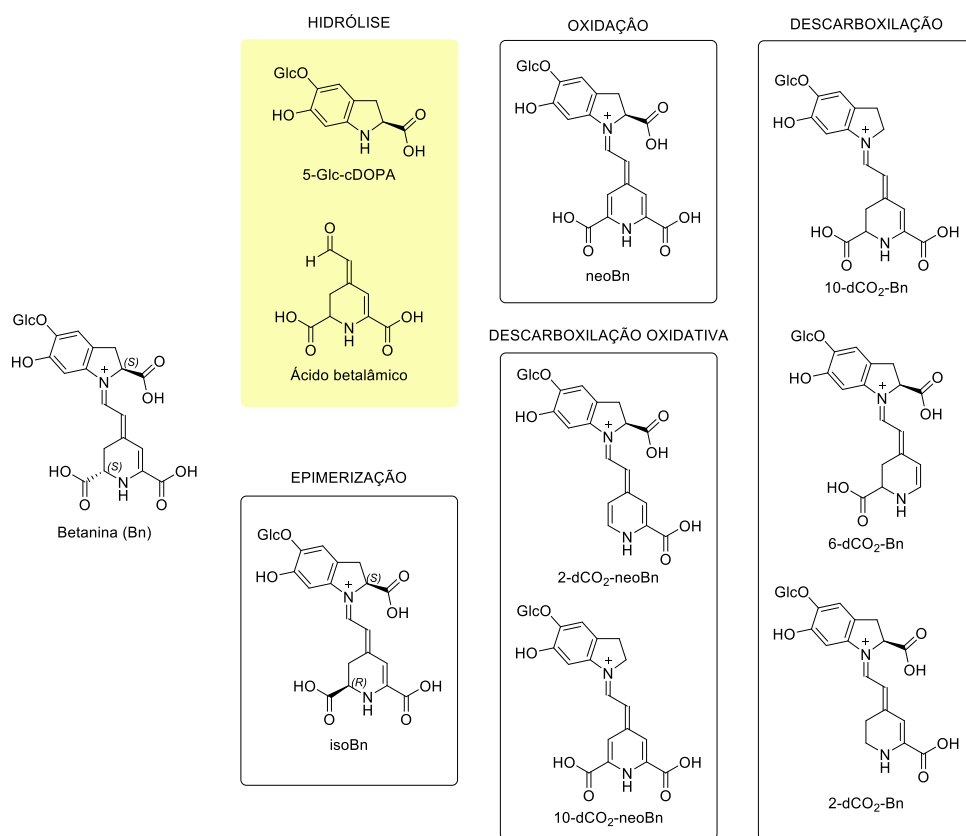
a atividade bioelétrica de neurônios *in vivo*.⁸⁸ Esses resultados demonstram a extensão da absorção e biodisponibilidade desse composto, que contribuem para o aumento de possibilidades de aplicações da indicaxantina e refletem o potencial das betalaínas, de forma geral.

1.6. Betalaínas são lábeis

Apesar de seu potencial antioxidante, a estabilidade das betalaínas pode ser uma desvantagem nas possíveis aplicações desses compostos. De forma geral, a estabilidade das betalaínas é afetada por alguns fatores como a temperatura, pH,⁸⁹ oxigênio, presença de luz^{19, 90} e atividade de água.^{91, 92} No entanto, a maioria dos estudos sobre a estabilidade química de betalaínas foram realizados com suco de beterraba, extratos de opuntia e betanina, e poucas informações sobre a estabilidade de outras betalaínas estão disponíveis na literatura.⁹³⁻⁹⁸

Embora a maioria das betalaínas seja solúvel somente em água ou solventes orgânicos polares próticos (e.g., metanol, etanol, 2,2,2-trifluoroetanol (TFE)), estes pigmentos são sensíveis a hidrólise, na qual ocorre quebra da ligação aldimínica, resultando em ácido betalâmico e amina precursora (Esquema 2).¹⁹ Valores similares para a constante cinética observada (k_{obs}) para a decomposição tanto de betanina quanto de indicaxantina, e a formação de ácido betalâmico sugere que a hidrólise é a via principal para a decomposição dessas betalaínas em toda a faixa de pH (2 – 11). A curva obtida a partir da correlação dos valores de k_{obs} com o pH mostra que a hidrólise de betanina e indicaxantina, e a consequente formação de HBt, são mais rápidas em condições ácidas e básicas, em comparação a condições neutras.^{89, 99} O formato de sino invertido da curva de betanina revelou a ocorrência de catálise ácida e básica específica, separadas por uma faixa de pH-independente, caracterizada pela ocorrência de catálise básica geral.⁸⁹ Esse

perfil é relatado na literatura para ocorrência de catálises específicas/gerais, sendo o exemplo mais conhecido o da hidrólise da aspirina.¹⁰⁰ Assim, existe uma dependência entre o pH e a estabilidade de betalínas que, de forma geral, são mais estáveis entre pH 4 e 7 e o pH ótimo para o máximo de estabilidade é em torno de 5,5.¹⁰¹ A hidrólise de indicaxantina em água pura ($k_{\text{obs}} = 6,9 \times 10^{-4} \text{ h}$, $t_{1/2} = 996 \text{ h}$) é muito mais lenta que a de betanina ($k_{\text{obs}} = 5,3 \times 10^{-3} \text{ h}$, $t_{1/2} = 130 \text{ h}$), nas mesmas condições experimentais.¹⁰²



Esquema 2. Principais produtos de decomposição observados para Betanina (Bn). Esquema adaptado da referência ¹⁰³

Além da susceptibilidade das betalínas à hidrólise, outras formas de decomposição térmica, como a descarboxilação, descarboxilação oxidativa e epimerização também podem ocorrer.^{89, 104, 105} Embora a hidrólise seja a principal via de degradação de betanina, produtos de descarboxilação e desidrogenação (neobetanina descarboxilada) foram observados durante o aquecimento prolongado de betanina a

85 °C.¹⁰⁴ Após períodos curtos de aquecimento, a recondensação de ácido betalâmico e derivados de ciclo-DOPA para sua forma de betacianina original ocorre em baixas temperaturas e meio ácido, indicando a reversibilidade da ligação aldimínica. No entanto, com o aquecimento prolongado produtos de degradação de ácido betalâmico e ciclo-DOPA podem ser formados, impedindo a regeneração da betalaína original.^{19, 89, 104}

Além da temperatura e do pH do meio, a presença de luz tem um efeito significativo sobre a estabilidade de betalaínas. Indicaxantina é mais estável na faixa de pH entre 6 e 7, na ausência de luz. Embora em períodos mais curtos de tempo a presença de luz não afete de forma significativa a estabilidade desse composto, sua exposição à luz por longos períodos de tempo diminui consideravelmente sua estabilidade, mesmo entre pH 6 e 7.¹⁰⁶ A presença de luz diminui consideravelmente a estabilidade de DA-Bx em toda a faixa de pH entre 4 – 8. Tanto na presença quanto na ausência de luz, observa-se uma maior velocidade de degradação em pH 8, provavelmente devido à oxidação dos grupos hidroxila em meio levemente básico. A DA-Bx é mais estável na faixa de pH entre 5 e 6, na ausência de luz.¹⁰⁷

Devido à natureza lábil das betalaínas, o estudo do mecanismo da ação antioxidante desses pigmentos é um desafio. É observada uma diminuição na capacidade de sequestrar radicais da betanina com o aumento da temperatura do meio, embora os seus produtos de hidrólise, ácido betalâmico e 5-O-β-glucosil ciclo-DOPA, sejam antioxidantes já conhecidos.¹⁰³ Assim, a determinação da capacidade antioxidante das betalaínas requer uma avaliação das condições utilizadas nos ensaios e das espécies presentes no meio.²⁴

Como forma de driblar a possível decomposição das betalaínas mantendo suas propriedades, a encapsulação de DA-Bx e indicaxantina (e betanidina) em maltodextrina

aumentou consideravelmente a estabilidade desses pigmentos, conservando tanto a cor quanto a capacidade antioxidante desses compostos, facilitando suas aplicações como antioxidantes.^{106, 107}

O potencial das betalaínas como moléculas bioativas contrasta com o número limitado de estudos com betalaínas puras e com o número de betalaínas diferentes empregadas nesses estudos, que utilizam, em sua grande maioria, betanina e indicaxantina.⁷¹ Isso ocorre devido à dificuldade em obter as betalaínas individualmente e puras em quantidades suficientes para realização dos estudos. Embora elas estejam presentes naturalmente em diversas fontes, algumas delas estão presentes em pequenas quantidades e quase sempre em misturas complexas.

O ácido betalâmico é a molécula principal para a formação da grande variedade de pigmentos encontrados. Diversos métodos para a obtenção de betalaínas a partir do ácido betalâmico já foram desenvolvidos. No entanto, a pequena quantidade de composto obtido continua a representar um desafio.^{7, 43, 108} Apenas recentemente, Guerrero-Rubio e colaboradores desenvolveram um método que utiliza *E. coli* modificada com a enzima DOPA dioxigenase da bactéria *G. diazotrophicus* em biofábricas capazes de produzir a condensação entre o ácido betalâmico e amina ou aminoácido precursor de cada betalaína derivada. Esse método permitiu a obtenção de até 150 mg de composto puro, e 15 betalaínas diferentes foram obtidas a partir desse método, sendo nove delas betaxantinas provenientes de aminoácidos proteínogênicos.^{83, 109}

Das 22 betaxantinas provenientes de biomoléculas (aminoácidos e derivados descarboxilados de aminoácidos) estudadas nesse trabalho, a betaxantina proveniente da L-lisina, embora já tenha sido identificada em fontes naturais, não teve sua estrutura

elucidada de forma não-ambígua, e a betaxantina proveniente da L-cisteína não foi reportada na literatura como uma betalaína natural até o momento.

Página intencionalmente deixada em branco.

2. OBJETIVOS

Entender como a porção proveniente do aminoácido de betaxantinas naturais influencia as suas propriedades de absorção, de fluorescência, redox e antioxidante.

Objetivos específicos

- i. Semissintetizar as betaxantinas derivadas dos 20 aminoácidos proteínogênicos, incluindo a betaxantina da cisteína e as duas betaxantinas da lisina.
- ii. Semissintetizar para uso como compostos-controle as betaxantinas derivadas da L-DOPA e da dopamina e a pseudo-betalaína derivada da pirrolidina.
- iii. Adquirir os espectros de absorção e de fluorescência de todas as betaxantinas e determinar propriedades de interesse.
- iv. Determinar a constante de hidrólise de todas as betaxantinas.
- v. Medir a capacidade antioxidantes dos compostos empregando os ensaios ABTS e FRAP.
- vi. Estudar o comportamento redox dessas betalaínas através de voltametria cíclica.

Página intencionalmente deixada em branco.

3. RESULTADOS

Durante a execução deste trabalho, foram preparadas vinte e uma betaxantinas naturais derivadas de aminoácidos proteinogênicos e três betaxantinas controle, derivadas da dopamina, L-DOPA e pirrolidina. Para facilitar a sua identificação, nesse trabalho, as betalaínas obtidas são representadas pela abreviatura de três letras do aminoácido correspondente seguido do sufixo “-Bx”.

3.1. Semissíntese e caracterização de betaxantinas

A semissíntese de betaxantinas requer o uso de ácido betalâmico (HBt), que foi extraído do suco de beterraba hidrolisado, conforme descrito anteriormente.^{27, 43} Nesse método, após a etapa de hidrólise do suco, a reação é acidificada para pH entre 1,5 e 2 com HCl concentrado e o ácido betalâmico é extraído com acetato de etila. Para que as reações possam ser realizadas em meio aquoso, o ácido betalâmico é então transferido para hidróxido de amônio aquoso pH 11. O pH resultante dessa solução fica em torno de 7. As reações entre o ácido betalâmico e L-aminoácidos ou aminas em excesso foram realizadas adaptando-se o método já utilizado no grupo.¹¹⁰ O pH da solução aquosa de HBt foi ajustado para 11 com NH₄OH e o aminoácido ou amina foi adicionado. A formação das betaxantinas foi acompanhada por espectrofotometria UV-Vis, obtendo-se alíquotas e monitorando-se o desaparecimento da banda correspondente ao ácido betalâmico ($\lambda^{Abs} = 430$ nm) e o aparecimento da banda característica de betaxantinas com máximo de absorção em torno de 480 nm. Na Figura 4, a reação de formação de Glu-Bx, exemplifica o perfil temporal da reação entre o ácido betalâmico (espectro inicial, em verde) e L-ácido glutâmico, até a formação do produto com absorção em 472 nm (espectro vinho).

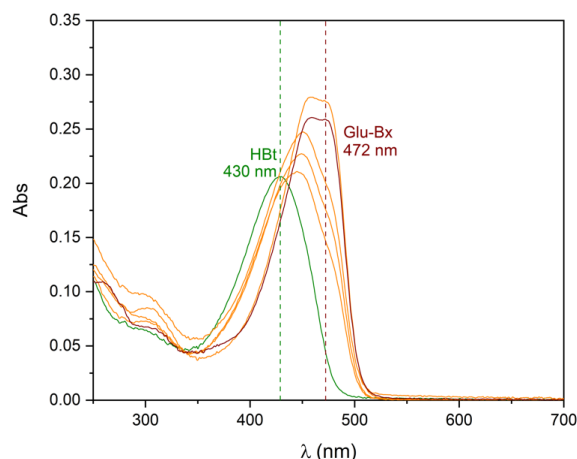


Figura 4. Espectros de absorção da reação de formação de Glu-Bx, partindo de ácido betalâmico (HBT) e ácido glutâmico, em pH 11, a 25 °C, por 48 h. Em verde, o espectro de absorção do HBT aquoso em pH 11. Em laranja, espectros de absorção da reação de HBT e ácido glutâmico em função do tempo, nos quais se observa o deslocamento do máximo de absorção de 430 nm para 472 nm. Em vinho, o espectro de absorção final, após a adição de HCl concentrado para ajuste do pH para 5. A diminuição na intensidade da absorção se deve à diluição da reação com a adição do HCl.

As betaxantinas foram classificadas em três grupos conforme as condições experimentais usadas na semissíntese. No primeiro grupo estão as betaxantinas Pro-Bx e Pyr-Bx, derivadas do aminoácido L-prolina e da pirrolidina, respectivamente. Essas betaxantinas foram obtidas seguindo o protocolo para a obtenção de Pro-Bx estabelecido anteriormente no grupo.¹¹⁰ Foram adicionados 10 equiv. de L-prolina ou pirrolidina ao ácido betalâmico e a reação foi mantida a temperatura ambiente (25 °C) por 30 min, tempo necessário para o desaparecimento da banda de absorção do ácido betalâmico. No segundo grupo estão as betaxantinas de aminoácidos primários e aromáticos não-fenólicos, que ocorrem de maneira mais lenta e requerem maior excesso de aminoácido (100 equiv.) na semissíntese. As reações foram mantidas sob agitação em temperatura ambiente (25 °C) por um período de até 48 h. No terceiro grupo estão a DA-Bx, DOPA-Bx e Tyr-Bx, que foram feitas nas condições do segundo grupo, mas em solução saturada com N₂ para evitar a oxidação dos reagentes fenólicos. Quando o produto não é destinado a análise das propriedades antioxidantes, N₂ pode ser substituído por ácido

ascórbico e a reação tem resultados similares em ambas as condições experimentais. Em todos os casos, uma vez formada a betaxantina, o pH foi ajustado para 5 com HCl concentrado em banho de gelo e mantidas a temperatura ambiente sob agitação por 30 min. As soluções resultantes foram então congeladas e liofilizadas antes da etapa de purificação por HPLC em condições de fase reversa e escala semi-preparativa.

As corridas cromatográficas foram obtidas com detecção por absorção em 254 nm e 480 nm. Em muitos casos, dois sinais com diferença de tempo de retenção pequena (ca. 1 min) foram observados, correspondendo a diastereômeros de uma mesma betalaína.¹¹¹ Nesses casos, somente as frações correspondentes a picos cromatográficos com absorção mais alta em 480 nm foram coletadas. Para a betaxantina derivada da lisina foram observados dois picos majoritários com absorção alta em 480 nm, que foram coletados separadamente. A purificação de todas as betaxantinas foi concluída em uma etapa de cromatografia em coluna com gel de Sephadex LH-20 em água. Os compostos purificados foram liofilizados e mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidos da luz. Os rendimentos das reações foram determinados espectrofotometricamente e são menores que 5% em todos os casos.

Devido à sua instabilidade em solução aquosa, as betaxantinas obtidas foram caracterizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução com ionização por elétron-spray operando em modo positivo (HPLC-ESI-qTOF-MS/MS). No caso da Cys-Bx, Lys-Bx e ϵ -Lys-Bx, a caracterização também foi realizada por RMN de ^1H . Os valores de razão massa/carga (m/z) experimental, m/z teórica, erro em ppm, e m/z dos fragmentos principais obtidos estão apresentados na Tabela 2, e os espectros de massas e padrões de fragmentação no Anexo

1 até o Anexo 24. Os valores de m/z sublinhados indicam os fragmentos já relatados na literatura, e são apresentados com as referências correspondentes.

Todas as betaxantinas analisadas apresentaram valores de m/z condizentes com os calculados para os íons $[M+H]^+$ desses compostos (ou $[M]^+$, no caso de Pro-Bx e Pyr-Bx), e com valores de m/z disponíveis na literatura, e apresentam erro inferior a 5 ppm, com exceção da DOPA-Bx e Pro-Bx. No entanto, o valor mais elevado do erro para essas duas betaxantinas parece estar relacionado a um problema na calibração do espectrômetro de massas, que só foi verificado após a análise dos compostos. As duas frações de Lys-Bx foram analisadas separadamente, e valores iguais de m/z foram encontrados para as duas frações, o que indica a formação de dois isômeros, de acordo com o reportado na literatura.^{20, 39}

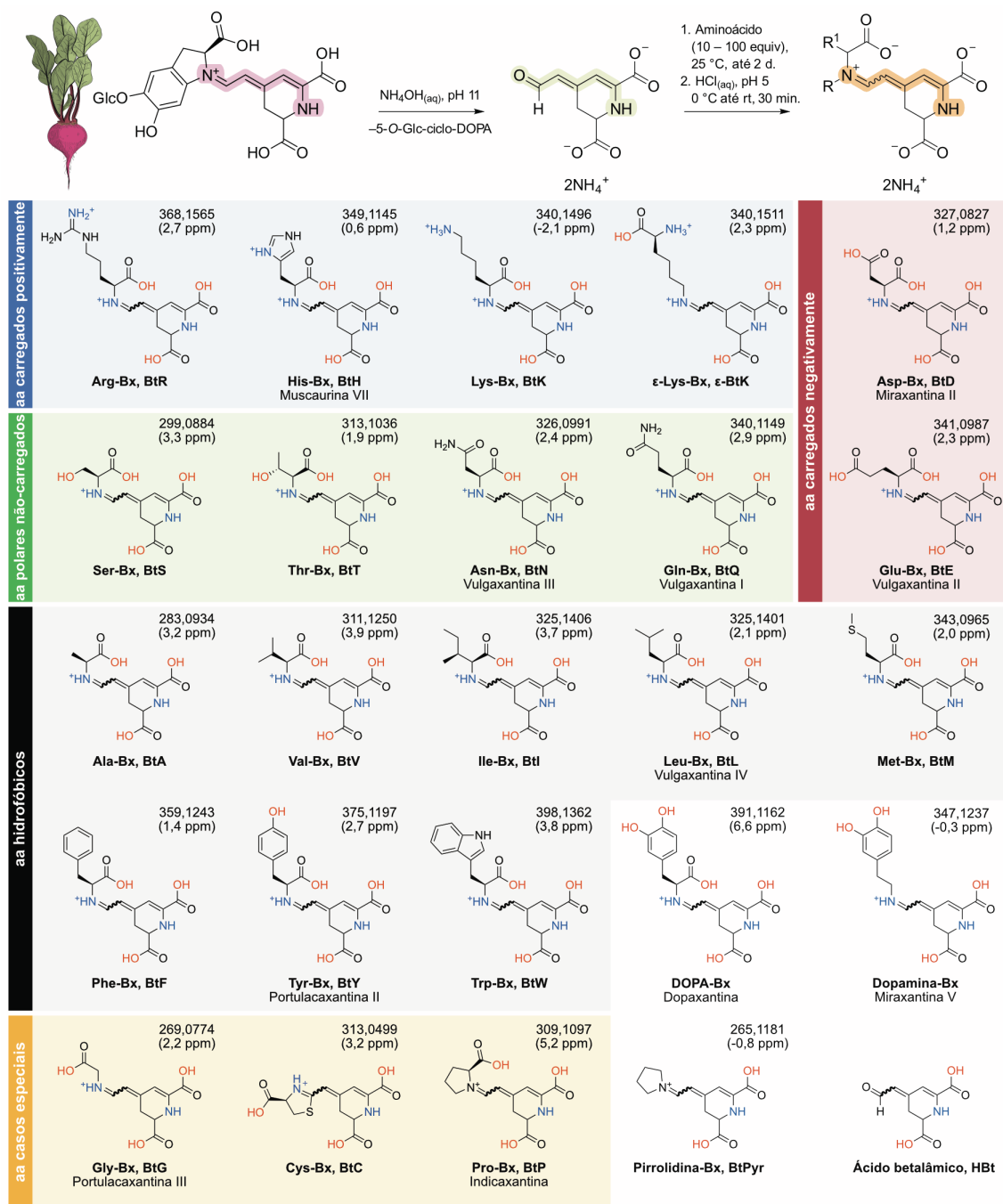


Figura 5. Semissíntese de betaxantinas derivadas de aminoácidos e estruturas das betaxantinas obtidas e seu precursor comum, ácido betalâmico. As betaxantinas estão na forma de sais de amônio antes da purificação. Os compostos estão classificados de acordo com as propriedades de seus aminoácidos precursores (aa) e estão apresentados em sua forma completamente protonada por questões de clareza. As ligações onduladas indicam que ambos diastereoisômeros são formados. R é o substituinte no grupo amino do aminoácido ou hidrogênio. R¹ representa a cadeia lateral. Os números na parte superior de cada estrutura são a *m/z* observada e a diferença entre o valor de *m/z* calculado e observado, em partes por milhão (ppm).

Tabela 2. Fórmula química, valores de razão massa/carga (m/z) teórico, m/z experimental, erro em ppm e m/z dos fragmentos principais obtidos nas análises de HPLC-ESI-qTOF-MS/MS das betaxantinas obtidas.

Composto	Fórmula	m/z teórico [M + H] ⁺	m/z experimental [M + H] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentos principais	Ref.
Ala-Bx	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₆ ⁺	283,0925	283,0934	3,2	<u>237,0876</u> ; <u>209,0924</u> ; <u>191,0817</u> ; <u>165,1020</u> ; 165,0658; 163,0864; <u>150,0553</u> ; 137,0715; 119,0613	<u>41, 51,</u> <u>112</u>
Arg-Bx	C ₁₅ H ₂₂ N ₅ O ₆ ⁺	368,1565	368,1577	3,3	184,5830 ^a ; 161,5795 ^a ; 280,1785; 236,1874; 177,1394; 123,0920; 114,1030	51
Asn-Bx	C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₇ ⁺	326,0983	326,0991	2,4	252,0977; 309,0728; 282,1076; 265,0827; 234,0890; 194,0458; 165,0647; 137,0703; 124,0401; 119,0608	51
Asp-Bx	C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O ₈ ⁺	327,0823	327,0827	1,2	<u>281,0778</u> ; 253,0825; <u>235,0705</u> ; <u>193,0610</u> ; <u>150,0559</u> ; 147,0552	<u>41, 51</u>
Cys-Bx	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₆ S ⁺	313,0489	313,0499	3,2	267,0438; 239,0496; 221,0389; 175,0323	
DA-Bx	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₆ ⁺	347,1238	347,1237	-0,3	<u>303,1335</u> ; 301,1148; 255,1126; <u>211,0687</u> ; 165,0658	<u>35, 41, 51</u>
Gln-Bx	C ₁₄ H ₁₈ N ₃ O ₇ ⁺	340,1139	340,1149	2,9	266,1142; <u>323,0873</u> ; <u>277,0818</u> ; <u>249,0873</u> ; 248,1009; <u>233,0915</u> ; <u>231,0760</u> ; <u>194,0454</u> ; 165,0665; <u>150,0561</u> ; 137,0705; 119,0599	<u>41, 51,</u> <u>112</u>
Glu-Bx	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₈ ⁺	341,0979	341,0987	2,3	295,0928; 267,0980; 277,0805; <u>249,0870</u> ; <u>231,0773</u> ; <u>205,0981</u> ; 203,0807; 165,0664; 137,0715; 119,0608	<u>41, 51</u>
Gly-Bx	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₆ ⁺	269,0768	269,0774	2,2	<u>223,0715</u> ; <u>195,0766</u> ; <u>194,0444</u> ; 177,0652; <u>150,0541</u> ; <u>149,0710</u>	<u>41, 51</u>
His-Bx	C ₁₅ H ₁₇ N ₄ O ₆ ⁺	349,1143	349,1145	0,6	175,0610 ^a ; 152,0579 ^a ; 305,1228; <u>261,1349</u> ; <u>217,1453</u> ; <u>156,0776</u> ; <u>150,0559</u> ; 138,1035; 131,0601; <u>124,0398</u> ; <u>112,0874</u> ; <u>110,0717</u> ; <u>106,0654</u> ; <u>95,0609</u> ; <u>80,0490</u>	<u>41, 51</u>
Ile-Bx	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₆ ⁺	325,1394	325,1406	3,7	<u>279,1345</u> ; 251,1395; <u>235,1439</u> ; 233,1284; <u>207,1495</u> ; 205,1335; 165,0661; 137,0715; 119,0607	<u>41, 51</u>
DOPA-Bx	C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₈ ⁺	391,1136	391,1162	6,6	781,2210 ^b ; 391,1149 ^c ; <u>347,1247</u> ; <u>345,1094</u> ; <u>301,1197</u> ; 299,1042; <u>255,1130</u> ; <u>194,0455</u> ; <u>150,0553</u>	<u>41, 51</u>

Leu-Bx	$C_{15}H_{21}N_2O_6^+$	325,1394	325,1401	2,1	<u>279,1339</u> ; 251,1390; <u>235,1428</u> ; 233,1280; 207,1494; 205,1334; 191,1541; 165,0655; 149,0705; 137,0709; 119,0601	<u>41, 51</u>
Lys-Bx	$C_{15}H_{22}N_3O_6^+$	340,1503	340,1496	-2,1	323,1227; 294,1445; 170,5788 ^a ; 147,5758 ^a ; <u>296,1604</u> ; 279,1338; <u>252,1697</u> ; 235,1447; 211,0711; 196,0602; 150,0551; 147,1126; 106,0652	20, <u>56</u> ^d
ϵ -Lys-Bx	$C_{15}H_{22}N_3O_6^+$	340,1503	340,1511	2,3	294,1449; 170,5793 ^a ; 147,5768 ^a ; <u>296,1311</u> ; 276,1347; <u>252,1703</u> ; 249,1239; 211,0708; 203,1186; 165,0649; 150,0563; 137,0702; 124,0395; 106,0650	20, <u>56</u> ^d
Met-Bx	$C_{14}H_{19}N_2O_6S^+$	343,0958	343,0965	2,0	297,0908; 269,0959; 251,0848; 233,0732; <u>207,0955</u> ; 165,0661; 137,0713; 119,0610	<u>41, 51</u>
Phe-Bx	$C_{18}H_{19}N_2O_6^+$	359,1238	359,1243	1,4	<u>313,1186</u> ; 285,1234; <u>269,1297</u> ; 267,1126; <u>223,1230</u> ; 221,1074; 165,0656; 137,0707	<u>41, 51</u>
Pro-Bx	$C_{14}H_{17}N_2O_6^+$	309,1081	309,1097	5,2	<u>235,1077</u> ; <u>263,1040</u> ; <u>219,1125</u> ; 217,0980; 189,1031; 173,1081; 171,0923; 116,0710; <u>106,0658</u>	<u>41, 51</u>
Pyr-Bx	$C_{13}H_{17}N_2O_4^+$	265,1183	265,1181	-0,8	<u>221,1279</u> ; 219,1125; 191,1177; 175,1227; 173,1069; 106,0650	8 ^d
Ser-Bx	$C_{12}H_{15}N_2O_7^+$	299,0874	299,0884	3,3	<u>253,0816</u> ; 225,0875; <u>207,0770</u> ; 179,0820; 165,0666; 161,0705; 137,0714; 119,0602; <u>106,0653</u> ; 80,0495	<u>41, 51</u>
Thr-Bx	$C_{13}H_{17}N_2O_7^+$	313,1030	313,1036	1,9	<u>267,0977</u> ; 239,1028; 221,0918; 193,0967; 175,0864; 165,0653; 137,0713	<u>41, 51</u>
Trp-Bx	$C_{20}H_{20}N_3O_6^+$	398,1347	398,1362	3,8	352,1302; 324,1350; 306,1242; <u>269,0774</u> ; 262,1355; <u>211,0716</u> ; <u>188,0710</u> ; <u>179,0817</u> ; 165,0661; 137,0714; <u>130,0654</u> ; <u>119,0609</u>	<u>35, 41, 51</u>
Tyr-Bx	$C_{18}H_{19}N_2O_7^+$	375,1187	375,1197	2,7	<u>331,1296</u> ; 301,1184; <u>285,1238</u> ; 283,1087; 255,1134; <u>239,1186</u> ; 237,1015; <u>211,0714</u> ; <u>194,0458</u> ; 165,0669; 137,0712; 119,0611	<u>41, 51</u>
Val-Bx	$C_{14}H_{19}N_2O_6^+$	311,1238	311,1250	3,8	<u>265,1191</u> ; 237,1240; <u>221,1278</u> ; 219,1130; <u>193,1333</u> ; 191,1180; 165,0661; 150,0553; 137,0713; 119,0610	<u>41, 51</u>

^a fragmento com carga 2+; ^b íon [2M+H]⁺; ^c fragmento do íon [2M+H]⁺; ^d referência de valor unitário de *m/z*.

Fragmentos e referências sublinhados: valores de *m/z* já reportados na literatura. Demais referências: outras referências que possuem caracterização por MS, sem fragmentação.

3.2. Caracterização de betaxantinas por espectroscopia de RMN de ^1H

Devido à dificuldade na obtenção de quantidades suficientes de amostra para realização do experimento de RMN de ^1H para todas as betaxantinas, foram selecionadas algumas betaxantinas com grupos diferentes na porção proveniente do aminoácido ou amina precursora. Assim, foram escolhidas, as betaxantinas primárias: Ala-Bx, proveniente de um aminoácido alifático com uma cadeia lateral simples; Phe-Bx, que possui um anel aromático; DOPA-Bx, com um grupo catecol; DA-Bx, que possui um grupo ácido carboxílico a menos, com relação a estrutura da DOPA-Bx e Trp-Bx, com um grupo indol; e a betaxantina secundária: Pyr-Bx, tanto para investigar as possíveis diferenças entre as betaxantinas primárias e secundárias, quanto os efeitos da presença/ausência do grupo ácido carboxílico nessas moléculas. O espectro de ^1H de Pro-Bx foi obtido anteriormente no grupo,¹¹⁰ e foi utilizado como base para atribuição dos sinais de Pyr-Bx, e das demais betalaínas.

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) das betaxantinas foram adquiridos empregando-se D_2O como solvente (ca. 1 mg de Bx em 500 μL) e estão nos Anexo 25 – Anexo 33. Apesar de todos os esforços para retirar todos os resquícios de solventes orgânicos utilizados nas etapas de semissíntese e purificação dos compostos, observam-se sinais do formiato (δ : 8,44 ppm), proveniente da etapa de purificação por HPLC, acetato (δ : 1,92 ppm) e etanol (δ : 1,19 ppm (t); δ : 3,65 ppm (q)),¹¹³ provenientes do acetato de etila utilizado na extração do ácido betalâmico.

Os sinais foram atribuídos a partir dos espectros das betaxantinas (Pro-Bx e DA-Bx)^{42, 110} e dos aminoácidos ou aminas precursoras disponíveis na literatura.¹¹⁴ Os sinais correspondentes aos hidrogênios da porção aromática da DOPA-Bx foram atribuídos utilizando-se o espectro de RMN de ^1H da L-DOPA como referência.^{115, 116} De forma

geral, os sinais que provém da porção betalâmica das betalaínas apresentam deslocamentos químicos semelhantes nos espectros de RMN de ^1H , com algumas pequenas variações. Assim, o espectro pode ser dividido em duas regiões: a região com valores de δ maiores que o do D_2O ($\delta = 4,79$ ppm), nos quais aparecerem os sinais de H-5, H-7 e H-8, e os sinais dos anéis aromáticos das porções provenientes dos aminoácidos ou aminas; e a região com valores de δ inferiores ao do D_2O , na qual estão os sinais de H-2 e H-3, e os sinais dos H das cadeias alifáticas dos aminoácidos.

Observa-se também nos espectros sinais correspondentes à dois isômeros majoritários e sinais de isômeros minoritários que, devido à sua baixa concentração no meio, apresentaram sinais com baixa intensidade e/ou sobrepostos com outros sinais e, portanto, não foram atribuídos. No espectro de RMN de ^1H de Pyr-Bx (Anexo 32), observam-se sinais correspondentes a apenas dois isômeros, sendo um deles majoritário. Os espectros de RMN de ^1H das betaxantinas analisadas foram superpostos a fim de se comparar a possível influência da porção proveniente do aminoácido sobre os deslocamentos químicos dos hidrogênios. Os espectros foram divididos em duas partes para melhor visualização dos sinais.

Os sinais de H-8 de Pyr-Bx, assim como de Pro-Bx (dados da literatura),^{42, 110} estão mais desblindados que os sinais correspondentes nas demais betalaínas analisadas, com uma variação de ca. 0,3 ppm em relação a Ala-Bx, até ca. 1 ppm em relação a DOPA-Bx e Trp-Bx (Figura 6). A carga positiva no N-9, presente nas duas betaxantinas secundárias, desblinda o H-8. Na Ala-Bx, o H-8 está mais desblindado do que os H-8 das moléculas que possuem anel aromático em sua estrutura, e os sinais dos isômeros estão mais próximos do que nas demais moléculas. A ausência das hidroxilas na Phe-Bx

desblinda os sinais correspondentes aos hidrogênios da porção aromática da molécula, em comparação aos sinais correspondentes da DA-Bx e DOPA-Bx.

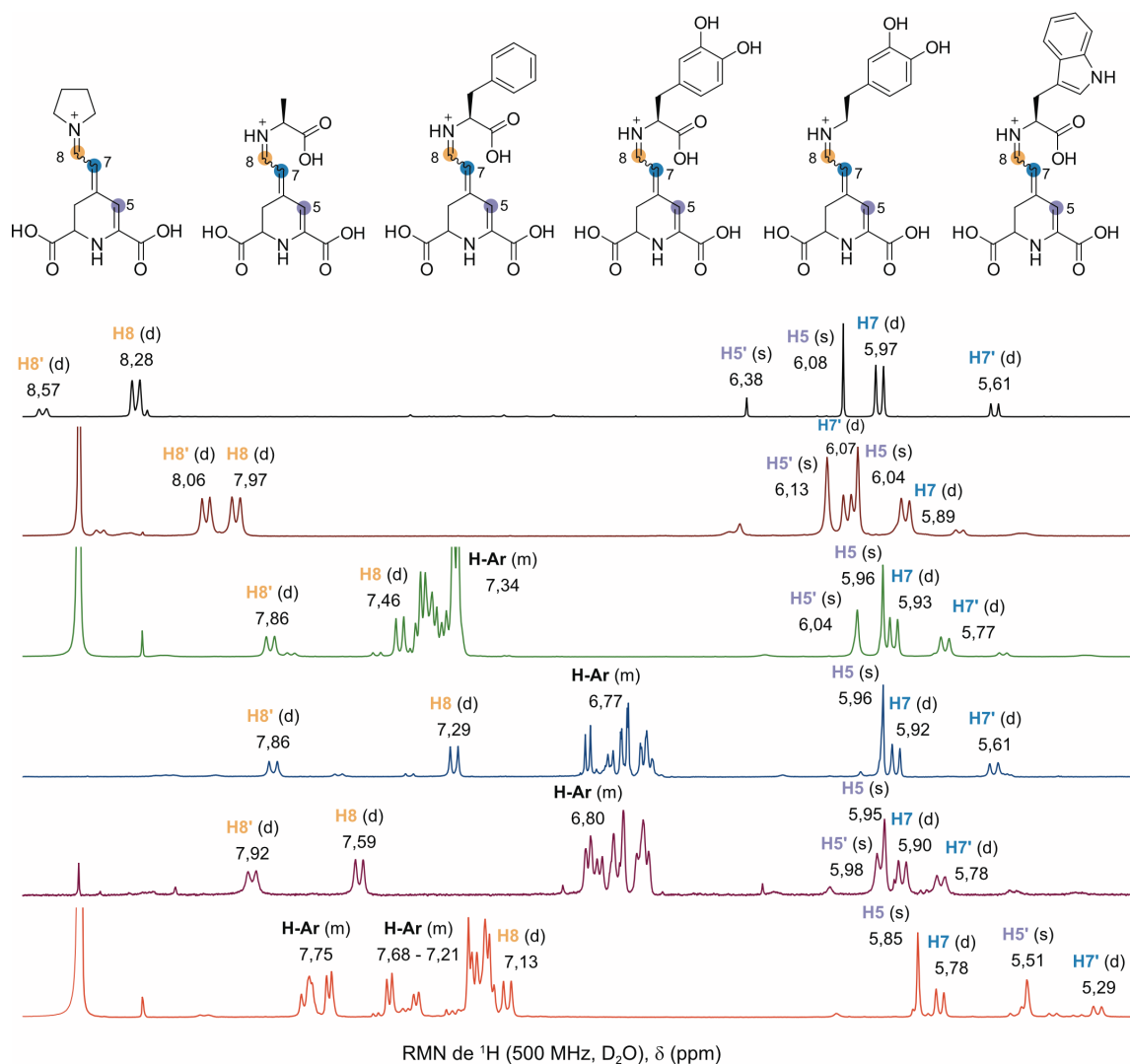


Figura 6. Superposição da região de campo baixo (anterior ao sinal de H_2O) dos espectros de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) de Pyr-Bx, Ala-Bx, Phe-Bx, DOPA-Bx, DA-Bx e Trp-Bx.

A ausência do grupo ácido carboxílico na Pyr-Bx blinda o H-10 mais de 0,5 ppm, próximo ao sinal do H-13 (Figura 7), com relação ao sinal obtido no espectro de Pro-Bx ($\delta = 4,63$ ppm).^{42, 110} Nos espectros de RMN de ^1H de DA-Bx e DOPA-Bx, observa-se a mesma blindagem do H-10 de DA-Bx, ocasionado pela ausência do grupo ácido carboxílico nessa molécula. Os sinais atribuídos aos H-3 aparecem menos definidos no espectro de DA-Bx, com relação ao da DOPA-Bx. O mesmo comportamento foi

observado para os H-11, cujos sinais no espectro de DA-Bx estão sobrepostos e blindados em relação aos hidrogênios correspondentes da DOPA-Bx.

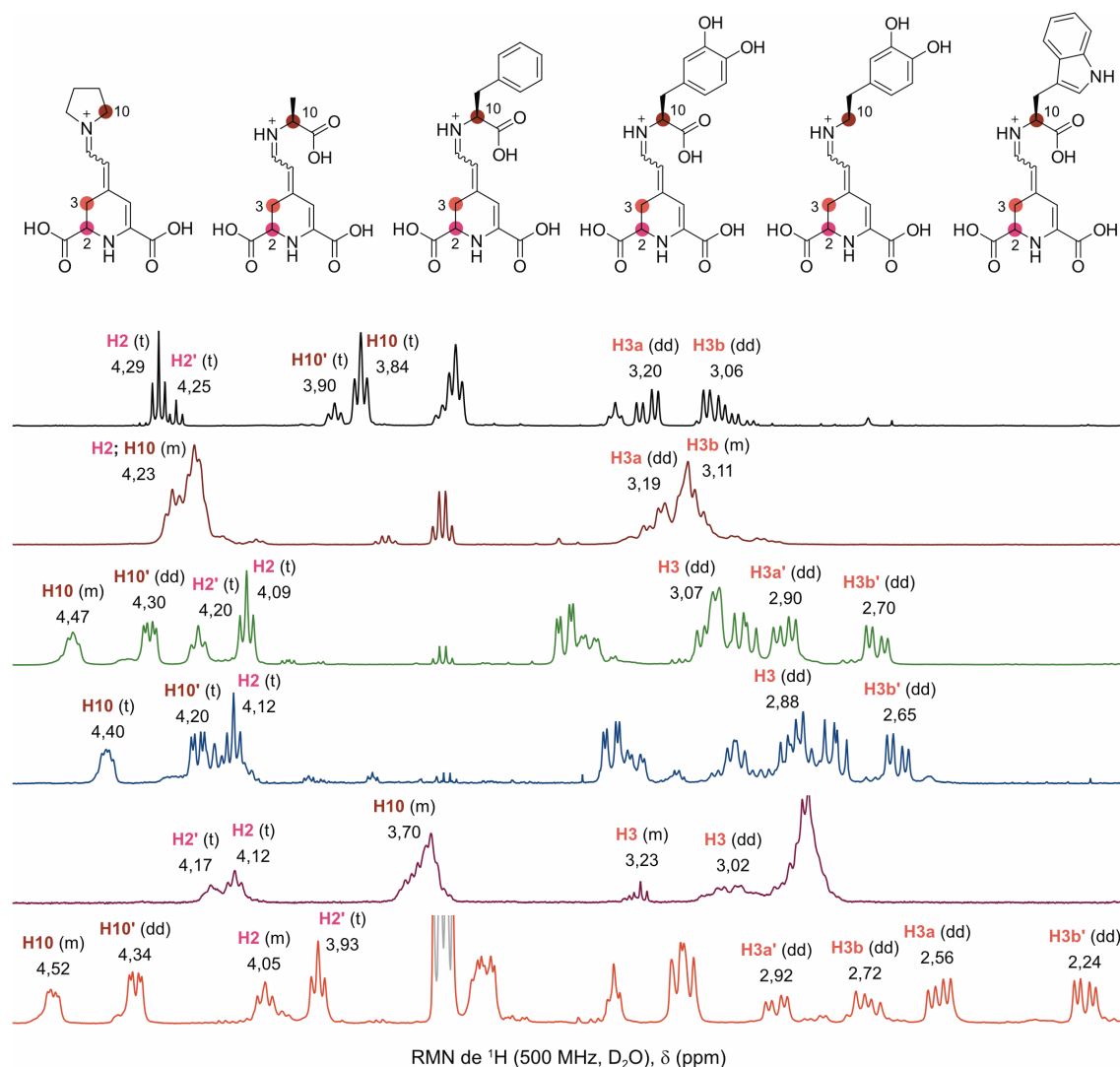


Figura 7. Superposição da região de campo alto (após o sinal de H_2O) dos espectros de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) de Pyr-Bx, Ala-Bx, Phe-Bx, DOPA-Bx, DA-Bx e Trp-Bx.

3.3. A elusiva betaxantina-cisteína

A semissíntese da Cys-Bx segue o protocolo usado para a obtenção das betaxantinas do segundo grupo. A cisteína (100 equiv.) foi adicionada a solução aquosa de ácido betalâmico em pH 11, a reação foi mantida a 25 °C, e foi acompanhada por espectrofotometria de UV-Vis. A Figura 8(A) apresenta os espectros da reação de formação de Cys-Bx em função do tempo. Os espectros obtidos em pH 11, em cinza,

indicam a diminuição da absorção do HBt ($\lambda^{\text{Abs}} = 424 \text{ nm}$), a formação de uma banda com $\lambda^{\text{Abs}} = 322 \text{ nm}$, um aumento discreto na absorção em torno de 495 nm e dois pontos isobésticos. A reação foi mantida por 1 h em pH 11 e, após esse período, o pH foi ajustado para 5 com HCl concentrado, para que não houvesse uma mudança efetiva na concentração da reação. Após o ajuste de pH (cerca de 5 min após o último espectro em pH 11), foi obtido um novo espectro, agora representado pela cor laranja na Figura 8(A), que apresenta o perfil característico dos espectros de absorção das betaxantinas, com máximo em 476 nm. No entanto, após o ajuste do pH, a reação continua progredindo: observa-se uma diminuição na absorção com máximo em 476 nm, e o seu deslocamento para 495 nm. É possível observar também um ponto isobéstico em torno de 502 nm, o que pode indicar a conversão da espécie transiente formada em 476 nm para o produto em 495 nm. Os espectros em pH 5 foram obtidos com intervalos de 1 h.

Na Figura 8(B), o gráfico de absorção em função do tempo mostra a variação da absorção no comprimento de onda máximo dos três principais componentes da reação: o ácido betalâmico (424 nm), a espécie transiente (476 nm) e o produto em 495 nm, a Cys-Bx. Nesse gráfico, é possível observar a diminuição na absorção do HBt desde o início da reação, ainda em pH 11, a formação imediata do produto em 476 nm após o ajuste do pH para 5, representada pelo aumento brusco na sua absorção, e sua posterior diminuição em função do tempo. A absorção em 495 nm é bastante influenciada pela banda com máximo em 476 nm, devido à proximidade entre as duas bandas e, por isso observa-se um aumento na sua absorção, logo após o ajuste do pH, simultâneo à banda em 476 nm, seguido por uma pequena diminuição até atingir um platô. É possível observar o ponto em que as duas curvas se encontram.

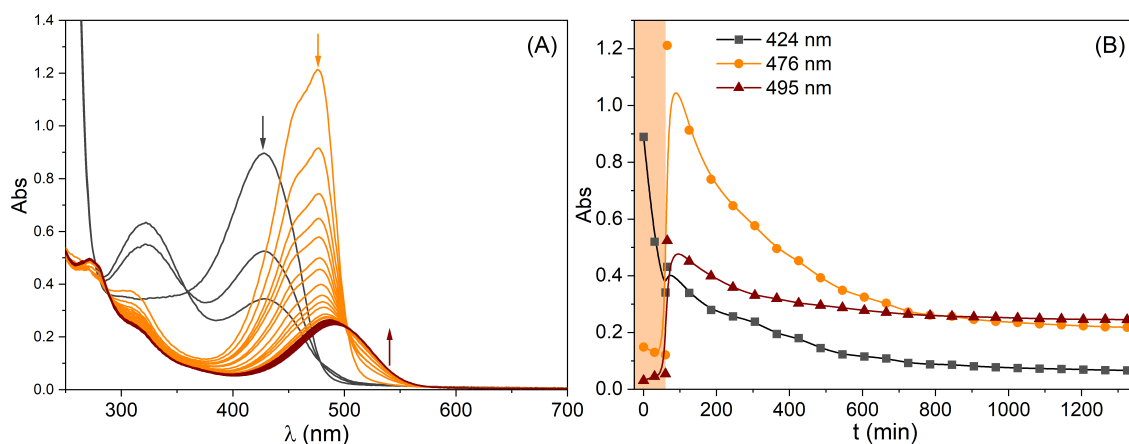
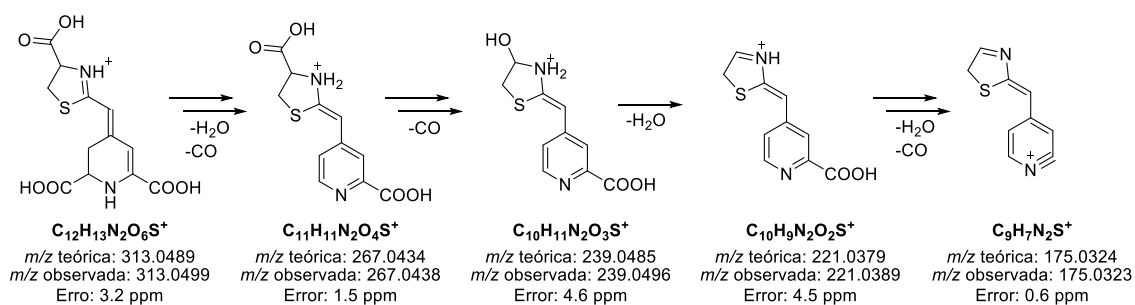


Figura 8. (A) Espectro de absorção em função do tempo de formação de Cys-Bx. Os espectros em cinza foram obtidos em pH 11, por um período de 60 minutos, com intervalos de 30 minutos. Os espectros em laranja e vinho foram obtidos após o ajuste do pH para 5, pelo tempo total de 23 horas, com intervalos de 1 hora entre os espectros. O intervalo entre o último espectro obtido em pH 11 e o primeiro espectro obtido em pH 5 é de 5 minutos. As setas para baixo indicam a diminuição da absorção em função do tempo, e a seta para cima indica o aumento da absorção, nas regiões em que estão posicionadas. (B) Gráfico de absorção em função do tempo, nos comprimentos de onda 424 nm (HBt), 476 nm (característico de betaxantinas) e 495 nm (formação de Cys-Bx). A faixa em laranja representa o período em que o pH da reação é 11, para facilitar a visualização.

Após a formação do produto, que levou em torno de 24 h, a solução obtida foi congelada e liofilizada, para as etapas de purificação, que foi realizada da mesma maneira que para as demais betaxantinas semissintetizadas, por HPLC semi-preparativo e em coluna Sephadex LH-20 eluída com água. A Cys-Bx foi armazenada sempre liofilizada, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na análise da Cys-Bx por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução com ionização por elétron-spray em modo positivo (HPLC-ESI-qTOF-MS/MS), foi obtido um valor de m/z de 313,0499, que é duas unidades menor do que o valor esperado, levando em consideração a estrutura das demais betaxantinas já identificadas (Tabela 2). O valor de m/z obtido é compatível com a presença de um anel 2-tiazolina em vez da betaxantina derivada da L-cisteína esperada, ou seu análogo piridina (neobetalaína). A fragmentação ocorre principalmente via

eliminação de CO e água, e corrobora a estrutura proposta para Cys-Bx (Esquema 3 e Anexo 5).



Esquema 3. Padrão de fragmentação de Cys-Bx.

A análise de RMN de 1H de Cys-Bx (Figura 9 e Anexo 26), revelou a ausência do sinal correspondente ao H-8, e o sinal correspondente ao H-7 se apresenta como um singlete deslocado em cerca de 2 ppm com relação ao sinal referente ao H-7 de Pro-Bx e DA-Bx, por exemplo, nos quais o H-7 se apresenta como um dubleto acoplado com H-8 ($^3J_{H7,H8} \sim 12$ Hz).⁴² Todos os demais sinais se apresentam em deslocamentos químicos e multiplicidades típicos de betalainas,^{42, 117} e os sinais de H-3b e H-11 parecem estar sobrepostos. No espectro do COSY, observa-se uma correlação entre H-2 e H-3a/b e H-10 e H-11. O tripleto ($\delta = 4,46$ ppm) e o dubleto ($\delta = 3,15$ ppm) foram atribuídos a um anel 2-tiazolina, de acordo com os resultados obtidos nas análises de LC-HRMS-MS.

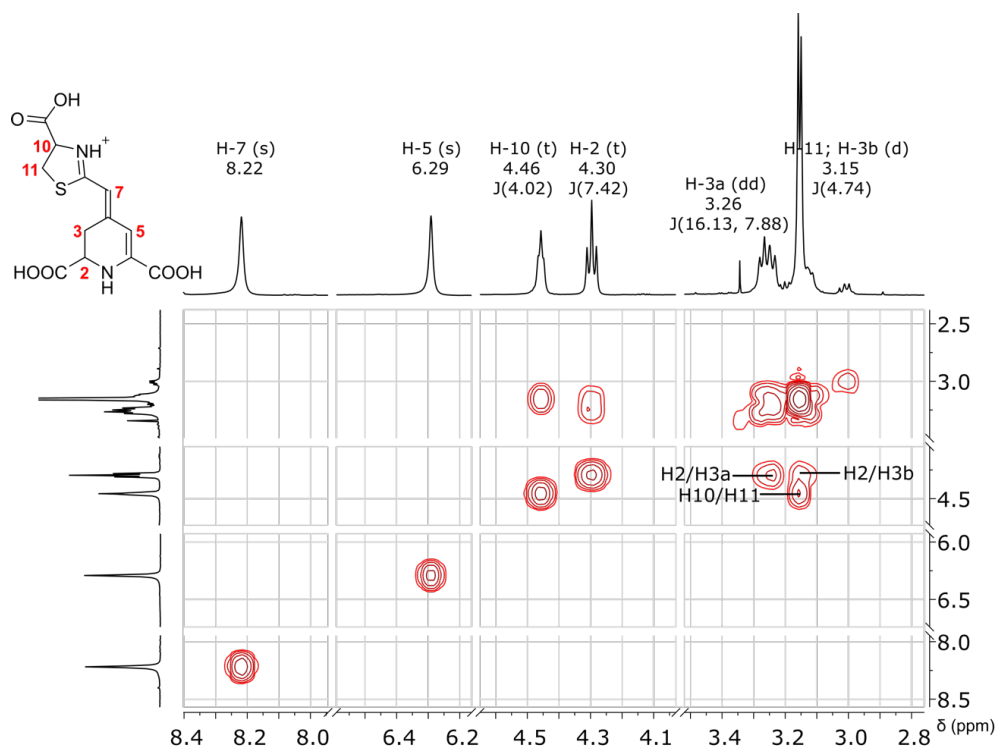


Figura 9. Espectros de ^1H (500 MHz) e COSY (500 MHz) de Cys-Bx em D_2O a 25 °C. Foi utilizada a sequência de pulso *zgpr*, que suprime o sinal residual de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ em 4,79 ppm, para o ^1H , e a sequência *cosyprqf* para o COSY. Os valores de J apresentados na figura estão em Hz.

3.4. As duas betaxantinas da L-lisina

A análise cromatográfica da reação entre o ácido betalâmico e a L-lisina revelou quatro picos com m/z compatível com isômeros de Lys-Bx. Duas frações foram coletadas separadamente, com os compostos com tempo de retenção de 4,1-4,2 min (fração 1) e 6,1-7,2 min (fração 2), utilizando-se o método de purificação por HPLC em escala semi-preparativa. Ambas as frações foram liofilizadas, ressuspensas em D_2O , e analisadas por espectroscopia de RMN de ^1H (Figura 10). Nas duas amostras foram encontrados sinais duplicados, que indicam a formação de estereoisômeros, provavelmente diastereoisômeros *E/Z* que não podem ser resolvidos por métodos cromatográficos não-quirais.¹¹¹

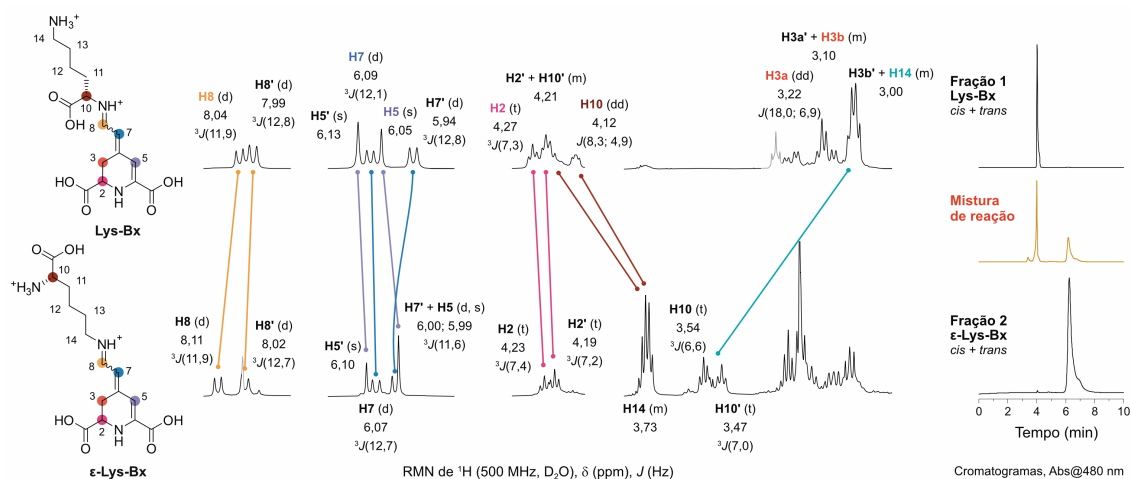


Figura 10. Análise de RMN de ^1H de Lys-Bx e ϵ -Lys-Bx. A numeração dos átomos na porção proveniente do aminoácido foi mantida idêntica por questões de clareza. Os sinais em cinza são de impurezas. Os espectros completos estão nos Anexo 29 e Anexo 30.

Os deslocamentos químicos (δ) dos sinais correspondentes aos hidrogênios H-8, H-7 e H-5 dos compostos em ambas as frações são similares entre si e estão de acordo com valores tipicamente encontrados para betalainas naturais. O H-10 no α -C, no entanto, está amplamente desblindado ($\Delta\delta \sim 0,8$ ppm) nos isômeros da fração 1 em comparação aos da fração 2, o que sugere que as frações 1 e 2 são os produtos do ataque dos grupos α - e ϵ -amino ao ácido betalâmico, respectivamente. O deslocamento químico do H-10 na Lys-Bx é similar ao valor reportado na literatura para Pro-Bx, betaxantina derivada da prolina,⁴² enquanto para ϵ -Lys-Bx, o deslocamento químico do H-14 é compatível com o determinado para o átomo de H no CH_2 ligado diretamente ao grupo imino da dopamina-Bx (3,60 ppm), que não possui um grupo α -ácido carboxílico diretamente ligado nessa posição,⁴² assim como na ϵ -Lys-Bx. Além disso, o sinal correspondente ao H-10 da ϵ -Lys-Bx (fração 2) está mais desblindado do que o sinal correspondente ao H-14 na Lys-Bx, o que pode estar relacionado à presença do grupo α -ácido carboxílico ligado na posição 10 da cadeia lateral da ϵ -Lys-Bx, que desblindada os sinais do hidrogênio ligado nessa posição. A atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^1H da Lys-Bx foi possível

visto que apenas pequenas impurezas estavam presentes na amostra. Infelizmente, para a fração 2, não foi possível atribuir os sinais correspondentes aos hidrogênios H-11 a H-13 de maneira inequívoca. Ainda assim, as propriedades de absorção, fluorescência, antioxidantes e redox de ambas as frações foram caracterizadas.

3.5. Propriedades de absorção UV-Vis e fluorescência

Embora a maioria das betaxantinas derivadas de aminoácidos proteínogênicos já tenha sido encontrada *in vivo* e/ou obtida por meio de semissíntese ou métodos biotecnológicos^{50, 118}, seus espectros de absorção são frequentemente adquiridos durante análises de HPLC/PDA sob condições cromatográficas específicas,^{20, 39, 43, 50, 83, 109, 119} por exemplo, misturas acidificadas de água/MeCN. O coeficiente de absorção molar (ϵ) para a maioria das betaxantinas também é desconhecido, e para fins práticos, a média de $48000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 480 nm é utilizada.¹²⁰ Gandía-Herrero e colaboradores reportaram as propriedades de fluorescência de algumas betaxantinas derivadas de aminoácidos, mas os valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) são conhecidos apenas para indicaxantina (Pro-Bx; $4,6 \times 10^{-3}$),^{59, 102} miraxantina V (DA-Bx; $3,0 \times 10^{-3}$),⁶¹ vulgaxantina I (Gln-Bx; $7,3 \times 10^{-3}$)⁶⁰ e miraxantina I ($8,4 \times 10^{-3}$),⁵⁸ betaxantina derivada da metionina sulfóxido.

As propriedades de absorção e fluorescência de todas as betaxantinas obtidas foram caracterizadas. O espectro de absorção de todas as betaxantinas em água é bastante similar (Figura 11), com um máximo de absorção entre 471 – 486 nm (Tabela 3) e um ombro em torno de 455 nm. A Cys-Bx, cuja solução possui uma coloração alaranjada, é a única exceção entre as betaxantinas estudadas, e apresenta um máximo de absorção deslocado para comprimentos de onda maiores, um perfil de absorção análogo a uma gaussiana com máximo de absorção em 495 nm (Figura 11).

Os espectros de emissão foram obtidos em água com excitação em $\lambda^{\text{Ex}} = 430$ nm (exceto para Cys-Bx, $\lambda^{\text{Ex}} = 455$ nm). Todas as betaxantinas, com exceção da Cys-Bx, possuem um espectro de emissão de fluorescência similar, com máximo de emissão entre 503 – 513 nm (Figura 11 e Tabela 3). Os espectros de emissão de Pro-Bx e Pyr-Bx são levemente deslocados para comprimentos de onda maiores em comparação com as demais betaxantinas, o que pode estar relacionado com a natureza secundária do aminoácido e amina precursores dessas betaxantinas. A Cys-Bx também possui um espectro de emissão deslocado para comprimentos de onda maiores, com um máximo de absorção em 532 nm. Todos os compostos apresentam um deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda = \lambda^{\text{fl}} - \lambda^{\text{abs}}$; $\Delta\nu = \nu^{\text{abs}} - \nu^{\text{fl}}$) entre 1083 – 1368 cm^{-1} e uma energia singlete (E_S) média de 244 kJ mol^{-1} . Exceto pela Cys-Bx, que apresenta um deslocamento de Stokes de 1405 cm^{-1} e uma energia singlete de 234 kJ mol^{-1} .

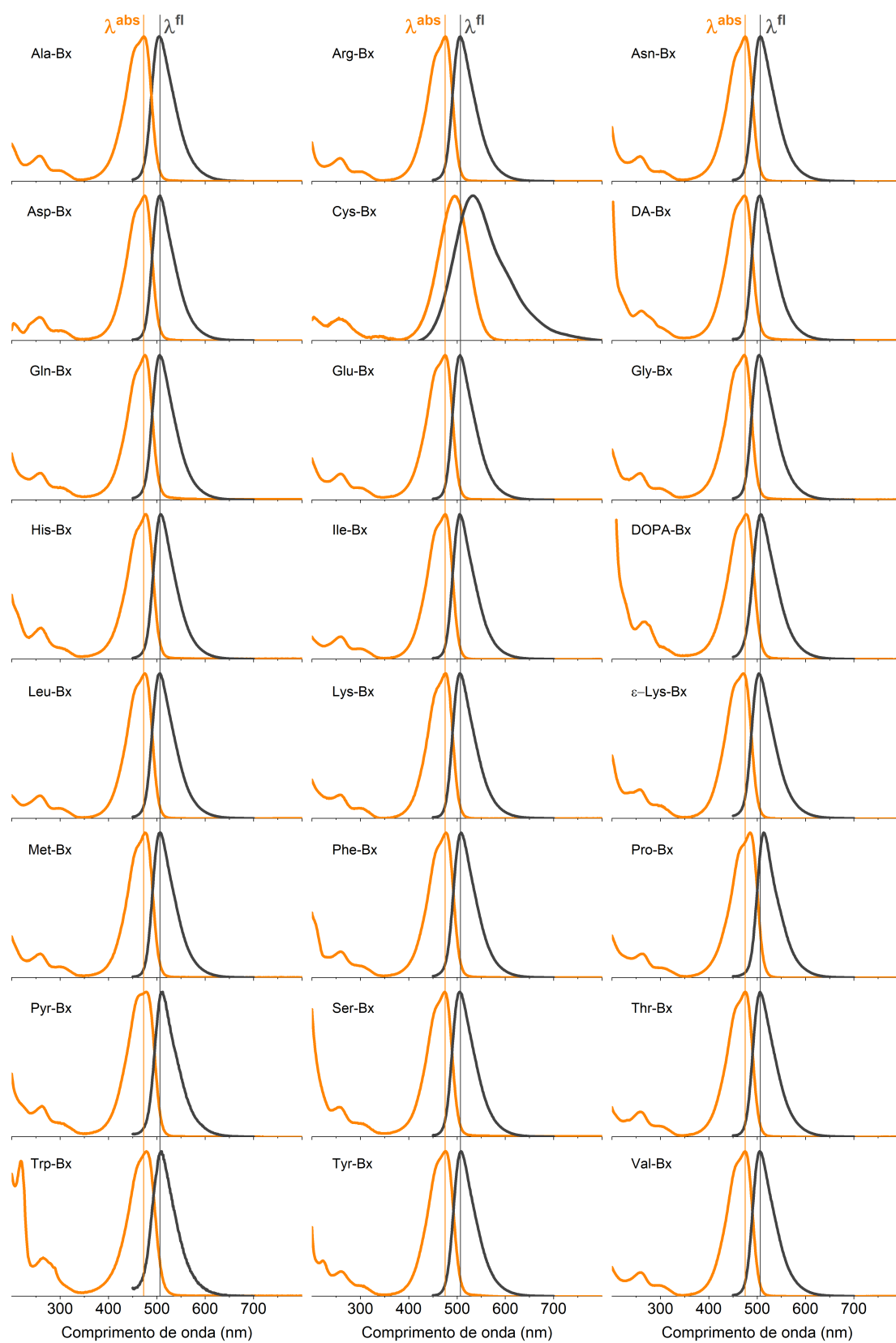


Figura 11. Espectros de absorção (linha laranja) e emissão (linha cinza escuro) obtidos em água a 25 °C.

Para determinar a concentração das betaxantinas em solução, foram obtidos os valores de ϵ para cada uma delas. As betalaínas são higroscópicas e, devido à pequena quantidade obtida na semissíntese desses compostos, a quantificação pela pesagem tem muitas incertezas e, portanto, não é um método adequado para calcular a concentração de betalaínas em solução. Os valores de ϵ foram calculados utilizando-se um método de ponto final que se baseia na comparação da concentração de ácido betalâmico com a concentração de betalaína, por meio da hidrólise alcalina das betalaínas para a formação estequiométrica de ácido betalâmico, que tem um valor de ϵ conhecido ($\epsilon^{424 \text{ nm}} = 26500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^{65, 121} Assim, as betaxantinas foram submetidas à hidrólise em meio alcalino (tampão Britton-Robinson 40 mmol L⁻¹, pH 9,5 – 10,5, Tabela Anexo 2) a temperatura ambiente por no máximo de 6 h. As cinéticas foram acompanhadas em um espectrofotômetro UV-Vis, e os espectros foram medidos a cada 10 min. Os Anexos 34, 35 e 36 apresentam a variação da absorção em 475 nm (betaxantinas) e 424 nm (HBt) em função do tempo, e o ajuste linear monoexponencial desses dados, com os respectivos valores de constante de velocidade observada (k_{obs}) para os processos de hidrólise de betaxantinas e formação de HBt. A formação de HBt ocorre com constante de velocidade observada similar à hidrólise das betaxantinas, o que indica que nenhum outro processo interfere na formação de HBt, ou seja, a betalaína é convertida somente em HBt e, portanto, as concentrações final de HBt e inicial de betaxantina podem ser comparadas. O valor de y_0 obtido a partir do ajuste da curva de formação de HBt indica sua absorção final (Tabela Anexo 2). Para obtenção dos valores de absorção inicial das betaxantinas, os espectros iniciais foram registrados em meio neutro (tampão Britton-Robinson 40 mmol L⁻¹, pH 7), e os valores de absorção nos comprimentos de onda máximos de absorção para cada uma delas foram utilizados. Devido à alta susceptibilidade das betalaínas à

hidrólise em meio alcalino, o espectro inicial (t_0) em meio alcalino pode não corresponder à concentração inicial da solução de betaxantina de fato, visto que durante o processo de preparação da amostra até que seja obtido o espectro inicial, pode ter ocorrido um pouco de degradação. Assim, a obtenção do espectro inicial em pH 7 garante que o valor de absorção utilizado corresponda à concentração inicial de betaxantina em solução. Por meio desse método, foi determinado um valor médio de ϵ de $53000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que é um pouco mais alto do que o valor médio de $48000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ reportado por Girod e Zryd,¹²⁰ e que é amplamente utilizado para fins analíticos.

Para obter o valor ϵ de Cys-Bx e, conseqüentemente, calcular sua concentração, a cinética de decomposição de Cys-Bx em tampão Britton-Robinson 40 mmol L^{-1} pH 9,5, foi monitorada por espectrofotometria UV-Vis por um período de 4 h, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, seguindo as mesmas condições e método empregado na obtenção do ϵ das demais betaxantinas apresentadas. No entanto, além de ter sido observado um decaimento de apenas 26% na absorção de Cys-Bx nessas condições (Figura 12), observou-se que o produto formado a partir da sua degradação não possui o perfil característico de HBt. O ponto isobéptico formado está em 424 nm, que é o comprimento de onda máximo de absorção do HBt, e a absorção da banda formada está deslocada para o azul, em relação ao que se observa para o HBt nas cinéticas de degradação das demais betaxantinas.

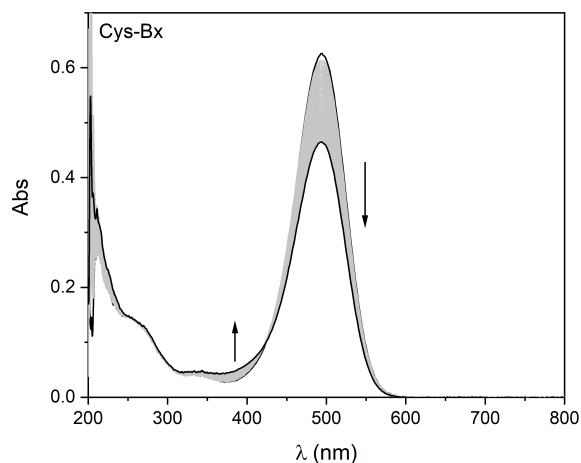


Figura 12. Espectros de absorção de Cys-Bx em função do tempo em tampão Britton-Robinson 40 mmol L^{-1} pH 9,5, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas.

Com isso, o valor de ϵ foi obtido por meio da reação de formação de Cys-Bx (Figura 8(A)), considerando o valor da absorção inicial de HBt ($\lambda^{424\text{nm}} = 0,89$) e da absorção final de Cys-Bx, após 24 h de reação ($\lambda^{495\text{nm}} = 0,25$). O valor de ϵ obtido ($\epsilon = 7320 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) é um valor aproximado, visto que está sendo considerado que todo HBt foi convertido em Cys-Bx, e que não ocorreu nenhum processo de degradação durante o período de reação. O valor de ϵ de HBt em 424 nm usado foi de $26500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, conforme calculado no grupo anteriormente.^{65, 121}

Tabela 3. Valores de comprimento de onda máximo de absorção (λ^{Abs}) e emissão (λ^{Em}), coeficiente de absorção molar (ϵ), deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda$), energia singlete (E_s), rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) e brilho ($\epsilon \times \Phi_{\text{Fl}}$) obtidos para as betaxantinas.

Compostos	λ^{Abs} /nm	ϵ^a /10 ⁴ L mol ⁻¹ cm ⁻¹	λ^{Em} /nm	Stokes shift, $\Delta\lambda$ /nm, [cm ⁻¹]	E_s /kJ mol ⁻¹	Φ_{Fl} /10 ⁻³	Brilho ^c $\epsilon \times \Phi_{\text{Fl}}$
Ala-Bx	473	5,19	505	32, [1340]	245	4,6 ± 0,2	239 ± 10
Arg-Bx	476	5,02	507	31, [1285]	244	9,3 ± 0,4	467 ± 20
Asn-Bx	476	5,62	507	31, [1285]	244	7,4 ± 0,4	416 ± 22
Asp-Bx	476	5,66	507	31, [1285]	244	5,1 ± 0,3	289 ± 17
Cys-Bx	495	0,73	532	41, [1405]	234	< 0,1	< 1,0
DA-Bx	474	5,46	506	32, [1334]	244	2,6 ± 0,1	142 ± 5
Gln-Bx	476	5,16	506	30, [1246]	244	6,5 ± 0,4	335 ± 21
Glu-Bx	475	5,52	506	31, [1290]	244	6,2 ± 0,4	342 ± 22
Gly-Bx	473	5,28	504	31, [1300]	245	4,6 ± 0,2	243 ± 11
His-Bx	477	4,99	507	30, [1240]	243	9,9 ± 0,5	494 ± 25
Ile-Bx	476	5,69	505	29, [1206]	244	5,4 ± 0,3	307 ± 17
DOPA-Bx	479	5,65	507	28, [1153]	243	3,6 ± 0,2	203 ± 11
Leu-Bx	476	5,21	507	31, [1285]	244	6,8 ± 0,4	354 ± 21
Lys-Bx	475	5,41	506	31, [1290]	244	7,8 ± 0,4	422 ± 22
ϵ -Lys-Bx	471	4,83	503	34, [1351]	245	4,2 ± 0,2	203 ± 10
Met-Bx	475	5,54	508	33, [1368]	244	6,3 ± 0,4	349 ± 22
Phe-Bx	477	5,21	508	31, [1279]	243	7,2 ± 0,4	375 ± 21
Pro-Bx	486	5,74	513	27, [1083]	239	4,8 ± 0,3	276 ± 17
Pyr-Bx	479	5,01	512	33, [1346]	242	1,0 ± 0,1	50 ± 5
Ser-Bx	474	5,45	505	31, [1295]	244	5,6 ± 0,3	305 ± 16
Thr-Bx	476	5,35	506	30, [1246]	244	5,7 ± 0,2	305 ± 11
Trp-Bx	478	4,77	510	32, [1313]	243	0,3 ± 0,2	14 ± 5
Tyr-Bx	477	5,20	508	31, [1279]	243	5,9 ± 0,4	307 ± 21
Val-Bx	475	5,15	505	30, [1251]	244	6,8 ± 0,3	350 ± 15

^a Em tampão BR 40 mmol L⁻¹ pH 9,5, exceto DOPA-Bx (pH 10) e Pyr-Bx (pH 10,5); em relação ao HBt, $\epsilon^{424 \text{ nm}} = 26500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ^b $\lambda^{\text{EX}} = 430 \text{ nm}$; exceto para Cys-Bx, $\lambda^{\text{EX}} = 455 \text{ nm}$. ^c em L mol⁻¹ cm⁻¹

Os rendimentos quânticos de fluorescência para as betaxantinas foram obtidos em água a temperatura ambiente, e utilizou-se a fluoresceína em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}_{(aq)}$ como padrão de fluorescência secundário ($n_D = 1,3325$, $\Phi_{Fl} = 0,95$).¹²² Foram obtidos espectros de emissão com $\lambda^{Ex} = 430 \text{ nm}$ das soluções de betaxantinas e do padrão com absorção inferior a 0,1, e correlacionou-se a área de emissão com a absorção para cada amostra com cinco concentrações diferentes, mantendo as configurações do equipamento idênticas para amostra e padrão. A razão entre o coeficiente angular do ajuste linear dos dados referentes a betaxantina e ao padrão corresponde ao valor de rendimento quântico de fluorescência. Os espectros de emissão e os gráficos de área de emissão vs. absorção das betaxantinas estão apresentados nos Anexo 37, Anexo 38 e Anexo 39, e dos padrões estão no Anexo 40, e os valores de Φ_{Fl} obtidos estão na Tabela 3 e na Figura 13.

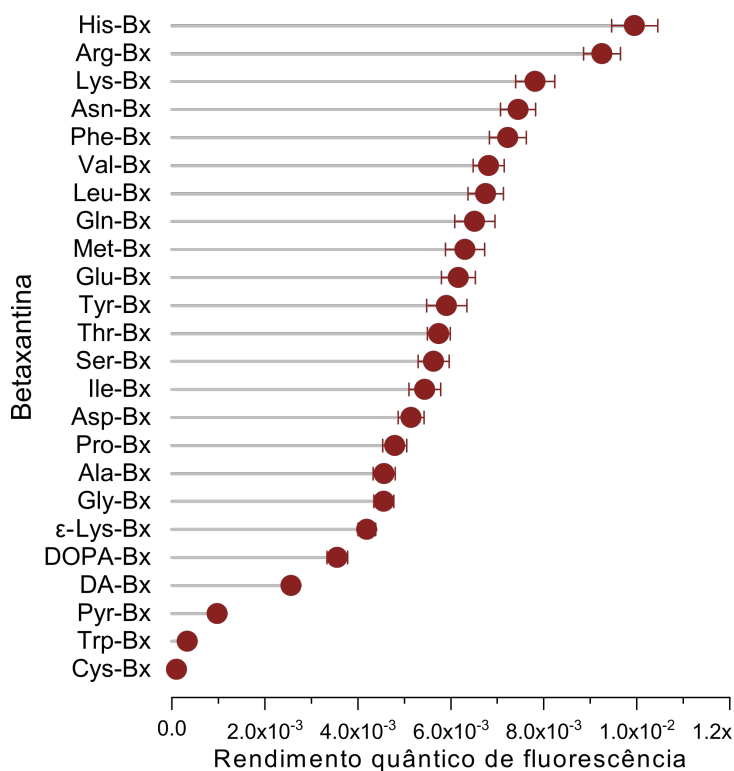


Figura 13. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) obtido para as betaxantinas ($\lambda^{Ex} = 430 \text{ nm}$; água).

Todos os valores de Φ_{Fl} obtidos para as betaxantinas possuem a mesma ordem de grandeza (10^{-3}), com exceção da Trp-Bx, para a qual foi obtido um valor um pouco inferior, de $(3,3 \pm 0,2) \times 10^{-4}$. Alguns valores de Φ_{Fl} para betaxantinas naturais, como DA-Bx ($3,0 \times 10^{-3}$),⁶¹ Gln-Bx ($7,3 \times 10^{-3}$)⁶⁰ e Pro-Bx ($5,3 \times 10^{-3}$),⁵⁹ já foram determinados anteriormente e são condizentes com os valores de Φ_{Fl} obtidos nesse trabalho, no entanto, para a maioria das betaxantinas apresentadas aqui, essa é a primeira vez que os valores de Φ_{Fl} são determinados. Cys-Bx apresenta um rendimento quântico de fluorescência inferior a 1×10^{-4} , abaixo dos limites de detecção dos equipamentos utilizados na medida. Trp-Bx e Pyr-Bx são as betaxantinas com os menores valores de Φ_{Fl} determinados, enquanto Arg-Bx e His-Bx apresentaram os maiores valores de Φ_{Fl} dentre as betaxantinas analisadas, próximos de 1×10^{-2} . O produto $\varepsilon \times \Phi_{\text{Fl}}$ de cada betaxantina corresponde ao seu brilho,⁹ e Arg-Bx e His-Bx são as betaxantinas mais brilhantes (Tabela 3).

3.6. Estabilidade hidrolítica

Para determinar a estabilidade das betaxantinas em meio aquoso, a degradação desses compostos em tampão fosfato (100 mmol L^{-1} , pH 7) foi acompanhada por espectrofotometria UV-Vis, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por um período de 6 h. O valor da constante cinética observada (k_{obs}) para a decomposição das betaxantinas foi determinado a partir da variação do máximo de absorção de cada uma delas em função do tempo. De forma geral, a degradação de betalaínas em temperatura ambiente é muito lenta para ser monitorada por mais de uma meia-vida antes que sinais de contaminação microbológica sejam observados na solução.⁸⁹ Por isso, optou-se por realizar os experimentos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

A análise do perfil de absorção das betaxantinas indica a diminuição da banda de absorção com máximo em torno de 475 nm em função do tempo, e o aparecimento de

uma banda com máximo em torno de 428 nm, que corresponde ao máximo de absorção do ácido betalâmico, um dos produtos da hidrólise das betalaínas (Anexo 40, Anexo 41, Anexo 42 e Anexo 44). Os dados de máximo de absorção em função do tempo foram ajustados utilizando-se uma função monoexponencial. Os valores de k_{obs} e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos estão apresentados na Figura 14 e na Tabela 4.

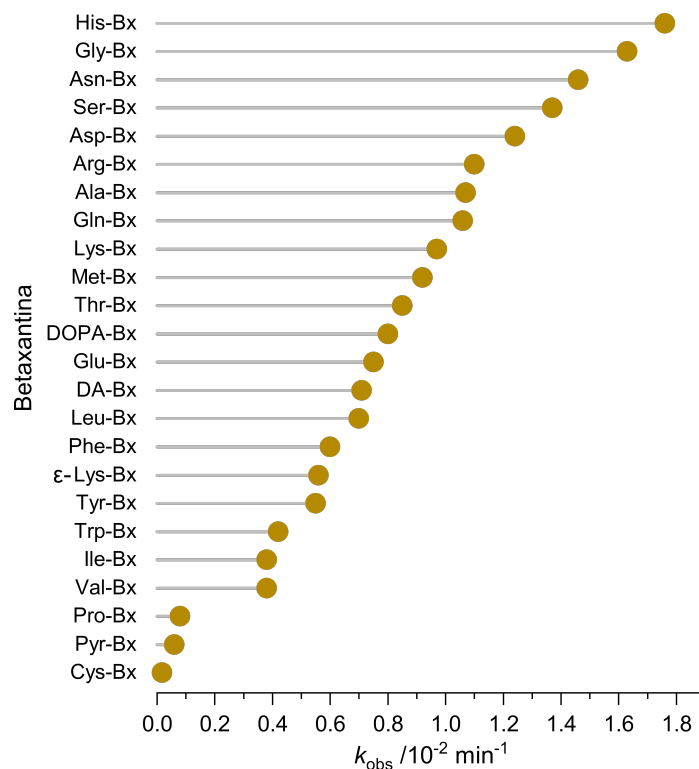


Figura 14. Valores de constante cinética observada (k_{obs}) para a hidrólise das betaxantinas em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7, a 50 °C.

A maioria das betaxantinas possuem um tempo de meia-vida de no máximo três horas, nas condições empregadas, sendo a His-Bx e a Gly-Bx as betaxantinas menos estáveis frente a hidrólise (Figura 14). Em contrapartida, Cys-Bx, Pyr-Bx e Pro-Bx são muito mais estáveis que as demais, e o decaimento da absorção para essas betaxantinas não atingiu duas meia-vidas, condição necessária para que se tenha dados suficientes para obter os seus valores de k_{obs} e $t_{1/2}$ com precisão. Para estimar esses valores, foi feita uma extrapolação do ajuste monoexponencial, com y_0 fixado em 0. Os valores de k_{obs} obtidos

para Pro-Bx e Pyr-Bx correspondem a 1/5 e 1/6 dos valores de k_{obs} obtidos para Ile-Bx e Val-Bx, que apresentaram maior estabilidade frente a hidrólise nessas condições. Para Cys-Bx, o valor determinado pelo método de extrapolação do ajuste é cerca de 20 vezes menor que os valores de Ile-Bx e Val-Bx, e cerca de 3 vezes menor que o de Pyr-Bx.

Para comparar a estabilidade dessas betalaínas com as demais, calculou-se a diferença entre a absorção (ΔAbs) no tempo inicial ($t = 0$) e após 1 hora de cinética (ΔAbs^{t0-1h}), e após 6 h de experimento (ΔAbs^{t0-6h}), no comprimento de onda máximo de absorção de cada betaxantina (Tabela 4). Após o período de uma hora, os valores de absorção de Pro-Bx e Pyr-Bx decaíram apenas 4,4% e 3,6%, respectivamente, enquanto as demais tiveram um decaimento de 19% a 59%, com relação à absorção inicial. Após 6 h, a absorção de Pro-Bx decaiu 24% e a de Pyr-Bx apenas 19%, enquanto as demais tiveram um decaimento de 65% a 92%. Para Cys-Bx, foi observado um decaimento de 1% no valor da absorção inicial, após uma hora de ensaio, e de apenas 6% após 6 h.

3.7. Propriedades antioxidantes

A capacidade antioxidante das betaxantinas foi medida por meio de dois métodos: Capacidade de remoção de radicais ABTS (Ensaio ABTS, TEAC/ABTS^{•+}) e Poder Antioxidante Redutor Férrico (*Ferric-Reducing Antioxidant Power*, FRAP). Os resultados de ambos os métodos são apresentados em capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) para comparação. Ácido ascórbico (AscH) foi utilizado como um antioxidante de referência adicional e experimentos controle incluíram ácido betalâmico, DA-betaxantina, DOPA-betaxantina e Pyr-betaxantina. A capacidade antioxidante da maioria das betaxantinas derivadas de aminoácidos não foi estudada, apesar da ocorrência natural desses compostos, e os resultados disponíveis na literatura para alguns desses compostos não são diretamente comparáveis entre si pois remontam à

vários grupos de pesquisas que utilizam métodos analíticos diferentes.^{8, 74, 75, 83} Para facilitar, os resultados obtidos com cada método serão apresentados separadamente e retomados na discussão para uma análise conjunta da capacidade antioxidante e propriedades redox desses compostos e a relação com sua estrutura.

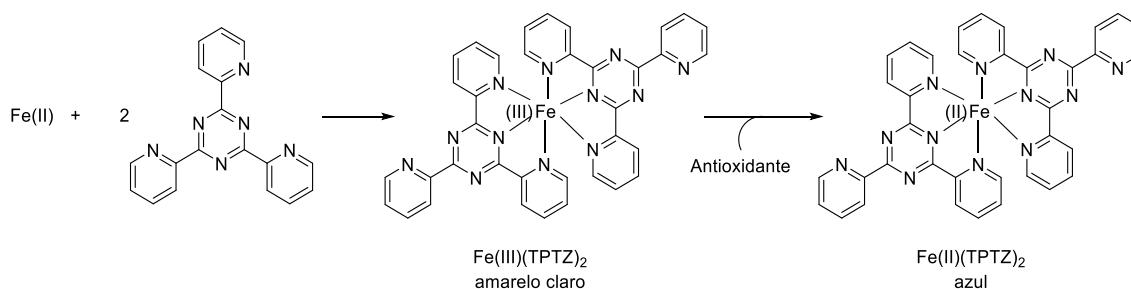
Tabela 4. Valores de constante cinética observada (k_{obs}) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a hidrólise de betaxantinas em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7, a 50 °C e em tampão Britton-Robinson (BR) 40 mmol L⁻¹ pH 9,5, a 25 °C.

Betaxantina	k_{obs} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	$\Delta\text{Abs}^{(t=1\text{h})}$ (%)	$\Delta\text{Abs}^{(t=6\text{h})}$ (%)
Ala-Bx	0,0107	65	0,29; [43]	0,60; [89]
Arg-Bx	0,0110	63	0,31; [45]	0,62; [90]
Asn-Bx	0,0146	47	0,41; [54]	0,71; [92]
Asp-Bx	0,0124	56	0,29; [47]	0,55; [88]
Cys-Bx	$1,77 \times 10^{-4\text{a}}$	3919 ^a	0,01; [1]	0,05; [6]
DA-Bx	0,0071	97	0,19; [24]	0,51; [67]
Gln-Bx	0,0106	65	0,33; [43]	0,67; [89]
Glu-Bx	0,0075	92	0,23; [34]	0,58; [87]
Gly-Bx	0,0163	43	0,31; [54]	0,49; [87]
His-Bx	0,0176	39	0,29; [59]	0,44; [90]
Ile-Bx	0,0038	184	0,15; [19]	0,55; [69]
DOPA-Bx	0,0080	87	0,17; [26]	0,42; [65]
Leu-Bx	0,0070	100	0,22; [31]	0,59; [84]
Lys-Bx	0,0097	71	0,28; [41]	0,62; [90]
ϵ -Lys-Bx	0,0056	123	0,16; [26]	0,49; [78]
Met-Bx	0,0092	75	0,27; [38]	0,61; [87]
Phe-Bx	0,0060	116	0,17; [28]	0,50; [83]
Pro-Bx	0,0008 ^a	900 ^a	0,03; [4,4]	0,17; [24]
Pyr-Bx	0,0006 ^a	1154 ^a	0,02; [3,6]	0,12; [19]
Ser-Bx	0,0137	51	0,35; [50]	0,62; [90]
Thr-Bx	0,0085	82	0,26; [37]	0,63; [88]
Trp-Bx	0,0042	164	0,18; [22]	0,63; [76]
Tyr-Bx	0,0055	125	0,21; [27]	0,61; [80]
Val-Bx	0,0038	184	0,14; [19]	0,53; [70]

^a valores obtidos a partir do ajuste monoexponencial com extrapolação dos dados, com $y_0 = 0$ (fixo); ^b Ensaio realizado em pH = 10; ^c Ensaio realizado em pH = 10,5.

3.7.1. Poder redutor relativo ao ferro(III)

No método FRAP, em condições ácidas, o complexo férrico $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{III})$ é reduzido para sua forma ferrosa $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$, que possui uma coloração azul, com máximo de absorção em 593 nm (Esquema 4). A reação de redução do complexo férrico envolve uma reação de transferência de um elétron entre o complexo $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{III})$ e o doador de elétron, nesse caso, as betalainas.



Esquema 4. Esquema simplificado da formação do complexo $\text{Fe}(\text{III})(\text{TPTZ})_2$ e sua posterior redução para $\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2$ por um antioxidante.

A solução do complexo $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{III})$, também chamada de reagente de trabalho FRAP, foi preparada por meio da mistura de uma solução aquosa ácida de triazina (TPTZ) com FeCl_3 , em tampão acetato 300 mmol L^{-1} pH 3,6. Essa solução tem coloração amarelo/marrom claro, e deve ser mantida a 37 °C para que não ocorra precipitação. O FeSO_4 foi usado como referência, já que sua reação com o complexo $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{III})$ representa uma reação de troca de um único elétron, e portanto, tem um valor de FRAP igual a 1. A Figura 15(A) mostra o perfil do espectro de $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$, formado após a adição de diferentes concentrações de FeSO_4 . A reação de redução de $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{III})$ é imediata na presença de FeSO_4 (Figura 15(B)).

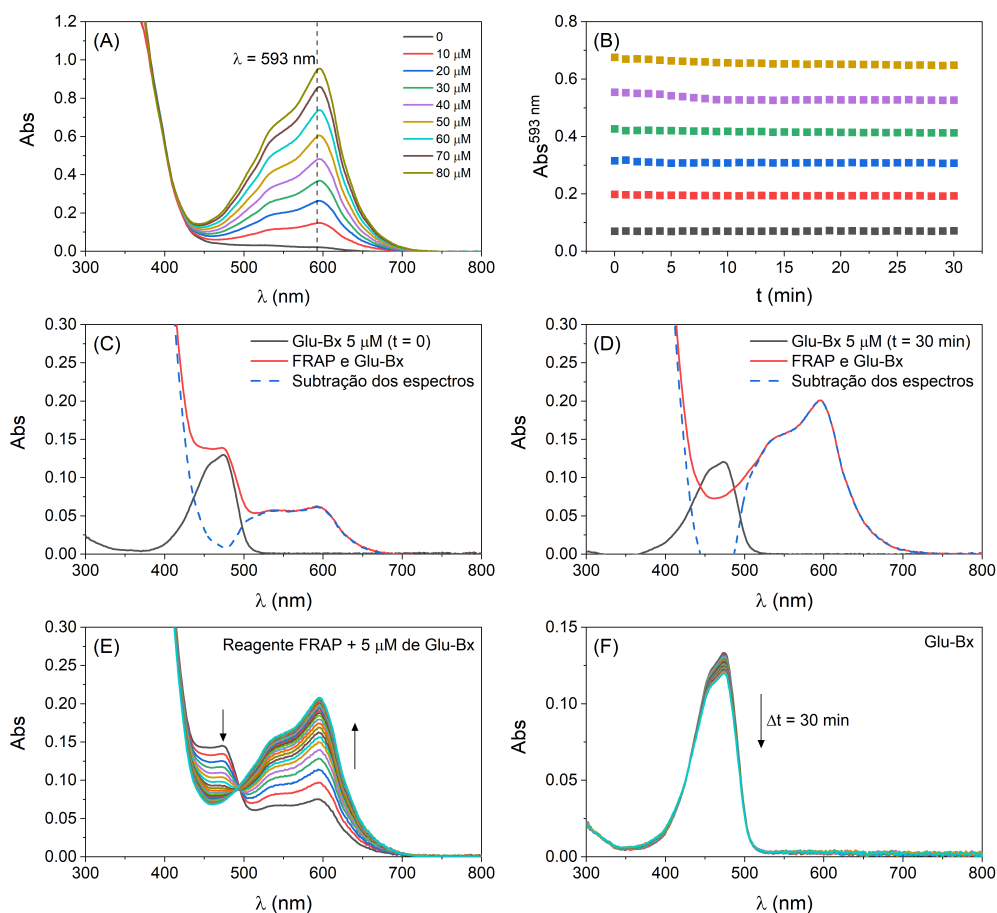


Figura 15. (A) Espectro de absorção do complexo $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$, formado após a adição de diferentes concentrações de $\text{Fe}(\text{II})$. (B) Gráfico de absorção em 593 nm em função do tempo após a adição de $\text{Fe}(\text{II})$ em concentrações de 0 a 50 μM . (C) Espectros de absorção de Glu-Bx em tampão acetato 300 mmol L^{-1} pH 3,6, da mistura reagente FRAP e Glu-Bx, e a subtração dos espectros no tempo inicial da reação ($t = 0$) e (D) após 30 min de reação. (E) Perfil cinético de absorção da reação de formação de $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$ após a adição de 5 μM de Glu-Bx, durante 30 min. (F) Absorção de Glu-Bx em tampão acetato 300 mmol L^{-1} pH 3,6 a 37 °C em função do tempo, por 30 min.

Para que o resultado obtido por meio desse método seja acurado, algumas condições devem ser cumpridas, como a velocidade da reação de redução deve ser rápida o suficiente para que a reação se complete em um período curto de tempo e, o antioxidante, sua forma oxidada, e quaisquer outros produtos secundários não podem interferir na medida de absorção em 593 nm (máximo de absorção do $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$).¹²³

As betaxantinas possuem máximo de absorção em torno de 475 nm, distante do máximo de absorção de 593 nm do complexo, e seu perfil de absorção não se sobrepõe

ao espectro do complexo $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$. A Figura 15(C) apresenta, como exemplo, o espectro de absorção de Glu-Bx em tampão acetato (300 mmol L^{-1} , pH 3,6) e o espectro de absorção do reagente FRAP obtido imediatamente após a adição de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Glu-Bx (linha vermelha). Após 30 min de reação (Figura 15(D)), observa-se que ocorreu uma diminuição na absorção de Glu-Bx (linha vermelha, redução na absorção em torno de 475 nm em comparação ao gráfico da Figura 15(C)) e a formação de $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$. A subtração dos espectros de Glu-Bx (que foi mantido em um poço separado, nas mesmas condições do ensaio) e da mistura FRAP e Glu-Bx (linha tracejada), em ambos os tempos, demonstra que não há interferência da absorção da betaxantina no comprimento de onda no qual foi acompanhada a formação do complexo $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$.

A Figura 15(E) apresenta a formação de $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$ após a adição de $5 \mu\text{M}$ de Glu-Bx acompanhada em função do tempo. Os espectros de absorção foram obtidos a cada 1 min, durante um período de 30 min. As setas indicam o consumo de Glu-Bx (seta para baixo, em torno de 475 nm) e a formação de $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$. O ponto isobéstico em 494 nm indica que não ocorrem reações secundárias durante o período da reação e, portanto, não há interferência de outros produtos na medida.

Para determinar o tempo de reação entre o reagente FRAP e as betaxantinas, foram escolhidas duas betaxantinas, DOPA-Bx e Glu-Bx, e a cinética da reação com $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{III})$ foi acompanhada em 593 nm por um período de duas horas (Figura 16). Embora ainda seja observado um aumento na absorção em 593 nm durante esse período na reação com a DOPA-Bx (Figura 16), o que indica que a reação ainda está ocorrendo, o aumento da absorção após 30 min é pequeno comparado ao ΔAbs nos primeiros 30 min. No entanto, para a maioria das betaxantinas observou-se a estabilização da absorção durante esse período de tempo (Anexo 49).

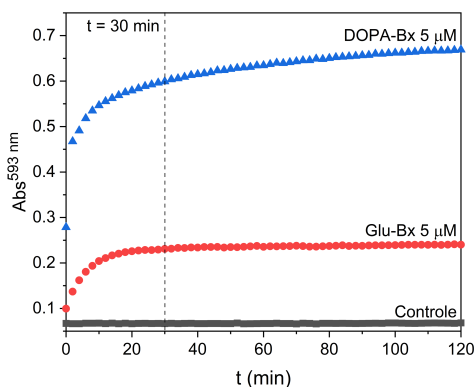


Figura 16. Valores de absorção em 593 nm em função do tempo após a adição de 5 µM de Glu-Bx e DOPA-Bx ao reagente FRAP, e o controle (reagente FRAP na ausência de antioxidantes).

As condições do método empregado também precisam ser levadas em consideração na escolha do tempo, visto que o ensaio é realizado em meio ácido (pH 3,6) e a 37 °C, ambas condições que, de forma geral, favorecem a degradação de betalaínas⁸⁹, e podem levar a formação de produtos de degradação que podem interferir no resultado do ensaio. Assim, para verificar o efeito do meio e da temperatura empregados no ensaio sobre a degradação das betaxantinas, foram preparadas soluções das betaxantinas em tampão acetato 300 mmol L⁻¹ pH 3,6 a 37 °C. Foram obtidos espectros de absorção imediatamente após o preparo das soluções ($t = 0$), e após serem mantidas por 30 min a 37 °C. Observa-se uma pequena diminuição na absorção das betalaínas nesse intervalo de tempo (Figura 15(F) e Anexo 50). Contudo, exceto para a Gly-Bx em que se observa uma diminuição maior na absorção, a degradação das demais betaxantinas é pequena no intervalo de tempo em que o ensaio foi acompanhado.

Com isso, levando-se em conta a estabilidade das betalaínas e a praticidade do ensaio, a variação da absorção (ΔAbs) em 593 nm na presença do antioxidante foi acompanhada por um período de 30 min, com cinco concentrações diferentes de antioxidantes (betalaínas e compostos de referência), e calculada em relação a um controle sem antioxidante. Como referência, além do Trolox mencionado anteriormente,

foi utilizado também o FeSO_4 para estimar o número de elétrons envolvidos na redução, em relação ao valor da reação de um único elétron por molécula. Ou seja, o valor de FRAP corresponde ao número de elétrons envolvidos na reação direta de redução de Fe(III) para Fe(II) pelo oxidante adicionado à solução contendo $\text{Fe(TPTZ)}_2\text{(III)}$. Os valores de ΔAbs em 593 nm apresentaram dependência linear com a concentração de antioxidante para todos os compostos analisados (Anexo 48; Tabela Anexo 4). Os resultados obtidos com o ensaio FRAP mostram que em pH 3,6, a maioria das betaxantinas possuem um $\text{TEAC}_{\text{FRAP}}$ menor que 2, que é similar ao valor obtido para o ácido ascórbico Figura 17.

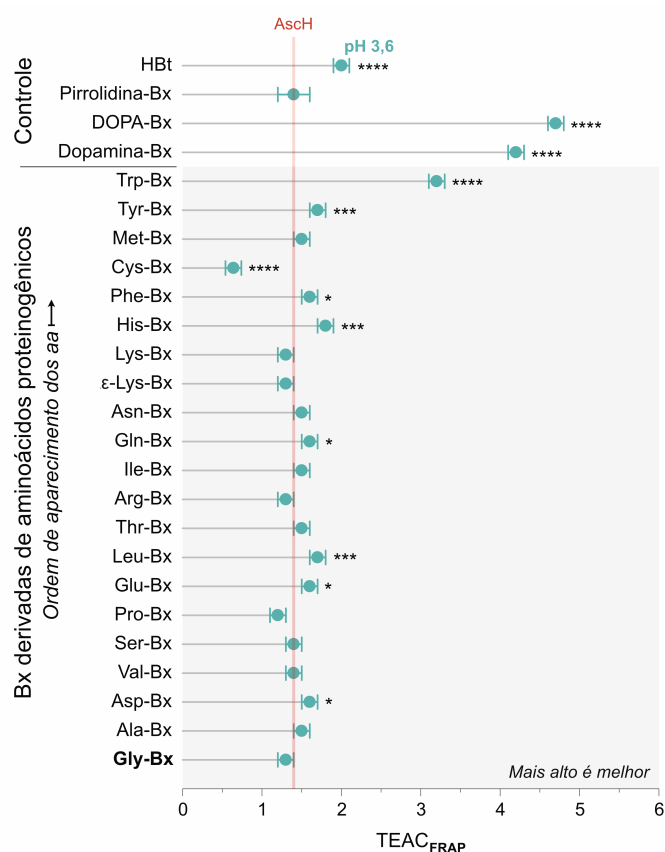


Figura 17. Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) das betaxantinas determinadas pelo método FRAP em pH 3,6. Os asteriscos indicam os valores que são diferentes dos valores de Gly-Bx (ANOVA-Tukey test, intervalo de confiança de 95%, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $N = 3$).

A Cys-Bx mostrou a menor capacidade antioxidante, e a Trp-Bx ($3,2 \pm 0,1$), a DA-Bx ($4,2 \pm 0,1$) e a DOPA-Bx ($4,7 \pm 0,1$) apresentaram os maiores valores de TEAC_{FRAP}. A Tyr-Bx possui um TEAC_{FRAP} de $1,7 \pm 0,1$, o que indica que o grupo fenólico não aumenta, necessariamente, o valor de TEAC_{FRAP} comparado à betaxantinas não-fenólicas, como a His-Bx, por exemplo.

3.7.2. Capacidade de sequestrar radicais de ABTS

A capacidade antioxidante das betaxantinas também foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico de remoção de cátions radicais ABTS (ABTS^{•+}).¹²⁴ Nesse ensaio, o ABTS^{•+} é gerado anteriormente a sua reação com o antioxidante, por meio da reação de ABTS com persulfato de potássio. O radical ABTS^{•+} possui máximos de absorção em 415 nm (o comprimento de onda mais comumente utilizado nos ensaios de TEAC), 645 nm, 734 nm e 815 nm. A adição de um antioxidante à solução contendo o radical ABTS^{•+} leva a sua redução a ABTS e, conseqüentemente, diminui a sua absorção, em uma reação dependente da concentração do antioxidante, de sua capacidade antioxidante e do tempo de reação. Assim, a capacidade antioxidante é determinada por meio da variação da absorção de radical ABTS^{•+} em 734 nm, durante um intervalo de tempo determinado, em função da concentração de antioxidante, e é calculada com relação ao valor obtido para o Trolox, nas mesmas condições experimentais. As betaxantinas tem máximo de absorção em torno de 480 nm e, portanto, não interferem na absorção do radical ABTS^{•+} em 734 nm.¹²⁵ Assim, a reação foi monitorada em 734 nm, por um período de 6 min, e a variação da absorção foi calculada com relação a um controle sem antioxidante.

O ensaio ABTS pode ser realizado em uma ampla faixa de pH.¹²⁶ Estudos anteriores mostram que a capacidade antioxidante de betalaínas é influenciada pelo pH

do meio. De forma geral, as betalaínas apresentam maior capacidade antioxidante em meios neutros e básicos, e menor capacidade em meios ácidos.^{8, 23, 29, 74} Com isso, optou-se por realizar o experimento em pH 7, pela proximidade com o pH de relevância biológica (pH = 7,4), e em pH 3,6, para que os resultados pudessem ser comparados com os valores obtidos com o método FRAP, que requer um meio ácido (pH 3,6) para solubilizar o produto $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$ formado.

Os resultados de $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ obtidos em pH 3,6 são menores que 1, o que significa que em meio ácido, as betaxantinas removem menos ABTS^{++} do que Trolox e AscH (**Figura 18**). Assim como no método FRAP, a Cys-Bx apresentou o menor valor de $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$, e a Tyr-Bx apresentou um valor ($0,46 \pm 0,02$) mais próximo dos valores obtidos para as betalaínas não-fenólicas que, no entanto, está de acordo com dados da literatura que descrevem que, em meio ácido, betalaínas fenólicas com apenas uma hidroxila em sua estrutura apresentam valores de $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ similares aos de betalaínas não-fenólicas.⁷⁴ Em contrapartida, em pH 7, todas as betaxantinas possuem capacidade antioxidante superior à do AscH e do Trolox, com exceção da Cys-Bx. As betaxantinas não-fenólicas apresentaram valores de $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ entre 1,8 e 2,5, e a Tyr-Bx apresentou um valor de $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ de $3,6 \pm 0,4$, se aproximando do grupo que contém as betaxantinas com os maiores valores de capacidade antioxidante: dopamina-betaxantina ($4,8 \pm 0,5$), DOPA-betaxantina ($4,4 \pm 0,4$), e triptofano-betaxantina ($5,1 \pm 0,5$).

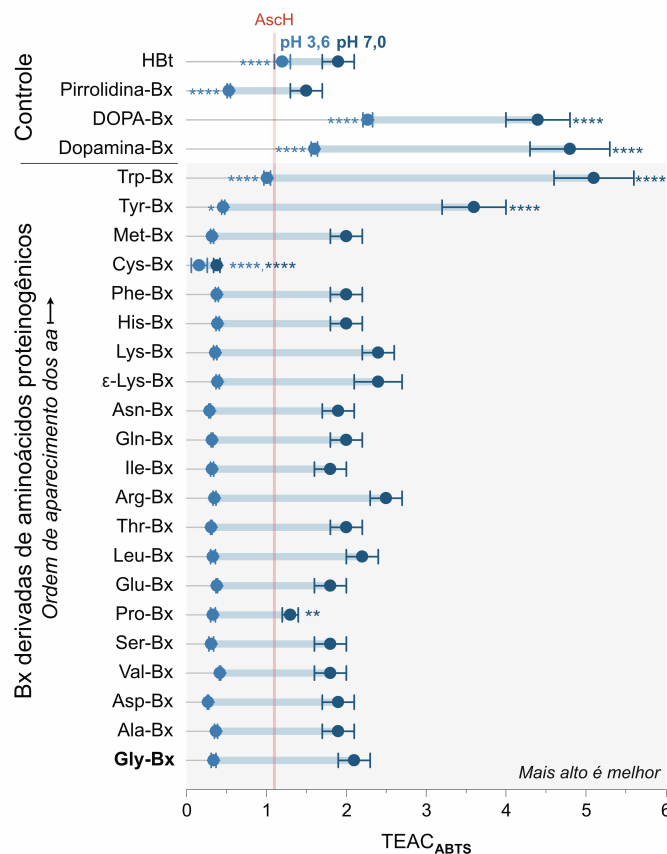


Figura 18. Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) das betaxantinas determinadas pelo ensaio ABTS em pH 3,6 e 7. Os asteriscos indicam os valores que são diferentes dos valores de Gly-Bx (ANOVA-Tukey test, intervalo de confiança de 95%, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $N = 3$).

3.8. Propriedades redox

Informações sobre os potenciais redox das betaxantinas são necessárias para uma análise mais profunda sobre as propriedades antirradicais desses compostos. Portanto, medidas de voltametria cíclica foram realizadas em KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7 com o objetivo de determinar os potenciais formais das betaxantinas. As medidas foram feitas utilizando-se um eletrodo impresso de carbono, que permite a utilização de uma quantidade mínima de solução. As soluções das betaxantinas de concentração 1 mmol L⁻¹ foram preparadas em KCl 0,1 mol L⁻¹. O voltamograma do eletrólito suporte (KCl 0,1 mol L⁻¹) foi subtraído dos voltamogramas das betaxantinas.

Todas as betaxantinas apresentaram pelo menos um potencial de pico anódico, com potenciais de pico que variam entre 0,4 – 1,2 V vs. SHE. A maioria das betaxantinas apresentaram voltamogramas cíclicos compatíveis com processos irreversíveis (Figura 19), o que impossibilita a obtenção dos seus potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) a partir dos valores de potenciais de pico anódico e catódico ($E_{p,a}$ e $E_{p,c}$, respectivamente). Potenciais de meio-pico ($E_{p/2}$) e potenciais de ponto de inflexão (E_i) foram utilizados como aproximações dos valores de potencial redox formal nos casos de irreversibilidade (Box 2).¹²⁷ Todos os valores de potenciais determinados a partir dos voltamogramas estão apresentados na Tabela Anexo 6. Os valores de potencial de meia-onda ($E_{1/2}$) foram determinados pelo ponto entre os potenciais de pico anódico e catódico, $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$, respectivamente. $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$ foram determinados pelos “pontos zero” da primeira derivada dos voltamogramas. O potencial de meio-pico ($E_{p/2}$) foi determinado pelo ponto onde a corrente é igual a metade do valor máximo de corrente no pico anódico. O potencial de ponto de inflexão (E_i) foi determinado pelo “ponto zero” da segunda derivada dos voltamogramas. Detalhes sobre a medida de processos irreversíveis por voltametria cíclica são apresentados no Box 1.

BOX 1. Voltametria cíclica: estimativa de potencial redox formal em processos irreversíveis

A voltametria cíclica é provavelmente a técnica eletroquímica mais utilizada para investigar processos de oxidação e redução de espécies moleculares.¹²⁸ O processo de transferência de elétron está relacionado com a reatividade de muitos sistemas antioxidantes.¹²⁹ Em um experimento básico de voltametria cíclica, um intervalo de potencial é aplicado na superfície de um eletrodo de trabalho em velocidade constante, e a corrente gerada durante o processo de oxidação de um antioxidante é monitorada. Os parâmetros mais simples obtidos do voltamograma resultante usados para caracterizar o antioxidante são o potencial de pico (E_p),

o potencial de meia-onda ($E_{1/2}$) e a corrente de pico (i_p). Geralmente, o potencial de pico fornece informações sobre a facilidade que uma molécula tem em transferir elétrons.¹²⁹

O valor de E^0 pode ser calculado por meio de experimentos de voltametria cíclica utilizando-se a equação de Nernst se as atividades relativas dos analitos oxidados e reduzidos em equilíbrio forem conhecidas, o que raramente é o caso. Assim, os potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) se tornaram a representação preferida de E^0 , ou seja, $E^0 \approx E_{1/2}$ para processos de oxidação e redução reversíveis. A média entre os valores de potencial de pico anódico ($E_{p,a}$) e pico catódico ($E_{p,c}$) definem o valor de $E_{1/2}$, valores esses simples de serem obtidos do voltamograma cíclico de processos reversíveis. Essa definição de $E_{1/2}$ também se estende a processos quase-reversíveis (*i.e.*, processos que são quimicamente reversíveis e eletroquimicamente irreversíveis).¹³⁰

Em um processo de redução quimicamente e eletroquimicamente reversível, a diferença entre os picos de potencial anódico e catódico (ΔE_p) é de 57 mV a 25 °C. A reversibilidade química indica se um analito se mantém estável após a redução e pode ser subsequentemente reoxidado. A reversibilidade eletroquímica se refere a cinética de transferência de elétrons entre o eletrodo e o analito. Quando existe uma barreira baixa para a transferência de elétrons (reversibilidade eletroquímica), o equilíbrio de Nernst é estabelecido imediatamente após qualquer mudança no potencial aplicado. Quando existe uma barreira alta para a transferência de elétrons (irreversibilidade eletroquímica), as reações de transferência de elétrons são mais lentas e potenciais mais negativos (positivos) são necessários para que ocorra a reação de redução (oxidação), levando a maiores valores de ΔE_p .¹²⁸

Quando um voltamograma cíclico indica um comportamento irreversível, e conseqüentemente o valor de $E_{1/2}$ não pode ser obtido, os potenciais de pico (E_p) são indicados, *i.e.*, os potenciais anódicos para oxidações ou potenciais catódicos para reduções. Contudo, os valores de E_p são sensíveis tanto às condições experimentais da medida, como a velocidade de varredura utilizada, a concentração da amostra e a concentração do eletrólito de suporte, quanto à

propriedades inerentes da amostra analisada, como a velocidade de transferência de elétron, a velocidade de difusão das formas oxidadas ou reduzidas do analito e velocidade de degradação ou transformação química das espécies formadas. Além disso, voltamogramas de processos reversíveis indicam que os valores de E_p desviam consideravelmente dos valores de $E_{1/2}$ e, portanto, essa pode não ser uma boa aproximação.¹³⁰

Com isso, para processos reversíveis, foram propostos o uso do potencial de meio-pico ($E_{p/2}$), que corresponde ao potencial na metade do valor máximo de corrente e o potencial no ponto de inflexão (E_i) das ondas anódicas e catódicas, como estimativas para o valor de E^0 .^{130, 131} Embora em muitos casos os valores obtidos para E_i e $E_{p/2}$ sejam quase os mesmos, os valores de E_i tendem a ser inerentemente mais próximos dos valores de $E_{1/2}$ que os valores de $E_{p/2}$.¹³⁰

Os voltamogramas cíclicos das betaxantinas primárias não-fenólicas apresentaram apenas um pico de potencial anódico irreversível, entre 720 mV (1,0 V vs. SHE) para Phe-Bx, e 854 mV (1,1 V vs. SHE) para Lys-Bx (Figura 19). Nos voltamogramas de prolina-betaxantina e pirrolidina-betaxantina observam-se dois picos anódicos, com valores acima de 700 mV. Para Pro-Bx, observa-se um primeiro pico anódico, $E_{p,a}^{II'}$ em 742 mV (1,0 V vs. SHE) e o segundo, $E_a^{II''}$ em 874 mV (1,2 V vs. SHE) (Figura 20). No voltamograma de Pyr-Bx, observa-se um segundo pico anódico, $E_a^{II''}$ em 835 mV (1,1 V vs. SHE). A primeira onda não possui um máximo bem definido, e não foi possível determinar o valor de $E_a^{II'}$ pela primeira derivada e, portanto, esse valor foi obtido por uma aproximação visual para 710 mV. A espécie formada em torno de 710 mV pode ser uma espécie quimicamente instável.

Dopamina-betaxantina, DOPA-betaxantina, Tyr-betaxantina e Trp-betaxantina apresentaram, além de um pico anódico irreversível na região entre 784 mV (DA-Bx) e 915 mV (Tyr-Bx), similar ao observado para as demais betaxantinas, uma região reversível e valores de $E_{p,a}$ menores. A partir dos valores de $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$ dos processos

reversíveis dessas betaxantinas, foram obtidos os seus valores de $E_{1/2}$, de 272 mV (DA-Bx; 5,6 V vs. SHE), 199 mV (DOPA-Bx; 4,9 V vs. SHE), 103 mV (Tyr-Bx; 3,9 V vs. SHE) e 90 mV (Trp-Bx; 3,8 V vs. SHE) (Tabela Anexo 6). O valor de $E_{p,a}$ de cisteína-betaxantina é em torno de 0,9 V e a intensidade da corrente gerada na voltametria cíclica dessa betalaína é muito menor do que nas demais, o que sugere uma ionização mais baixa. Embora em alguns voltamogramas pareça existir uma região reversível entre 0 e 400 mV, os potenciais não puderam ser definidos pela primeira derivada (Figura 19).

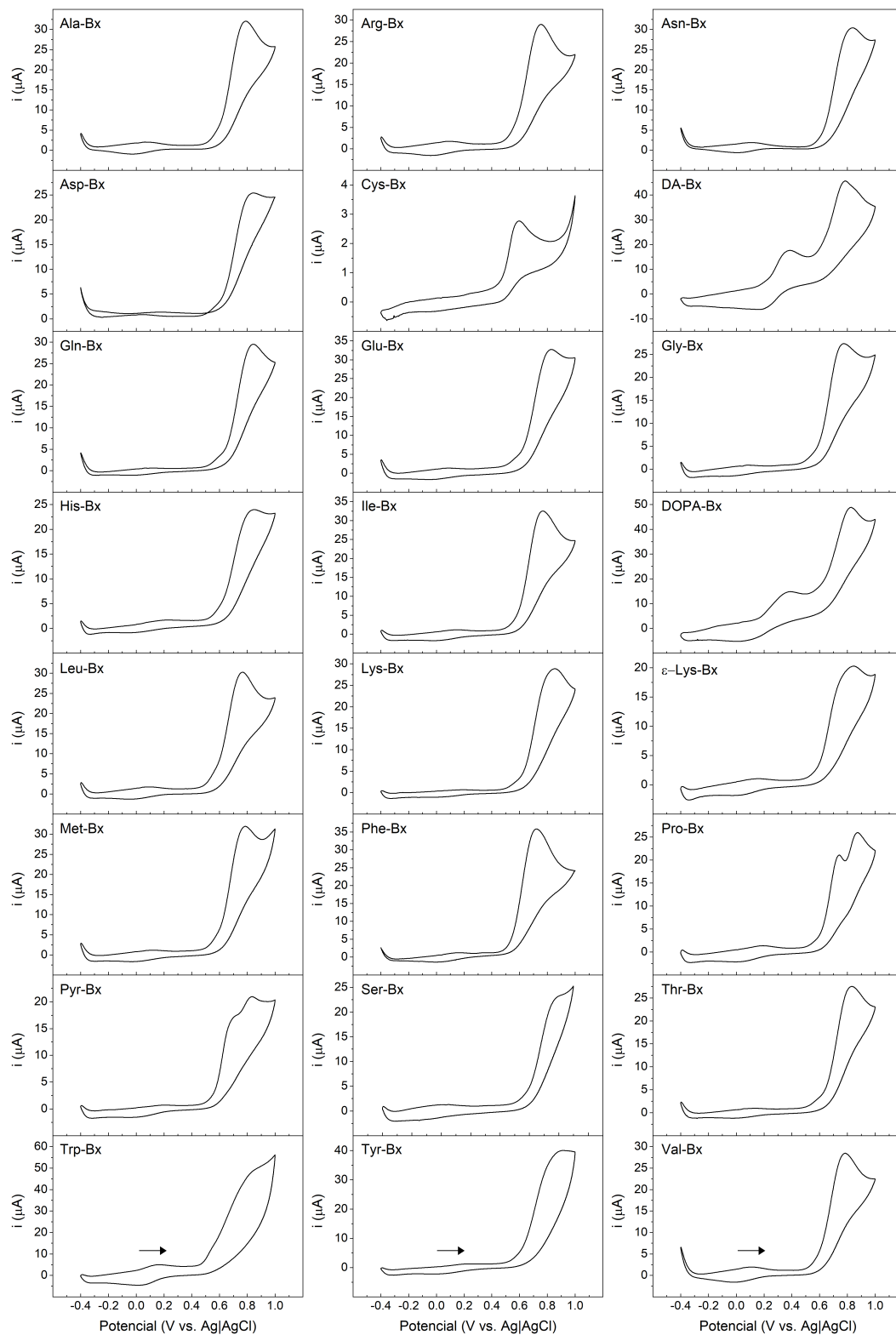


Figura 19. Voltamogramas cíclicos das betaxantinas estudadas, concentração 1 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . O voltamograma do eletrólito de suporte (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi subtraído dos voltamogramas das betaxantinas. As setas indicam o início e a direção da varredura.

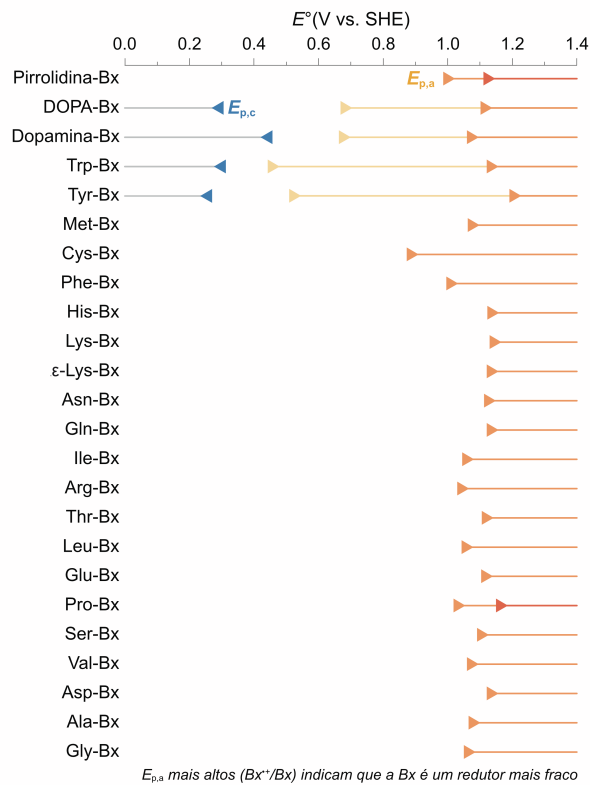


Figura 20. Potenciais de pico determinados por voltametria cíclica. Potenciais catódicos (◄) e anódicos (►) foram determinados utilizando-se eletrodos impressos de carbono, eletrodo de referência de Ag/AgCl e eletrodo auxiliar de de carbono. Intervalo de potencial: $-0,4$ a $1,0$ V, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} , concentração de betaxantina: 1 mmol L^{-1} em KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0.

4. DISCUSSÃO

4.1. Considerações sobre a semissíntese de betaxantinas

A hidrólise alcalina das betalainas presentes no suco de beterraba produz uma mistura escalêmica de ácido betalâmico e isobetalâmico.⁴³ Por esse motivo, o uso de condições alcalinas para a semissíntese das betaxantinas a partir do ácido betalâmico pode parecer ilógica. No entanto, sob as condições de semissíntese reportadas nesse trabalho, a desprotonação dos grupos amônio dos aminoácidos ($pK_a \sim 9,5$; Tabela Anexo 7) promove a adição nucleofílica do grupo amino à função aldeído do ácido betalâmico, produzindo betaxantinas quantitativamente. O estado de protonação dos aminoácidos também tem um efeito na reatividade dos grupos funcionais da cadeia lateral desses compostos. O meio básico no qual a reação de semissíntese das betaxantinas é realizada favorece a desprotonação desses grupos e, portanto, o acoplamento pela cadeia lateral poderia ocorrer, levando à formação de isômeros. No entanto, outros fatores, além do equilíbrio de protonação, devem ser levados em consideração.

Na glutamina e asparagina, o grupo amino da função amida possui reatividade menor que o grupo α -amino, devido à conjugação eletrônica intramolecular.⁵⁰ Os grupos funcionais da cadeia lateral da tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico são menos reativos que o grupo α -amino e, portanto, a reação de acoplamento não ocorre por meio desses grupos. O grupo da cadeia lateral da arginina (grupo guanidina) possui um valor de $pK_a = 13,8 \pm 0,1$ e, portanto, está predominantemente protonado nas condições da semissíntese (pH 11),¹³³ impedindo a formação da ligação pelo grupo guanidina. A histidina possui um grupo imidazol em sua cadeia lateral, que embora possua um valor de pK_a de 6,04, o grupo com maior nucleofilicidade na histidina é o grupo α -amino.¹³⁴

Assim, com exceção da Cys-Bx e ϵ -Lys-Bx, todas as demais betaxantinas são obtidas por meio do ataque do grupo α -amino ao aldeído do ácido betalâmico.

O ácido betalâmico reage muito mais rápido com L-prolina e pirrolidina em comparação aos demais aminoácidos e aminas primárias, para os quais são necessários uma quantidade 10 vezes maior do nucleófilo e um período de reação de até 48 h para que ocorra a formação das betaxantinas. Isso é devido à maior nucleofilicidade de aminas secundárias comparadas às aminas primárias, como evidenciado pelo parâmetro de nucleofilicidade de Mayr (N), como por exemplo, os parâmetros N de Pro (18,1), Pyr (17,2), Phe (14,1), e Thr (12,7).^{134, 135} O parâmetro N serve como um guia para o uso de nucleófilos em geral em sínteses e permite a comparação com outros nucleófilos de diferentes estruturas que já tiveram o seu parâmetro N determinado: quanto maior o valor de N , maior a nucleofilicidade.

Dopamina, L-DOPA e tirosina possuem grupos fenol em sua estrutura, o que as torna susceptíveis à oxidação, principalmente em meio básico, como o utilizado na semissíntese das betaxantinas. A oxidação de L-DOPA e dopamina levam à suas formas quinona (dopaquinona e dopaminoquinona, respectivamente), que são capazes de realizar uma adição de Michael intramolecular (ciclização), formando leucodopacromo e leucodopaminacromo, que após sucessivas reações, eventualmente polimerizam formando melanina. O meio básico utilizado na reação de semissíntese garante a desprotonação dos grupos $-OH$ e do grupo amino, necessária para que ocorra a ciclização.^{136, 137} A oxidação de L-DOPA e dopamina foi observada durante as reações de semissíntese das betaxantinas derivadas dessas aminas, pela formação de uma solução marrom escura. Assim, para evitar a oxidação dessas moléculas, as reações de semissíntese foram realizadas em solução saturada com N_2 ou com a adição de ácido

ascórbico. O procedimento para a semissíntese de betaxantinas apresentado aqui evita o uso de um grande excesso (> 500 equiv) de aminoácidos ou aminas, e ácido é utilizado somente para ajustar o pH da solução para 5 ao final da reação e evitar a degradação das betaxantinas.

A semissíntese de betalaínas é geralmente realizada em acetato de etila ou água como solventes. Em acetato de etila, a reação requer catálise ácida, para a qual é utilizado ácido p-toluenossulfônico, e que tem a vantagem adicional de induzir a precipitação do produto formado.^{27, 43, 138, 139} As betalaínas, de forma geral, sofrem degradação em meio aquoso ácido e, por isso, a semissíntese desses compostos em água é geralmente realizado em pHs maiores que 3.⁸⁹ A resolução das betaxantinas [(*S*)-C6] e seus estereoisômeros *iso* [(*R*)-C6], assim como seu isolamento ou a síntese de um único diastereoisômero não é produtiva porque betaxantinas e outras iminas isomerizam em solução aquosa.^{19, 140, 141} Assim, os resultados apresentados nesse trabalho se referem a misturas de pelo menos dois estereoisômeros de cada betaxantina, assim como todos os outros estudos que utilizam betaxantinas semissintéticas (ou naturais), um fato que não é suficientemente enfatizado na literatura.

4.2. As betaxantinas derivadas da L-lisina

A lisina possui um grupo α - e um grupo ϵ -amino, o que pode resultar na formação de dois adutos de lisina-betaxantina, com o mesmo valor de m/z . A formação de dois adutos a partir do acoplamento de L-lisina com ácido betalâmico com tempos de retenção e λ^{Abs} diferentes (475 nm e 469 nm) já foi reportada, no entanto, apenas análises de espectrometria de massas foram realizadas, o que não permitiu a elucidação da estrutura dos produtos obtidos, uma vez que o mesmo padrão de fragmentação foi observado para ambas as espécies.^{43, 50, 56} A betaxantina derivada da lisina encontrada em beterrabas

vermelhas e amarelas e em acelga amarela coincide com apenas um dos adutos obtidos pela reação *in vitro* entre ácido betalâmico e L-lisina, ou seja, embora a lisina possua dois sítios nucleofílicos, apenas um aduto é formado na biossíntese de lisina-betaxantina nas fontes naturais em que essa betalaína está presente.³⁹

Em reações de lisina com meteto de quinona, nas quais o grupo α -amino da lisina estava protegido, o grupo ε -amino foi alquilado, mas em uma velocidade 30 vezes menor em relação à alquilação no grupo α -amino. Essa diferença de seletividade das meteto de quinona pelo grupo α -amino versus o grupo ε -amino da lisina foi racionalizada pela diferença do grau de protonação entre esses grupos (pK_a NH_2 - α = 9,16; pK_a NH_2 - ε = 10,67; Tabela Anexo 7).¹⁴²

A análise cromatográfica do produto obtido após a reação de L-lisina com ácido betalâmico indica que os valores das áreas dos sinais correspondentes às frações 1 e 2 são similares, a área do pico da fração 2 corresponde a 92% da área do pico da fração 1, o que indica que, nas condições utilizadas para a semissíntese de betaxantinas, não há uma preferência entre os dois possíveis sítios de ligação da lisina, e as duas betaxantinas derivadas desse aminoácido, Lys-Bx e ε -Lys-Bx, são formadas em proporções similares.

Os padrões de fragmentação obtidos pelas análises de HPLC-ESI-qTOF-MS/MS das duas betaxantinas da lisina não permitem, de fato, a determinar de forma inequívoca a identidade dos dois compostos obtidos. No entanto, a fragmentação do íon $[M+H]^+$ da fração 1 produz um fragmento de m/z 323,1227, condizente com a perda de NH_3 , não observado na análise da fração 2 (Anexo 14 e Anexo 15). Investigações com lisina marcada com $^{15}N\alpha$ revelaram que a perda de NH_3 ocorre exclusivamente do grupo amino da cadeia lateral do aminoácido.¹⁴³ Assim, a perda de NH_3 pelos isômeros presentes na

fração 1 corrobora a identificação da estrutura desse composto, como um produto do ataque do grupo α -amino ao ácido betalâmico (Lys-Bx).

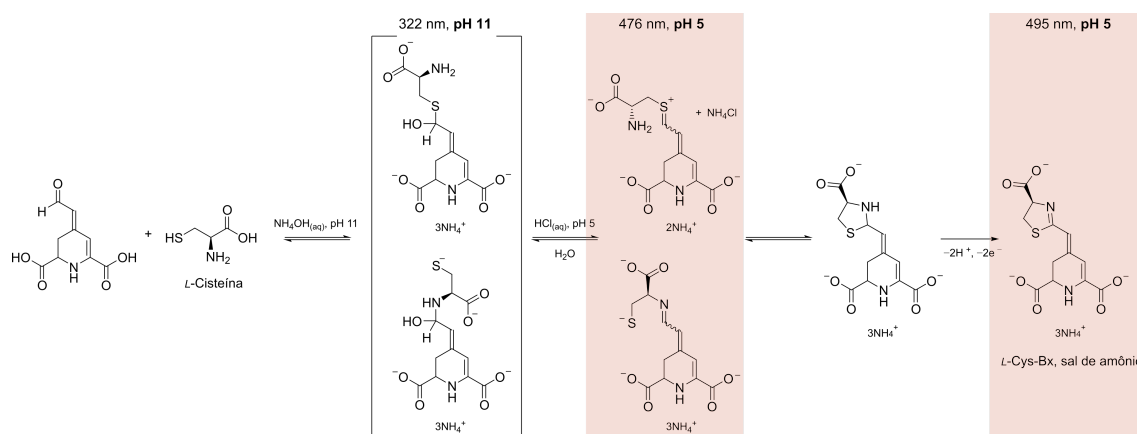
4.3. A betalaína não-imínica derivada da cisteína

De acordo com seu parâmetro N , a cisteína é o aminoácido proteínogênico mais nucleofílico ($N = 23,43$), sendo aproximadamente 6000 vezes mais reativo em reações com íons benzidrílio, em comparação à alanina, aminoácido similar que não possui o enxofre em sua estrutura, o que indica uma maior reatividade do enxofre. Assim, em contraste com os demais aminoácidos, nos quais o grupo amino- α é o sítio reativo, na cisteína o tiolato é o sítio reativo.¹³⁴ Em reações de aminoácidos com meteto de quinona o sítio primário de alquilação para cisteína também é o enxofre, enquanto pra outros aminoácidos como glicina, serina e histidina, o sítio reativo é o grupo α -amino.¹⁴² Além disso, em reações com formaldeído, a cisteína foi o aminoácido com maior reatividade, em comparação com aminoácidos que não possuem um grupo tiol (Ala, Ser, Thr e His).¹⁴⁴ No entanto, apesar da maior reatividade do enxofre, na reação de cisteína com formaldeído, na qual se obtém como produtos a tiazolidina e um produto S-hidroximetil, evidências indicam que a formação do produto ciclizado ocorre provavelmente via formação de um intermediário imina e não via formação do produto S-hidroximetil.¹⁴⁴

Na reação de formação de Cys-Bx, após o ajuste do pH do meio para 5, o espectro obtido possui um perfil característico de betaxantinas, com máximo de absorção em 476 nm, e um ombro em 456 nm. Esse poderia ser um indício de que a reação de formação de Cys-Bx ocorre pela formação da imina como um produto intermediário, que posteriormente cicliza de forma espontânea para formação do anel tiazolidina.

Considerando todas as evidências, as espécies com λ^{Abs} em 322 nm foram, de forma tentativa, atribuídas como um intermediário tetraédrico formado pelo ataque do

nucleófilo tiolato (e/ou do amino grupo da cisteína) ao ácido betalâmico e as espécies com λ^{Abs} em 476 nm como a betaxantina da cisteína esperada ou seu isômero sulfônico (Esquema 5). A ciclização espontânea de ambas as espécies leva a um anel tiazolidina que é oxidado em um processo que envolve $2e^-$, $2H^+$, para a formação de um anel 2-tiazolina (Cys-Bx), como inferido por meio das análises de RMN de 1H e espectrometria de massas, embora não seja muito claro como essa oxidação ocorre.



Esquema 5. Mecanismo proposto para a obtenção de Cys-Bx.

Esse resultado possui implicações biológicas interessantes, visto que é a primeira evidência de que betalainas são susceptíveis ao ataque nucleofílico de grupos tiol, como os presentes na cadeia lateral de resíduos de cisteína em peptídeos e proteínas, o que pode levar a formação de adutos. Ainda, é importante mencionar que essa é a primeira vez que a estrutura da Cys-Bx é reportada e essa é a primeira betalaina não-imínica derivada de um aminoácido. No entanto, a ocorrência natural desse composto ainda não foi verificada.

4.4. Padrão de fragmentação de betalainas

A espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) possui um alto poder de resolução fornecendo medidas de massas altamente precisas. Além disso, a fragmentação gerada no método MS/MS auxilia na identificação dos compostos analisados. Para

garantir a confiabilidade dos compostos identificados, o valor do erro entre a razão m/z experimental e teórica deve ser menor que 5 ppm.

A espectrometria de massas tem sido utilizada para a caracterização de betalaínas, tanto semissintetizadas, quanto purificadas a partir de fontes naturais. A identificação de fragmentos e a observação de um possível padrão de fragmentação auxiliam na identificação e descoberta de novas betalaínas. No entanto, a maioria dos trabalhos reportam apenas a massa unitária do íon molecular,^{20, 36, 37, 50} ou de alta resolução, mas sem a fragmentação, como reportado recentemente na identificação de 64 betalaínas em extratos provenientes de três variedades diferentes de beterrabas.⁵¹ Xie e colaboradores apresentaram os valores de massas obtidos com a fragmentação de 68 betalaínas encontradas em djulis também no massas de alta resolução. No entanto, muitos fragmentos não possuem uma estrutura como possível identificação.⁴¹

A partir das análises de HPLC-ESI-qTOF-MS/MS realizadas para caracterizar as betaxantinas semissintetizadas, foi possível identificar que existe um padrão de fragmentação típico que envolve, principalmente, a perda de fragmentos de CO e H₂O. Todos os íons obtidos na análise de massas foram fragmentados, e os fragmentos de íons foram tentativamente identificados (Anexo 1 – Anexo 24).

Além do íon molecular $[M+H]^+$ (ou $[M]^+$) foram observados, ainda no espectro MS (sem fragmentação), dois outros íons, com valores de m/z correspondentes aos íons $[M+H-46]^+$ e $[M+H-74]^+$. Esses íons são observados para a maioria das betaxantinas, com exceção da DA-Bx e DOPA-Bx, que não apresentaram nenhum dos dois íons. Arg-Bx, Gly-Bx, His-Bx, Lys-Bx, ϵ -Lys-Bx e Pyr-Bx não apresentaram o íon $[M+H-74]^+$. Esses íons, chamados de íons metaestáveis, são fragmentos do íon molecular, que são formados no caminho entre a fonte de ionização e o analisador de massas.¹⁴⁵

Para as betalaínas derivadas da arginina, histidina e lisina, foram observados, além do íon molecular $[M+H]^+$ de m/z esperado para essas betaxantinas, íons do tipo $[M+2H]^{2+}$, que correspondem à molécula com carga 2+, e íons do tipo $[M+2H-46]^{2+}$, que correspondem a perda de CO_2 e H_2 (Anexo 2, Anexo 10, Anexo 14 e Anexo 15).

Os íons $[M+H]^+$ de Ile-Bx e Leu-Bx possuem o mesmo valor de m/z , visto que os dois compostos são isômeros. Os fragmentos resultantes da dissociação entre os carbonos 11 e 12, ou seja, a eliminação de C_3H_8 na molécula de Leu-Bx, ou C_2H_6 , no caso de Ile-Bx, poderiam diferenciar as duas betalaínas¹⁴⁶. Infelizmente, nenhum íon com m/z compatível com esse tipo de fragmentação foi encontrado na análise dessas betaxantinas (Anexo 11 e Anexo 13). No entanto, como todas as betalaínas foram semissintetizadas utilizando-se os aminoácidos apropriados para o composto que se desejava obter, os resultados obtidos com as análises de espectrometria de massas são suficientes para identificar as betalaínas obtidas.

O espectro de DOPA-Bx apresentou um sinal com m/z 781,2210, correspondente à estrutura de um dímero de DOPA-Bx, e sua fragmentação resulta em um sinal com m/z 391,1149, que está de acordo com a massa esperada para DOPA-Bx (Anexo 12). Tanto a fragmentação do sinal correspondente ao dímero quanto a fragmentação do sinal do íon $[M+H]^+$ geraram fragmentos de íons de mesma m/z , confirmando a identidade do dímero de DOPA-Bx. Na análise de HRMS de OxiBeet também foi observado um sinal com valor m/z compatível com um dímero dessa betalaína, sugerindo que existam agregados dessa betalaína.¹⁴⁷ Nesse trabalho, a existência de dímeros foi observada apenas para a DOPA-Bx.

A fragmentação do íon $[M+H]^+$ da maioria das betaxantinas produziu, de forma geral, três tipos de fragmentos de íons: íons derivados das próprias betaxantinas, do ácido

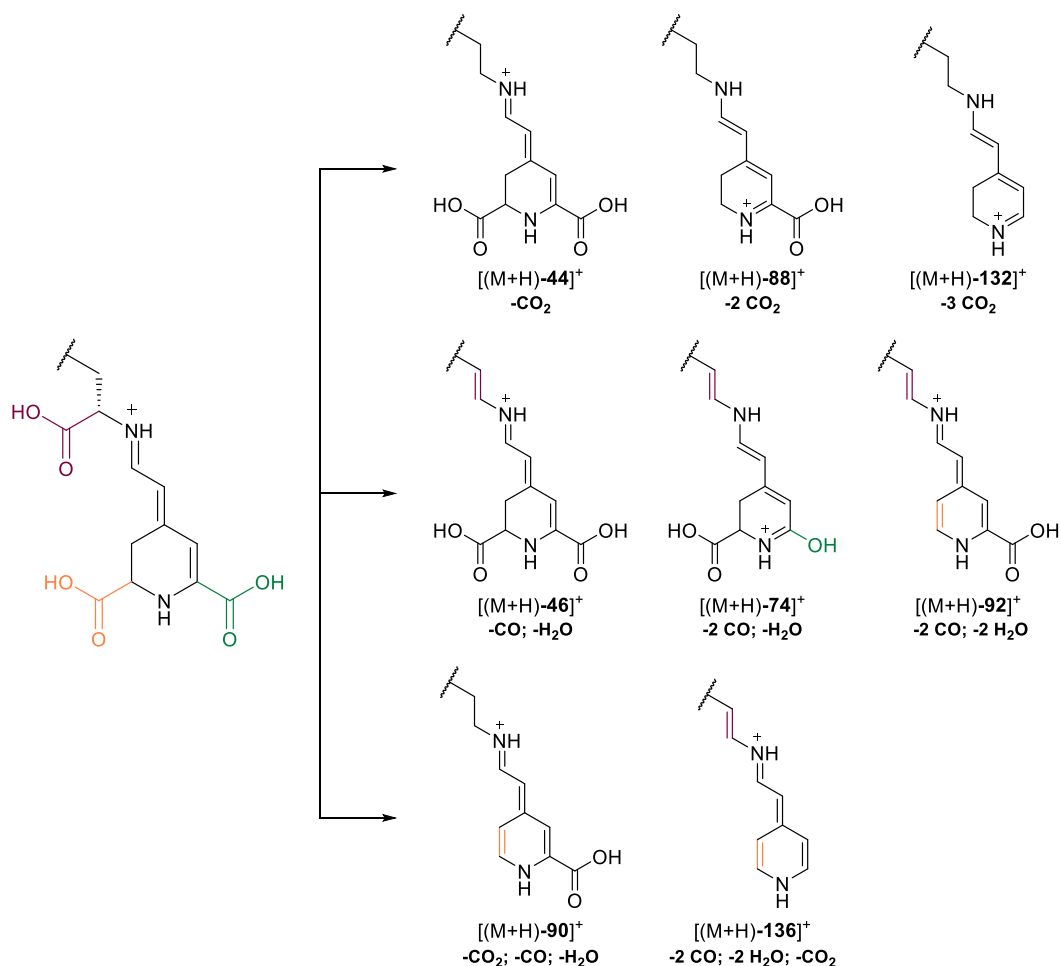
betalâmico e dos aminoácidos ou amins precursoras. Não foram obtidos exatamente os mesmos fragmentos de íons para todas as betalaínas analisadas, mas observam-se fragmentos em comum que se repetem entre elas, principalmente os fragmentos derivados de descarboxilações, que auxiliam na identificação, e permitem traçar um padrão de fragmentação para esses compostos. Ou seja, são fragmentos que podem ser esperados em análises de espectrometria de massas (MS/MS) de betalaínas, contribuindo para a identificação desses compostos, principalmente em análises de extratos de fontes naturais de betalaínas.

Alguns fragmentos provenientes da porção betalâmica foram identificados, como o fragmento de íon de m/z teórica de 211,0713, já relatado na literatura,^{35, 41} presente, por exemplo nas análises de DA-Bx (Anexo 6) e Trp-Bx (Anexo 22). Esse tipo de fragmento é importante na identificação de betalaínas, pois possui em sua estrutura o átomo de N proveniente do aminoácido/amina precursor, ausente na estrutura do ácido betalâmico, ou seja, é um fragmento “misto”, composto em sua maior parte pela estrutura proveniente do ácido betalâmico, porém, possui também uma pequena porção do aminoácido/amina precursor. Os fragmentos de íons de m/z teórica 194,0448 e 150,0550, já relatados na fragmentação de outras betalaínas,⁴¹ também foram observados nas análises das betaxantinas, como Asn-Bx (Anexo 3) e Gln-Bx (Anexo 7).

Fragmentos de íons derivados dos aminoácidos ou amins foram observados somente nas análises de algumas betaxantinas: Arg-Bx apresentou um fragmento de íon de m/z 114,1030, identificado como um fragmento proveniente da arginina (Anexo 2); Asn-Bx apresentou um fragmento, de m/z 87,0558, que corresponde à estrutura da asparagina descarboxilada (Anexo 3); His-Bx apresentou um fragmento de m/z 156,0776, correspondente à estrutura protonada de seu aminoácido precursor (histidina), e outros

três fragmentos de massa inferior, identificados como também provenientes da histidina, sendo eles: m/z 112,0874, que corresponde à histidina descarboxilada, m/z 110,0717, corresponde à perda de H_2 , com relação ao fragmento anterior, e m/z 95,0604, com perda de NH_3 (Anexo 10); Lys-Bx apresentou um fragmento de m/z 147,1126, correspondente à estrutura de lisina protonada (Anexo 14); Pro-Bx, um fragmento de m/z 116,0710, compatível com a estrutura da prolina protonada (Anexo 18); e Trp-Bx, que apresentou os fragmentos de m/z 188,0710 e 130,0654 (Anexo 22), ambos fragmentos típicos de conjugados de triptofano.¹⁴⁶

Os fragmentos derivados das betaxantinas apresentam um padrão de fragmentação típico de perda de CO_2 ou de CO e H_2O . Como as betaxantinas analisadas possuem entre dois e três grupos carboxílicos em suas estruturas, são observados fragmentos de íons mono, di e tri-descarboxilados. A Tabela 5 apresenta os valores de m/z para os fragmentos de íons obtidos após a perda desses fragmentos, para todas as betaxantinas analisadas. O Esquema 6 apresenta as estruturas genéricas dos fragmentos de íons mono, di e tri-descarboxilados obtidos. De todos os fragmentos de íons obtidos, o fragmento gerado pela perda de 46 Da ($[(M+H)-46]^+$) é o mais comum entre as betaxantinas, não sendo observado apenas para Asn-Bx, Gln-Bx e Tyr-Bx. Para a Gln-Bx foram obtidos apenas fragmentos de íons que correspondem a uma descarboxilação após a perda de NH_3 e, portanto, nenhum dos fragmentos típicos de descarboxilação foram observados na análise dessa betaxantina.



Esquema 6. Estruturas genéricas dos fragmentos de íons gerados pelas fragmentações mais comuns observadas nas análises de betaxantinas por HPLC-ESI-qTOF-MS/MS.

Com relação a mono-descarboxilação, a maioria das betaxantinas apresentou fragmentos de íons com perda de CO e H₂O (-46 Da; $[(M+H)-46]^+$), algumas apresentaram o fragmento de íon (-46 Da; $[(M+H)-44]^+$), e um grupo um pouco menor de betaxantinas apresentou ambos os fragmentos de íons. Os fragmentos di-descarboxilados estão entre os mais comuns entre as betaxantinas analisadas, gerados pela perda de duas moléculas de CO e H₂O (-74 Da; $[(M+H)-74]^+$) e de duas moléculas de CO e 2H₂O (-92 Da; $[(M+H)-92]^+$). Também foi observado, com menor frequência entre as betaxantinas, fragmentos gerados pela perda de 2CO₂ (-88 Da; $[(M+H)-88]^+$) e pela perda de CO₂, CO e H₂O (-90 Da; $[(M+H)-90]^+$). A tri-descarboxilação gerou os

fragmentos de íons observados com menor frequência entre as betaxantinas analisadas, com perdas de 3CO_2 (-132 Da; $[(\text{M}+\text{H})-132]^+$) e CO_2 , duas moléculas de CO e duas moléculas de H_2O (-136 Da; $[(\text{M}+\text{H})-136]^+$). A fragmentação do íon metaestável $[\text{M}+\text{H}-74]^+$, gerou fragmentos de íon de m/z teórica 165,0659, 137,0709 e 119,0604, que são, inclusive, os fragmentos de íons observados com maior frequência nas análises das betaxantinas. A identificação desses fragmentos contribuiu para a confirmação da estrutura do fragmento $[\text{M}+\text{H}-74]^+$, do qual eles foram derivados.

Tabela 5. Valores de m/z para as fragmentações típicas de betalainas obtidas pelas análises de HPLC-ESI-qTOF-MS/MS.

Composto	m/z [M+H] ⁺	m/z [(M+H)-44] ⁺ -CO ₂	m/z [(M+H)-46] ⁺ -CO; -H ₂ O	m/z [(M+H)-74] ⁺ -2CO; -H ₂ O	m/z [(M+H)-88] ⁺ -2CO ₂	m/z [(M+H)-90] ⁺ -CO ₂ ; -CO; -H ₂ O	m/z [(M+H)-92] ⁺ -2CO; -2H ₂ O	m/z [(M+H)-132] ⁺ -3CO ₂	m/z [(M+H)-136] ⁺ -CO ₂ ; -2CO; -2H ₂ O
Ala-Bx	283,0934	–	237,0876	209,0924	–	–	191,0815	–	–
Arg-Bx	368,1575	–	161,5795 ^a	–	280,1785	–	–	236,1874	–
Asn-Bx	326,0991	282,1076	–	252,0977	–	–	234,0890	–	–
Asp-Bx	327,0827	–	281,0778	253,0825	–	–	235,0705	–	–
Cys-Bx	313,0499	–	267,0438	239,0496	–	–	221,0389	–	–
DA-Bx	347,1237	303,1335	301,1182	–	–	–	255,1126	–	–
Gln-Bx	340,1149	–	–	266,1142	–	–	–	–	–
Glu-Bx	341,0987	–	295,0928	267,0980	–	–	249,0870	–	205,0981
Gly-Bx	269,0774	–	223,0715	195,0779	–	–	177,0658	–	–
His-Bx	349,1145	305,1128	152,0579 ^a	–	261,1349	–	–	217,1453	–
Ile-Bx	325,1406	–	279,1345	251,1395	–	235,1439	233,1284	–	–
DOPA-Bx	391,1162	347,1247	345,1094	–	–	301,1197	299,1042	–	255,1130
Leu-Bx	325,1401	–	279,1339	251,1390	–	235,1428	233,1280	–	–
Lys-Bx	340,1496	296,1604	294,1495	–	252,1697	–	–	–	–
ε-Lys-Bx	340,1511	296,1326	294,1449; 147,5768 ^a	–	252,1703	–	–	–	–
Met-Bx	343,0965	–	297,0908	269,0959	–	–	251,0848	–	207,0955
Phe-Bx	359,1243	–	313,1186	285,1234	–	269,1297	267,1126	–	223,1230
Pro-Bx	309,1097	–	263,1040	235,1077	–	219,1125	217,0980	–	173,1081
Pyr-Bx	265,1181	221,1279	219,1124	191,1176	–	175,1227	173,1069	–	–
Ser-Bx	299,0884	–	253,0816	225,0875	–	–	207,0770	–	–
Thr-Bx	313,1036	–	267,0977	239,1028	–	–	221,0918	–	–
Trp-Bx	398,1362	–	352,1302	324,1350	–	–	306,1242	–	262,1355
Tyr-Bx	375,1197	331,1296	–	301,1184	–	285,1238	283,1087	–	239,1186
Val-Bx	311,1250	–	265,1191	237,1240	–	221,1278	219,1130	–	–

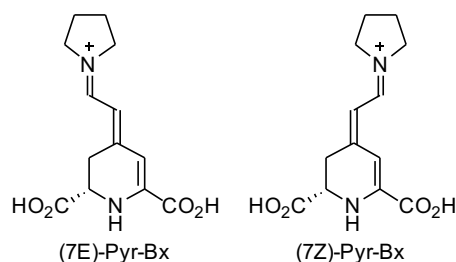
^a fragmento com carga 2+

4.5. Propriedades eletrônicas de betaxantinas

Na literatura, há poucas informações sobre deslocamentos químicos e constantes de acoplamento de hidrogênios e, principalmente de ^{13}C de betalaínas.^{42, 148} Para realização do experimento de RMN de ^1H , alguns requisitos precisam ser levados em consideração, como a quantidade de amostra disponível e a solubilidade e estabilidade da amostra no solvente utilizado. Apesar disso, nosso grupo tem tido sucesso na obtenção de dados de RMN nos últimos anos, principalmente nas análises de RMN de ^1H .^{27, 89, 110} As análises de carbono ainda são um desafio, devido ao tempo de aquisição, instabilidade/solubilidade da amostra em água, e o equipamento robusto necessário. No entanto, para betalaínas mais estáveis, já foram obtidos espectros de RMN de ^{13}C .^{62, 138, 139}

As betaxantinas são solúveis em D_2O , e embora elas sejam susceptíveis a hidrólise, o tempo necessário para a obtenção do espectro de RMN de ^1H (≈ 30 min) é curto para que ocorra a degradação da amostra. No entanto, a quantidade de composto necessária ainda é um desafio. Devido à baixa nucleofilicidade dos aminoácidos primários, o acoplamento desses compostos com ácido betalâmico requer a adição de 100 equiv. de aminoácido à reação. Embora o rendimento esperado para o acoplamento aldimínico seja alto, as várias etapas de purificação necessárias para retirar todo o excesso de aminoácido presente no meio, além de outras impurezas provenientes da etapa de extração do ácido betalâmico, acarretam uma perda grande na quantidade de composto. Para que a quantidade necessária para a realização do experimento de RMN de ^1H fosse obtida, as etapas de purificação teriam que ser repetidas diversas vezes para cada betaxantina, o que tornou inviável a obtenção dos espectros de RMN de ^1H para todas as betaxantinas estudadas nesse trabalho.

A partir das análises de RMN de ^1H e ^{13}C de DA-Bx e Pro-Bx, Stintzing e colaboradores reportaram a coexistência de quatro estereoisômeros (*E,E*, *Z,E*, *E,Z* e *Z,Z*) dessas betaxantinas em solução aquosa, sendo dois deles majoritários (*E,E* e *Z,E*).⁴² Devido à simetria da pirrolidina, apenas dois isômeros são de fato possíveis para a Pyr-Bx (7E e 7Z, Esquema 7) e, portanto, o espectro de ^1H desse composto é o mais simples dentre os obtidos nesse trabalho para atribuição dos sinais (Anexo 32). As análises de Pro-Bx e DA-Bx indicaram a configuração (*E*) para $\text{C}(4) = \text{C}(7)$ como os isômeros majoritários para ambos os compostos.⁴² No entanto, somente com as análises de ^1H não é possível identificar qual dos isômeros de Pyr-Bx é o majoritário.



Esquema 7. Isômeros de Pyr-Bx observados nas análises de RMN de ^1H dessa betaxantina.

As betalainas possuem, em comum, a porção proveniente do ácido betalâmico que atua como cromóforo devido à presença de suas ligações duplas conjugadas. O acoplamento com aminoácidos ou aminas, independentemente da natureza desses compostos, desloca o comprimento de onda de absorção para valores similares de comprimento de onda, de 430 nm para valores em torno de 475 nm. Todas as betaxantinas semissintetizadas, com exceção da Cys-Bx, apresentaram comportamentos similares com relação aos comprimentos de onda máximos de absorção (entre 471 e 486 nm) e emissão (entre 503 e 513 nm), e valores deslocamento de Stokes (entre 1083 e 1368 cm^{-1}). Assim, mesmo diferenças na polaridade, tamanho da cadeia ou grupos funcionais parecem ter

uma contribuição limitada nas características espectrais de absorção e emissão das betaxantinas formadas. No entanto, algumas observações podem ser feitas.

DA-Bx e Pyr-Bx, pares descarboxilados de DOPA-Bx e Pro-Bx, respectivamente, possuem máximos de absorção deslocados para o azul, em torno de 5 nm. Para Lys-Bx e ϵ -Lys-Bx, observa-se também o efeito do grupo ácido carboxílico na absorção desses compostos, visto que o máximo de absorção de ϵ -Lys-Bx está levemente deslocado para o azul em relação à Lys-Bx. O mesmo efeito já foi reportado para betanina, que possui um máximo de absorção em 536 nm, e sofre um deslocamento hipsocrômico (para 532 nm) com sua descarboxilação no C-2, para formação de 2-descarboxi-betanina.¹⁴⁹ Esse efeito é resultado da concentração de carga no sistema 1,7-diaza-heptametínio causado pelo efeito de campo do grupo carboxilato α -imínico. Os valores de máximo de absorção obtidos nesse trabalho concordam com valores já reportados na literatura para DA-Bx,⁶¹ Gln-Bx,⁶⁰ Pro-Bx,⁵⁹ DOPA-Bx, Phe-Bx e Pyr-Bx.⁸

Alguns dados de comprimento de onda máximo de emissão reportados na literatura, como para DOPA-Bx, Phe-Bx e Pyr-Bx, em torno de 549 nm,⁸ são mais altos do que os determinados aqui. Como consequência, os valores de deslocamento de Stokes reportados para esses compostos são duas vezes maiores. No entanto, os valores para DA-Bx ($\lambda^{\text{Em}} = 511$ nm),⁶¹ Gln-Bx ($\lambda^{\text{Em}} = 513$ nm)⁶⁰ e Pro-Bx ($\lambda^{\text{Em}} = 518$ nm)⁵⁹ estão mais próximos dos valores determinados para as betaxantinas em geral, e seus valores de deslocamento de Stokes também estão mais próximos. O baixo valor de deslocamento de Stokes das betaxantinas sugere que a transição eletrônica S_0/S_1 é responsável pela absorção nesses compostos.⁵⁹

Gandía-Herrero e colaboradores calcularam o valor de ϵ para DOPA-Bx ($46000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), Phe-Bx ($49000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e Pyr-Bx ($50000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por meio

da hidrólise básica (com amônia com concentração final de $1,2 \text{ mol L}^{-1}$).⁸ Embora o valor de ϵ para DOPA-Bx obtido nesse trabalho seja mais alto do que o relatado na literatura, os valores das demais betaxantinas são similares.

As betalaínas apresentam, de forma geral, rendimentos quânticos de fluorescência muito baixos, e as ligações duplas conjugadas provenientes da porção betalâmica dessas moléculas parecem ser as responsáveis pelas propriedades fluorescentes desses compostos⁶, principalmente no caso das betaxantinas investigadas nesse trabalho. A porção proveniente do aminoácido parece ter uma contribuição limitada sobre os valores de Φ_{FI} obtidos para as betaxantinas, visto que estão todas dentro da mesma ordem de grandeza. Apesar disso, algumas considerações podem ser feitas sobre a influência da estrutura das betaxantinas sobre a sua fluorescência.

A presença de grupos retiradores de elétrons aumenta a intensidade de fluorescência das betalaínas,⁸ como evidenciado pela presença de um ácido carboxílico a mais na estrutura da betalaínas DOPA-Bx e Pro-Bx, que possuem valores de Φ_{FI} maiores que os determinados para seus pares descarboxilados, DA-Bx e Pyr-Bx, respectivamente. Lys-Bx também possui um valor de Φ_{FI} maior do que seu isômero ϵ -Lys-Bx. Nenhum efeito sobre o Φ_{FI} foi observado na substituição do grupo ácido carboxílico por uma amida na cadeia lateral proveniente do aminoácido, para as betaxantinas Glu-Bx e Gln-Bx, para as quais foram determinados valores de Φ_{FI} similares. No entanto, para os pares Asp-Bx e Asn-Bx, a substituição do ácido carboxílico pelo grupo amida na Asn-Bx aumentou discretamente o valor do Φ_{FI} em relação ao determinado para Asp-Bx.

Os efeitos de grupos doares de elétrons na diminuição do Φ_{FI} das betalaínas é observado nas betaxantinas Phe-Bx, Tyr-Bx e DOPA-Bx, para as quais observa-se uma

diminuição nos valores de Φ_{Fl} determinados com o aumento no número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático dessas moléculas.

Para a maioria das betaxantinas, ou para as betaxantinas primárias, o aminoácido precursor parece não possuir um efeito muito significativo sobre a estabilidade hidrolítica desses compostos, evidenciado pelo máximo de 3 h de tempo de meia-vida obtido para essas betaxantinas. No entanto, para Cys-Bx, Pro-Bx e Pyr-Bx é possível identificar um efeito da natureza dos aminoácidos e amina precursores na estabilidade dessas betaxantinas. Cys-Bx é a betaxantina mais estável por ser uma betalaína não-imínica, o que diminui a sua susceptibilidade à hidrólise. A alta estabilidade de Pro-Bx e Pyr-Bx está relacionada a natureza secundária do aminoácido e da amina precursora. Embora essas betaxantinas não apresentem os maiores valores de rendimento quântico de fluorescência e de capacidade antioxidante, a sua alta estabilidade pode ser uma vantagem para aplicação desses compostos. A natureza hidrofóbica das cadeias laterais de Ile e Val, bem como dos aminoácidos aromáticos Trp e Tyr influencia positivamente na estabilidade.

4.6. Betaxantinas derivadas de aminoácidos como antioxidantes

Embora as betaxantinas derivadas de aminoácidos já tenham sido encontradas em diversas fontes naturais,¹⁶ e a capacidade antioxidante de algumas dessas betaxantinas já tenha sido descrita anteriormente, o estudo completo de betaxantinas derivadas de todos os aminoácidos proteínogênicos, com exceção da selenocisteína, é apresentado nesse trabalho pela primeira vez. O fato de que todos os experimentos foram realizados utilizando compostos preparados, purificados e estudados da mesma forma aumentam a confiança na comparação entre os resultados obtidos.

Apesar disso, a comparação dos resultados obtidos nesse trabalho com os resultados disponíveis na literatura permitem observar uma tendência similar entre eles, na qual, como observado nos nossos resultados, as betalaínas que não possuem grupos fenólicos apresentam uma capacidade antioxidante inferior as betalaínas com grupos fenólicos em sua estrutura. Betalaínas não-fenólicas possuem valores de TEAC_{ABTS} variando de 1,5 a 2,5, como, por exemplo, as betaxantinas Phe-Bx (TEAC_{ABTS} = 2,0 ± 0,2) e Pyr-Bx (TEAC_{ABTS} = 1,5 ± 0,2).^{8, 74} Em contrapartida, as betaxantinas Tyr-Bx (TEAC_{ABTS} 4,0 ± 0,2), DOPA-Bx (TEAC_{ABTS} = 6,5) e DA-Bx (TEAC_{ABTS} = 5,8 ± 0,2) apresentam valores mais altos, indicando a maior capacidade antioxidante desse grupo de betalaínas em meio neutro (pH 7).^{8, 74}

Os resultados obtidos nos ensaios com prolina-betaxantina (indicaxantina) concordam com dados reportados de que, embora essa betalaína seja um agente antioxidante e anti-inflamatório *in vivo* bem conhecido,^{86, 150} ela não demonstra uma capacidade antioxidante excepcional nos ensaios *in vitro*,^{75, 82} que é inclusive menor do que a reportada pra vulgaxantina I (glutamina-betaxantina).⁸² Os resultados de capacidade antioxidante inferiores para betaxantinas derivadas de aminoácidos ou aminas secundárias, como é o caso da prolina-betaxantina e da pirrolidina-betaxantina, tem sido racionalizados considerando que a presença da carga positiva no grupo imínio desses compostos diminui sua capacidade antioxidante.^{8, 82} No entanto, essa interpretação implica que betaxantinas carregadas mais negativamente devem ter propriedades antioxidantes ainda melhores e/ou que a porção imínica da prolina-betaxantina é importante para suas propriedades biológicas. O valor de TEAC_{ABTS} obtido para o ácido ascórbico (0,96 ± 0,1, pH 7) também está próximo aos valores relatados na literatura, que variam de 0,99 a 1,2.^{121, 124, 151}

Ensaio que determinam a atividade e a capacidade antioxidante *in vitro* contribuem para um entendimento geral dos mecanismos de ação antioxidante e para o estabelecimento de relações estrutura-propriedade, embora seus resultados não reflitam ou expliquem, necessariamente, a efetividade e o comportamento complexo dos antioxidantes *in vivo*.¹⁵² Qualquer ensaio antioxidante pode, em princípio, ser usado para determinar quantos radicais ou elétrons foram removidos por molécula de antioxidante (capacidade) e/ou quão rápidas (reatividade/atividade) são essas reações, desde que suas limitações sejam conhecidas e os resultados não sejam superestimados ou extrapolados para matrizes biológicas complexas sem evidências adicionais.¹⁵³

Resultados obtidos com métodos baseados em *single electron transfer* (SET) tem sido considerados como resultados que possuem baixa correlação com aqueles obtidos por métodos baseados em outros mecanismos antioxidantes, como por exemplo PCET (*proton-coupled electron transfer*). No entanto, a combinação de ensaios antioxidantes tem sido sugerida como uma forma de acessar diferentes aspectos das propriedades antioxidantes de um determinado composto redutor.^{152, 154} Assim, foi realizada uma combinação de medidas de voltametria cíclica e o método FRAP, cujos resultados estão relacionados com processos de transferência de elétrons, e o ensaio ABTS, que fornece informações sobre reduções mediadas pelos mecanismos SET/PCET, para investigar como a estrutura do aminoácido precursor afeta as propriedades antioxidantes das betaxantinas.

Foi realizada uma análise de pares moleculares combinados (*Matched Molecular Pair Analysis*, MMPA) para encontrar *cliffs* de atividade na capacidade antioxidante das betaxantinas derivadas de aminoácidos. A MMPA é uma abordagem para comparar pares de moléculas semelhantes de um conjunto de compostos e avaliar mudanças de

propriedades associadas a diferenças pontuais nas estruturas das moléculas. Ou seja, os pares combinados são pares de moléculas que diferem apenas por uma única mudança estrutural localizada. Um *cliff* de atividade é definido como um par de estruturas químicas semelhantes com propriedades muito diferentes.¹⁵⁵

A abordagem inicial utilizada para a análise foi definida considerando os valores de $E_{p,a}$ e TEAC que são estatisticamente diferentes dos determinados para a glicina-betaxantina. Comparações adicionais foram realizadas a fim de estabelecer relações estrutura-propriedade entre as betaxantinas. Foram selecionadas cinco estruturas “núcleo”, também chamadas de “*core*”, que são porções estruturais idênticas que não devem afetar os resultados das comparações entre um conjunto de betaxantinas, e foi avaliado o efeito da troca dos substituintes indicados na mudança observada no potencial de pico anódico em pH 7 ($\Delta E_{p,a}$), TEAC_{FRAP} em pH 3,6 ($\Delta TEAC_{FRAP, 3,6}$), TEAC_{ABTS} em pH 3,6 ($\Delta TEAC_{ABTS, 3,6}$), TEAC_{ABTS} em pH 7,0 ($\Delta TEAC_{ABTS, 7,0}$), e variação de TEAC_{ABTS} com o aumento do pH de 3,6 para 7,0 ($\Delta \Delta TEAC_{ABTS}$).

A substituição de H por um grupo CO₂H no α -C da porção proveniente do aminoácido tem efeitos modestos em todos os parâmetros, como inferido por meio da comparação dos pares dopamina-Bx/DOPA-betaxantina (*core* 2) e pirrolidina-betaxantina/prolina-betaxantina (*core* 4). Ainda, no caso dos dois estereoisômeros de lisina-betaxantina, as propriedades antioxidantes e redox são idênticas às da glicina-betaxantina, independente de qual grupo amino da lisina está ligado à estrutura da betaxantina.

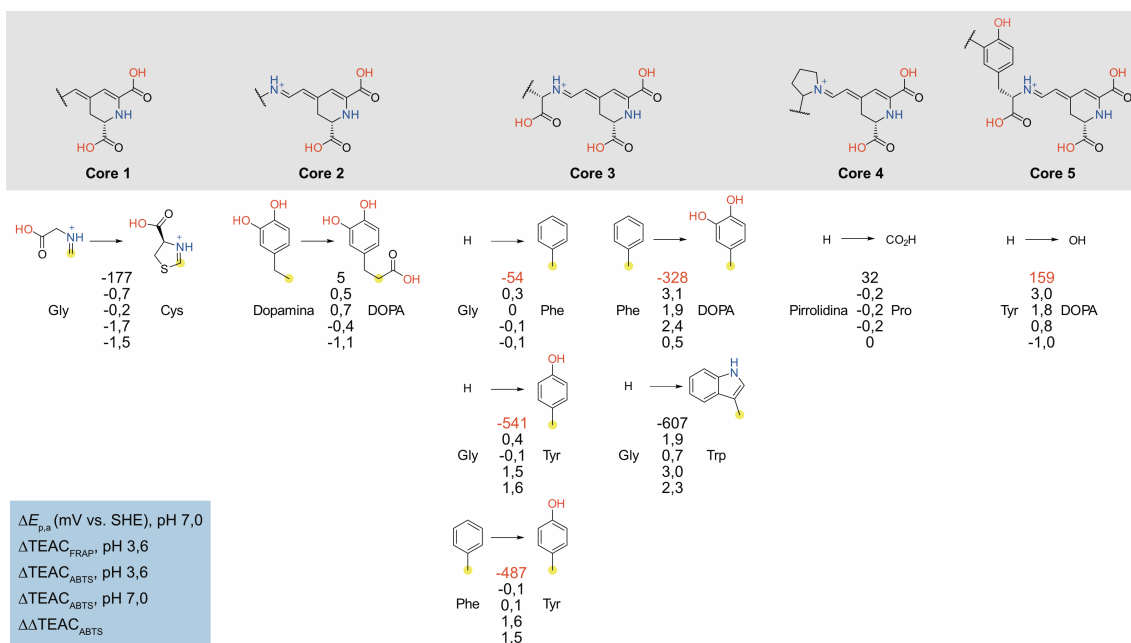


Figura 21. Análise de pares moleculares combinados com 5 núcleos (core) e apenas um ponto de troca de substituintes. Os pontos de ligações estão identificados em amarelo nos substituintes. Os números são os parâmetros experimentais indicados na legenda em azul.

O *core* 3 inclui a porção iminoácido das betaxantinas derivadas de aminoácidos primários, o que permite a avaliação dos efeitos dos grupos laterais no α -C. A troca de H por um grupo fenil (Ph) não tem efeitos no potencial de pico e na capacidade antioxidante das betaxantinas. Entretanto, quando H ou Ph são substituídos por uma porção fenol, um aumento abrupto de aproximadamente 500 mV no potencial anódico é observado, seguido de um aumento no valor de TEAC em pH 7, mas não em pH 3,6. A substituição de Ph por um grupo catecol (Phe-Bx vs. DOPA-Bx) tem um efeito muito menor no potencial de pico anódico ($\Delta E_{p,a} = -328$ mV) do que a variação observada para Ph versus fenol (Phe-Bx vs. Tyr-Bx; $\Delta E_{p,a} = -487$ mV), que concorda com o aumento de $E_{p,a}$ observado quando fenol é substituído por um grupo catecol (Tyr-Bx vs. DOPA-Bx, *core* 5; $\Delta E_{p,a} = 159$ mV). O substituinte fenol de Tyr-Bx influencia o valor de TEAC em pH 7, mas não em condições ácidas, o que sugere que a desprotonação aumenta a sua capacidade antioxidante. O maior efeito na variação de potencial de pico anódico ($\Delta E_{p,a}$

= -607 mV) é observada quando H é substituído por um grupo indol no *core* 3 (Gly-Bx vs. Trp-Bx). Essa modificação também resulta na maior variação de TEAC_{ABTS, 7,0}, e uma variação perceptível de TEAC_{FRAP, 3,6} e TEAC_{ABTS, 3,6}.

A substituição da porção glicinil pelo grupo ácido 2-tiazolinocarboxílico reduz os valores de todos os parâmetros (*core* 1), ou seja, a cisteína-betaxantina não remove radicais ABTS^{•+} e não ocorre transferência de elétrons entre essa betaxantina e o complexo Fe(TPTZ)₂(III). A baixa capacidade antioxidante da cisteína-betaxantina e a similaridade entre a sua estrutura e a da glicina-betaxantina, que difere apenas pelo grupo CH₂S que fecha o anel heterocíclico na cisteína-betaxantina, sugere que o átomo de enxofre compromete a formação de um radical estável ou de um radical cátion por meio da oxidação desse composto.

A similaridade entre os valores obtidos para as betaxantinas não-fenólicas estão de acordo com a existência de um valor intrínseco para a capacidade antioxidante das betaxantinas estudadas, que independe da porção superior da molécula, proveniente do aminoácido ou amina, e que deve estar associado com a porção betalâmica da molécula.⁸

²⁵ Valores de TEAC_{ABTS} obtidos anteriormente no grupo para L-prolina (0,3 ± 0,1) e L-DOPA (3,9 ± 0,3)¹²¹, utilizando o mesmo método empregado aqui em pH 7, confirmam que a porção betalâmica contribui para a capacidade antioxidante principalmente no caso das betalaínas não-fenólicas, em que não se observa um valor expressivo de TEAC_{ABTS} para L-prolina. No caso da DOPA-betaxantina, a maior contribuição para a capacidade antioxidante dessa betaxantina parece ser de fato proveniente do grupo catecol presente na estrutura da L-DOPA. Com relação aos demais aminoácidos precursores das betaxantinas investigadas, a maioria dos aminoácidos não possui uma boa capacidade antioxidante, sendo a cisteína, o triptofano e os aminoácidos fenólicos as exceções.¹⁵⁶⁻¹⁵⁹

No entanto, a reação dos aminoácidos com ácido betalâmico produz, na maior parte dos casos, compostos com capacidade antioxidante superior à dos aminoácidos precursores.

A capacidade antioxidante do ácido betalâmico determinada pelo ensaio ABTS em pH 7 e pelo método FRAP ($TEAC_{ABTS, 7,0} = 1,9 \pm 0,2$; $TEAC_{FRAP} = 2,0 \pm 0,1$) é similar à determinada para as betaxantinas não-fenólicas. Esse resultado indica que a capacidade antioxidante das betalaínas está relacionada ao sistema conjugado presente na porção proveniente do ácido betalâmico dessas moléculas.²⁵ Inclusive, já foi demonstrado que a porção 1,7-diazaheptametíneo é a parte estrutural principal responsável pela alta capacidade antioxidante das betalaínas, mesmo na ausência de conjugação com uma porção fenólica.^{28, 29}

O pH possui de fato um efeito sobre a capacidade antioxidante das betalaínas, como evidenciado pela diferença entre os valores de $TEAC_{ABTS}$ em pH 7 e pH 3,6, com uma diminuição de 1 a 2 unidades de $TEAC_{ABTS}$ para as betaxantinas não-fenólicas, de 3 unidades para tirosina-betaxantina, e de 4 unidades para a triptofano-betaxantina. Estudos da dependência do valor de TEAC de diferentes betalaínas com o pH em uma faixa de 3,5 a 8,5 sugerem a existência de um ponto de inflexão entre pH 5,5 e 6, que foi relacionado com a presença do sistema de ressonância eletrônica comum a todas as betalaínas, e com a desprotonação do grupo NH.⁷⁴ O efeito do pH no potencial de pico e na corrente de pico de prolina-betaxantina também sugerem a existência de um pK_a em torno de 6,¹²¹ um dado que não é facilmente racionalizado considerando os valores estimados de pK_a para as betalaínas (Tabela Anexo 8), mas que pode estar relacionado ao pK_a de 6,8 determinado para o ácido betalâmico.²⁵

De forma geral, um bom antioxidante não-enzimático de quebra de cadeia (*chain-breaking*) deve reagir rapidamente com radicais de uma maneira espontânea, e os

produtos dessa reação devem terminar ou diminuir significativamente a cadeia de radicais. Por exemplo, a oxidação de um elétron do ácido ascórbico produz o radical ascorbato que, após uma segunda oxidação de um elétron gera o ácido de-hidroascórbico, um produto estável. A oxidação de um elétron do Trolox produz um radical estabilizado por ressonância que, após uma segunda oxidação de um elétron produz uma quinona. Com isso, é aparentemente fácil explicar por que o Trolox remove dois radicais por molécula, como determinado por muitos grupos independentes, mas é difícil justificar a razão pela qual, em alguns casos, o ácido ascórbico tem uma capacidade de remoção de radicais menor do que a do Trolox, por exemplo.

Para esses compostos utilizados como padrões e outros antioxidantes que possuem grupos ácidos O–H, N–H, e/ou S–H, o aumento do pH do meio promove a desprotonação e, conseqüentemente, a oxidação tende a ocorrer de uma maneira mais espontânea, ilustrando a importância da relação entre a transferência de próton e elétron para as propriedades de remoção de radicais de moléculas orgânicas pequenas. No entanto, essa racionalização simples não se sustenta quando o número de radicais removidos por uma única molécula de antioxidante torna-se muito alta para ter um significado físico direto, o que sugere a ocorrência de processos mais complexos.

Embora os resultados apresentados demonstrem que betaxantinas que não contém grupos fenol possuem uma capacidade antioxidante inferior à das que o contém, essa pode não ser uma representação do potencial desses antioxidantes *in vivo*, visto que a biodisponibilidade das betalaínas, suas interações com outras moléculas *in vivo* e possíveis diferenças nos seus metabolismos podem ocasionar em atividades antioxidantes diferentes das observadas nos estudos *in vitro*. Como ocorre por exemplo com a prolina-betaxantina que, conforme já citado, embora não apresente uma performance expressiva

nos ensaios de capacidade antioxidante *in vitro*, é um agente antioxidante e anti-inflamatório *in vivo* bem conhecido.^{86, 150} Além da prolina-betaxantina, DOPA-betaxantina e fenilalanina-betaxantina apresentaram efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido em modelos de estudo de *C. elegans*. No entanto, apenas a DOPA-Bx apresentou valores altos relacionados a sua capacidade antioxidante tanto nos ensaios *in vitro* como nos *in vivo*. A triptofano-betaxantina, que possui capacidade antioxidante similar à da DOPA-Bx *in vitro*, não apresentou a mesma eficiência contra o estresse oxidativo no modelo *in vivo* utilizado.^{66, 83} Com isso, é importante mencionar que os ensaios *in vitro* não descartam o potencial antioxidante que as betalaínas possuem. No entanto, outros fatores importantes precisam ser levados em consideração no estudo da atividade biológica dessa classe de compostos e de seu potencial para a promoção de benefícios a saúde.

5. CONCLUSÕES

A obtenção de todas as betaxantinas derivadas de aminoácidos proteínogênicos, com exceção da selenocisteína, permitiu a caracterização das propriedades de absorção e fluorescência desses compostos, além da elucidação da estrutura dos dois isômeros derivados de L-lisina e da descoberta da betalaína não-imínica cisteína-betaxantina. Embora a natureza do aminoácido tenha apenas efeitos discretos sobre essas propriedades das betaxantinas derivadas de aminoácidos com estrutura 1,7-diaza-heptamética, a histidina-betaxantina possui um valor de brilho ca. de 35 vezes maior que a triptofano-betaxantina, que é a betaxantina menos brilhante. Aminoácido e amina secundários aumentam consideravelmente a estabilidade das betaxantinas, mas apresentam menores Φ_{FIS} . O fato da reação de aminoácidos com ácido betalâmico produz betaxantinas cuja capacidade antioxidante é muito superior do que aquela dos precursores pode representar uma vantagem evolutiva para organismos submetidos a estresse oxidativo. Esse efeito é observado para todas as betaxantinas reportadas aqui, com exceção da cisteína-betaxantina, que tem capacidade antioxidante é muito baixa e, até o momento, nunca foi encontrada *in vivo*. A presença de cadeias laterais ionizáveis que contém grupos catecol (O–H) ou substituintes indol (N–H) aumentam a capacidade antioxidante de betaxantinas, favorecendo sua oxidação em múltiplos centros. A triptofano-betaxantina não brilha possivelmente pela ocorrência de transferência de elétron fotoinduzida, hipótese que é corroborada pelo fato desta betaxantina ser um eficiente redutor *in vitro*. As propriedades *in vivo* desta betaxantina ainda não foram amplamente investigadas.^{160, 161} Os resultados apresentados aqui representam um entendimento aprofundado das características gerais das betaxantinas naturais mais comuns em organismos vivos e poderão contribuir para a

racionalização do papel das betaxantinas em organismos vivos e para estabelecer as bases para o desenho racional de derivados bioinspirados funcionais.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados nesse trabalho foram adquiridos em alto grau de pureza da Sigma-Aldrich (exceto quando indicado) e foram usados sem tratamento prévio. Acetato de etila (Merck, P.A.), acetonitrila (Tedia, Grau HPLC), ácido acético ($\geq 99\%$), ácido ascórbico ($\geq 98\%$), L-ácido aspártico ($\geq 98\%$), ácido bórico ($\geq 99,5\%$), ácido clorídrico (Vetec), ácido fórmico (Merck, 98–100%), ácido fosfórico, L-ácido glutâmico ($\geq 99\%$), ácido 6-hidróxi-2,5,7,8 tetrametilcromano-2 carboxílico (Trolox, 97%), L-alanina ($\geq 98\%$), L-arginina ($\geq 98\%$), L-asparagina ($\geq 98\%$), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) de amônio (ABTS, $\geq 98\%$), L-cisteína (97%), cloreto de potássio ($\geq 99\%$), cloreto de ferro III (97%), dopamina, etanol (Merck, P.A.), L-fenilalanina ($\geq 98\%$), fosfato de sódio monobásico ($\geq 99,5\%$), L-glicina ($\geq 99\%$), hidróxido de amônio (Merck), hidróxido de sódio ($\geq 98\%$), L-histidina ($\geq 99\%$), L-isoleucina ($\geq 98\%$), L-DOPA ($\geq 98\%$), L-leucina ($\geq 98\%$), L-lisina ($\geq 98\%$), metanol (Synth, P.A.), L-metionina ($\geq 98\%$), persulfato de potássio ($\geq 99\%$), pirrolidina (99%), L-prolina ($\geq 99\%$), Sephadex LH-20 (G.E.), L-serina ($\geq 99\%$), sulfato de ferro II ($\geq 99\%$), L-tirosina ($\geq 98\%$), L-treonina ($\geq 98\%$), 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina ($\geq 99\%$), L-triptofano ($\geq 98\%$) e L-valina ($\geq 98\%$).

6.2. Soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas em água deionizada com resistividade em temperatura ambiente $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

6.2.1. Gerais

Solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH 1 mol L⁻¹): 4 g de NaOH foram dissolvidas em 100 mL de água em um balão volumétrico.

Solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH, 0,2 mol L⁻¹): 0,8 g de NaOH foram dissolvidas em 100 mL de água em um balão volumétrico.

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

Solução aquosa de ácido clorídrico (HCl 40 mmol L⁻¹): 4 mL de uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ foram diluídos em 100 mL de água em um balão volumétrico.

Solução aquosa de cloreto de potássio (KCl, 0,1 mol L⁻¹): 0,373 g do sal foi dissolvido em 50 mL de água em um balão volumétrico.

Tampão fosfato (100 mmol L⁻¹, pH 7): 2,4 g de NaH₂PO₄ foram dissolvidos em 180 mL de água. O pH foi ajustado para 7 com NaOH 1 mol L⁻¹, e o volume foi completado com água para 200 mL em um balão volumétrico.

Tampão acetato (300 mmol L⁻¹, pH 3,6): 3,4 mL de ácido acético foram diluídos em 150 mL de água. O pH foi ajustado para 3,6 com NaOH 1 mol L⁻¹, e o volume foi completado com água para 200 mL em um balão volumétrico.

Tampão Britton-Robinson (acetato-fosfato-borato, tpBR, 40 mmol L⁻¹, vários pHs): H₃BO₃ (0,247 g), CH₃COOH (229 µL) e H₃PO₄ (274 µL) foram todos dissolvidos ou diluídos em água (100 mL) em um balão volumétrico. Uma solução de NaOH (0,2 mol L⁻¹) foi gotejada ajustando-se o pH para 7, 9,5 e 10 e 10,5. O pH de soluções tamponadas com tpBR foi aferido antes e depois do uso com um pHmetro.

Solução aquosa de ácido ascórbico (AscH, 0,1 mmol L⁻¹): 1,76 mg de ácido ascórbico foi dissolvido em 100 mL de água em um balão volumétrico.

Solução de ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox, 0,1 mmol L⁻¹): 1,25 mg de trolox foi dissolvido em 50 mL de etanol (EtOH) em um balão volumétrico.

Solução aquosa de sulfato de ferro II (FeSO₄·7H₂O, 0,1 mmol L⁻¹): 1,40 mg do sal foi dissolvido em 50 mL de água em um balão volumétrico.

6.2.2. Análise cromatográfica

As soluções foram preparadas imediatamente antes das análises cromatográficas:

Solvente A (água/HCO₂H; 0,05% v/v): 125 µL de ácido fórmico foram diluídos em água deionizada para um volume final de 250 mL.

Solvente B (MeCN/HCO₂H; 0,05% v/v): 125 µL de ácido fórmico foram diluídos em acetonitrila para um volume final de 250 mL.

6.2.3. Ensaio ABTS

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) de amônio (ABTS, 7 mmol L⁻¹): 0,192 g do sal foi dissolvido em 50 mL de água em um balão volumétrico. A solução foi mantida a 5 °C, protegida da luz e sem agitação por até uma semana.

Solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈, 140 mmol L⁻¹): 0,378 g do sal foi dissolvido em 10 mL de água em um balão volumétrico. A solução foi mantida em temperatura ambiente e protegida da luz, por no máximo um mês.

Solução-estoque de ABTS^{•+}: à 5 mL da solução de ABTS (7 mmol L⁻¹), adicionaram-se 88 µL da solução de K₂S₂O₈ (140 mmol L⁻¹), para uma concentração final de K₂S₂O₈ de

$2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (1/3 da concentração de ABTS). A mistura azulada foi mantida protegida da luz e em temperatura ambiente por 16 h até seu uso.

6.2.4. Método FRAP

Solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, 10 mmol L^{-1}) em 40 mmol L^{-1} de HCl:
0,0156 g de TPTZ foi dissolvido em 10 mL de solução aquosa de HCl 40 mmol L^{-1} em um balão volumétrico de 5 mL.

Solução aquosa de cloreto de ferro III ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mmol L^{-1}): 0,0162 g do sal foi dissolvido em 5 mL de água em um balão volumétrico.

Reagente de trabalho FRAP: foi preparada uma solução contendo 25 mL de tampão acetato 300 mmol L^{-1} pH 3,6, 2,5 mL de solução de TPTZ 40 mmol L^{-1} e 2,5 mL de solução de cloreto de ferro III 20 mmol L^{-1} . O reagente de trabalho foi preparado no momento do experimento e mantido a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo o experimento.

6.3. Semissínteses e purificações

6.3.1. Obtenção de ácido betalâmico em acetato de etila

Suco de beterraba (500 mL) em um béquer (1 L) munido de agitação mecânica foi refrigerado ($\sim 10 \text{ }^\circ\text{C}$) e o pH do meio foi levado a 11,4 com a adição de NH_4OH 30% (70 a 90 mL). A reação foi mantida sob agitação até que a solução atingisse uma coloração esverdeada com filme amarelo brilhante, característico do ácido betalâmico (cerca de 60 min). A solução foi então resfriada a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ e, em seguida, o pH foi levado a um valor entre 1,5 e 2 com a adição de $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 37% v/v (ca. 100 mL). Em seguida, a agitação foi interrompida e a plataforma elevatória foi abaixada. A solução foi transferida para um funil de separação de 1,0 L e foram adicionados 50 mL de acetato de etila (10% do volume inicial de suco). O funil foi agitado com movimento precessional e foi observado um

pequeno volume na fase superior. A fase inferior (aquosa) foi reservada para segunda extração e cerca de 90 mL restantes (contendo a fase orgânica) foram transferidos, vertendo pela boca de cima do funil, para tubos *falcon* de 50 mL e centrifugados a 5000 xg durante 2 minutos. A fase orgânica amarela foi separada com o auxílio de uma pipeta *pasteur*. O procedimento de extração foi repetido com a fase aquosa separada anteriormente para a segunda extração. O ácido betalâmico obtido com as duas extrações foi reunido e congelado em um banho de CO₂(s)/EtOH. Ocorre a formação de uma suspensão que foi filtrada rapidamente a vácuo, com o auxílio de um funil de *Büchner*, para eliminar a água e o sal em suspensão.

6.3.2. Extração de ácido betalâmico para a fase aquosa

O volume de ácido betalâmico em acetato de etila (50 mL; 4×10^{-4} mol L⁻¹) foi reduzido em baixa pressão para 1/3 de seu volume inicial (\approx 15 mL) e em seguida foi extraído para água com pH previamente ajustado para 11 com hidróxido de amônio, em uma razão de volume 1:1 de HBt e água. O funil de separação foi agitado com movimentos leves para evitar emulsificação e, após a separação entre as fases, a fase inferior foi coletada em tubos *falcon* e centrifugada para garantir uma melhor separação da fase orgânica (7500 xg, 5 min). A fase superior contendo acetato de etila foi retirada com o auxílio de uma pipeta *pasteur* e foi borbulhado N₂ na solução aquosa de HBt para retirar traços restantes de acetato de etila, até que a solução ficasse límpida. A solução aquosa de HBt obtida possui pH em torno de 7.

6.3.3. Semissíntese de betaxantinas primárias não-fenólicas

As betaxantinas primárias não-fenólicas foram formadas a partir do acoplamento de ácido betalâmico com os aminoácidos: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico,

glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina. Após a etapa de extração do HBt para a solução aquosa, o pH da solução foi ajustado para 11 com NH_4OH e foram adicionados **100 equiv.** de aminoácido ao HBt. A reação foi mantida a 25 °C, sob agitação, e a formação da betaxantina foi acompanhada por UV-Vis, pelo desaparecimento da banda de HBt ($\lambda^{\text{Abs}} = 430 \text{ nm}$), e formação da banda da betaxantina, em $\lambda^{\text{Abs}} = 480 \pm 5 \text{ nm}$, por um período que variou de **12h até 48h**. Após esse período, o pH da reação foi ajustado para 5 com HCl concentrado, em banho de gelo (0 °C), borbulhando N_2 . A reação foi mantida a temperatura ambiente sob agitação por cerca de 30 min, e foi finalmente congelada e liofilizada para a etapa de purificação.

6.3.4. Semissíntese de Pro-Bx e Pyr-Bx

Pro-Bx e Pyr-Bx foram obtidas a partir do acoplamento entre ácido betalâmico e prolina ou pirrolidina, respectivamente. Após a etapa de extração do HBt para a solução aquosa, o pH da solução foi ajustado para 11 com NH_4OH e foram adicionados **10 equiv.** de aminoácido ou amina ao HBt. A reação foi mantida a 25 °C, sob agitação, e a formação da betaxantina foi acompanhada por UV-Vis, pelo desaparecimento da banda de HBt ($\lambda^{\text{Abs}} = 430 \text{ nm}$), e formação da banda da betaxantina, em $\lambda^{\text{Abs}} = 480 \pm 5 \text{ nm}$, por um período de **30 min**. Após esse período, o pH da reação foi ajustado para 5 com HCl concentrado, em banho de gelo (0 °C), borbulhando N_2 . A reação foi mantida a temperatura ambiente sob agitação por cerca de 30 min, e foi finalmente congelada e liofilizada para a etapa de purificação.

6.3.5. Semissíntese de DA-Bx, DOPA-Bx e Tyr-Bx

DA-Bx, DOPA-Bx e Tyr-Bx foram obtidas a partir do acoplamento entre ácido betalâmico e dopamina, L-DOPA ou tirosina, respectivamente. Após a etapa de extração do HBt para a solução aquosa, foi adicionado 26,5 mg de ácido ascórbico à solução aquosa de HBt (15 mL) para uma concentração final de ácido ascórbico de 10 mmol L⁻¹. O pH da solução foi ajustado para 11 com NH₄OH e foram adicionados **100 equiv.** de aminoácido ou amina ao HBt. A reação foi mantida a 25 °C, sob agitação, e a formação da betaxantina foi acompanhada por UV-Vis, pelo desaparecimento da banda de HBt ($\lambda^{\text{Abs}} = 430 \text{ nm}$), e formação da banda da betaxantina, em $\lambda^{\text{Abs}} = 480 \pm 5 \text{ nm}$, por um período que variou de **12h até 48h**. Após esse período, o pH da reação foi ajustado para 5 com HCl concentrado, em banho de gelo (0 °C), borbulhando N₂. A reação foi mantida a temperatura ambiente sob agitação por cerca de 30 min, e foi finalmente congelada e liofilizada para a etapa de purificação.

6.3.6. Semissíntese de Cys-Bx

Cys-Bx foi obtida a partir do acoplamento entre ácido betalâmico e cisteína. Após a etapa de extração do HBt para a solução aquosa, o pH da solução foi ajustado para 11 com NH₄OH e foram adicionados **100 equiv.** de cisteína ao HBt. A reação foi mantida a 25 °C, sob agitação, por 1h. Após esse período, o pH da reação foi ajustado para 5, com HCl concentrado, em banho de gelo (0 °C), borbulhando N₂. Após o ajuste do pH, a reação foi mantida a 25 °C por 24h, até a formação completa de Cys-Bx. A formação foi acompanhada por UV-Vis, pelo desaparecimento da banda de HBt ($\lambda^{\text{Abs}} = 430 \text{ nm}$), e formação da banda de Cys-Bx, em $\lambda^{\text{Abs}} = 495 \text{ nm}$. Após esse período, a solução da betalaína formada foi finalmente congelada e liofilizada para a etapa de purificação.

6.3.7. Purificação

A purificação foi realizada da mesma maneira para todas as betalaínas, em três etapas, com exceção da Pyr-Bx, cujo método de purificação possui apenas uma etapa, e está apresentado separadamente. Na primeira etapa, a betaxantina liofilizada foi solubilizada em água (no máximo 5 mL) e foi realizada uma filtração em coluna de SiO₂-C18, utilizando-se água como eluente, para retirar o excesso de sal formado na reação. Toda fração amarela, contendo betaxantina, foi coletada, liofilizada e armazenada a -20 °C. Em seguida, para a purificação, empregou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa de fase reversa (Shimadzu, Supelco Ascentis C18 25 cm × 1 cm, 5 μm). Os solventes empregados foram água/HCO₂H (0,05% v/v; **solvente A**) e MeCN/HCO₂H (0,05% v/v; **solvente B**), em um fluxo de 2 mL min⁻¹. A corrida foi acompanhada por detecção espectrofotométrica com grade de diodo em 254 nm e 480 nm. As frações contendo betaxantina foram coletadas, reunidas e o pH foi ajustado para 5 com 0,1 mol L⁻¹ NH₄OH. A solução foi então liofilizada e o sólido resultante armazenado a -20 °C no escuro. Os métodos cromatográficos utilizados para cada betaxantina estão indicados na Tabela 6. Na terceira e última etapa, a betaxantina foi novamente solubilizada em água e purificada por cromatografia de coluna, com Sephadex LH-20 como fase estacionária, e água como eluente. As frações coletadas foram analisadas por UV-Vis, e as semelhantes foram reunidas e liofilizadas novamente, para concentrar ou para armazenar (a -20 °C), se não forem utilizadas no mesmo dia.

Para a Pyr-Bx, a purificação foi realizada por cromatografia de coluna, utilizando C18 como fase estacionária e água como eluente. As frações coletadas foram analisadas por espectroscopia de UV-Vis e as frações contendo espectros semelhantes foram reunidas. A solução resultante foi liofilizada e armazenada a -20 °C, protegida da luz.

Tabela 6. Métodos cromatográficos utilizados na purificação de betaxantinas por HPLC em escala semi-preparativa.

Betaxantinas	Método cromatográfico
Asn-Bx	2% B em 30 min
Arg-Bx, DA-Bx, DOPA-Bx, Pro-Bx, Tyr-Bx	10% B em 30 min
His-Bx	2 – 15% B em 30 min
Ala-Bx, Asp-Bx, Gln-Bx, Glu-Bx, Gly-Bx, Ile-Bx, Leu-Bx, Lys-Bx, Met-Bx, Ser-Bx, Thr-Bx, Val-Bx	2 – 30% B em 30 min
Phe-Bx, Tyr-Bx	10 – 60% B em 30 min
Cys-Bx	0 – 7 min: 2% 7 – 15 min: 2 – 5% 15 – 30 min: 5 – 10%

6.4. Métodos de caracterização

6.4.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises de RMN de ^1H e COSY foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP, em um espectrômetro Bruker Avance III 500, operando a 500 MHz, equipado com uma sonda de tripla ressonância (TXI) de 5mm com detecção inversa. As análises de Pyr-Bx foram realizadas em um espectrômetro Bruker Avance III 800 acoplado a criosonda (TCI) com 4 canais. As amostras de betalaínas foram solubilizadas em D_2O , imediatamente antes da aquisição dos espectros, com concentração de cerca de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$. A sequência de pulso zgpr foi utilizada para suprimir o sinal residual da água. Os deslocamentos químicos (δ) estão representados em unidades de partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do ácido trimetilsililpropanóico (TSP; δ 0,00). Todos os espectros foram processados utilizando-se o software MestReNova (v. 11.0.4, 2017, Mestrelab Research S.L.).

6.4.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

As análises de HPLC-MS foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP em um cromatógrafo líquido Prominence LC-20AD (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução q-ToF maxis 3G Bruker Daltonics operando em modo positivo e a um detector Prominence SPD-M20A (Shimadzu). Para separação foi utilizada uma coluna de fase reversa (Luna C18, 250 x 4,6 mm, 5 μm ; Phenomenex®), um gradiente linear de 5 – 65% de B em 20 min, e os solventes água/HCO₂H (0,05% v/v; **solvente A**) e MeCN/HCO₂H (0,05% v/v; **solvente B**), com fluxo de 1 mL min⁻¹.

6.4.3. Espectroscopia de absorção, emissão e excitação

Os espectros de absorção foram adquiridos em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio equipado com um banho termostático *Peltier*. Os espectros de emissão foram adquiridos em um espectrofluorímetro Edinburgh FL980. Todas as medidas foram realizadas em água, a 25 ± 1 °C, em cubetas de quartzo de caminho óptico de 10 mm, com as seguintes configurações de absorção: 300–800 nm, *scan rate*: 4800 nm min⁻¹; emissão (Em): 450–700 nm, comprimento de onda de excitação de $\lambda^{\text{Ex}} = 430$ nm, com fendas de excitação e emissão de 10 nm.

6.4.4. Coeficiente de absorção molar (ϵ)

O coeficiente de absorção molar foi determinado usando um método de ponto final, baseado na hidrólise de betanina⁸. A hidrólise alcalina de betaxantinas em tampão Britton-Robinson, pH 9,5 (25 °C), foi monitorada por espectrofotometria UV-Vis, durante 4 a 6 horas, em intervalos de 10 min. A formação de ácido betalâmico foi monitorada em $\lambda^{\text{Abs}} = 424$ nm ($\epsilon^{424 \text{ nm}} = 26.500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^{65, 121} e usada para determinar a concentração

inicial de cada betalaína, considerando uma estequiometria de 1:1. O ácido betalâmico não é degradado durante o experimento. A mudança na absorção em função do tempo em $\lambda^{\text{Abs}} = 424 \text{ nm}$ foi ajustada com uma função monoexponencial para determinar o valor máximo de absorção de ácido betalâmico ($A^{424\text{nm}}_{\text{HBt},\infty}$). A absorção da amostra no comprimento de onda máximo de absorção ($A^{\lambda_{\text{bet},0}}$) foi adquirida em pH 7 para evitar mudanças na concentração devido à hidrólise. O coeficiente de absorção da amostra no comprimento de onda máximo de absorção ($\epsilon^{\lambda_{\text{bet}}}$) foi calculado de acordo com a Eq. 9:

$$\epsilon_{\text{bet}}^{\lambda} = \epsilon_{\text{HBt}}^{424 \text{ nm}} \frac{A_{\text{bet},0}^{\lambda}}{A_{\text{HBt},\infty}^{424 \text{ nm}}} \quad \text{Eq. 9}$$

6.4.5. Rendimento quântico de fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_{Fl}) foi determinado por um método indireto, por comparação com padrões secundários. Foi realizado em água, e utilizou-se fluoresceína (solução de fluoresceína em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}_{(\text{aq})}$; $n_{\text{D}} = 1,3325$; $\Phi_{\text{Fl}} = 0,95$)¹²² como padrão de fluorescência secundário¹⁶², para determinação do Φ_{Fl} de todas as betaxantinas. Espectros de absorção e emissão do padrão e de todas as betaxantinas foram adquiridos nas mesmas condições experimentais em cubetas de quartzo de 1,5 mL com caminho óptico de 10 mm, em cinco concentrações diferentes. As soluções foram diluídas de forma que a absorção da amostra fosse inferior a 0,1. Os espectros de emissão foram obtidos em condições espectrofotométricas idênticas: comprimento de onda de excitação (λ^{Ex}): 430 nm, emissão (Em) de 460 a 800 nm, fendas de Ex e Em: 20 nm, tensão da fotomultiplicadora: 600 V, a $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Um gráfico que correlaciona a área de emissão com o valor da absorção do composto no comprimento de onda de excitação ($\lambda^{\text{Ex}} = 430 \text{ nm}$) foi construído para cada betalaína, e o coeficiente angular da reta traçada foi correlacionado com o padrão. Assim, o Φ_{Fl} foi calculado de acordo com a Eq. 10:

$$\Phi_{Fl} = \Phi_{Fl}^r \frac{\alpha}{\alpha^r} \left(\frac{n_D}{n_D^r} \right)^2 \quad \text{Eq. 10}$$

na qual α é o coeficiente angular do ajuste linear do gráfico de área sob a curva de emissão vs. a absorção em 430 nm, n_D é o índice de refração do solvente, e o sobrescrito r se refere aos valores do padrão de referência de fluorescência.

6.5. Determinação da estabilidade em solução aquosa

A decomposição das betalaínas em tampão fosfato (pH 7, 100 mmol L⁻¹) foi monitorada a 50 °C em um espectrofotômetro de absorção Varian Cary 50 Bio, com um porta-cubetas para 18 cubetas, acoplado a um banho termostático Lauda. Os espectros de absorção (200 a 800 nm) foram obtidos em intervalos de tempo de 10 min por um período de 6 horas.

6.6. Ensaio ABTS

A capacidade antiradicalar foi determinada pelo ensaio ABTS, utilizando o protocolo desenvolvido por Re e coautores.¹²⁴ Uma solução estoque de ABTS^{•+}/ABTS foi preparada em água via oxidação parcial de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) de amônio, 7 mmol L⁻¹) por persulfato de potássio (2,45 mmol L⁻¹) no escuro, a temperatura ambiente por 16h. A solução estoque de ABTS^{•+}/ABTS foi diluída em tampão fosfato (pH 7, 0,1 mol L⁻¹) ou tampão acetato (pH 3,6, 0,3 mol L⁻¹) até um valor de absorção em torno de 0,7 (46,7 μmol L⁻¹ ABTS^{•+}) em 734 nm. Após adição do antioxidante, foi acompanhada a variação da absorção de ABTS^{•+} em 734 nm por 6 min (ΔAbs), a 25 °C. O coeficiente angular (α) da correlação linear entre ΔA e a concentração de antioxidante é uma medida da capacidade antioxidante. Conseqüentemente, a razão $\alpha_{\text{amostra}}/\alpha_{\text{Trolox}}$ é a capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC_{ABTS}), que é usado como antioxidante de referência.

6.7. Método FRAP

O ensaio FRAP foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido por Benzie e Strain.¹⁶³ A solução de trabalho FRAP foi preparada pela adição de 2,5 mL de solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina, 10 mmol L⁻¹, em 40 mmol L⁻¹ HCl) e 2,5 mL de solução de FeCl₃·6H₂O (20 mmol L⁻¹) em 25 mL de tampão acetato (pH 3,6, 0,3 mol L⁻¹), para um volume final de 30 mL de solução de trabalho FRAP. Soluções aquosas de concentração conhecida de FeSO₄·7H₂O entre 5 – 100 μmol L⁻¹ foram utilizadas para a obtenção de uma curva de calibração. A redução do complexo tripiridil-triazina-férrico (Fe(TPTZ)₂(III)) para sua forma ferrosa (Fe(TPTZ)₂(II)) após a adição de antioxidante foi monitorada pela mudança na absorção em 593 nm por 30 min (ΔAbs). O coeficiente angular (α) da correlação linear entre ΔAbs e a concentração de antioxidante foi obtido. A capacidade antioxidante foi calculada como a razão entre o valor de α da amostra e da curva de calibração de FeSO₄, $\alpha_{\text{Amostra}}/\alpha_{\text{FeSO}_4}$, para obtenção do valor FRAP, em relação à reação com FeSO₄, e do antioxidante de referência Trolox (1 – 5 μmol L⁻¹), $\alpha_{\text{Amostra}}/\alpha_{\text{Trolox}}$, para obtenção dos valores de capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox, TEAC_{FRAP}.

6.8. Voltametria cíclica

O experimento de voltametria cíclica foi conduzido empregando-se um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT101 (Metrohm), utilizando o software NOVA. As medidas foram realizadas utilizando-se um eletrodo impresso (Metrohm; DropSens DRP-110; 6.1208.110), composto por um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono, contra-eletrodo de carbono e eletrodo de referência de prata. A velocidade de varredura foi fixada em 50 mV s⁻¹ e o potencial foi varrido de -1 V a +1 V, em janela aberta, seguida de varredura em janela fechada, entre 0,4 e 1,0 V, com 4

ciclos de varredura. As soluções aquosas de betalaínas foram preparadas em KCl 0,1 mol L⁻¹, também utilizado como solução controle nos ensaios, em uma concentração fixa de 1,0 mmol L⁻¹.

7. REFERÊNCIAS

1. Tyburski, R.; Liu, T.; Glover, S. D.; Hammarström, L., Proton-Coupled Electron Transfer Guidelines, Fair and Square. *J. Am. Chem. Soc.* 2021, 143 (2), 560-576.
2. Lagorio, M. G.; Cordon, G. B.; Iriel, A., Reviewing the relevance of fluorescence in biological systems. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015.
3. Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta* 2005, 222 (4), 586-593.
4. Iriel, A.; Lagorio, M., Is the flower fluorescence relevant in biocommunication? *Naturwissenschaften* 2010, 97 (10), 915-924.
5. Gandia-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J., Floral fluorescence effect. *Nature* 2005, 437 (7057), 334-334.
6. Gandia-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J., A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins. *J. Chromatogr., A* 2005, 1078 (1-2), 83-89.
7. Gandia-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J., Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem. Anal.* 2006, 17 (4), 262-269.
8. Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* 2010, 232 (2), 449-460.
9. Lavis, L. D.; Raines, R. T., Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chemical Biology* 2008, 3 (3), 142-155.
10. Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A., *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books: Sausalito, 2006; p 1099.

11. Lakowicz, J. R., Principles of fluorescence spectroscopy. Springer: Singapore, 2006.
12. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U., Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nat Protoc* 2013, 8 (8), 1535-1550.
13. Fery-Forgues, S.; Lavabre, D., Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationary products. *J. Chem. Educ.* 1999, 76 (9), 1260-1264.
14. Quina, F. H.; Bastos, E. L., Chemistry Inspired by the Colors of Fruits, Flowers and Wine. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2018, 90 (1 Suppl 1), 681-695.
15. Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F., Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci.* 2013, 18 (6), 334-343.
16. Khan, M. I.; Giridhar, P., Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochem.* 2015, 117, 267-295.
17. Stintzing, F.; Schliemann, W., Pigments of fly agaric (*Amanita muscaria*). *Z Naturforsch C* 2007, 62 (11-12), 779-85.
18. Contreras-Llano, L. E.; Guerrero-Rubio, M. A.; Lozada-Ramirez, J. D.; Garcia-Carmona, F.; Gandia-Herrero, F., First Betalain-Producing Bacteria Break the Exclusive Presence of the Pigments in the Plant Kingdom. *Mbio* 2019, 10 (2).
19. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.* 2006, 71 (4), R41-R50.
20. Kugler, F.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387 (2), 637-648.

21. Piattelli, M.; Minale, L.; Prota, G., Pigments of centrospermae-III. Betaxanthins from *Beta vulgaris* L. *Phytochem.* 1965, 4, 121-125.
22. Piattelli, M.; Minale, L.; Prota, G., Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron* 1964, 20 (10), 2325-2329.
23. Escribano, J.; Pedreño, M.; Garcia-Carmona, F.; Muñoz, R., Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochem. Anal.* 1998, 9 (3), 124-127.
24. Bastos, E. L.; Schliemann, W., Betalains as Antioxidants. In *Plant Antioxidants and Health*, Ekiert, H. M.; Ramawat, K. G.; Arora, J., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 1-44.
25. Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., Purification and Antiradical Properties of the Structural Unit of Betalains. *J. Nat. Prod.* 2012, 75 (6), 1030-1036.
26. Timoneda, A.; Feng, T.; Sheehan, H.; Walker-Hale, N.; Pucker, B.; Lopez-Nieves, S.; Guo, R.; Brockington, S., The evolution of betalain biosynthesis in Caryophyllales. *New Phytol.* 2019, 224 (1), 71-85.
27. Pioli, R. M.; Mattioli, R. R.; Esteves, L. C.; Dochev, S.; Bastos, E. L., Comparison of the effect of N-methyl and N-aryl groups on the hydrolytic stability and electronic properties of betalain dyes. *Dyes Pigm.* 2020, 183.
28. Goncalves, L. C. P.; Lopes, N. B.; Augusto, F. A.; Pioli, R. M.; Machado, C. O.; Freitas-Dorr, B. C.; Suffredini, H. B.; Bastos, E. L., Phenolic betalain as antioxidants: meta means more. *Pure Appl. Chem.* 2020, 92 (2), 243-253.
29. Nakashima, K. K.; Bastos, E. L., Rationale on the High Radical Scavenging Capacity of Betalains. *Antioxidants-Basel* 2019, 8 (7).

30. 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.
31. Trezzini, G. F.; Zryd, J. P., Two betalains from *Portulaca grandiflora*. *Phytochem.* 1991, 30 (6), 1897-9.
32. Piattelli, M.; Minale, L.; Nicolaus, R. A., Pigments of centrospermae-V. Betaxanthins from *Mirabilis jalapa* L. *Phytochem.* 1965, 4, 817-823.
33. Savolainen, K.; Kuusi, T., Stability Properties of Golden Beet and Red Beet Pigments - Influence of pH, Temperature, and Some Stabilizers. *Z Lebensm Unters For* 1978, 166 (1), 19-22.
34. Strack, D.; Reznik, H., High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Beta-Xanthins in Centrospermae (Caryophyllales). *Z Pflanzenphysiol* 1979, 94 (2), 163-167.
35. Schliemann, W.; Cai, Y.; Degenkolb, T.; Schmidt, J.; Corke, H., Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochem.* 2001, 58 (1), 159-65.
36. Stintzing, F. C.; Schieber, A.; Carle, R., Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50 (8), 2302-7.
37. Kugler, F.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp *cicla* L. Alef. Cv. Bright lights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52 (10), 2975-2981.

38. Stintzing, F. C.; Herbach, K. M.; Mosshammer, M. R.; Carle, R.; Yi, W. G.; Sellappan, S.; Akoh, C. C.; Bunch, R.; Felker, P., Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 (2), 442-451.
39. Kugler, F.; Graneis, S.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Studies on betaxanthin profiles of vegetables and fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 2007, 62 (5-6), 311-318.
40. Wyler, H.; Dreiding, A. S., Deuterierung von Betanidin und Indicaxanthin. (E/Z)-Stereoisomerie in Betalainen. *Helv. Chim. Acta* 1984, 67 (7), 1793-1800.
41. Xie, G.-R.; Chen, H.-J., Comprehensive Betalain Profiling of Djulis (*Chenopodium formosanum*) Cultivars Using HPLC-Q-Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69 (51), 15699-15715.
42. Stintzing, F. C.; Kugler, F.; Carle, R.; Conrad, J., First C-13-NMR assignments of betaxanthins. *Helv. Chim. Acta* 2006, 89 (5), 1008-1016.
43. Schliemann, W.; Kobayashi, N.; Strack, D., The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol.* 1999, 119 (4), 1217-1232.
44. Impellizzeri, G.; Piattelli, M.; Sciuto, S., A new betaxanthin from *Glottiphyllum longum*. *Phytochem.* 1973, 12, 2293-2294.
45. Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiol.* 2005, 138 (1), 421-432.
46. Musso, H., The pigments of fly agaric, *Amanita muscaria*. *Tetrahedron* 1979, 35, 2843-2853.

47. Trezzini, G. F.; Zryd, J. P., Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. *Phytochem.* 1991, 30 (6), 1901-3.
48. Hempel, J.; Bohm, H., Betaxanthin pattern of hairy roots from *Beta vulgaris* var *lutea* and its alteration by feeding of amino acids. *Phytochem.* 1997, 44 (5), 847-852.
49. Preczenhak, A. P.; Orsi, B.; Lima, G. P. P.; Tezotto-Uliana, J. V.; Minatel, I. O.; Kluge, R. A., Cysteine enhances the content of betalains and polyphenols in fresh-cut red beet. *Food Chem* 2019, 286, 600-607.
50. Sekiguchi, H.; Ozeki, Y.; Sasaki, N., In Vitro Synthesis of Betaxanthins Using Recombinant DOPA 4,5-Dioxygenase and Evaluation of Their Radical-Scavenging Activities. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58 (23), 12504-12509.
51. Kusznierewicz, B.; Mróz, M.; Koss-Mikołajczyk, I.; Namieśnik, J., Comparative evaluation of different methods for determining phytochemicals and antioxidant activity in products containing betalains – Verification of beetroot samples. *Food Chem.* 2021, 362, 130132.
52. Amaya-Cruz, D. M.; Perez-Ramirez, I. F.; Delgado-Garcia, J.; Mondragon-Jacobo, C.; Dector-Espinoza, A.; Reynoso-Camacho, R., An integral profile of bioactive compounds and functional properties of prickly pear (*Opuntia ficus indica* L.) peel with different tonalities. *Food Chem.* 2019, 278, 568-578.
53. Svenson, J.; Smallfield, B. M.; Joyce, N. I.; Sansom, C. E.; Perry, N. B., Betalains in red and yellow varieties of the Andean tuber crop Ulluco (*Ullucus tuberosus*). *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (17), 7730-7737.
54. Khan, M. I.; Harsha, P. S. C. S.; Giridhar, P.; Ravishankar, G. A., Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and in vitro cancer cell cytotoxicity of

Rivina humilis L. berries, potential source of betalains. *Lwt-Food Sci Technol* 2012, 47 (2), 315-323.

55. Escribano, J.; Cabanes, J.; Jiménez-Atiénzar, M.; Ibañez-Tremolada, M.; Gómez-Pando, L. R.; García-Carmona, F.; Gandía-Herrero, F., Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. *Food Chem.* 2017, 234, 285-294.

56. Cabanes, J.; Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F.; Jimenez-Atienzar, M., Fluorescent bioinspired protein labeling with betalamic acid. Derivatization and characterization of novel protein-betaxanthins. *Dyes Pigm.* 2016, 133, 458-466.

57. Gandia-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J., Fluorescent pigments: New perspectives in betalain research and applications. *Food Res. Int.* 2005, 38 (8-9), 879-884.

58. Niziński, S.; Popenda, Ł.; Rode, M. F.; Kumorkiewicz, A.; Fojud, Z.; Paluch-Lubawa, E.; Wybraniec, S.; Burdziński, G., Structural studies on the stereoisomerism of a natural dye miraxanthin I. *New J. Chem.* 2019, 43 (46), 18165-18174.

59. Wendel, M.; Szot, D.; Starzak, K.; Tuwalska, D.; Prukala, D.; Pedzinski, T.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G., Photophysical properties of indicaxanthin in aqueous and alcoholic solutions. *Dyes Pigm.* 2015, 113 (0), 634-639.

60. Wendel, M.; Szot, D.; Starzak, K.; Tuwalska, D.; Gapinski, J.; Naskrecki, R.; Prukala, D.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G., Photophysical properties of betaxanthins: Vulgaxanthin I in aqueous and alcoholic solutions. *J. Lumin.* 2015, 167, 289-295.

61. Nizinski, S.; Wendel, M.; Rode, M. F.; Prukala, D.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G., Photophysical properties of betaxanthins: miraxanthin V - insight into

the excited-state deactivation mechanism from experiment and computations. *Rsc Advances* 2017, 7 (11), 6411-6421.

62. Rodrigues, A. C. B.; Mariz, I. D. A.; Macoas, E. M. S.; Tonelli, R. R.; Martinho, J. M. G.; Quina, F. H.; Bastos, E. L., Bioinspired water-soluble two-photon fluorophores. *Dyes Pigm.* 2018, 150, 105-111.

63. Wendel, M.; Nizinski, S.; Prukala, D.; Sikorski, M.; Wybraniec, S.; Burdzinski, G., Ultrafast internal conversion in neobetanin in comparison to betacyanins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2017, 332, 602-610.

64. Guerrero-Rubio, M. A.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F.; Gandia-Herrero, F., Light Emission in Betalains: From Fluorescent Flowers to Biotechnological Applications. *Trends Plant Sci.* 2020, 25 (2), 159-175.

65. Gonçalves, L. C. P.; Tonelli, R. R.; Bagnaresi, P.; Mortara, R. A.; Ferreira, A. G.; Bastos, E. L., A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. *Plos One* 2013, 8 (1), e53874.

66. Guerrero-Rubio, M. A.; Hernandez-Garcia, S.; Garcia-Carmona, F.; Gandia-Herrero, F., Extension of life-span using a RNAi model and in vivo antioxidant effect of Opuntia fruit extracts and pure betalains in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chem.* 2019, 274, 840-847.

67. Granold, M.; Hajieva, P.; Toşa, M. I.; Irimie, F.-D.; Moosmann, B., Modern diversification of the amino acid repertoire driven by oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018, 115 (1), 41-46.

68. Davies, K. M.; Albert, N. W.; Zhou, Y.; Schwinn, K. E., Functions of Flavonoid and Betalain Pigments in Abiotic Stress Tolerance in Plants. In *Annual Plant Reviews* online, pp 21-62.

69. Lichman, B. R., The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 2021, 38 (1), 103-129.
70. Spiegel, M., Current Trends in Computational Quantum Chemistry Studies on Antioxidant Radical Scavenging Activity. *J Chem Inf Model* 2022, 62 (11), 2639-2658.
71. Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., Biological Activities of Plant Pigments Betalains. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016, 56 (6), 937-945.
72. Sawicki, T.; Bączek, N.; Wiczowski, W., Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional Foods* 2016, 27, 249-261.
73. Koss-Mikolajczyk, I.; Kusznierevich, B.; Wiczowski, W.; Sawicki, T.; Bartoszek, A., The comparison of betalain composition and chosen biological activities for differently pigmented prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) and beetroot (*Beta vulgaris*) varieties. *Int J Food Sci Nutr* 2019, 70 (4), 442-452.
74. Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., The Role of Phenolic Hydroxy Groups in the Free Radical Scavenging Activity of Betalains. *J. Nat. Prod.* 2009, 72 (6), 1142-1146.
75. Butera, D.; Tesoriere, L.; Di Gaudio, F.; Bongiorno, A.; Allegra, M.; Pintaudi, A. M.; Kohen, R.; Livrea, M. A., Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50 (23), 6895-6901.
76. Tesoriere, L.; Butera, D.; D_Arpa, D.; Di_Gaudio, F.; Allegra, M.; Gentile, C.; Livrea, M. A., Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radical Res.* 2003, 37 (6), 689-96.

77. Graça Miguel, M.; Gago, C.; Valente, R.; Guerreiro, A.; Antunes, D.; Manhita, A.; Barrocas-Dias, C., Qualitative evaluation of fruits from different *Opuntia ficus-indica* ecotypes/cultivars harvested in South Portugal. *Journal of Food Biochemistry* 2018, 42 (6), e12652.
78. Cai, Y. Z.; Sun, M.; Corke, H., Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51 (8), 2288-2294.
79. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20 (7), 933-956.
80. Stewart, A. J.; Mullen, W.; Crozier, A., On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Mol. Nutri. Food Res.* 2005, 49, 52-60.
81. Kerem, Z.; Bilkis, I.; Flaishman, M. A.; Sivan, L., Antioxidant Activity and Inhibition of α -Glucosidase by trans-Resveratrol, Piceid, and a Novel trans-Stilbene from the Roots of Israeli *Rumex bucephalophorus* L. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (4), 1243-1247.
82. Fernando, G. S. N.; Sergeeva, N. N.; Frutos, M. J.; Marshall, L. J.; Boesch, C., Novel approach for purification of major betalains using flash chromatography and comparison of radical scavenging and antioxidant activities. *Food Chem.* 2022, 385, 132632.
83. Guerrero-Rubio, M. A.; Hernandez-Garcia, S.; Escribano, J.; Jimenez-Atienzar, M.; Cabanes, J.; Garcia-Carmona, F.; Gandia-Herrero, F., Betalain health-promoting effects after ingestion in *Caenorhabditis elegans* are mediated by DAF-16/FOXO and SKN-1/Nrf2 transcription factors. *Food Chem.* 2020, 330, 127228.

84. Kanner, J.; Harel, S.; Granit, R., Betalains - a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49 (11), 5178-5185.
85. Tesoriere, L.; Butera, D.; Pintaudi, A. M.; Allegra, M.; Livrea, M. A., Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: A comparative study with vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80 (2), 391-395.
86. Allegra, M.; Tutone, M.; Tesoriere, L.; Almerico, A. M.; Culetta, G.; Livrea, M. A.; Attanzio, A., Indicaxanthin, a multi-target natural compound from *Opuntia ficus-indica* fruit: From its poly-pharmacological effects to biochemical mechanisms and molecular modelling studies. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 179, 753-764.
87. Allegra, M.; Furtmueller, 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.
88. Allegra, M.; Carletti, F.; Gambino, G.; Tutone, M.; Attanzio, A.; Tesoriere, L.; Ferraro, G.; Sardo, P.; Almerico, A. M.; Livrea, M. A., Indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* Crosses the Blood-Brain Barrier and Modulates Neuronal Bioelectric Activity in Rat Hippocampus at Dietary-Consistent Amounts. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63 (33), 7353-60.
89. 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.

90. Esatbeyoglu, T.; Wagner, A. E.; Schini-Kerth, V. B.; Rimbach, G., Betanin-A food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 2015, 59 (1), 36-47.
91. Pasch, J. H.; Von Elbe, J. H., Betanine degradation as influenced by water activity. *J. Food Sci.* 1975, 40 (6), 1145-1147.
92. Cohen, E.; Saguy, I., Effect of water activity and moisture content on the stability of beet powder pigments. *J. Food Sci.* 1983, 48, 703-707.
93. Huang, A. S.; von Elbe, J. H., Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.* 1985, 50, 1115-1120.
94. von Elbe, J. H.; Schwartz, S. J.; Hildenbrand, B. E., Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *J. Food Sci.* 1981, 46 (6), 1713-1715.
95. von Elbe, J. H.; Maing, I.-Y.; Amundson, C. H., Color stability of betanin. *J. Food Sci.* 1974, 39 (2), 334-7.
96. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 219 (4), 377-385.
97. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J. Food Sci.* 2004, 69 (6), C491-C498.
98. Saguy, I., Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-I): influence of pH and temperature. *J. Food Sci.* 1979, 44 (5), 1554-1555.
99. Esteves, L. C. Estudo cinético da hidrólise de betalaínas-modelo. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

100. Edwards, L. J., The hydrolysis of aspirin. A determination of the thermodynamic dissociation constant and a study of the reaction kinetics by ultra-violet spectrophotometry. *Trans. Faraday Soc.* 1950, 46 (0), 723-735.
101. Cai, Y.; Sun, M.; Schliemann, W.; Corke, H., Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49 (9), 4429-35.
102. Bartoloni, F. H.; Goncalves, L. C. P.; Rodrigues, A. C. B.; Dorr, F. A.; Pinto, E.; Bastos, E. L., Photophysics and hydrolytic stability of betalains in aqueous trifluoroethanol. *Monatshefte Fur Chemie* 2013, 144 (4), 567-571.
103. Gonçalves, L. C. P.; Di Genova, B. M.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Bastos, E. L., Effect of dielectric microwave heating on color and antiradical capacity of betanin. *J. Food. Eng.* 2013, 118, 49-55.
104. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phylloactin and hydroxytyrosin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19 (18), 2603-2616.
105. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Carle, R., Stability and color changes of thermally treated betanin, phylloactin, and hydroxytyrosin solutions. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (2), 390-398.
106. Gandia-Herrero, F.; Jimenez-Atienzar, M.; Cabanes, J.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J., Stabilization of the Bioactive Pigment of *Opuntia* Fruits through Maltodextrin Encapsulation. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 10646–10652.

107. Gandia-Herrero, F.; Cabanes, J.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F.; Jimenez-Atienzar, M., Encapsulation of the Most Potent Antioxidant Betalains in Edible Matrixes as Powders of Different Colors. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61 (18), 4294-4302.
108. Cabanes, J.; Gandia-Herrero, F.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F.; Jimenez-Atienzar, M., One-Step Synthesis of Betalains Using a Novel Betalamic Acid Derivatized Support. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62 (17), 3776-3782.
109. Guerrero-Rubio, M. A.; Lopez-Llorca, R.; Henarejos-Escudero, P.; Garcia-Carmona, F.; Ganda-Herrero, F., Scaled-up biotechnological production of individual betalains in a microbial system. *Microb Biotechnol* 2019, 12 (5), 993-1002.
110. Pagano, A. P. E. Efeitos de interações intermoleculares sobre as propriedades fotofísicas de betalaínas naturais. Doctorate, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
111. Kumorkiewicz-Jamro, A.; Świergosz, T.; Sutor, K.; Spórna-Kucab, A.; Wybraniec, S., Multi-colored shades of betalains: recent advances in betacyanin chemistry. *Nat. Prod. Rep.* 2021, 38 (12), 2315-2346.
112. Polturak, G.; Grossman, N.; Vela-Corcia, D.; Dong, Y.; Nudel, A.; Pliner, M.; Levy, M.; Rogachev, I.; Aharoni, A., Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017, 114 (34), 9062-9067.
113. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry* 1997, 62 (21), 7512-7515.
114. Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Eisner, R.; Young, N.; Gautam, B.; Hau, D. D.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bouatra, S.; Mandal, R.; Sinelnikov, I.; Xia, J.; Jia, L.; Cruz, J. A.; Lim, E.; Sobsey, C. A.; Shrivastava, S.; Huang, P.; Liu, P.; Fang, L.;

Peng, J.; Fradette, R.; Cheng, D.; Tzur, D.; Clements, M.; Lewis, A.; De Souza, A.; Zuniga, A.; Dawe, M.; Xiong, Y.; Clive, D.; Greiner, R.; Nazyrova, A.; Shaykhutdinov, R.; Li, L.; Vogel, H. J.; Forsythe, I., HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 2008, 37 (suppl_1), D603-D610.

115. Benfica, J.; Miranda, J. S.; Morais, E. S.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P.; de Cássia Superbi de Sousa, R., Enhanced Extraction of Levodopa from *Mucuna pruriens* Seeds Using Aqueous Solutions of Eutectic Solvents. *ACS Sustain Chem Eng* 2020, 8 (17), 6682-6689.

116. Fernandez-Pastor, I.; Luque-Muñoz, A.; Rivas, F.; Medina-O'Donnell, M.; Martinez, A.; Gonzalez-Maldonado, R.; Haidour, A.; Parra, A., Quantitative NMR analysis of L-Dopa in seeds from two varieties of *Mucuna pruriens*. *Phytochem. Anal.* 2019, 30 (1), 89-94.

117. Stintzing, F. C.; Conrad, J.; Klaiber, I.; Beifuss, U.; Carle, R., Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochem.* 2004, 65 (4), 415-422.

118. 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.; Bastos, E. L., Reannotation of Fly *Amanita* l-DOPA Dioxygenase Gene Enables Its Cloning and Heterologous Expression. *ACS Omega* 2022, 7 (18), 16070-16079.

119. Hou, Y.; Liu, X.; Li, S.; Zhang, X.; Yu, S.; Zhao, G.-R., Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for de Novo Production of Betaxanthins. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68 (31), 8370-8380.

120. Girod, P. A.; Zryd, J. P., Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 1991, 25 (1), 1-12.
121. Goncalves, L. C. P. Betalaínas: semissíntese, capacidade antirradicalar e aplicação como sondas em sistemas biológicos. Doctorate, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2012.
122. Brannon, J. H.; Magde, D., Absolute quantum yield determination by thermal blooming. Fluorescein. *The Journal of Physical Chemistry* 1978, 82 (6), 705-709.
123. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K., Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50 (11), 3122-3128.
124. 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.
125. Nakashima, K. K. Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalaínas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
126. Cano, A.; Arnao, M. B., ABTS/TEAC (2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)/Trolox® - Equivalent Antioxidant Capacity) radical scavenging mixed-mode assay. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications* 2018, 117-139.
127. Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L., A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J Chem Educ* 2017, 95 (2), 197-206.

128. Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L., A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* 2018, 95 (2), 197-206.
129. Haque, M. A.; Morozova, K.; Ferrentino, G.; Scampicchio, M., Electrochemical Methods to Evaluate the Antioxidant Activity and Capacity of Foods: A Review. *Electroanalysis* 2021, 33 (6), 1419-1435.
130. Espinoza, E. M.; Clark, J. A.; Soliman, J.; Derr, J. B.; Morales, M.; Vullev, V. I., Practical Aspects of Cyclic Voltammetry: How to Estimate Reduction Potentials When Irreversibility Prevails. *J. Electrochem. Soc.* 2019, 166 (5), H3175-H3187.
131. Roth, H. G.; Romero, N. A.; Nicewicz, D. A., Experimental and Calculated Electrochemical Potentials of Common Organic Molecules for Applications to Single-Electron Redox Chemistry. *Synlett* 2016, 27 (05), 714-723.
132. Bischoff, R.; Schlüter, H., Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *J Proteomics* 2012, 75 (8), 2275-2296.
133. Fitch, C. A.; Platzer, G.; Okon, M.; Garcia-Moreno, B. E.; McIntosh, L. P., Arginine: Its pKa value revisited. *Protein science : a publication of the Protein Society* 2015, 24 (5), 752-761.
134. Brotzel, F.; Mayr, H., Nucleophilicities of amino acids and peptides. *Org. Biomol. Chem.* 2007, 5 (23), 3814-3820.
135. Brotzel, F.; Chu, Y. C.; Mayr, H., Nucleophilicities of Primary and Secondary Amines in Water. *The Journal of Organic Chemistry* 2007, 72 (10), 3679-3688.
136. Salomäki, M.; Marttila, L.; Kivelä, H.; Ouvinen, T.; Lukkari, J., Effects of pH and Oxidants on the First Steps of Polydopamine Formation: A Thermodynamic Approach. *The Journal of Physical Chemistry B* 2018, 122 (24), 6314-6327.

137. Zhou, Y. Z.; Alany, R. G.; Chuang, V.; Wen, J., Studies of the Rate Constant of l-DOPA Oxidation and Decarboxylation by HPLC. *Chromatographia* 2012, 75 (11), 597-606.
138. 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.
139. Freitas-Dörr, B. C.; Machado, C. O.; Pinheiro, A. C.; Fernandes, A. B.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Lopes-Ferreira, M.; Abdellah, M.; Sa, J.; Russo, L. C.; Forti, F. L.; Gonçalves, L. C. P.; Bastos, E. L., A metal-free blue chromophore derived from plant pigments. *Science Advances* 2020, 6 (15), eaaz0421.
140. Johnson, J.; Morales, N.; Gorczyca, A.; Dolliver, D.; McAllister, M., Mechanisms of acid-catalyzed Z/E isomerization of imines. *J. Org. Chem* 2001, 66 (24), 7979-7985.
141. Guimond, N.; Mayer, P.; Trauner, D., Development of an Iron(II)-Catalyzed Aerobic Catechol Cleavage and Biomimetic Synthesis of Betanidin. *Chem-Eur J* 2014, 20 (31), 9519-9523.
142. Bolton, J. L.; Turnipseed, S. B.; Thompson, J. A., Influence of quinone methide reactivity on the alkylation of thiol and amino groups in proteins: studies utilizing amino acid and peptide models. *Chem.-Biol. Interact.* 1997, 107 (3), 185-200.
143. Zhang, P.; Chan, W.; Ang, I. L.; Wei, R.; Lam, M. M. T.; Lei, K. M. K.; Poon, T. C. W., Revisiting Fragmentation Reactions of Protonated α -Amino Acids by High-Resolution Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with Collision-Induced Dissociation. *Sci Rep-Uk* 2019, 9 (1), 6453.

144. Kamps, J. J. A. G.; Hopkinson, R. J.; Schofield, C. J.; Claridge, T. D. W., How formaldehyde reacts with amino acids. *Communications Chemistry* 2019, 2 (1), 126.
145. Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P., Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2016, 33 (3), 432-455.
146. Schmidt, J.; Kramell, R.; Schneider, G., Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry of Amino Acid Conjugates of Jasmonic Acid under Positive and Negative Ionisation. *European Mass Spectrometry* 1995, 1 (6), 573-581.
147. Pinheiro, A. C. Caminhos para a estabilização de betalínas e suas consequências. Doctorate, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.
148. Wybraniec, S.; Nowak-Wydra, B.; Mizrahi, Y., H-1 and C-13 NMR spectroscopic structural elucidation of new decarboxylated betacyanins. *Tetrahedron Lett.* 2006, 47 (11), 1725-1728.
149. Kobayashi, N.; Schmidt, J.; Wray, V.; Schliemann, W., Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochem.* 2001, 56 (5), 429-36.
150. Madadi, E.; Mazloun-Ravasan, S.; Yu, J. S.; Ha, J. W.; Hamishehkar, H.; Kim, K. H., Therapeutic Application of Betalains: A Review. *Plants* 2020, 9 (9), 1219.
151. Miller, N. J.; Rice-Evans, C., Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radical Res.* 1997, 26, 195-199.
152. Munteanu, I. G.; Apetrei, C., Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* 2021, 22 (7), 3380.
153. Apak, R., Current Issues in Antioxidant Measurement. *J. Agric. Food Chem.* 2019, 67 (33), 9187-9202.

154. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 (6), 1841-1856.
155. Hussain, J.; Rea, C., Computationally Efficient Algorithm to Identify Matched Molecular Pairs (MMPs) in Large Data Sets. *J Chem Inf Model* 2010, 50 (3), 339-348.
156. Zhang, B.; Xia, T.; Duan, W.; Zhang, Z.; Li, Y.; Fang, B.; Xia, M.; Wang, M., Effects of Organic Acids, Amino Acids and Phenolic Compounds on Antioxidant Characteristic of Zhenjiang Aromatic Vinegar. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2019, 24 (20), 3799.
157. Zhang, D.; Zhang, T., Enhancing the in vitro Antioxidant Capacities via the interaction of amino acids. *Emir J Food Agr* 2018, 30, 224.
158. Aliaga, C.; Lissi, E. A., Reactions of the radical cation derived from 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS \cdot^+) with amino acids. Kinetics and mechanism. *Can. J. Chem.* 2000, 78 (8), 1052-1059.
159. Nayak, B. N.; Buttar, H. S., Evaluation of the antioxidant properties of tryptophan and its metabolites in in vitro assay. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 2016, 13 (2), 129-136.
160. Mata, A.; Ferreira, J. P.; Semedo, C.; Serra, T.; Duarte, C. M. M.; Bronze, M. R., Contribution to the characterization of *Opuntia* spp. juices by LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Chem.* 2016, 210, 558-565.
161. Betancourt, C.; Cejudo-Bastante, M. J.; Heredia, F. J.; Hurtado, N., Pigment composition and antioxidant capacity of betacyanins and betaxanthins fractions of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl) Haw cactus fruit. *Food Res. Int.* 2017, 101, 173-179.

162. Brouwer, A. M., Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 2011, 83 (12), 2213-2228.
163. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 1996, 239 (1), 70-76.

Página intencionalmente deixada em branco.

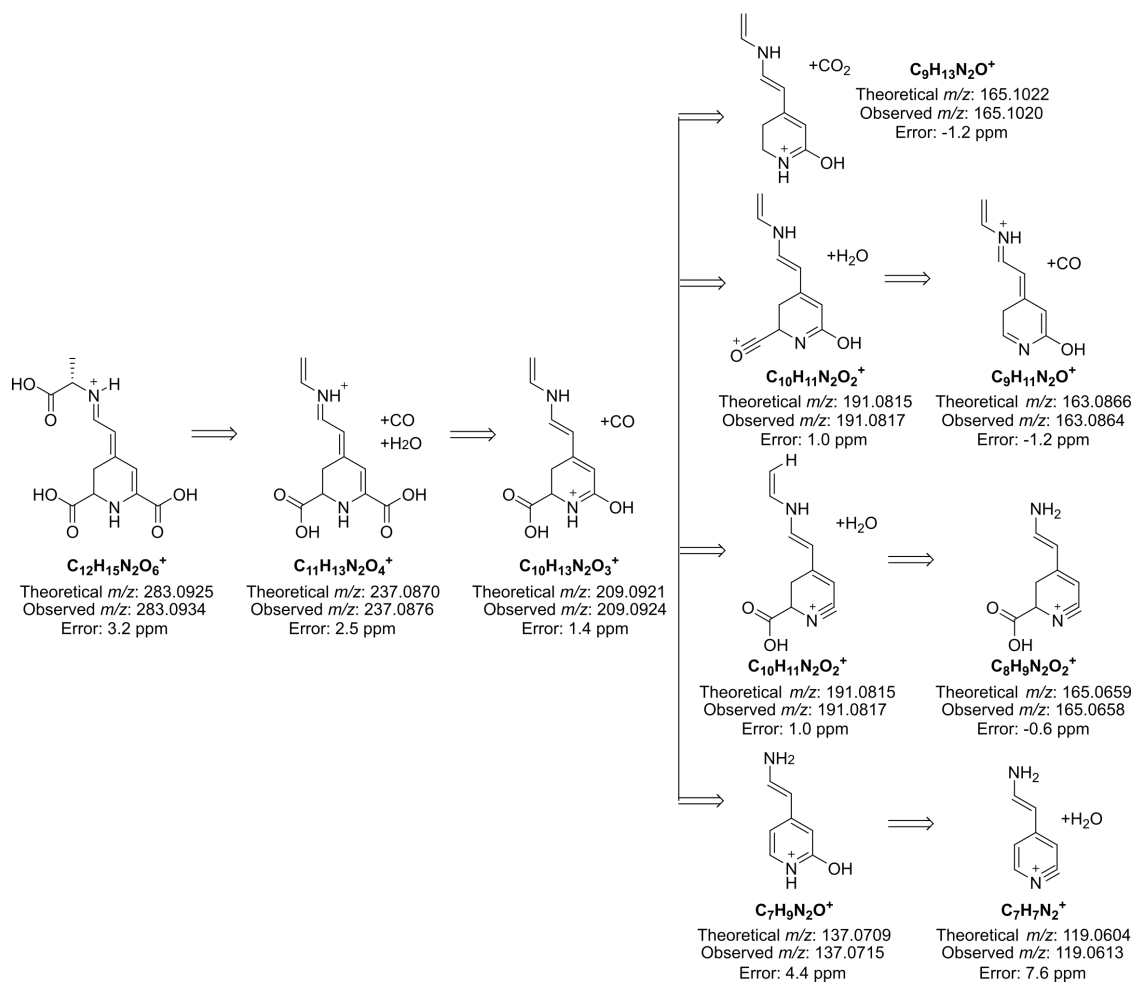
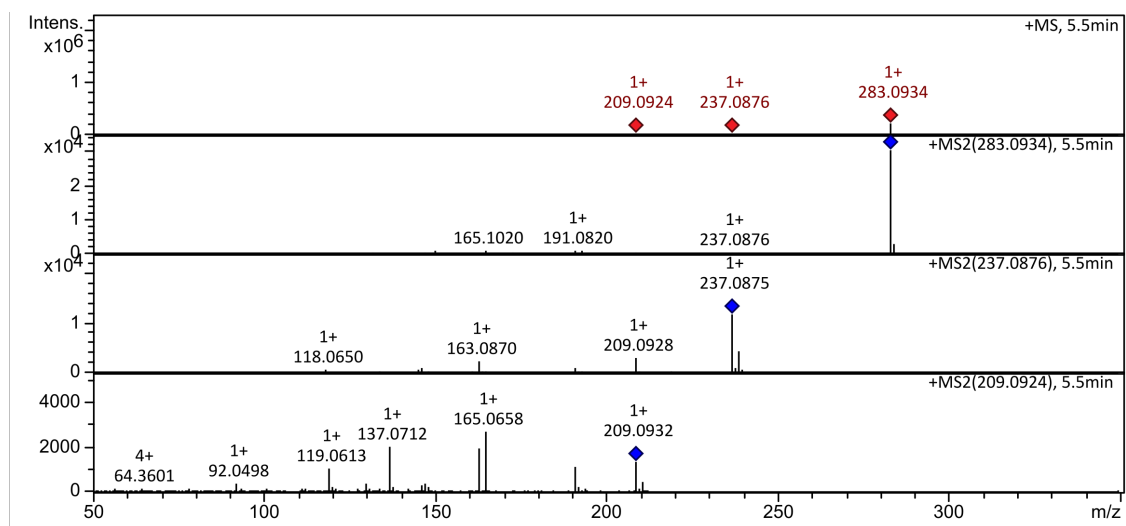
8. ANEXOS

Tabela Anexo 1. Fontes de betaxantinas. Nomes comuns e nomes científicos registrados no International Plant Names Index (IPNI), e referências das imagens utilizadas na Figura 3.

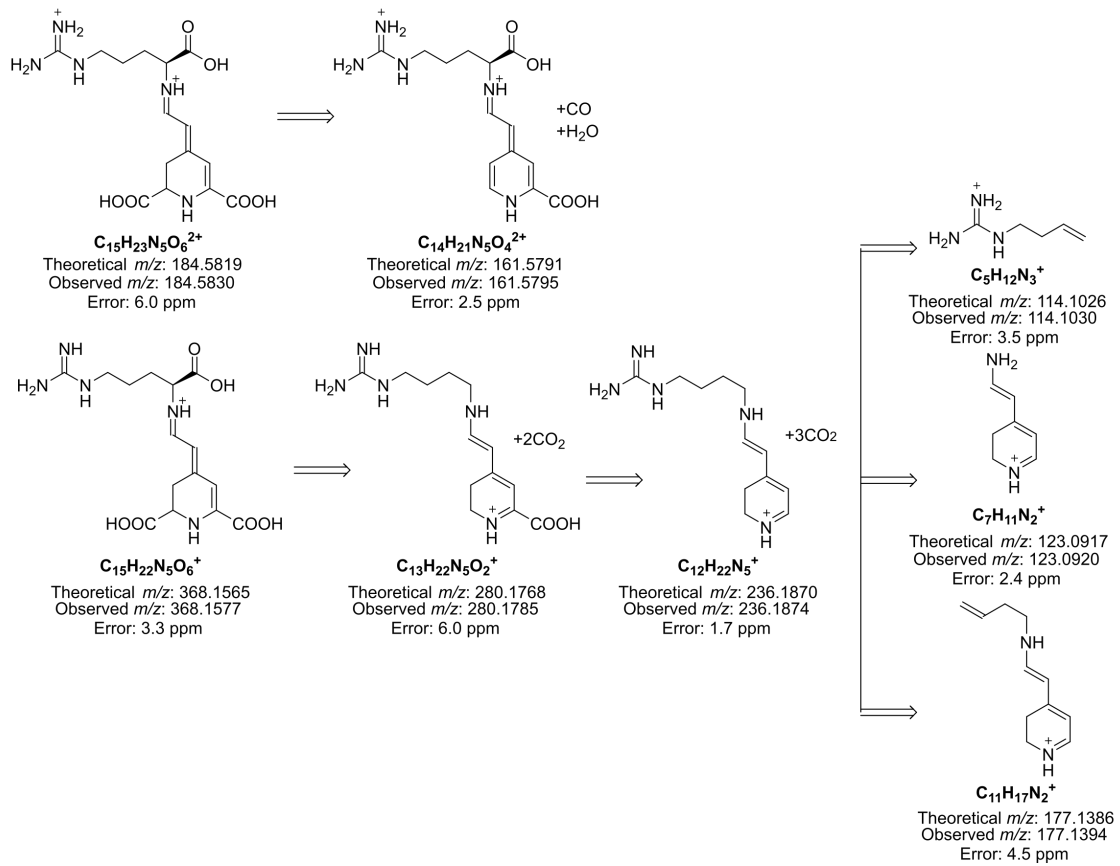
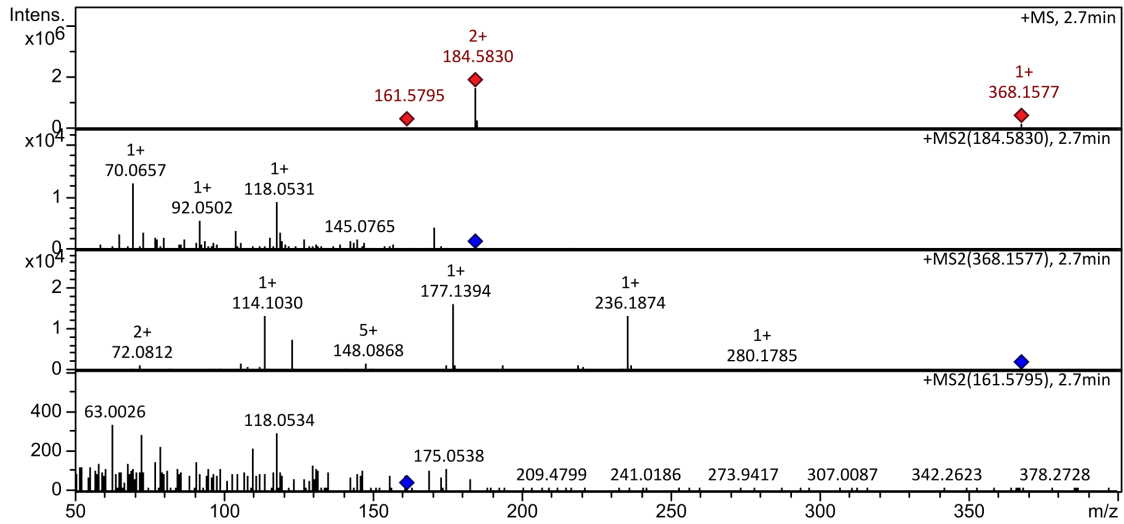
Fontes de betaxantinas		
Nomes comuns	Nomes científicos registrados no IPNI	Referências das imagens da Figura 3
Acelga (<i>swiss chard</i>)	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i> (L.) Voss https://www.ipni.org/n/60468550-2	https://www.flickr.com/photos/megz/5898652489/in/photostream/
Agário-das-moscas	<i>Amanita muscaria</i>	https://www.flickr.com/photos/95786621@N02/51655284487/
Beterraba amarela, vermelha e listrada	<i>Beta vulgaris</i> L. https://www.ipni.org/n/164505-1	https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photography-beets-various-colors-image15961817
Opuntia	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill. https://www.ipni.org/n/1151735-2	https://www.flickr.com/photos/gudrun44/51557688425/in/photostream/
Djulis	<i>Chenopodium formosanum</i> https://www.ipni.org/n/164939-1	https://www.earth.com/plant-encyclopedia/angiosperms/amaranthaceae/chenopodium-formosanum/pt/
Perpétua ou amaranto-globoso	<i>Gomphrena globosa</i> L. https://www.ipni.org/n/327333-2	https://www.flickr.com/photos/physics_of_free_kick/2894124365/
Ulucu	<i>Ullucus tuberosus</i> Caldas https://www.ipni.org/n/167633-1	https://stock.adobe.com/es/images/olluquito-is-a-root-vegetable-from-south-america-an-important-crop-in-the-andean-region-and-for-traditional-dishes-in-peruvian-cuisine-pile-of-yellow-ulluco-in-a-farmers-market/434254070?start-checkout=1&content-id=434254070
Raízes de beterraba amarela (<i>hairy roots</i>)	<i>Beta vulgaris</i> L. https://www.ipni.org/n/164505-1	
Maravilha	<i>Mirabilis jalapa</i> L. https://www.ipni.org/n/162591-2	https://www.flickr.com/photos/hector_va_a_su_bola/51337770545/
Rivina	<i>Rivina humilis</i> L. https://www.ipni.org/n/221479-2	https://www.flickr.com/photos/ericmadrigal/4061562647/

Onze-horas	<i>Portulaca grandiflora</i> Hook. https://www.ipni.org/n/208592-2	https://www.flickr.com/photos/154568542@N07/48557982172/
Crista-de-galo	<i>Celosia argentea</i> var. <i>cristata</i> (L.) Kuntze https://www.ipni.org/n/1073771-2	https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2089504
Crista plumosa	<i>Celosia plumosa</i> Hort. ex Burvenich https://www.ipni.org/n/59953-1	https://www.flickr.com/photos/jenn2d2/19310624130/
Quinoa	<i>Chenopodium quinoa</i> https://www.ipni.org/n/165175-1	https://www.flickr.com/photos/bioversity/6672474921/
Primavera	<i>Bougainvillea spectabilis</i> Willd. https://www.ipni.org/n/604358-1	https://www.flickr.com/photos/35318832@N00/4337221774/ https://www.flickr.com/photos/brindleyron/11448024066/
Planta com folhas de língua (<i>tongue-leaf plant</i>)	<i>Glottiphyllum longum</i> N.E.Br. https://www.ipni.org/n/362000-1	https://www.flickr.com/photos/jim-sf/2526446006/
Cacto-margarida	<i>Lampranthus productus</i> N.E.Br. https://www.ipni.org/n/362301-1	https://www.flickr.com/photos/109081/49869013801/

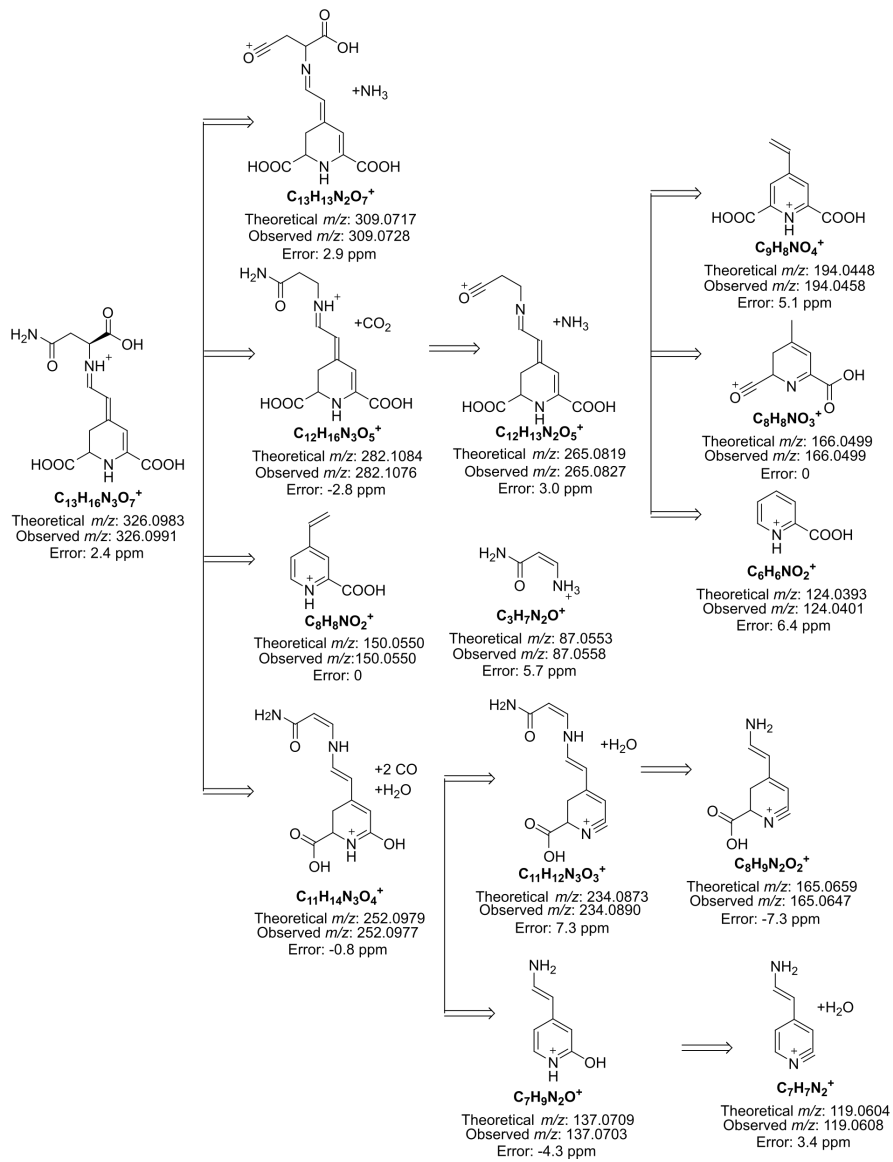
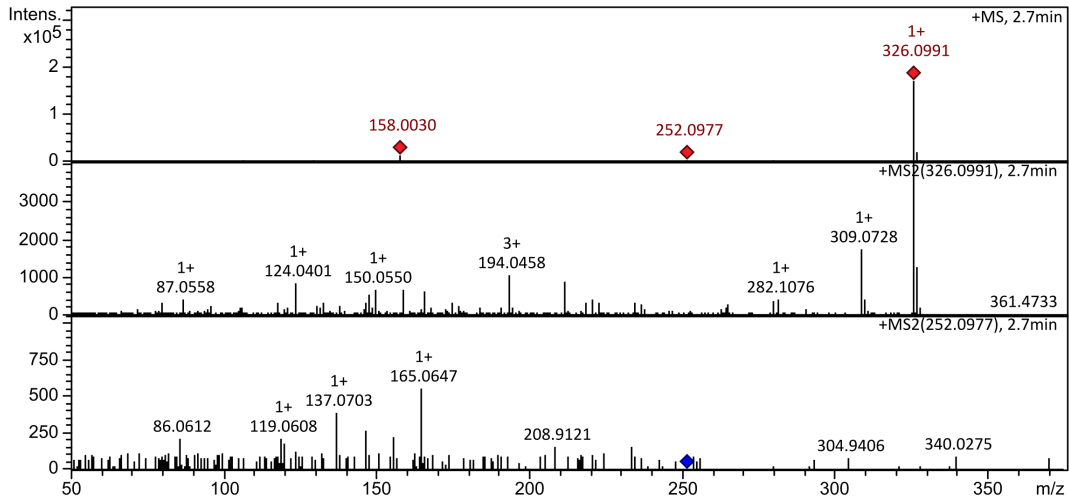
8.1. Espectros de ESI-qTOF-MS/MS e padrões de fragmentação



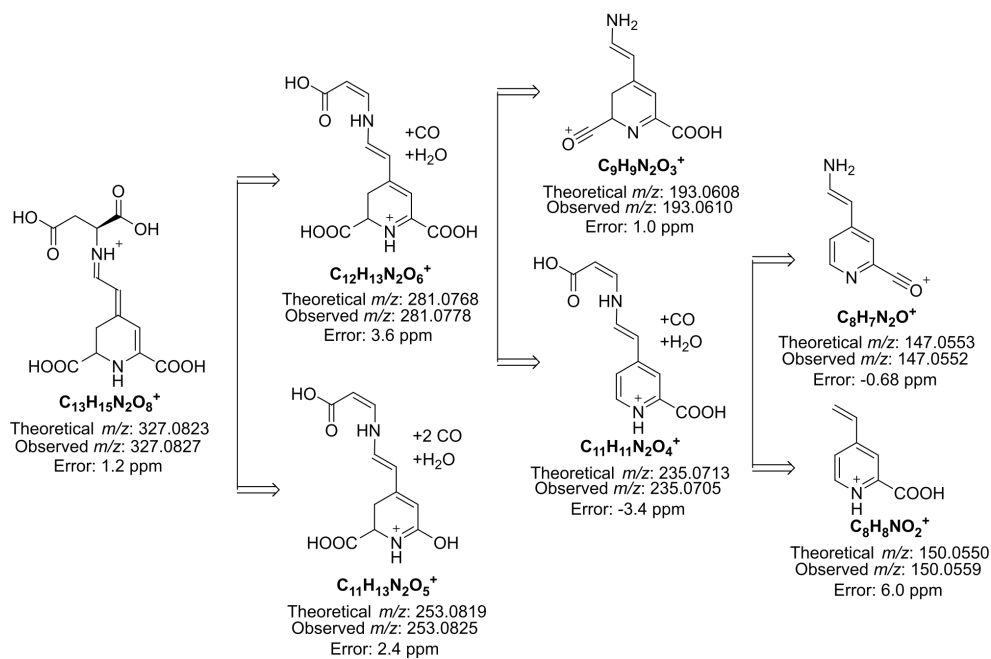
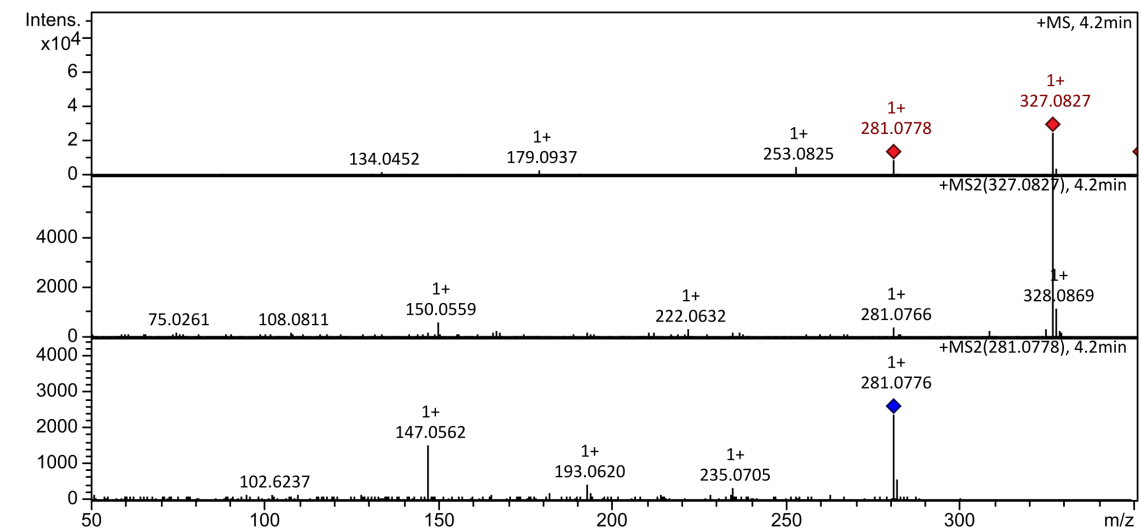
Anexo 1. Alanina-betaxantina (Ala-Bx).



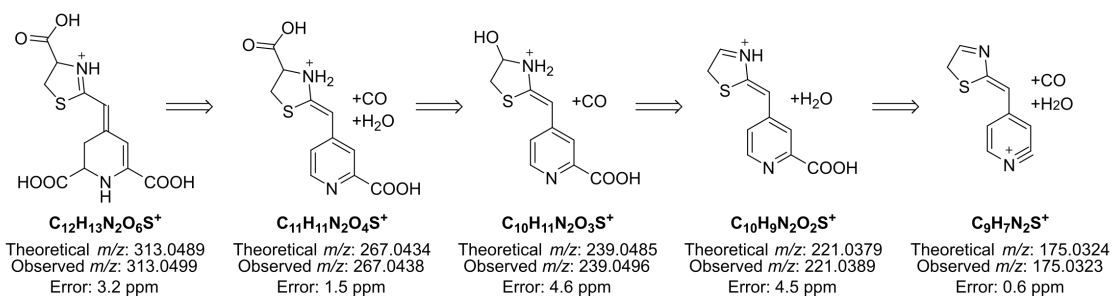
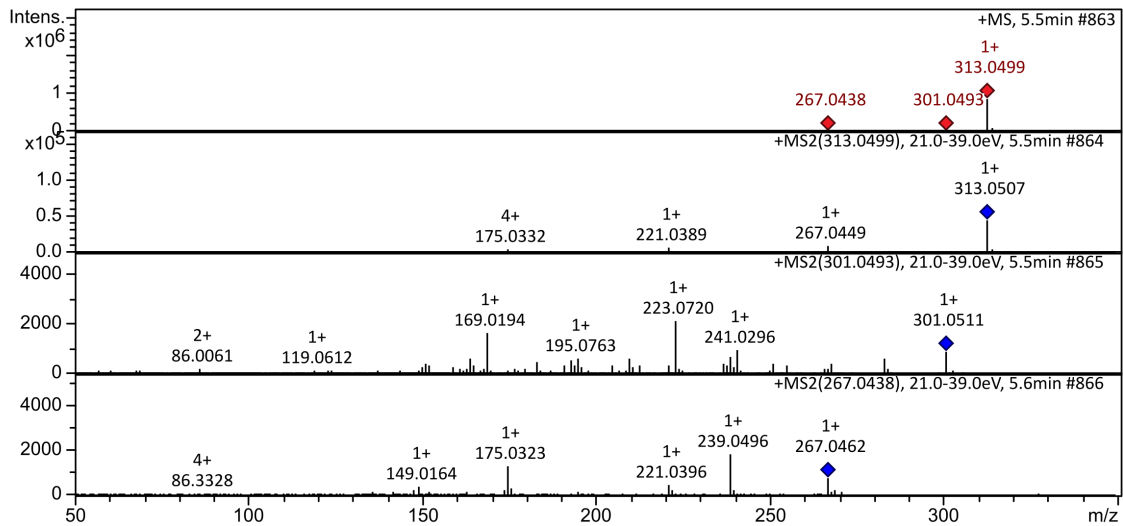
Anexo 2. Arginina-betaxantina (Arg-Bx).



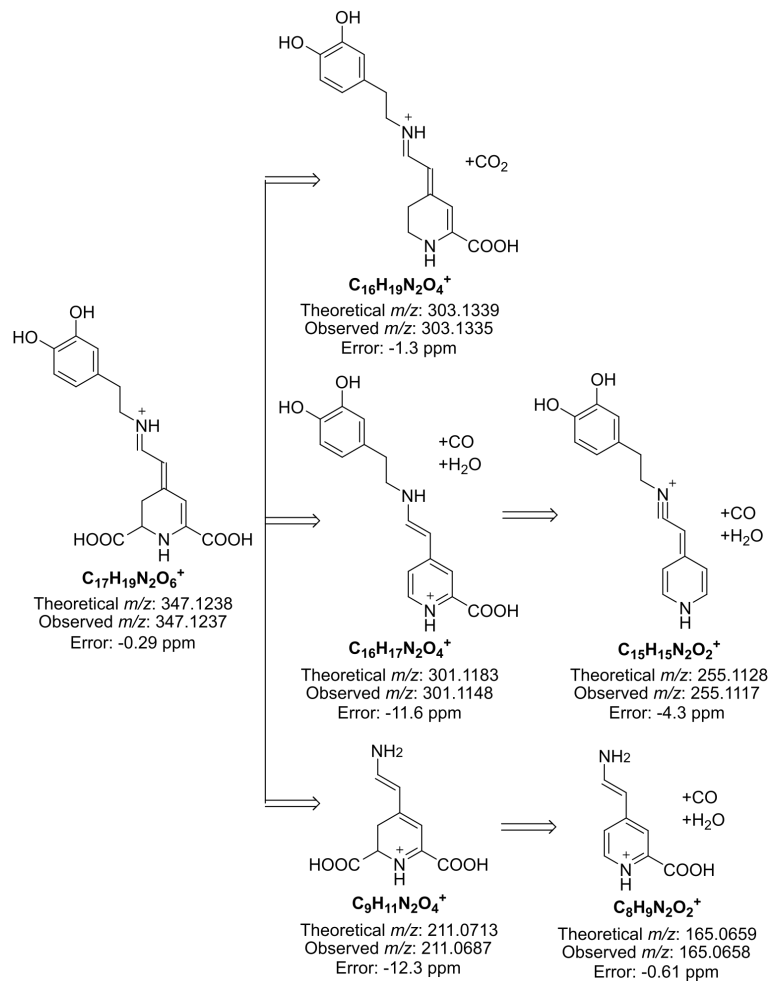
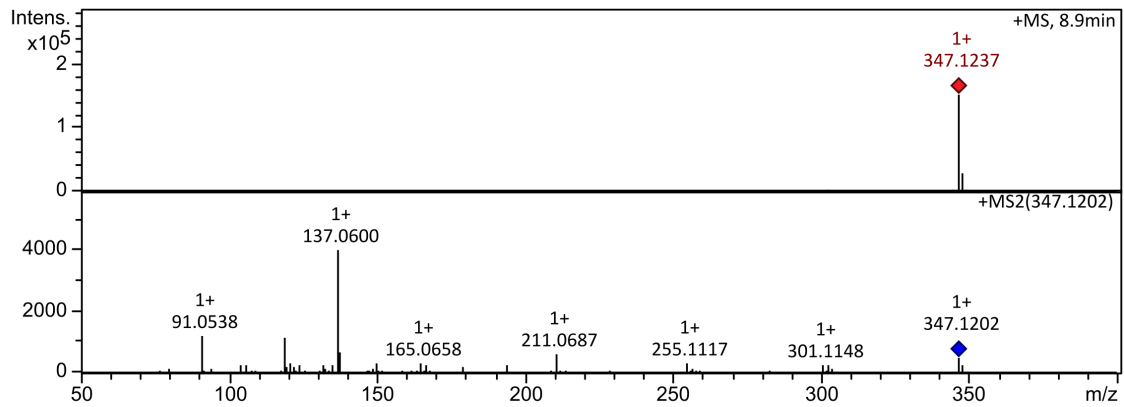
Anexo 3. Asparagina-betaxantina (Asn-Bx).



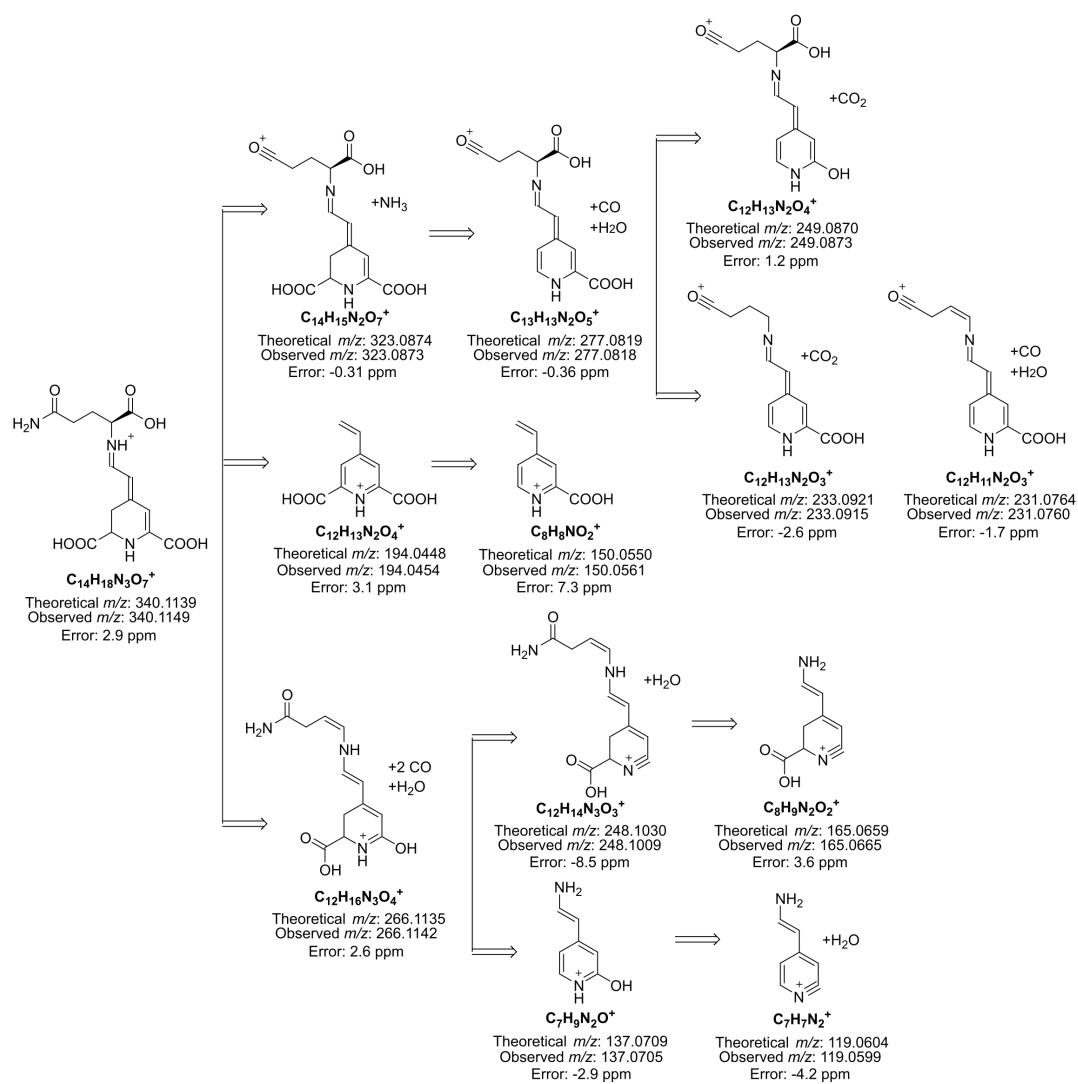
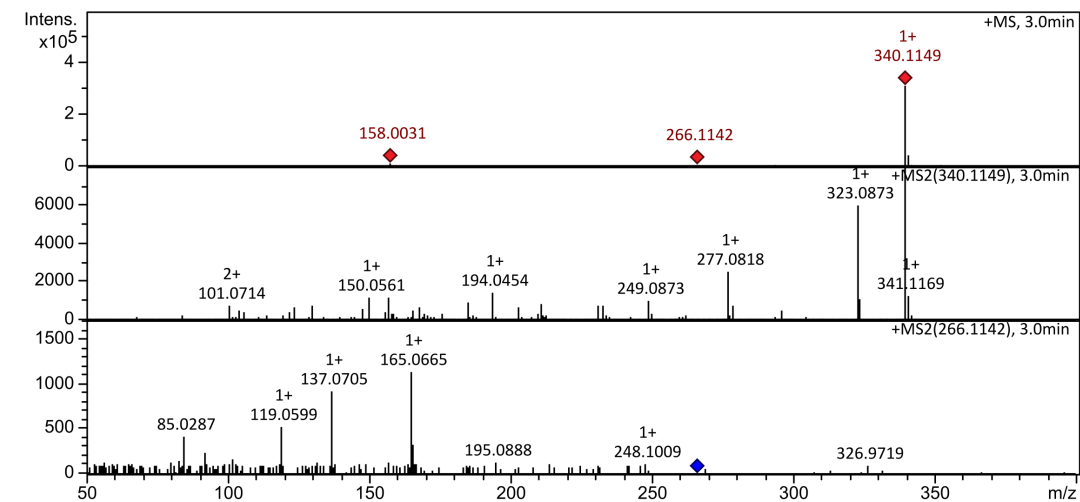
Anexo 4. Ácido aspártico-betaxantina (Asp-Bx).



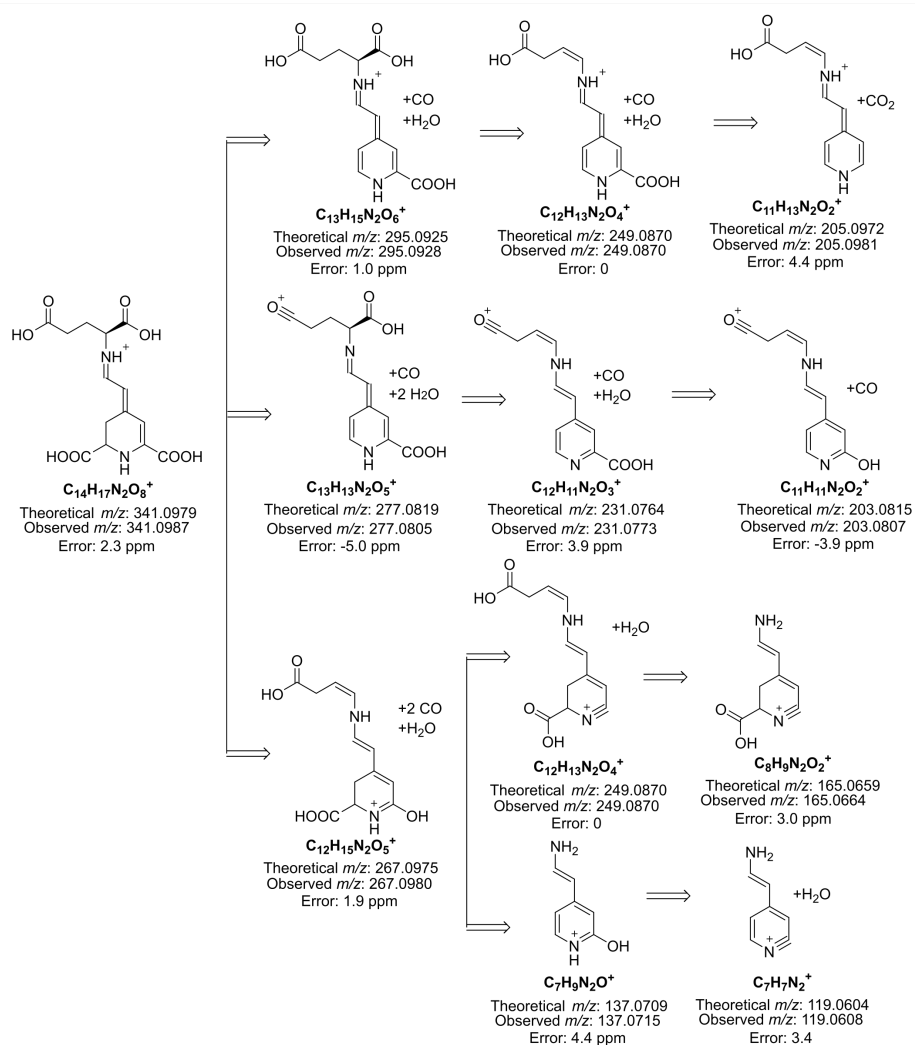
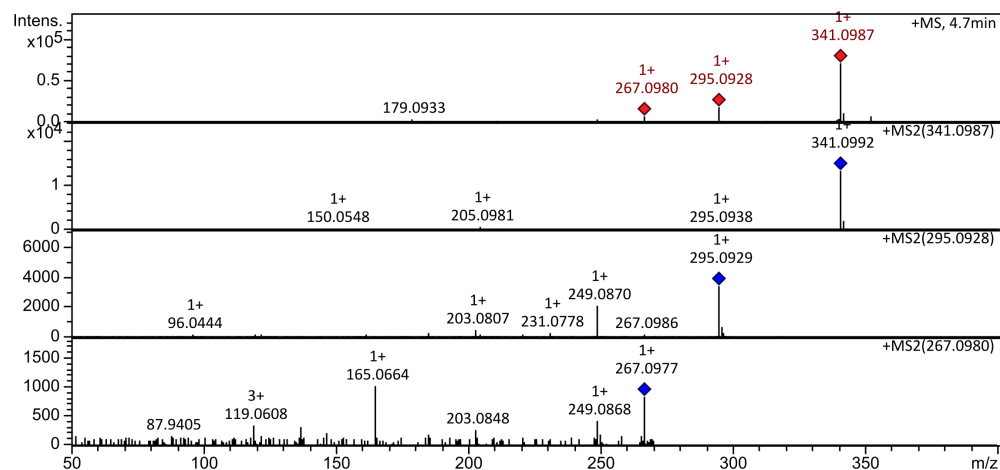
Anexo 5. Cisteína-betaxantina (Cys-Bx).



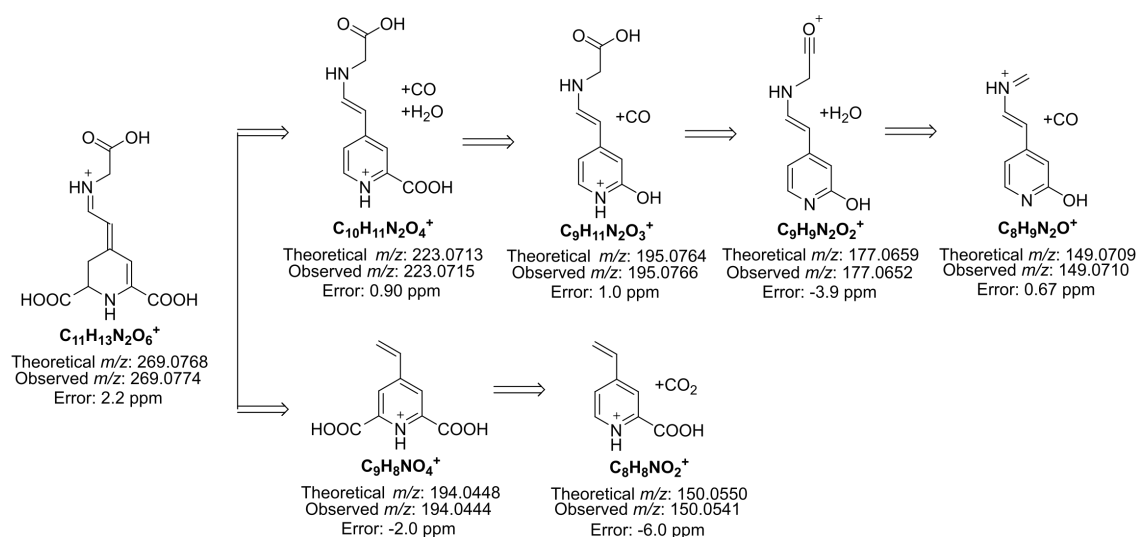
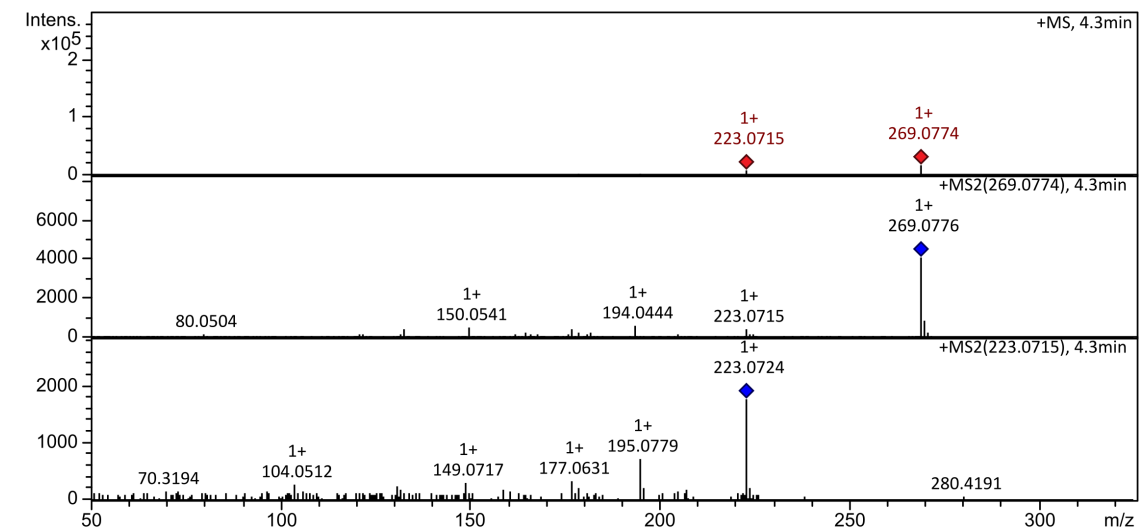
Anexo 6. Dopamina-betaxantina (DA-Bx).



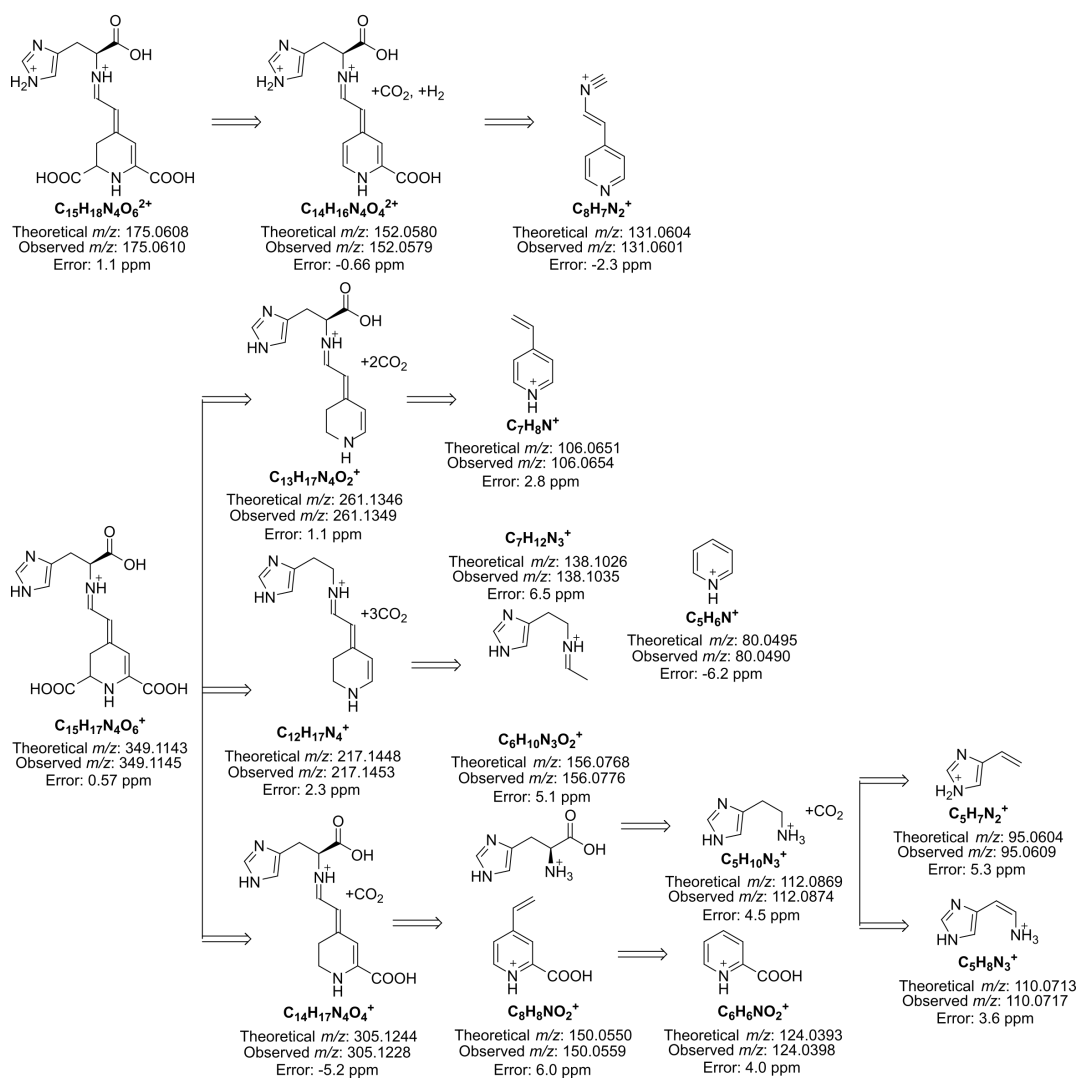
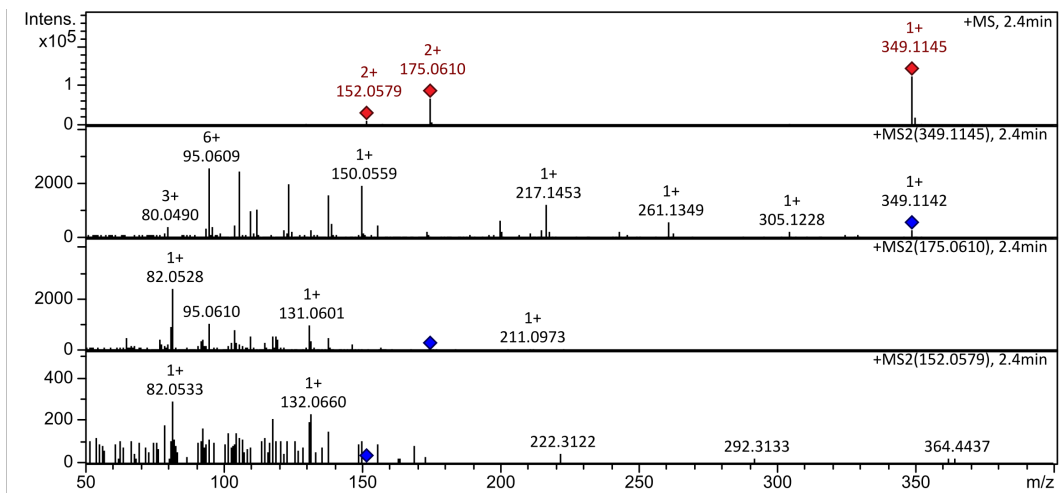
Anexo 7. Glutamina-betaxantina (Gln-Bx).



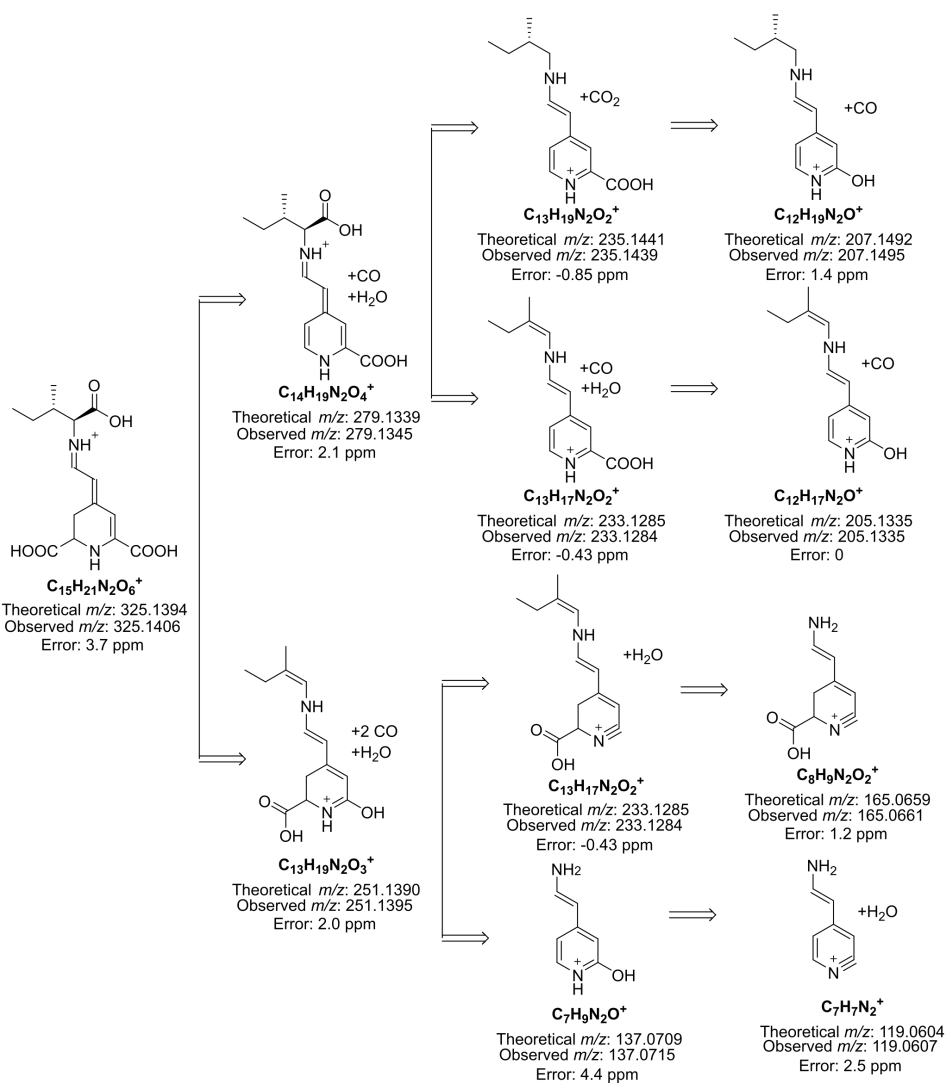
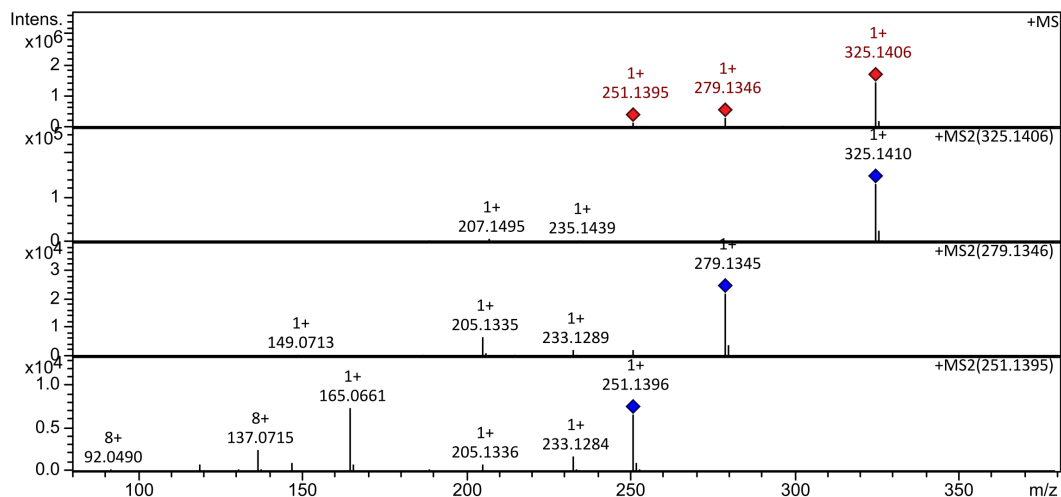
Anexo 8. Ácido glutâmico-betaxantina (Glu-Bx).



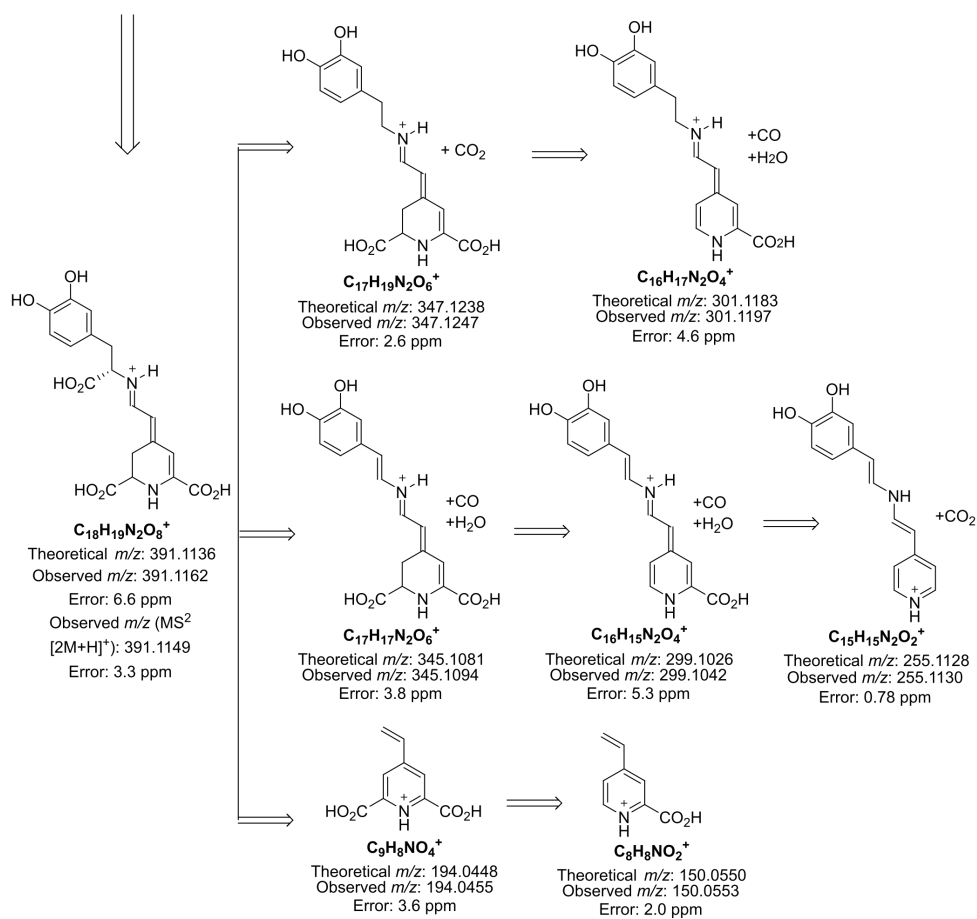
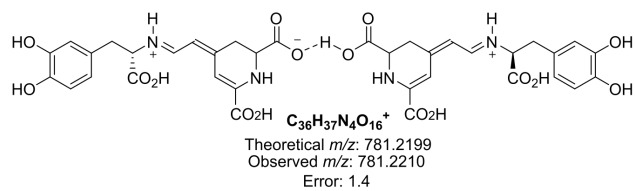
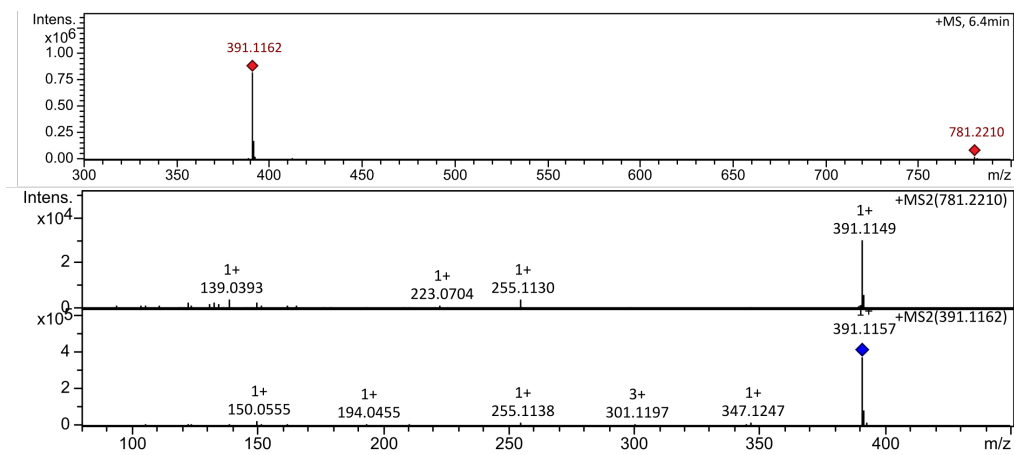
Anexo 9. Glicina-betaxantina (Gly-Bx).



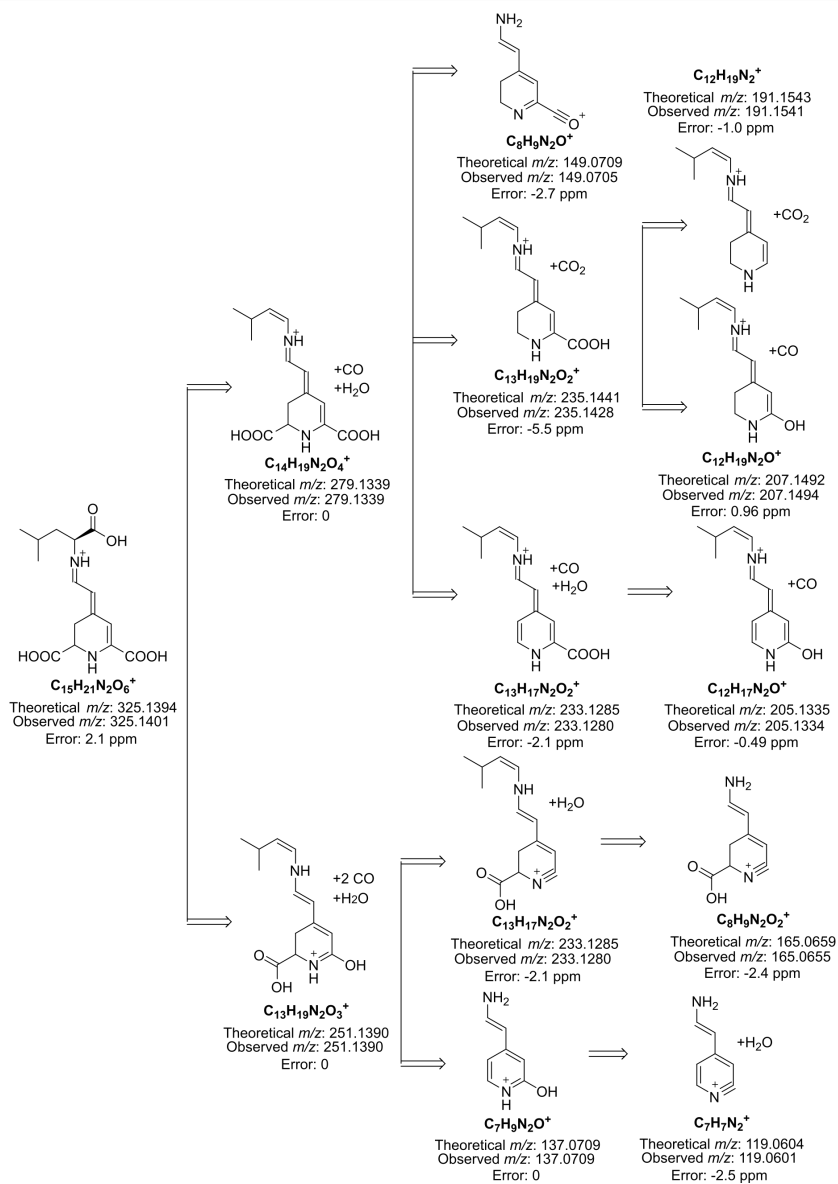
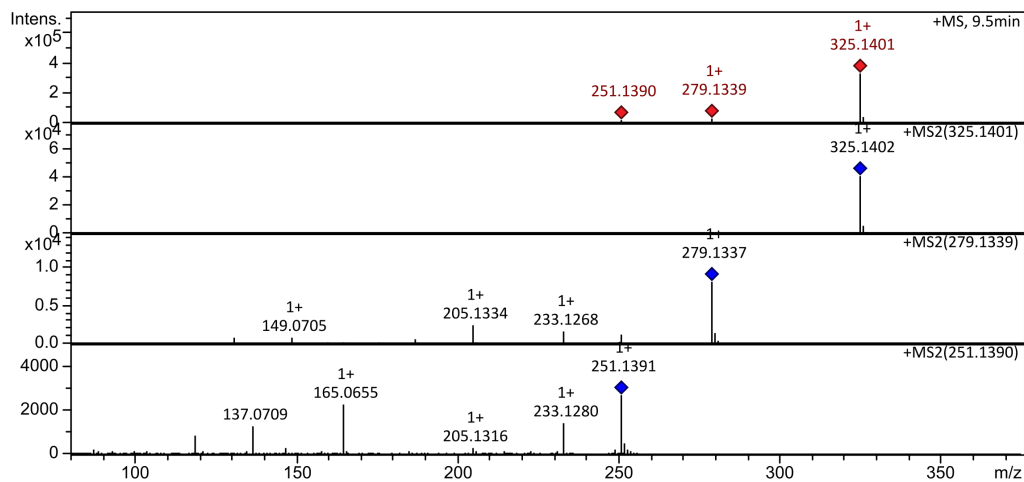
Anexo 10. Histidina-betaxantina (His-Bx).



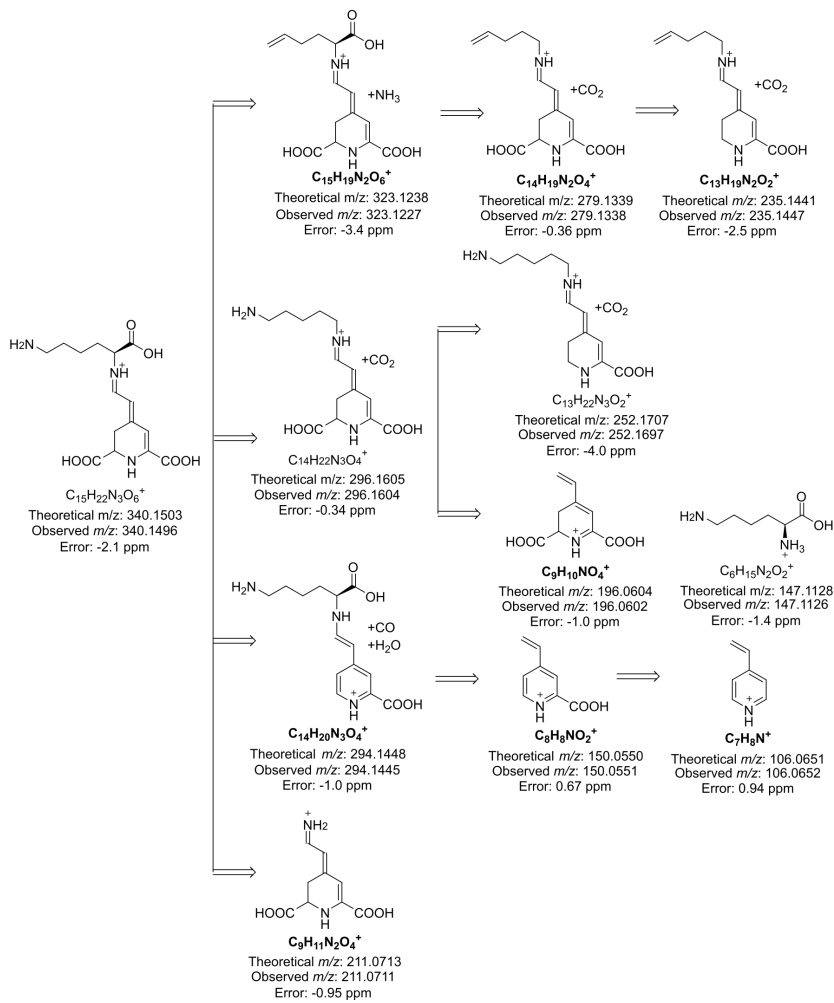
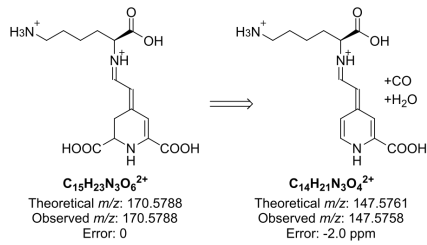
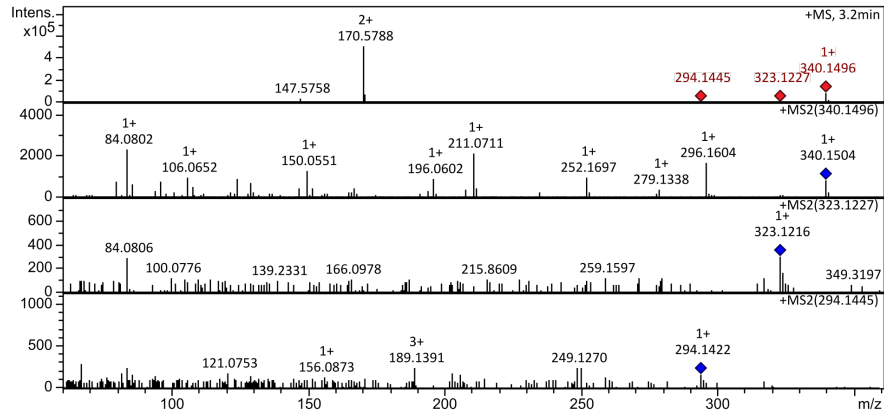
Anexo 11. Isoleucina-betaxantina (Ile-Bx).



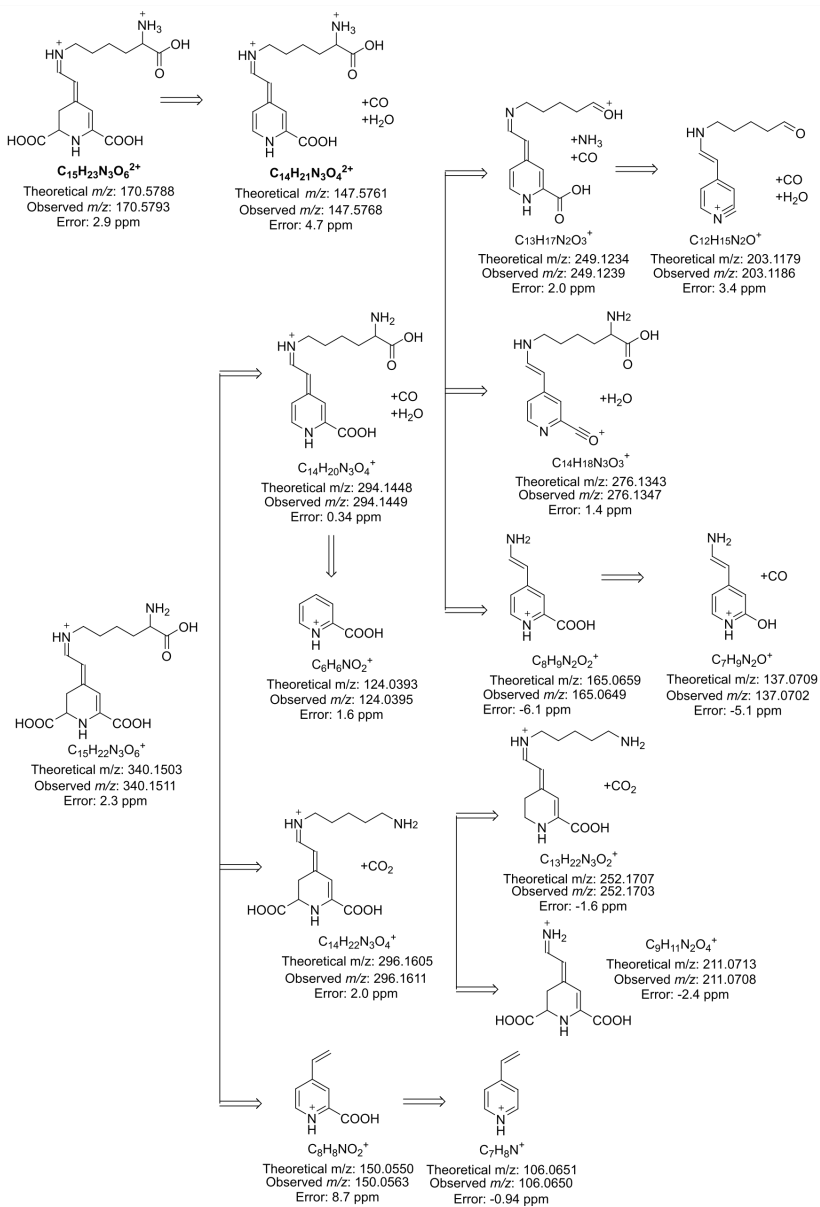
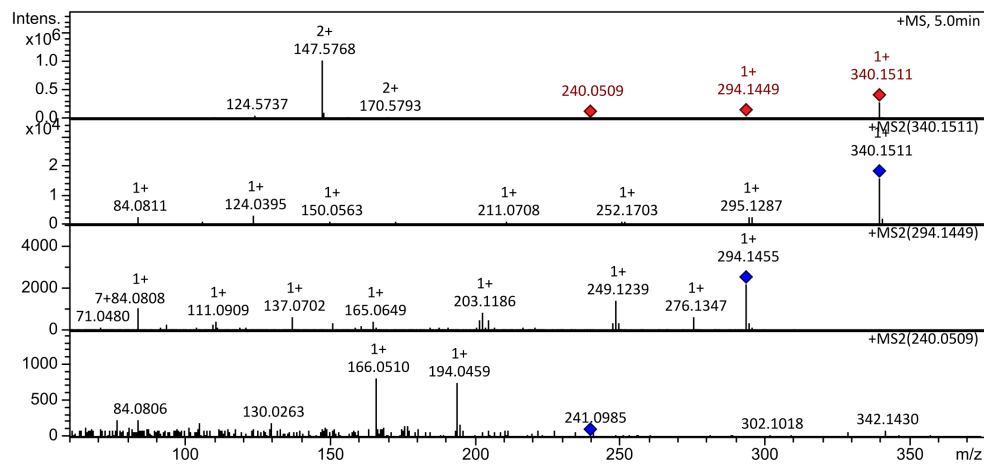
Anexo 12. DOPA-betaxantina (DOPA-Bx).



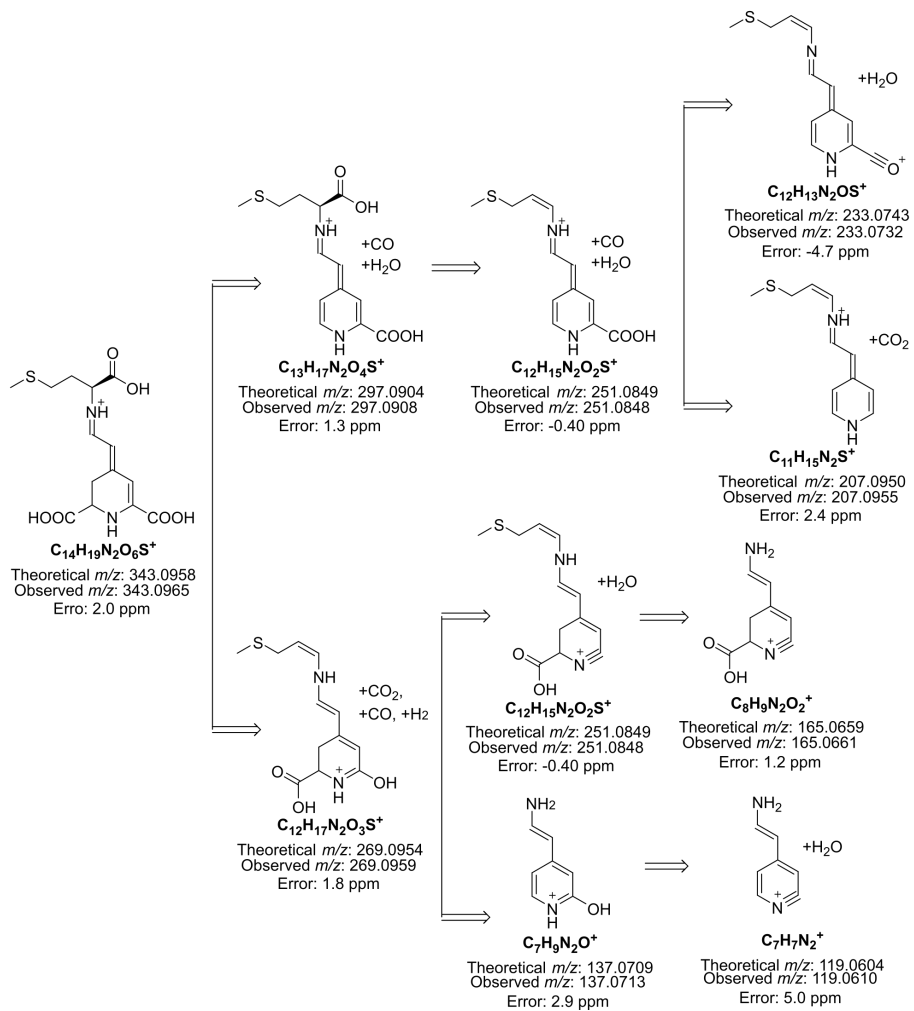
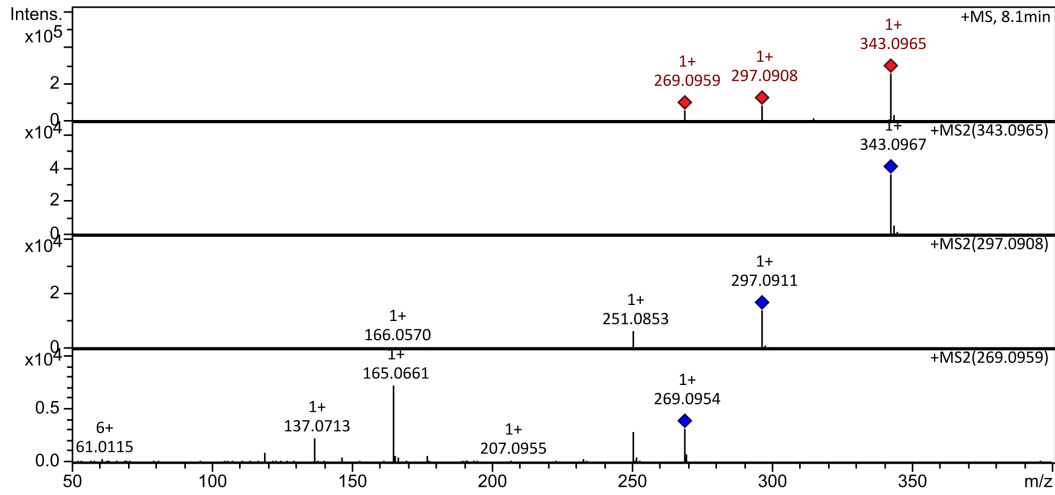
Anexo 13. Leucina-betaxantina (Leu-Bx).



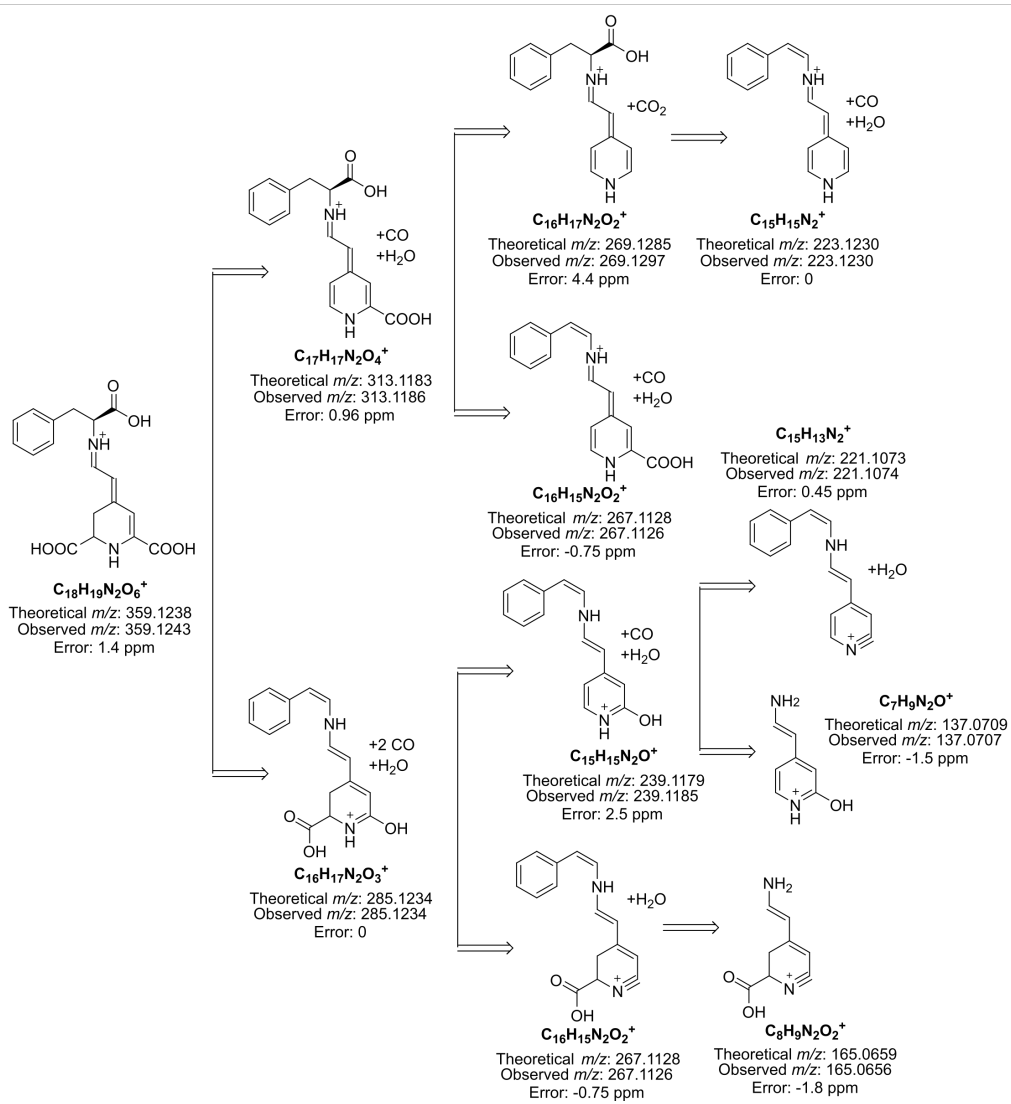
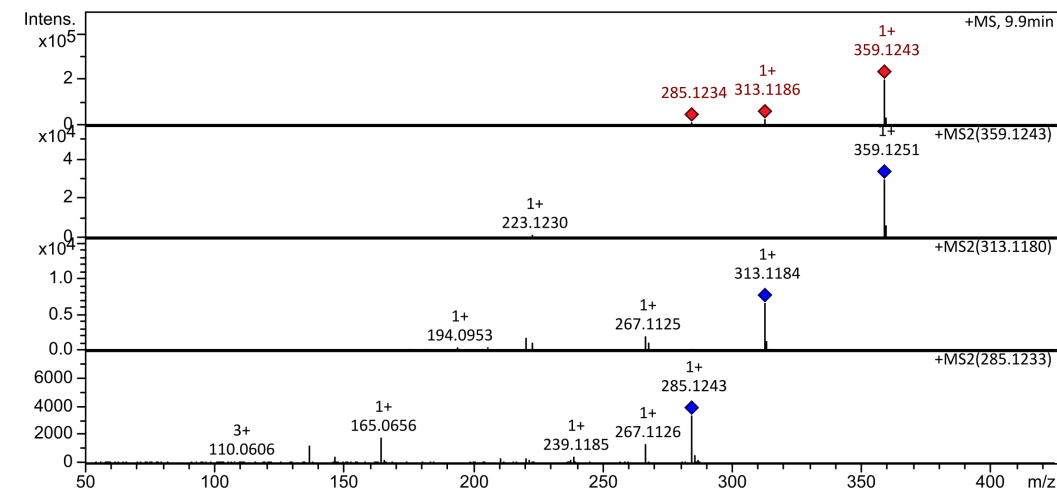
Anexo 14. Lisina-betaxantina (Lys-Bx).



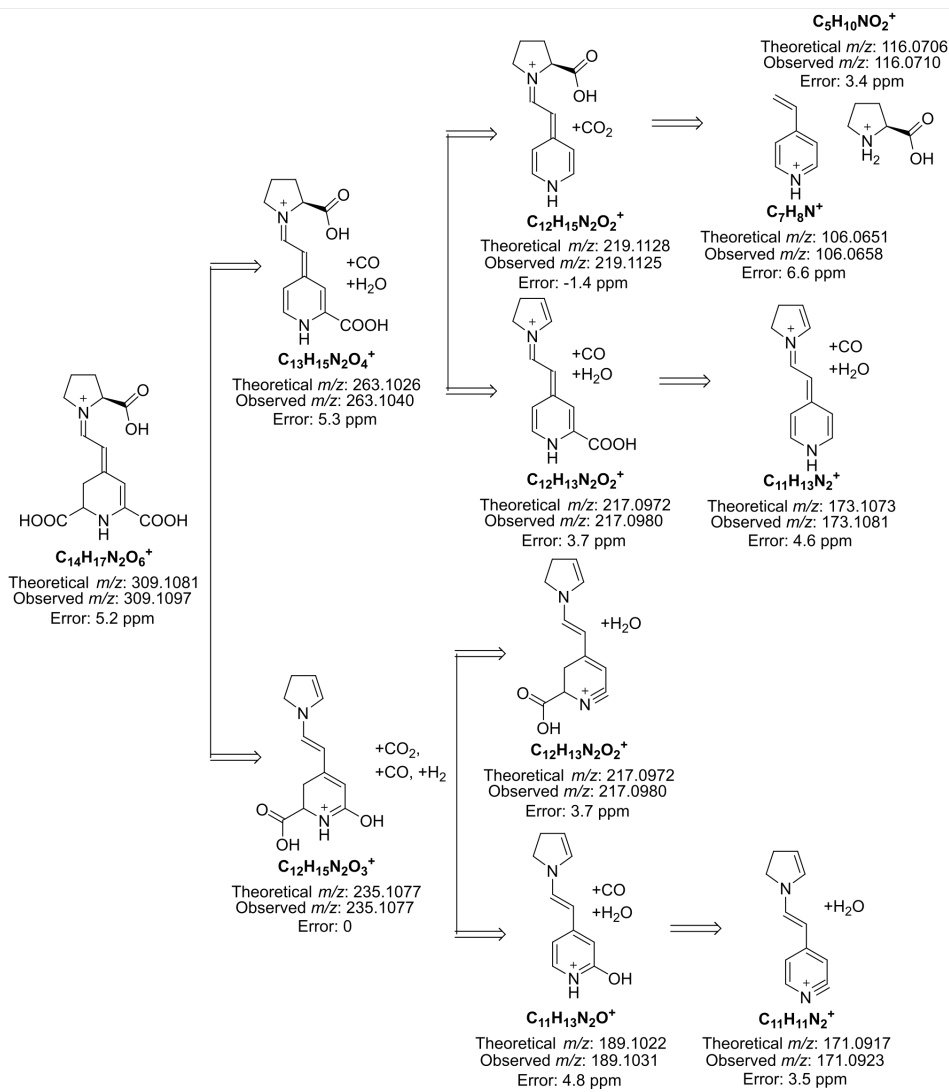
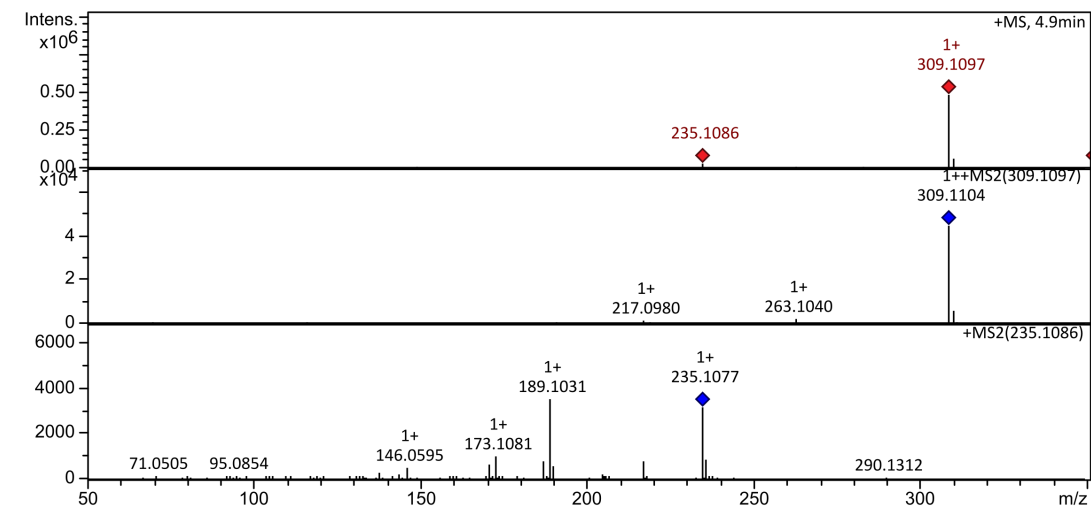
Anexo 15. ε-Lisina-betaxantina (ε-Lys-Bx).



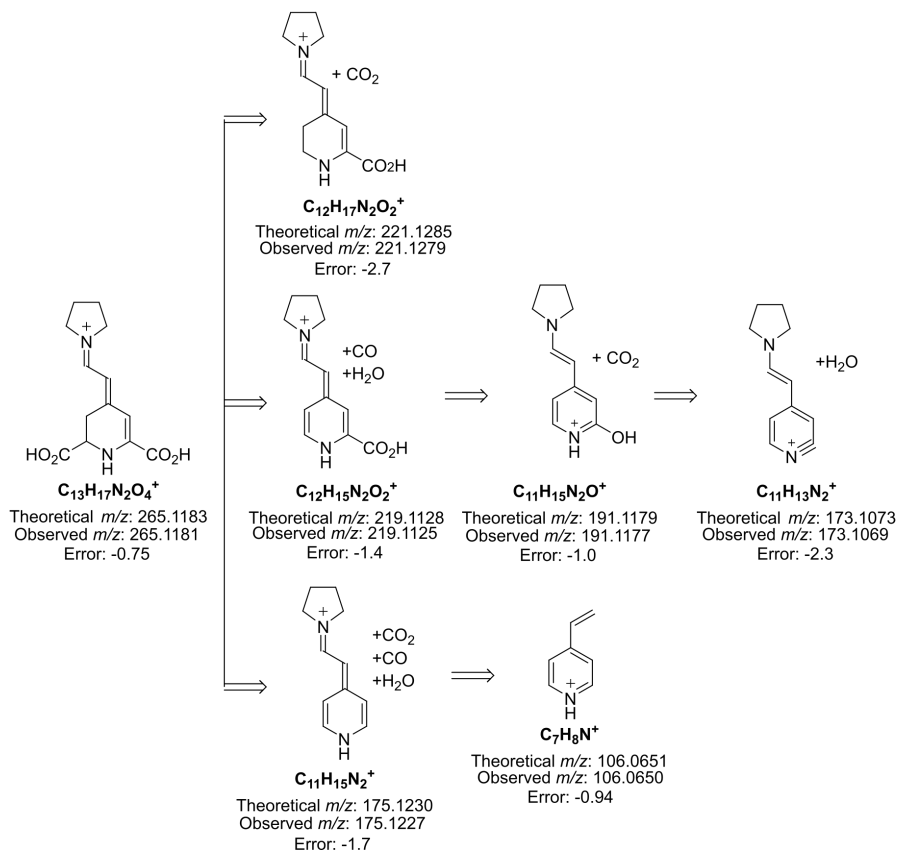
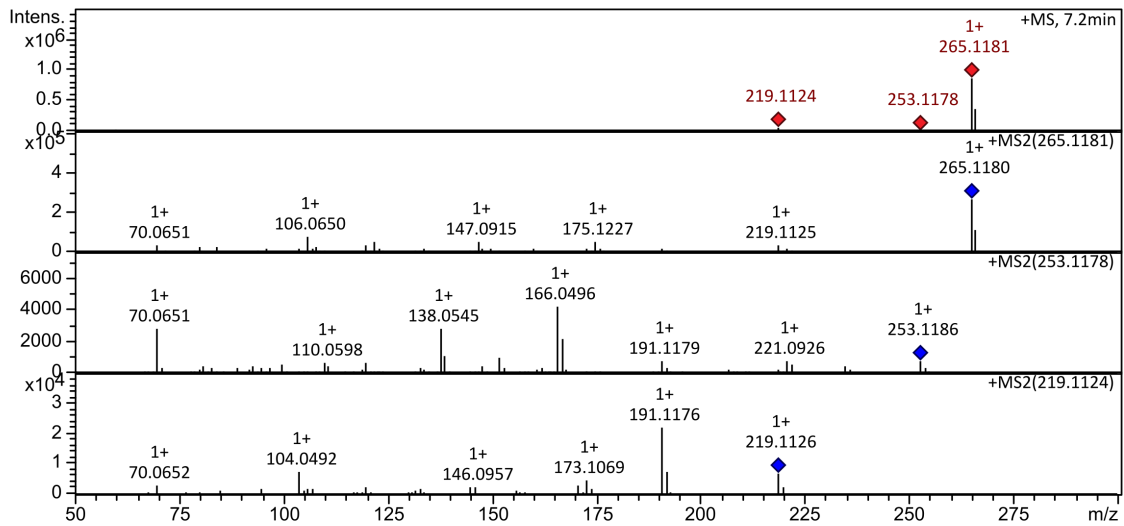
Anexo 16. Metionina-betaxantina (Met-Bx).



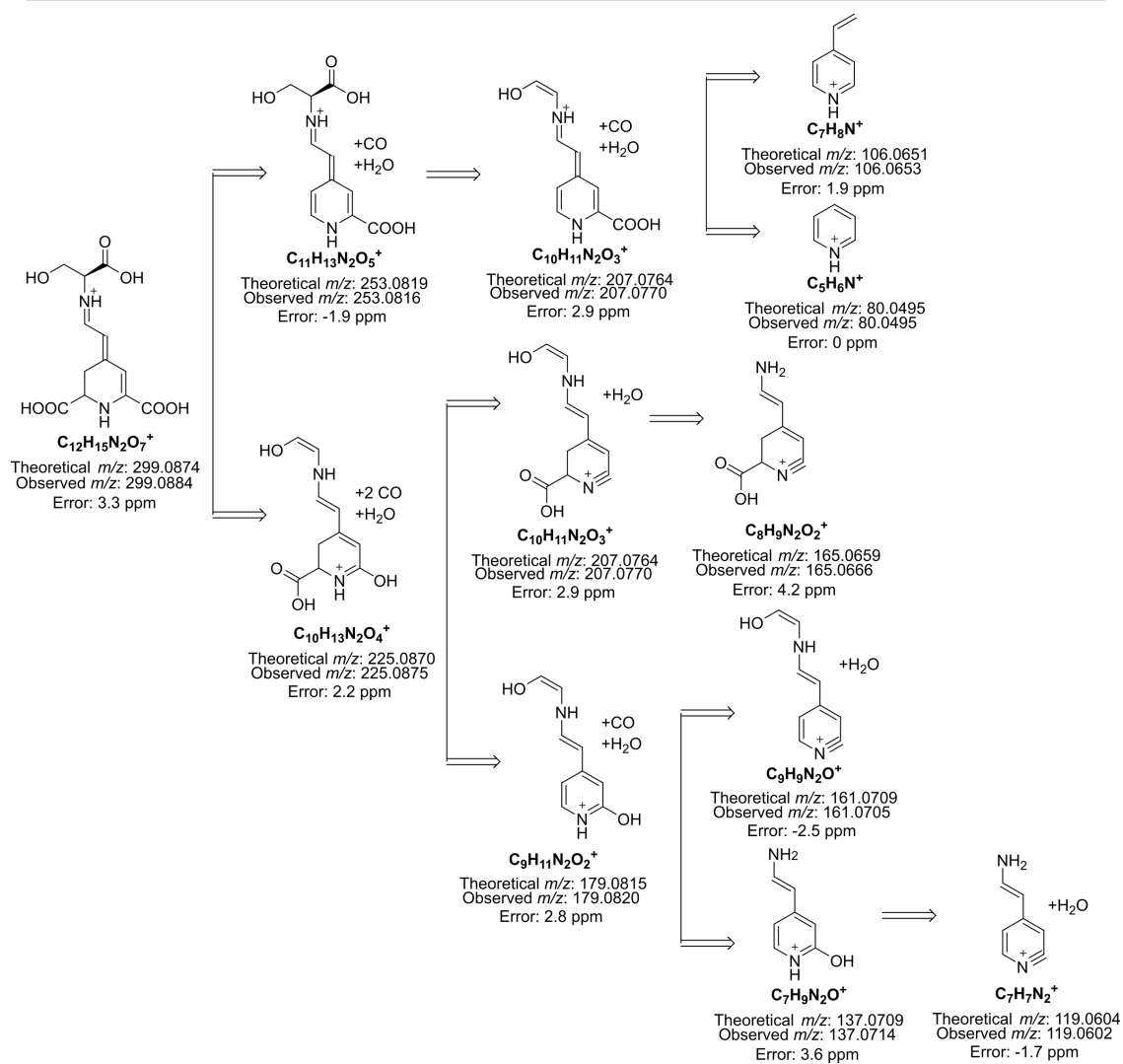
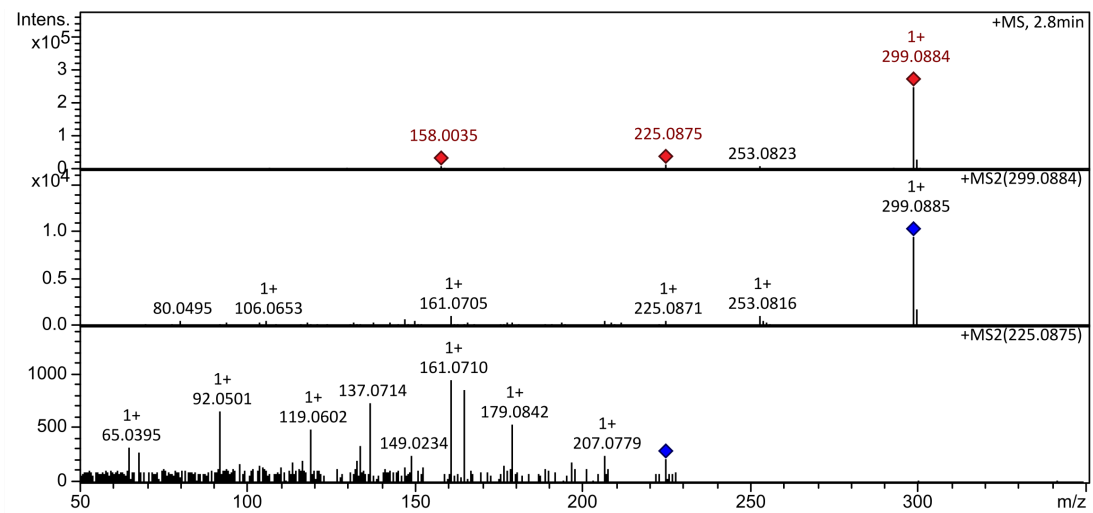
Anexo 17. Fenilalanina-beta-oxanthina (Phe-Bx).



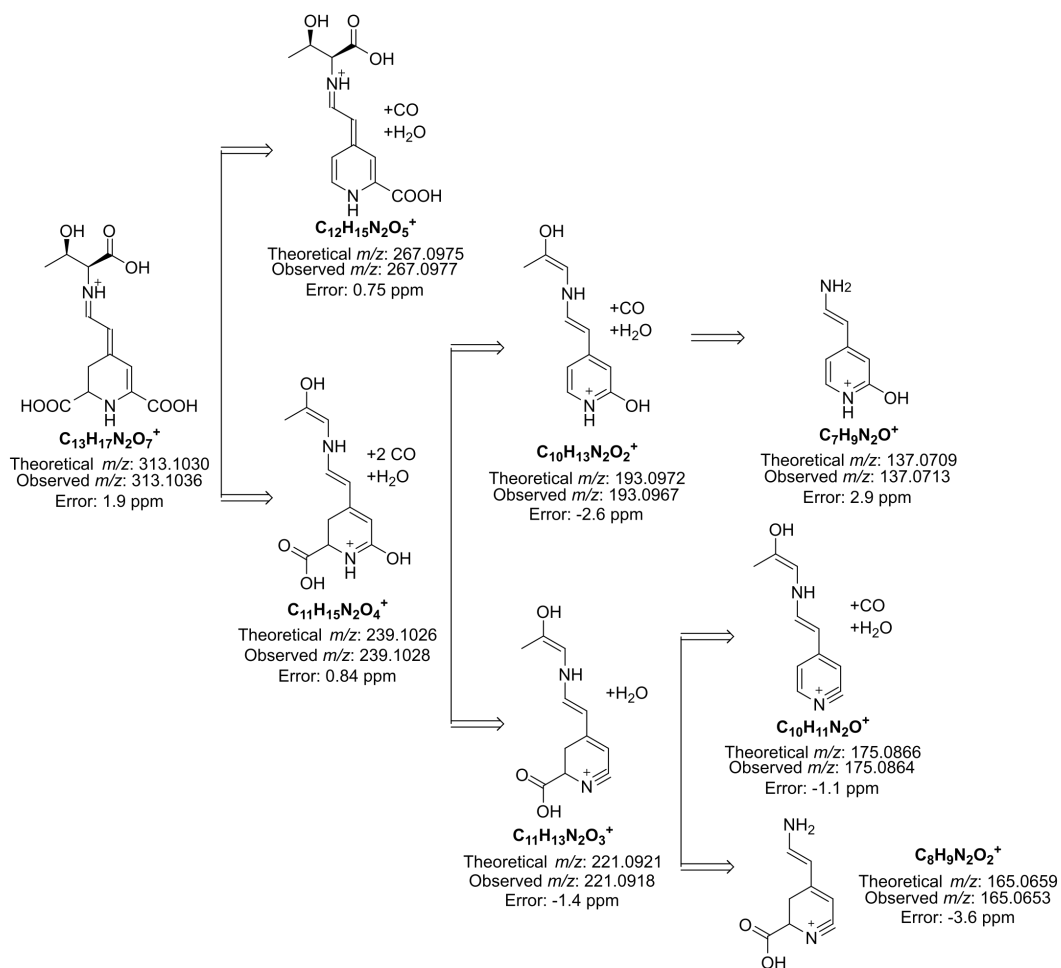
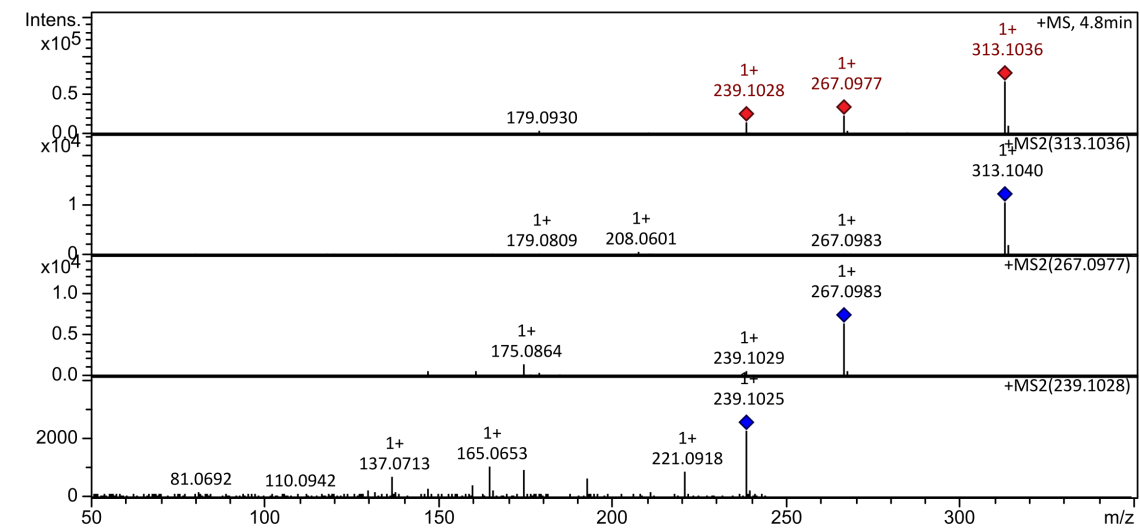
Anexo 18. Prolina-betaxantina (Pro-Bx).



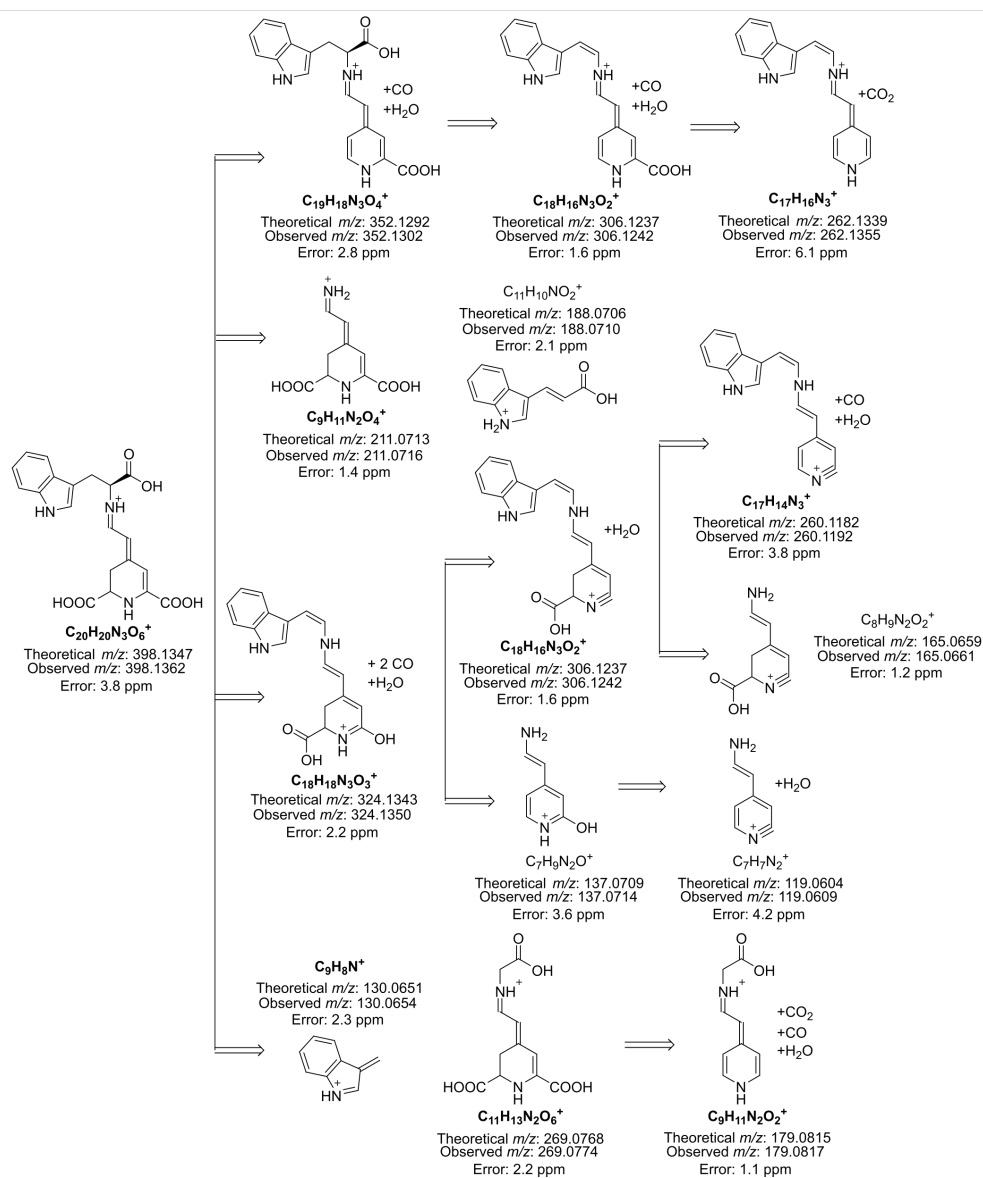
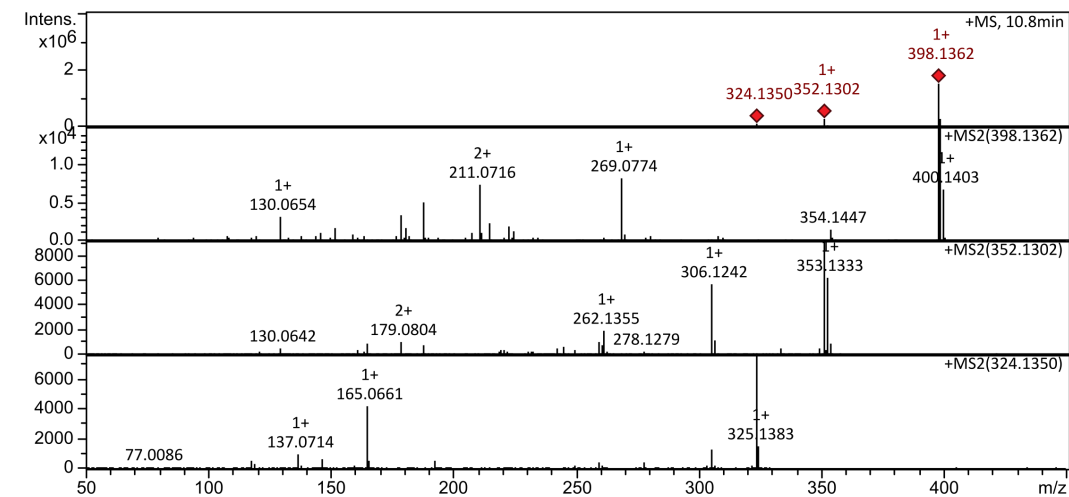
Anexo 19. Pirrolidina-betaxantina (Pyr-Bx).



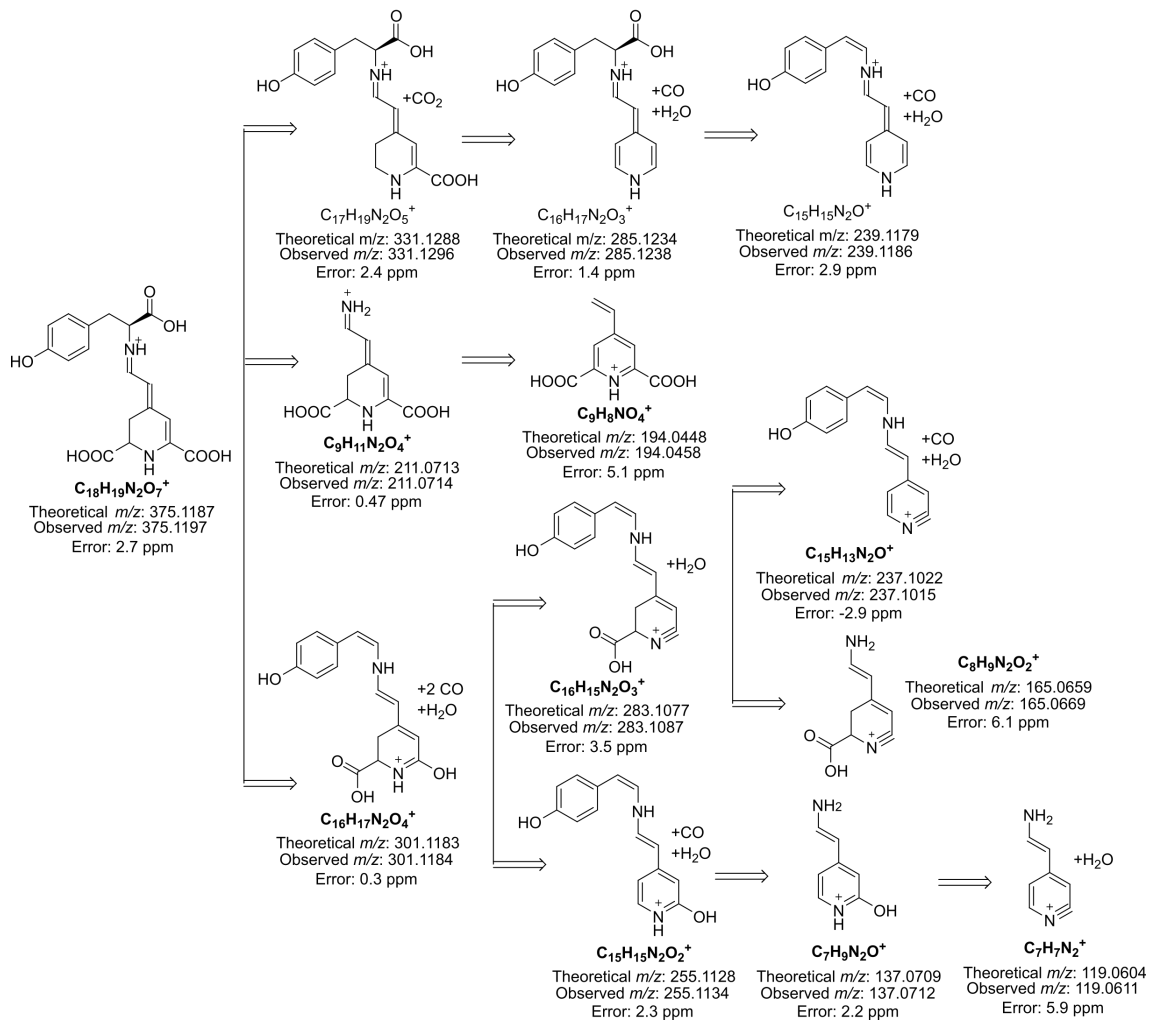
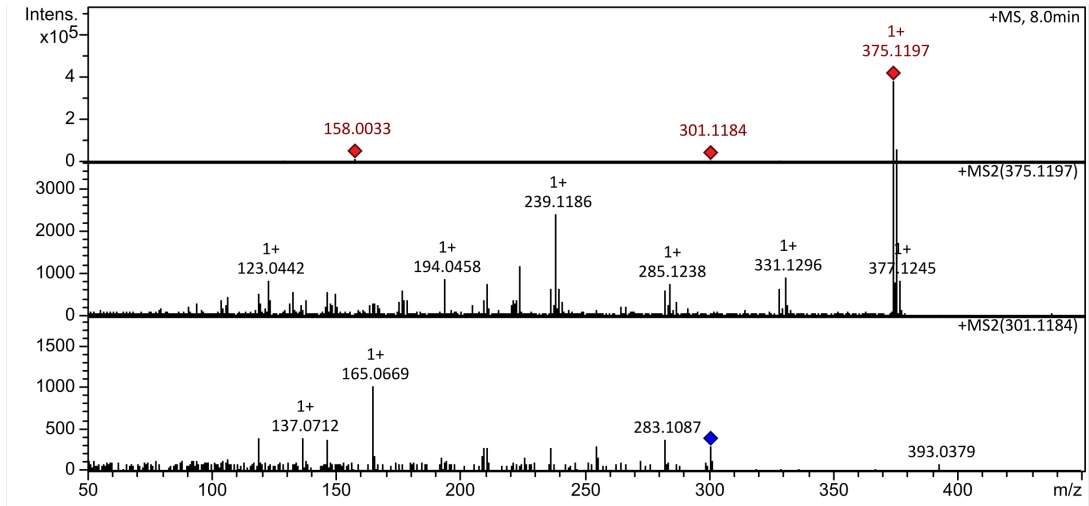
Anexo 20. Serina-betaxantina (Ser-Bx).



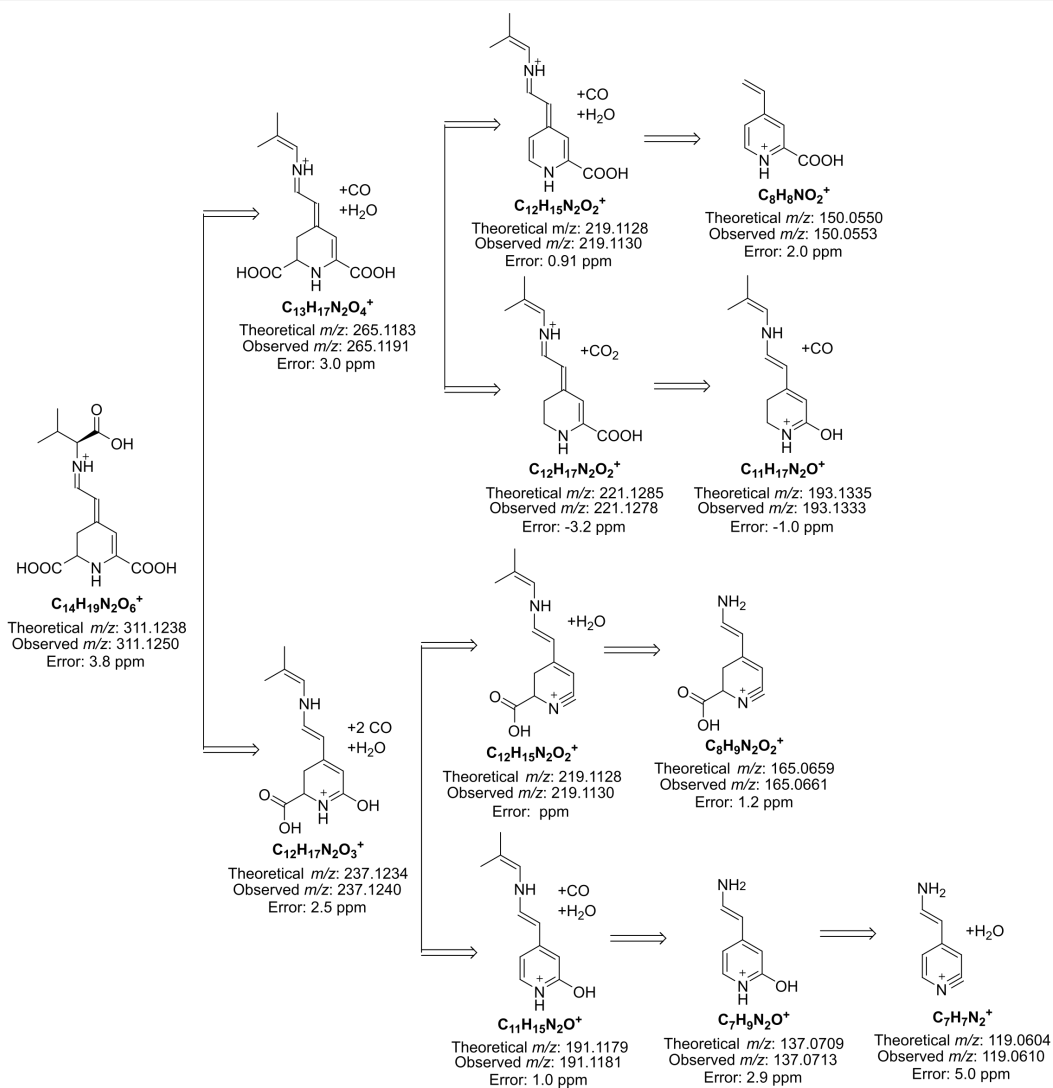
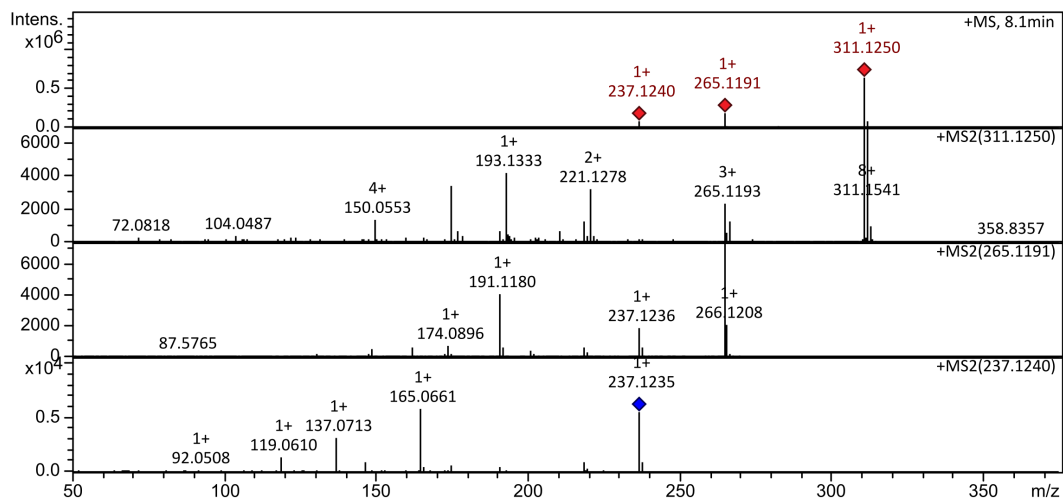
Anexo 21. Treonina-betaxantina (Thr-Bx).



Anexo 22. Triptofano-betaxantina (Trp-Bx).

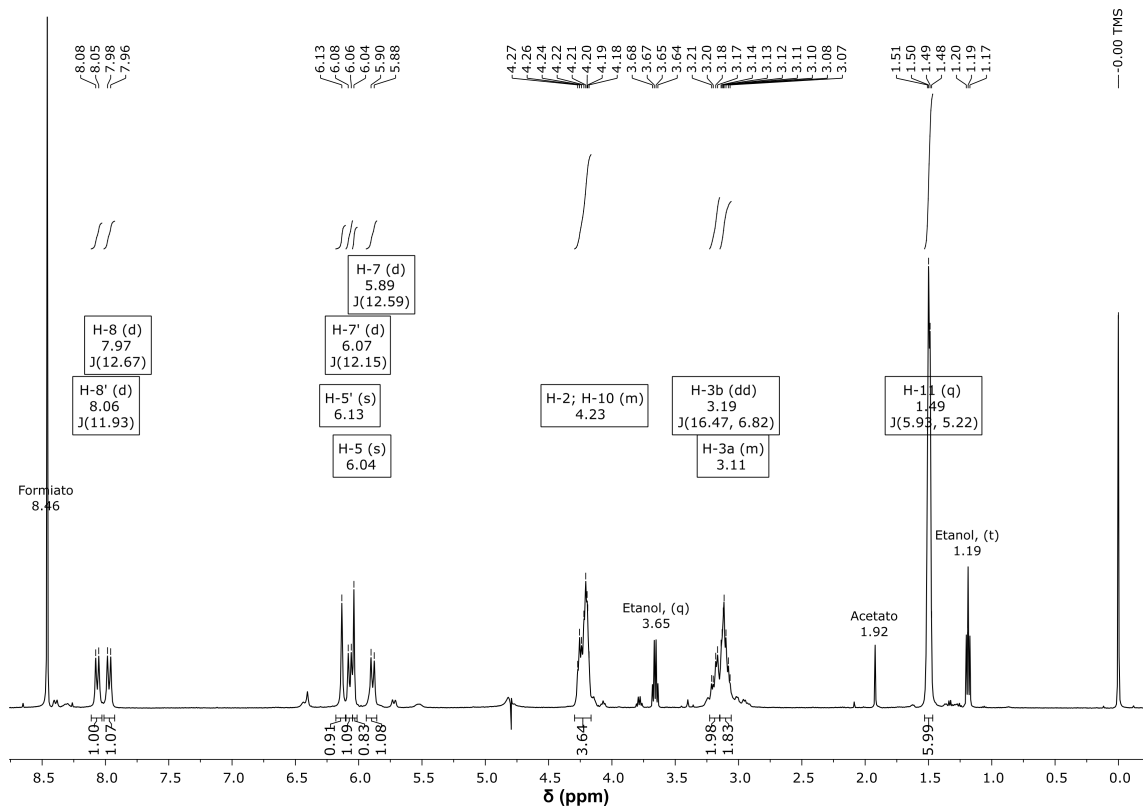


Anexo 23. Tirosina-betaxantina (Tyr-Bx).

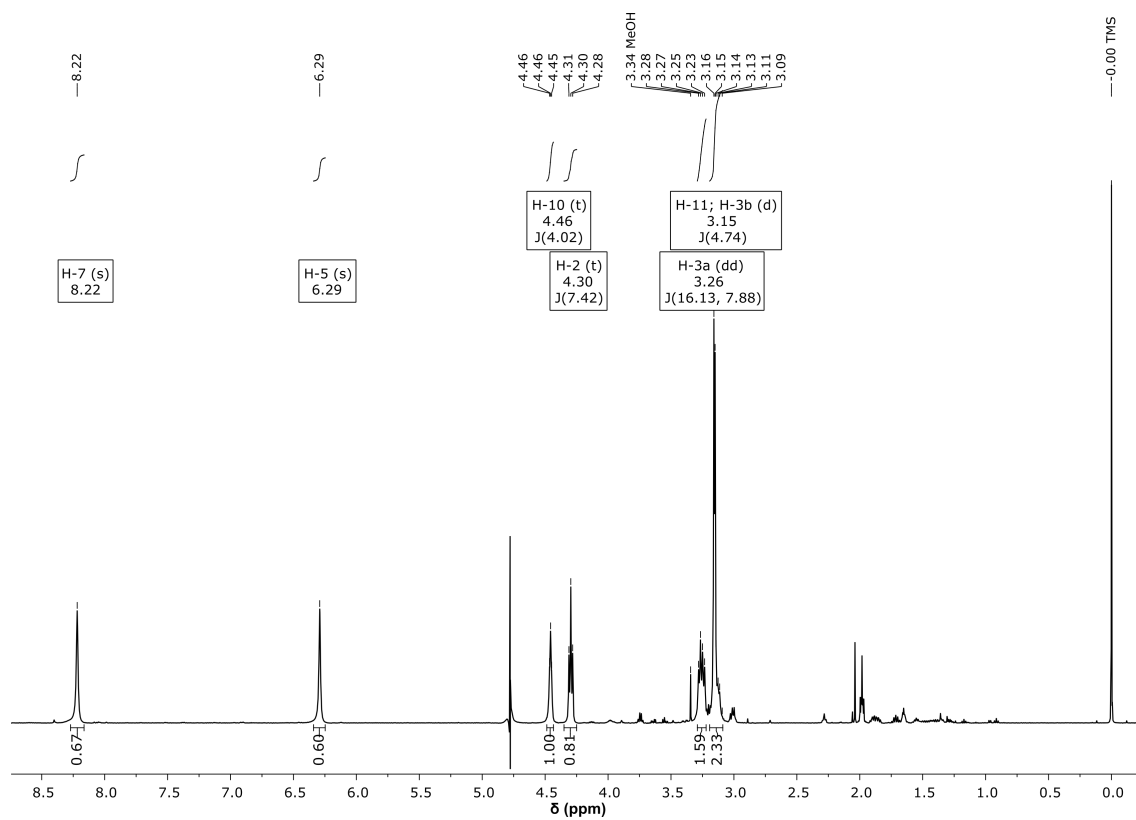


Anexo 24. Valina-betaxantina (Val-Bx).

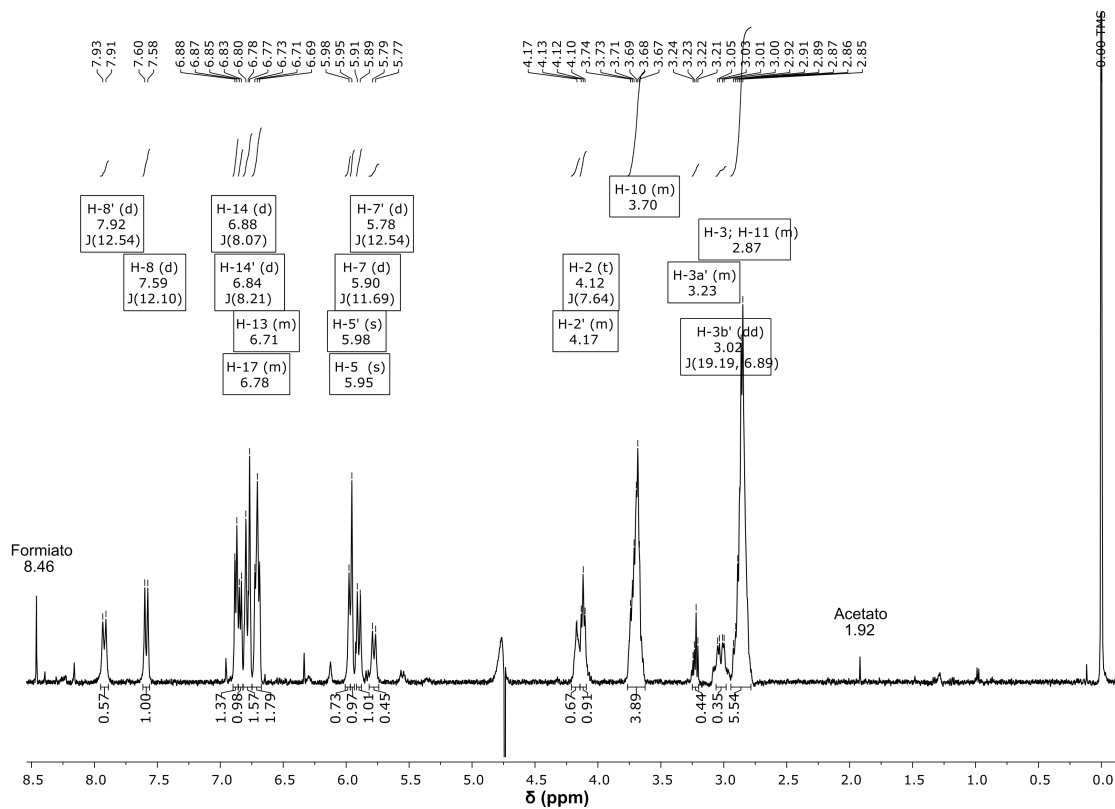
8.2. Espectros de RMN



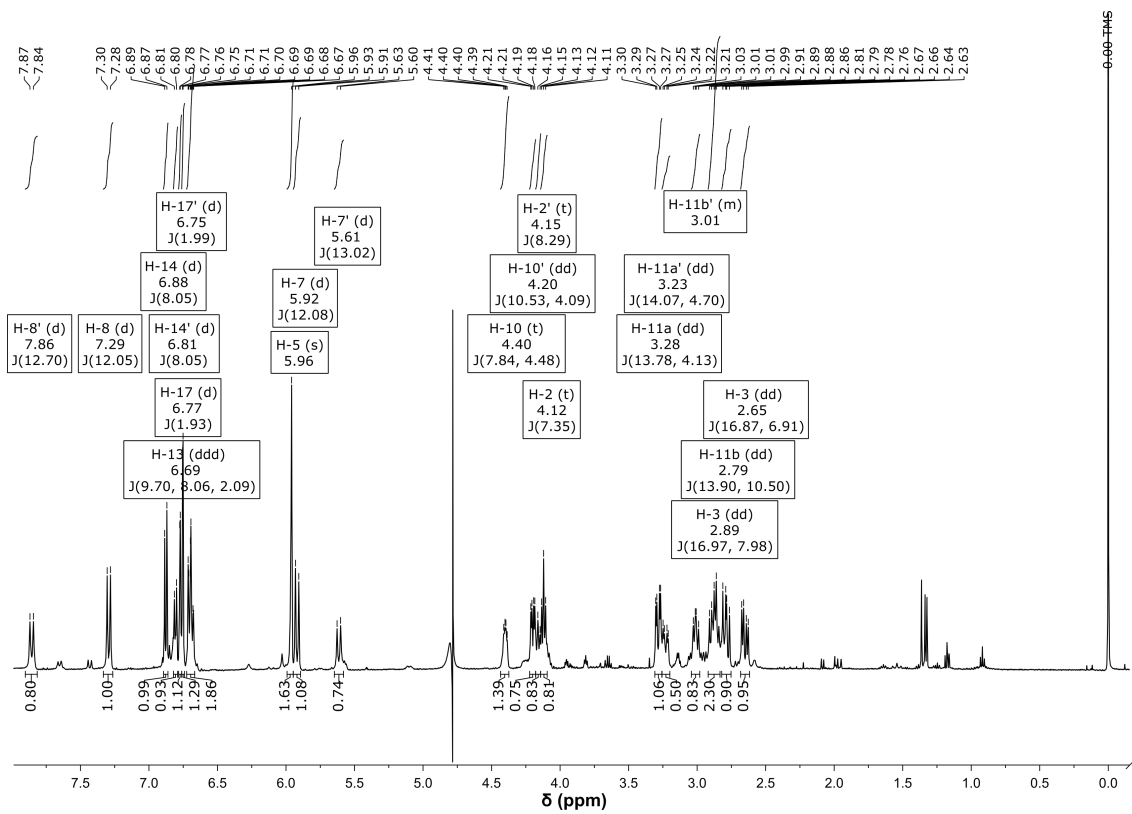
Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H de Ala-Bx, em D_2O a 25 °C.



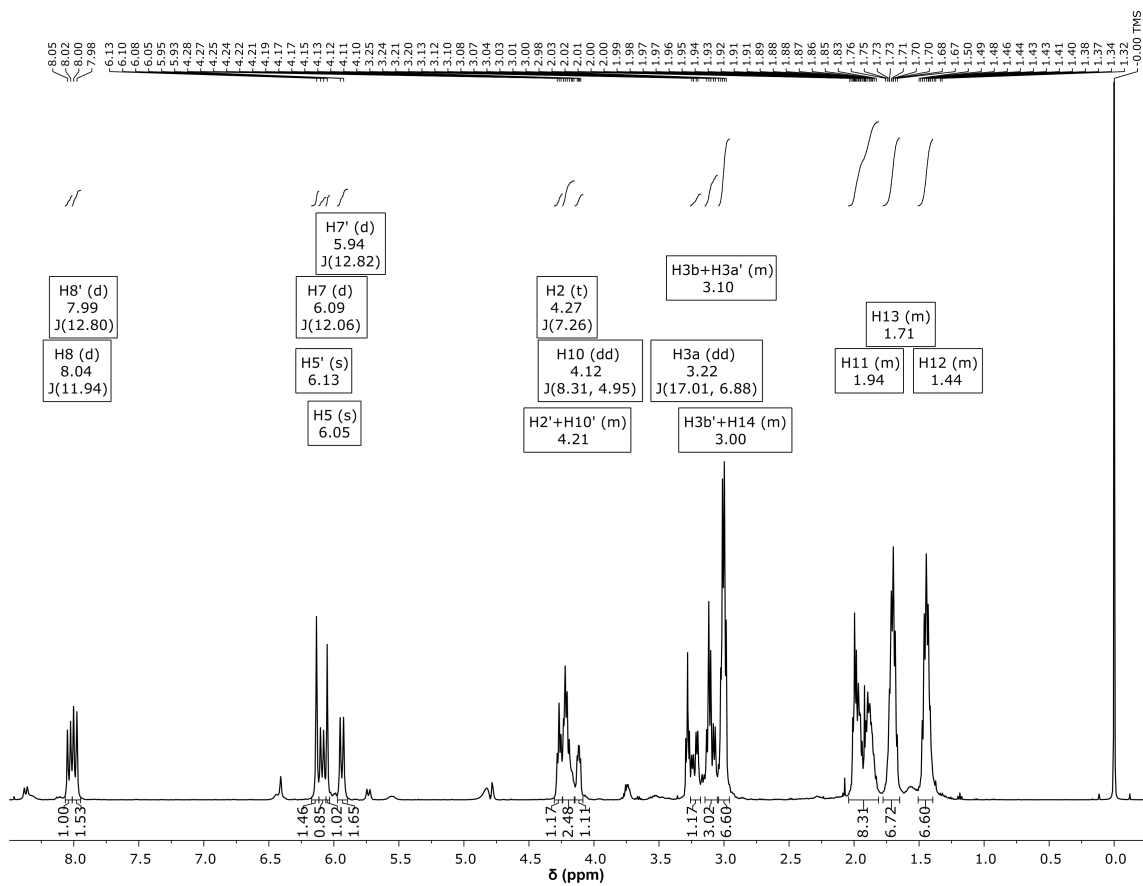
Anexo 26. Espectro de RMN de ^1H de Cys-Bx, em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$.



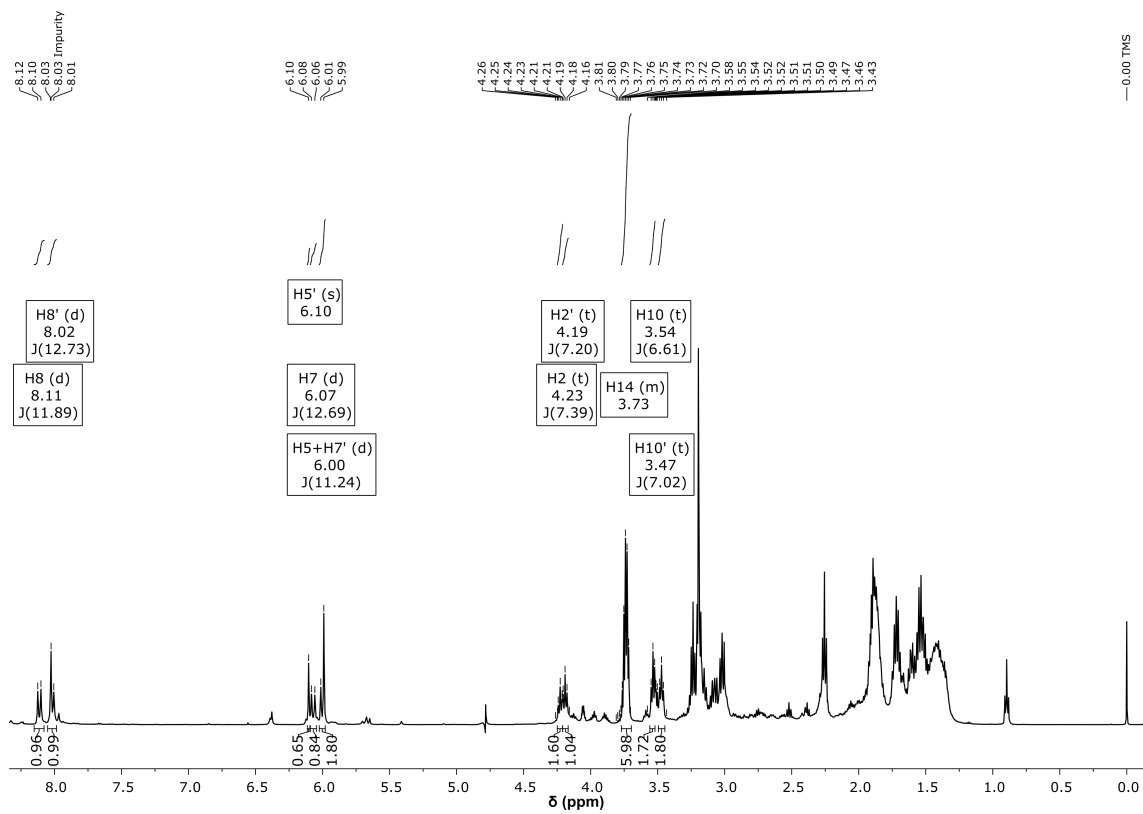
Anexo 27. Espectro de RMN de ^1H de DA-Bx, em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$.



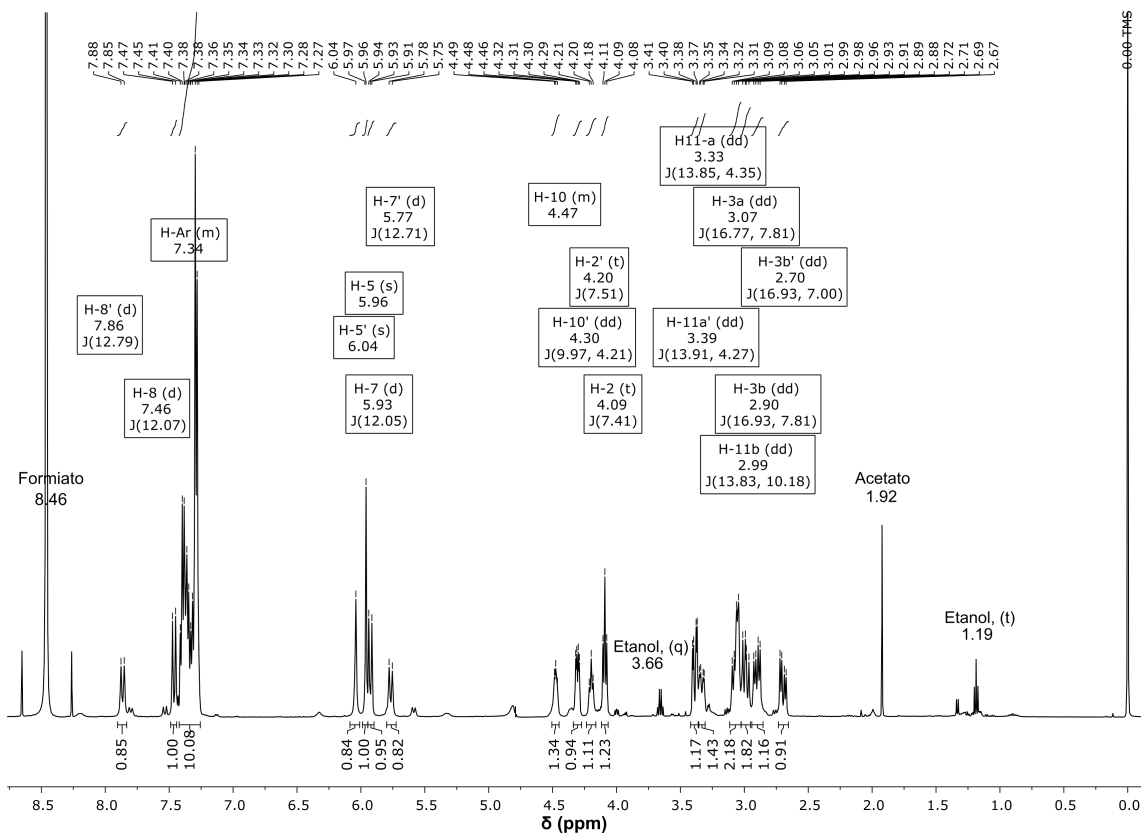
Anexo 28. Espectro de RMN de ^1H de DOPA-Bx, em D_2O a 25 °C.



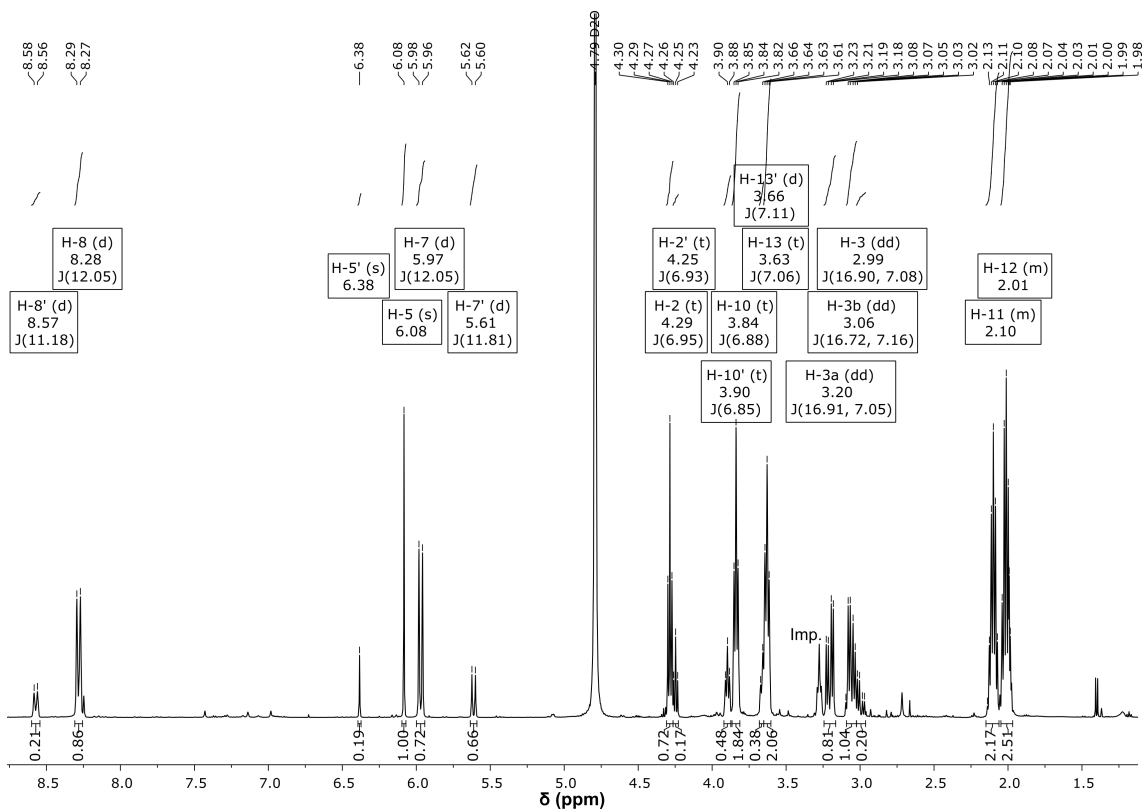
Anexo 29. Espectro de RMN de ^1H de Lys-Bx, em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$.



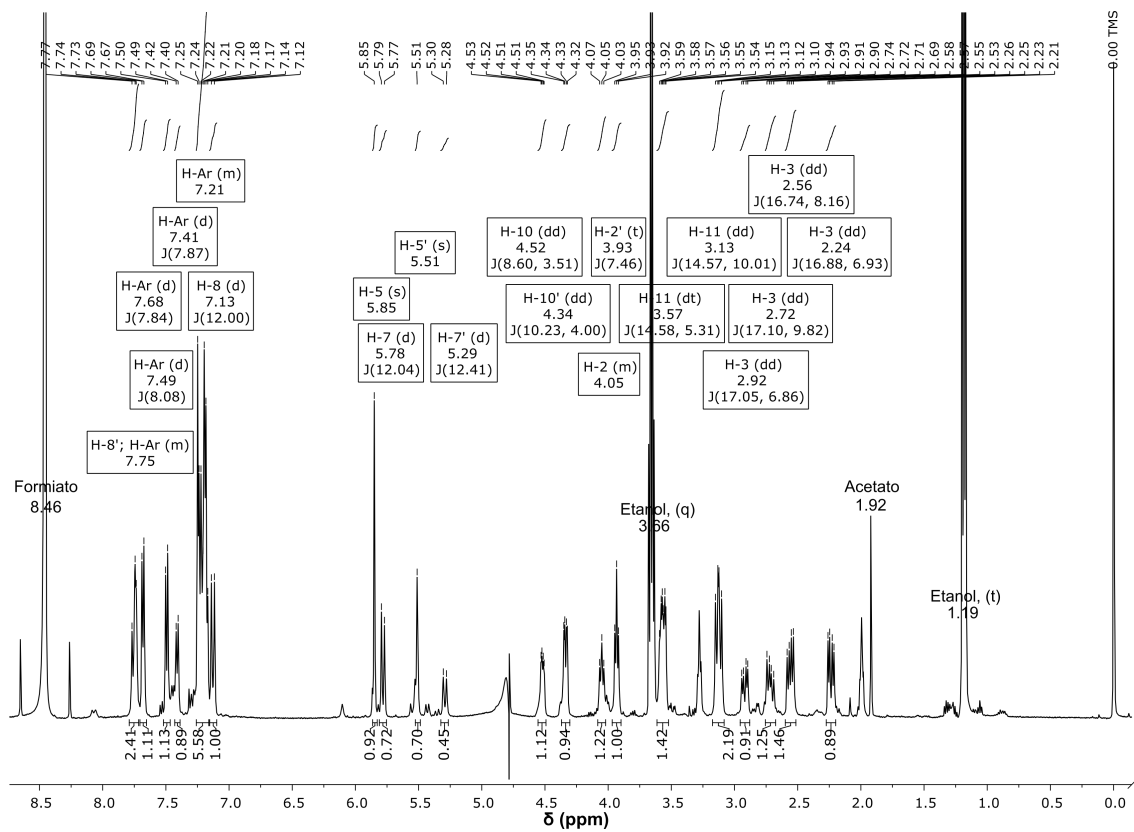
Anexo 30. Espectro de RMN de ^1H de ϵ -Lys-Bx, em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Não foi possível atribuir de maneira inequívoca os sinais correspondentes aos hidrogênios H-3a/b e H-11 – H-13.



Anexo 31. Espectro de RMN de ^1H de Phe-Bx, em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

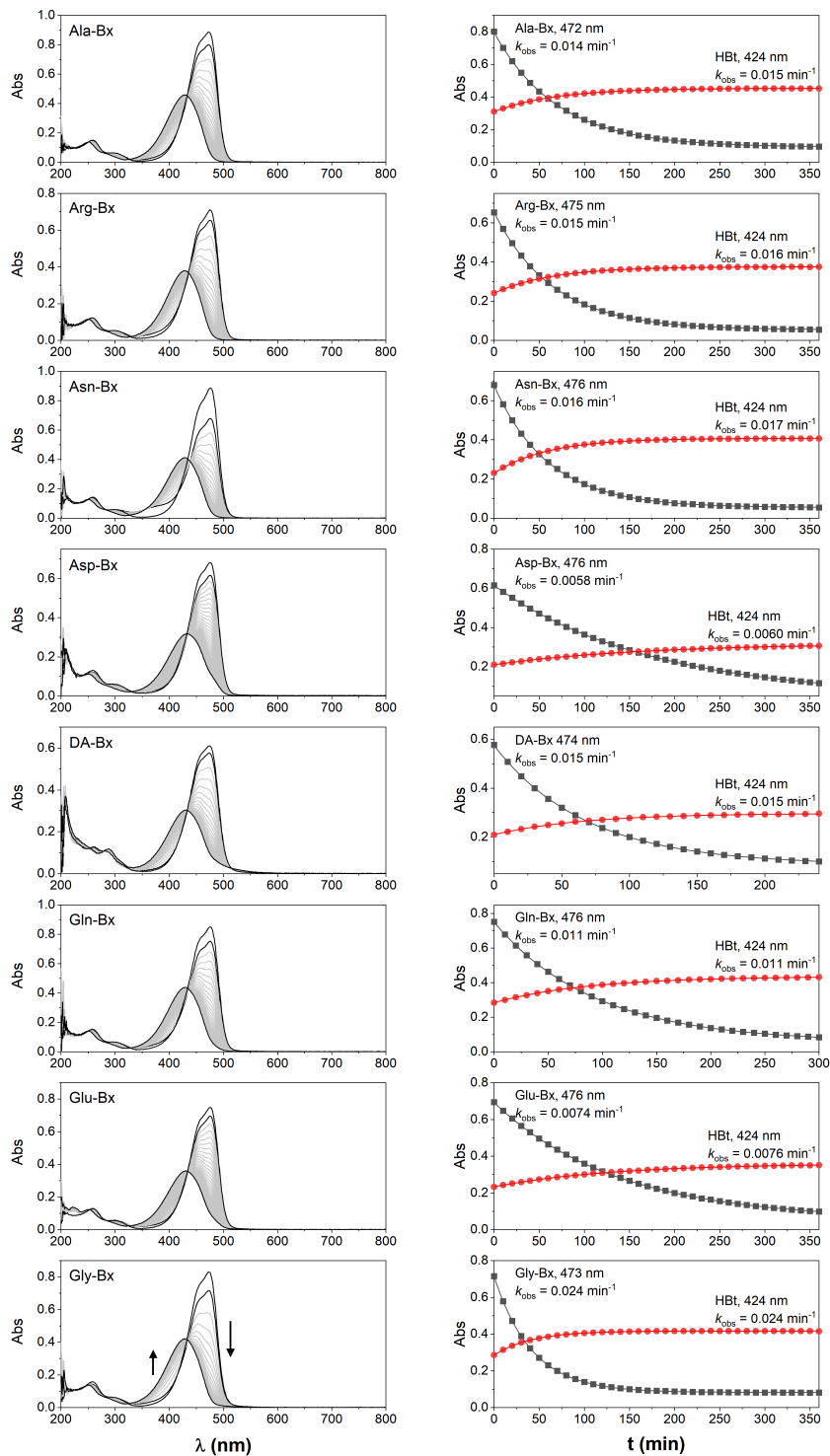


Anexo 32. Espectro de RMN de ^1H de Pyr-Bx, em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

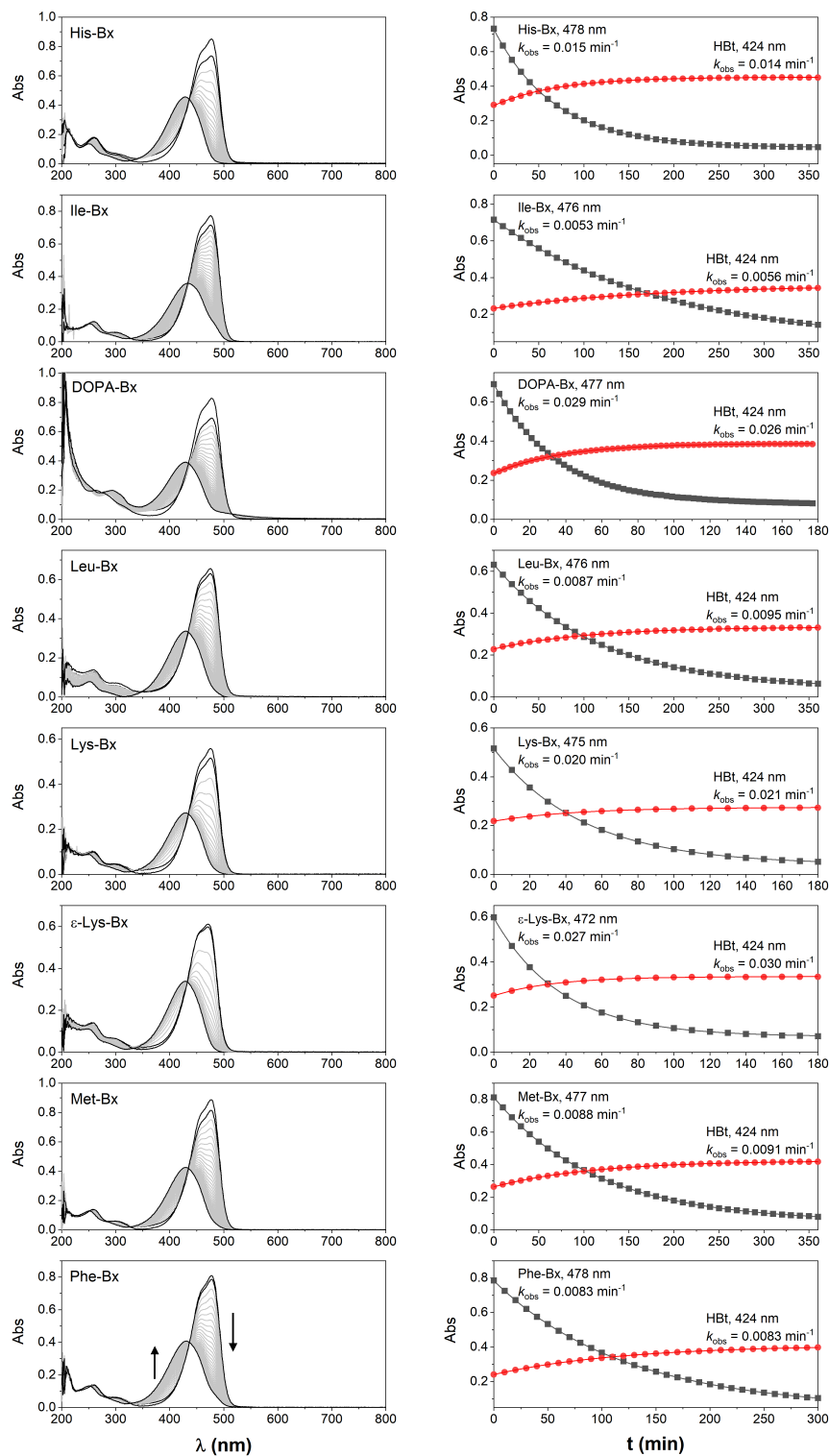


Anexo 33. Espectro de RMN de ^1H de Trp-Bx, em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

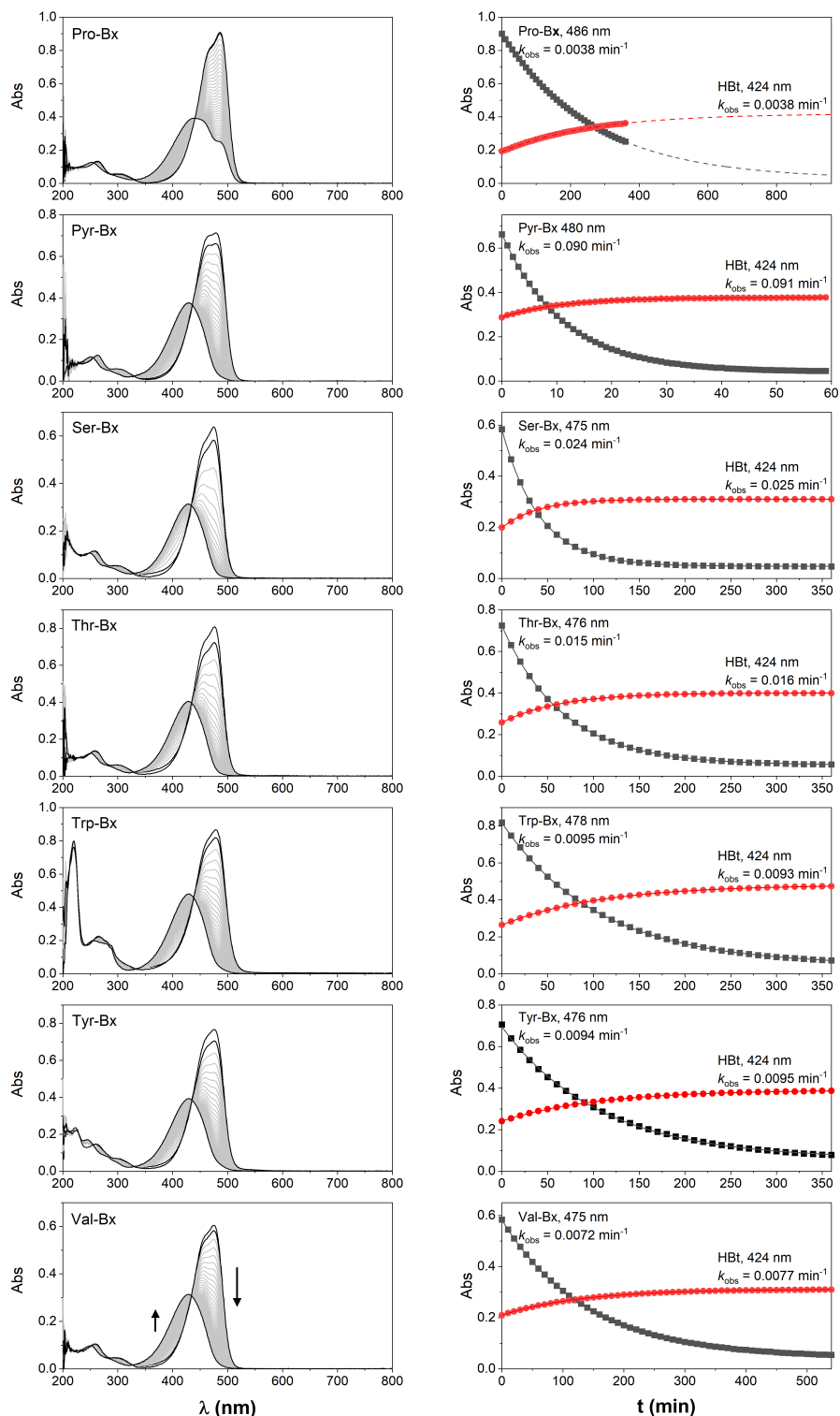
8.3. Coeficiente de absorção molar



Anexo 34. Espectros da variação da absorção em função do tempo para a hidrólise de Ala-Bx, Arg-Bx, Asn-Bx, Asp-Bx, DA-Bx, Gln-Bx, Glu-Bx e Gly-Bx em tampão BR 40 mmol L⁻¹ pH 9,5; e gráficos dos ajustes monoexponenciais dos dados de absorção no máximo de absorção das betaxantinas e em 424 nm (HBT) em função do tempo. As setas indicam a diminuição da absorção das betaxantinas ($\lambda^{Abs} \approx 475 \text{ nm}$) e aumento da absorção do HBT ($\lambda^{Abs} = 424 \text{ nm}$). O espectro de maior intensidade corresponde ao espectro obtido em pH 7 (absorção inicial das betaxantinas).



Anexo 35. Espectros da variação da absorção em função do tempo para a hidrólise de His-Bx, Ile-Bx, DOPA-Bx, Leu-Bx, Lys-Bx, ϵ -Lys-Bx, Met-Bx e Phe-Bx em tampão BR 40 mmol L⁻¹ pH 9,5; e gráficos dos ajustes monoexponenciais dos dados de absorção no máximo de absorção das betaxantinas e em 424 nm (HBT) em função do tempo. As setas indicam a diminuição da absorção das betaxantinas ($\lambda^{Abs} \approx 475$ nm) e aumento da absorção do HBT ($\lambda^{Abs} = 424$ nm). O espectro de maior intensidade corresponde ao espectro obtido em pH 7 (absorção inicial das betaxantinas).



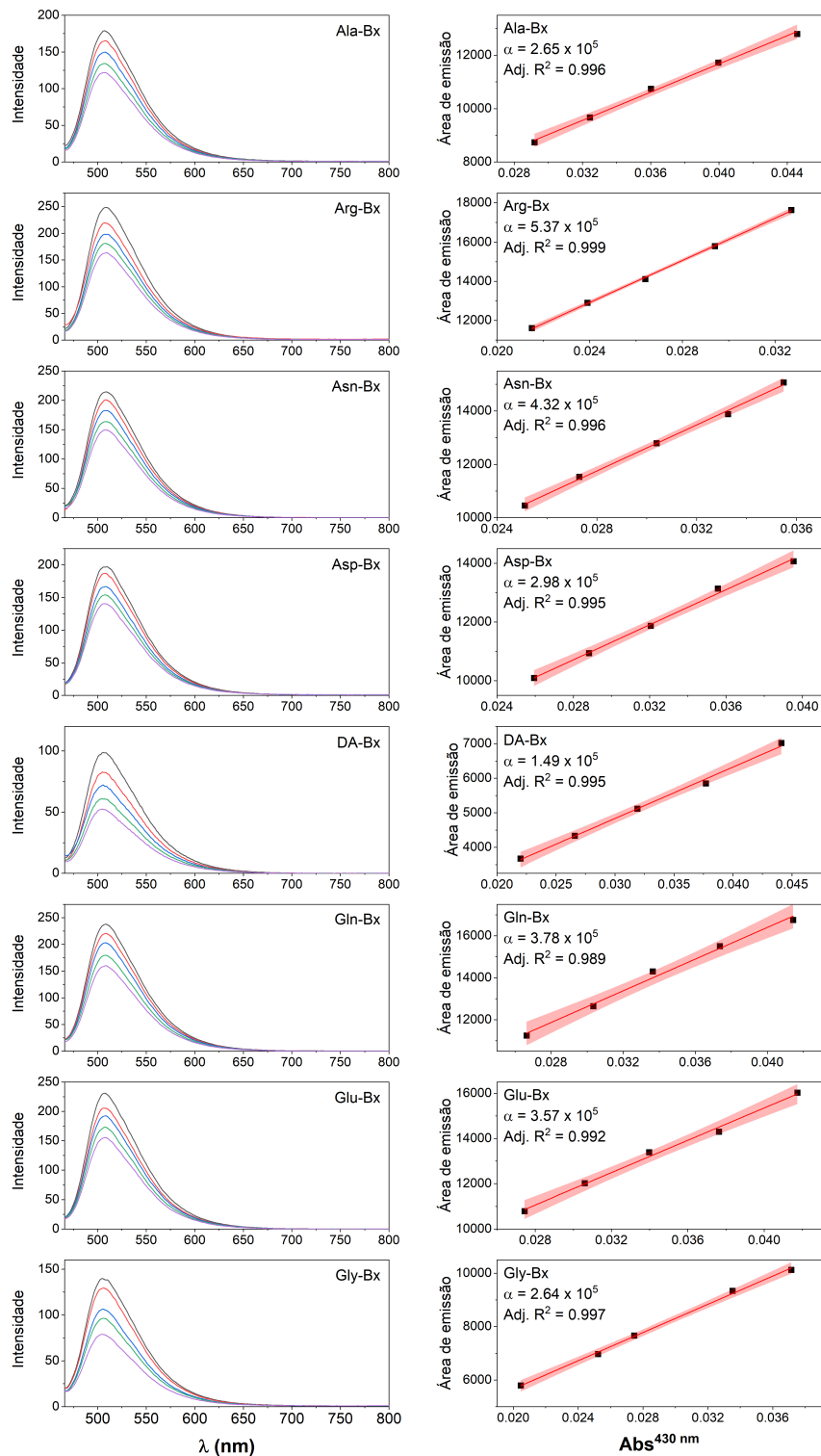
Anexo 36. Espectros da variação da absorção em função do tempo para a hidrólise de Pro-Bx, Pyr-Bx, Ser-Bx, Thr-Bx, Trp-Bx, Tyr-Bx e Val-Bx em tampão BR 40 mmol L⁻¹ pH 9,5; e gráficos dos ajustes monoexponenciais dos dados de absorção no máximo de absorção das betaxantinas e em 424 nm (HBt) em função do tempo. As setas indicam a diminuição da absorção das betaxantinas ($\lambda^{Abs} \approx 475$ nm) e aumento da absorção do HBt ($\lambda^{Abs} = 424$ nm). O espectro de maior intensidade corresponde ao espectro obtido em pH 7 (absorção inicial das betaxantinas).

Tabela Anexo 2. Valores usados no cálculo do coeficiente de absorção molar e pH no qual o ensaio foi realizado.

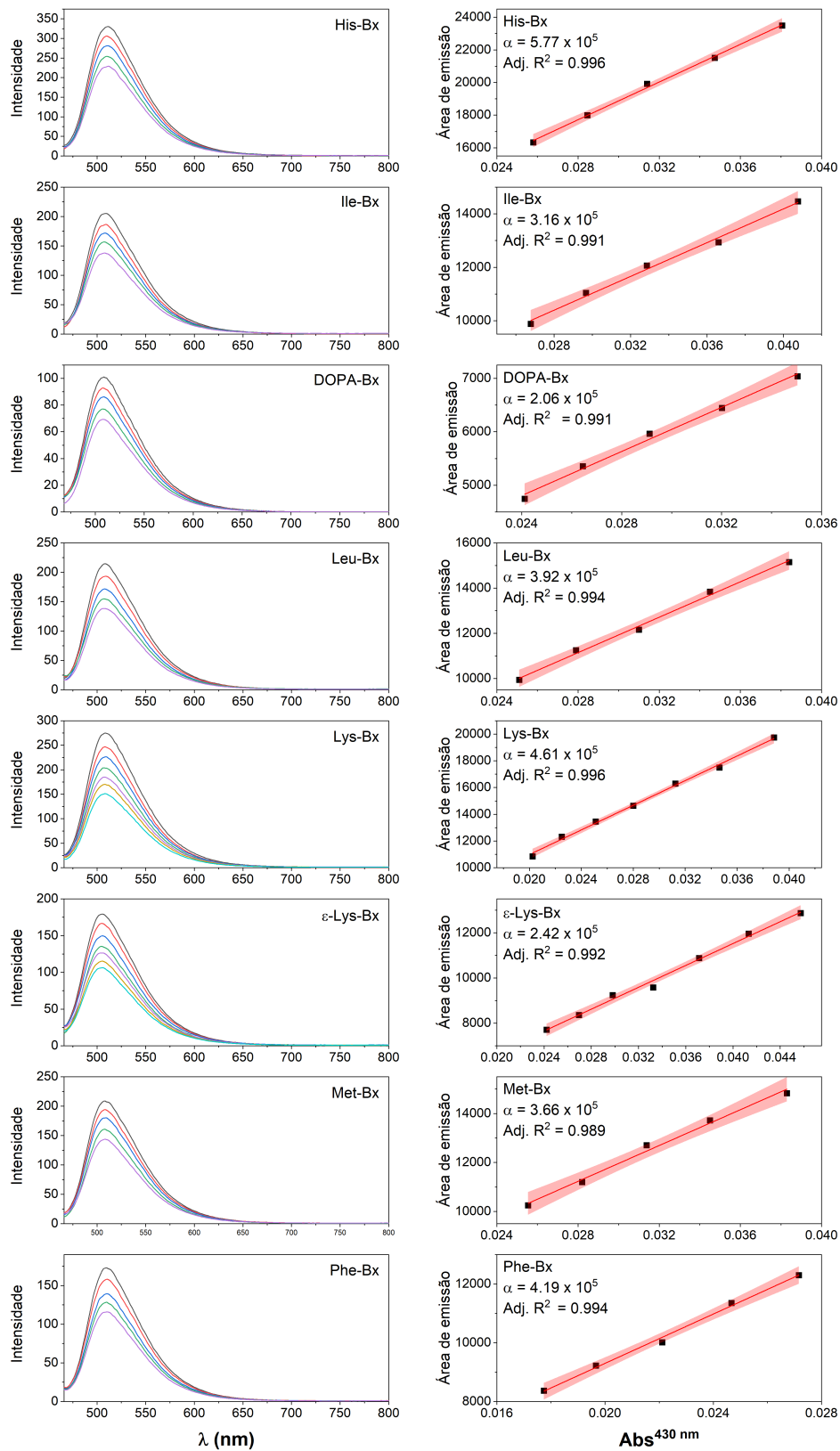
Composto	$A_{\text{bet},0}^a$	$A_{\text{HBT},\infty}^b$	pH
Ala-Bx	0,88721	0,45293	9,5
Arg-Bx	0,71094	0,37535	9,5
Asn-Bx	0,8864	0,40732	9,5
Asp-Bx	0,68117	0,31901	9,5
DA-Bx	0,61102	0,29646	9,5
Gln-Bx	0,84866	0,43615	9,5
Glu-Bx	0,74893	0,35945	9,5
Gly-Bx	0,82993	0,41644	9,5
His-Bx	0,85135	0,4519	9,5
Ile-Bx	0,77335	0,36018	9,5
DOPA-Bx	0,82741	0,38781	10
Leu-Bx	0,65681	0,33389	9,5
Lys-Bx	0,55903	0,27407	9,5
ϵ-Lys-Bx	0,61099	0,33505	9,5
Met-Bx	0,88689	0,42423	9,5
Phe-Bx	0,80914	0,41127	9,5
Pro-Bx	0,90837	0,41932	9,5
Pyr-Bx	0,71278	0,3768	10,5
Ser-Bx	0,63836	0,31017	9,5
Thr-Bx	0,80771	0,40036	9,5
Trp-Bx	0,86702	0,48152	9,5
Tyr-Bx	0,76853	0,39132	9,5
Val-Bx	0,60543	0,31161	9,5

^a Valor da absorção no comprimento de onda máximo para o espectro obtido em pH 7; ^b valores obtidos a partir do ajuste exponencial (y_0).

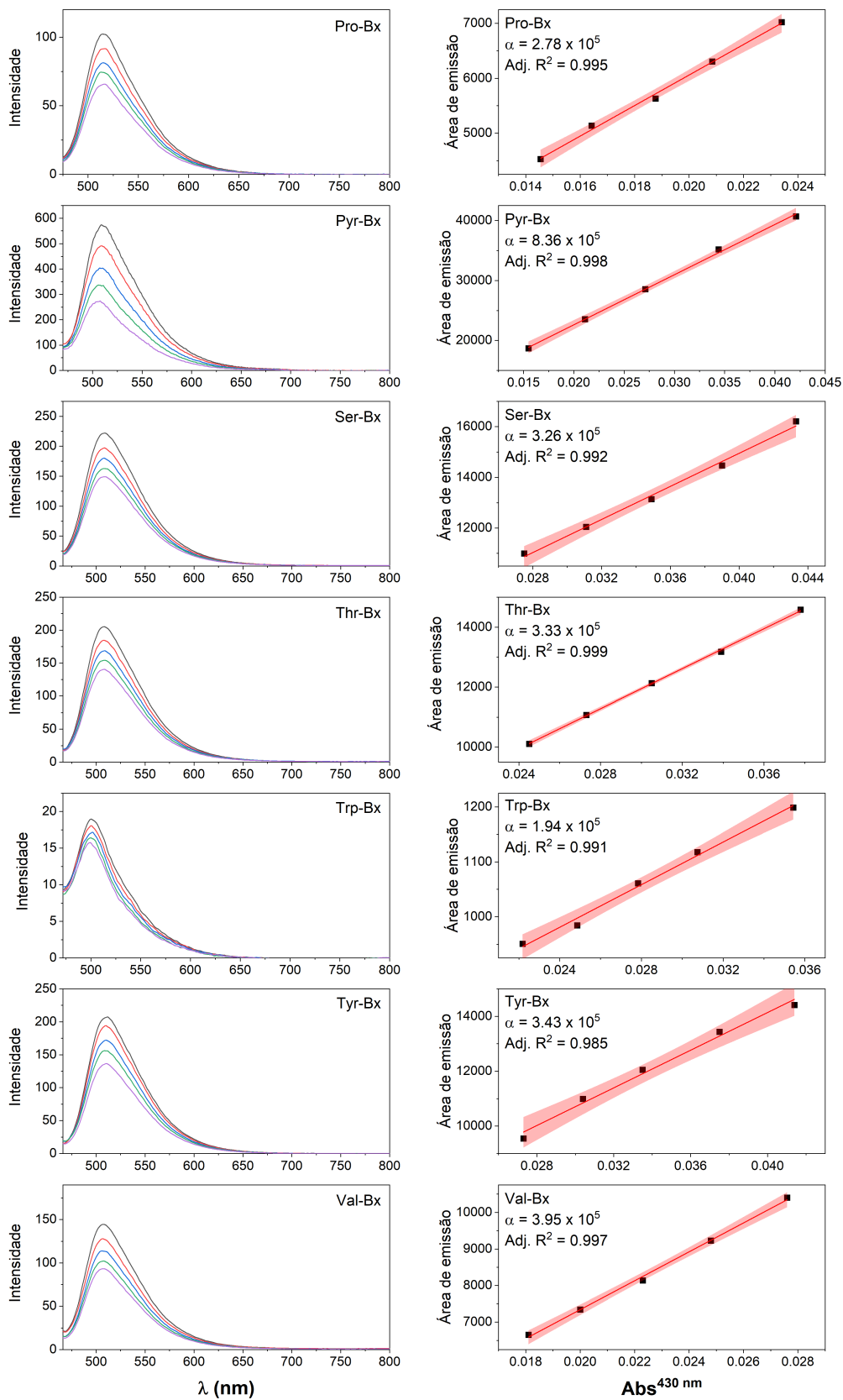
8.4. Rendimento quântico de fluorescência



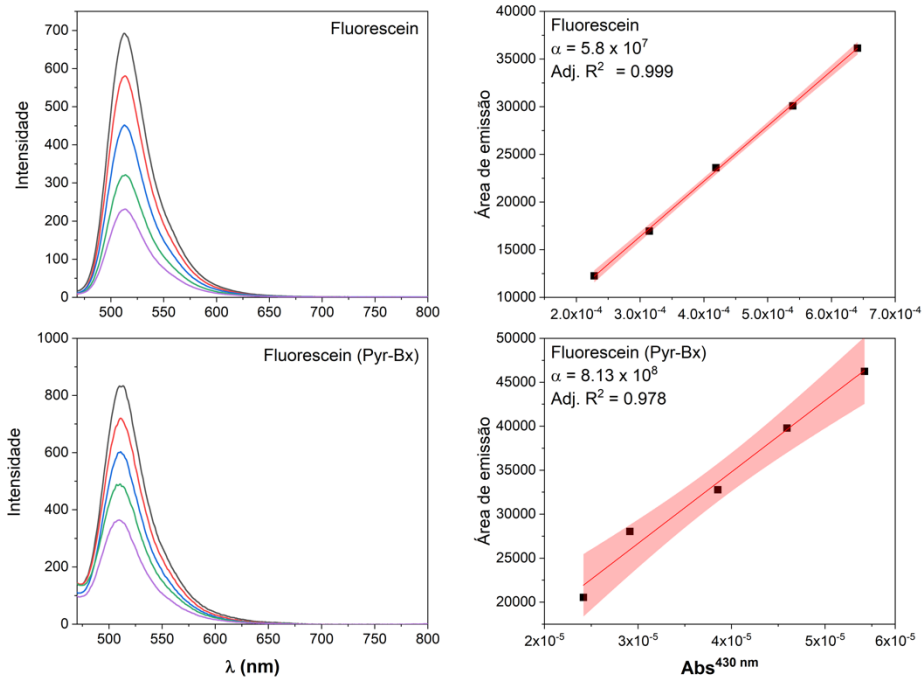
Anexo 37. Espectros de emissão de fluorescência de Ala-Bx, Arg-Bx, Asn-Bx, Asp-Bx, DA-Bx, Gln-Bx, Glu-Bx e Gly-Bx ($\lambda^{\text{Ex}} = 430\text{ nm}$; em água) e ajustes lineares da área de emissão em função do valor da absorção.



Anexo 38. Espectros de emissão de fluorescência de His-Bx, Ile-Bx, DOPA-Bx, Leu-Bx, Lys-Bx, ϵ -Lys-Bx, Met-Bx e Phe-Bx ($\lambda^{\text{Ex}} = 430 \text{ nm}$; em água) e ajustes lineares da área de emissão em função do valor da absorção.

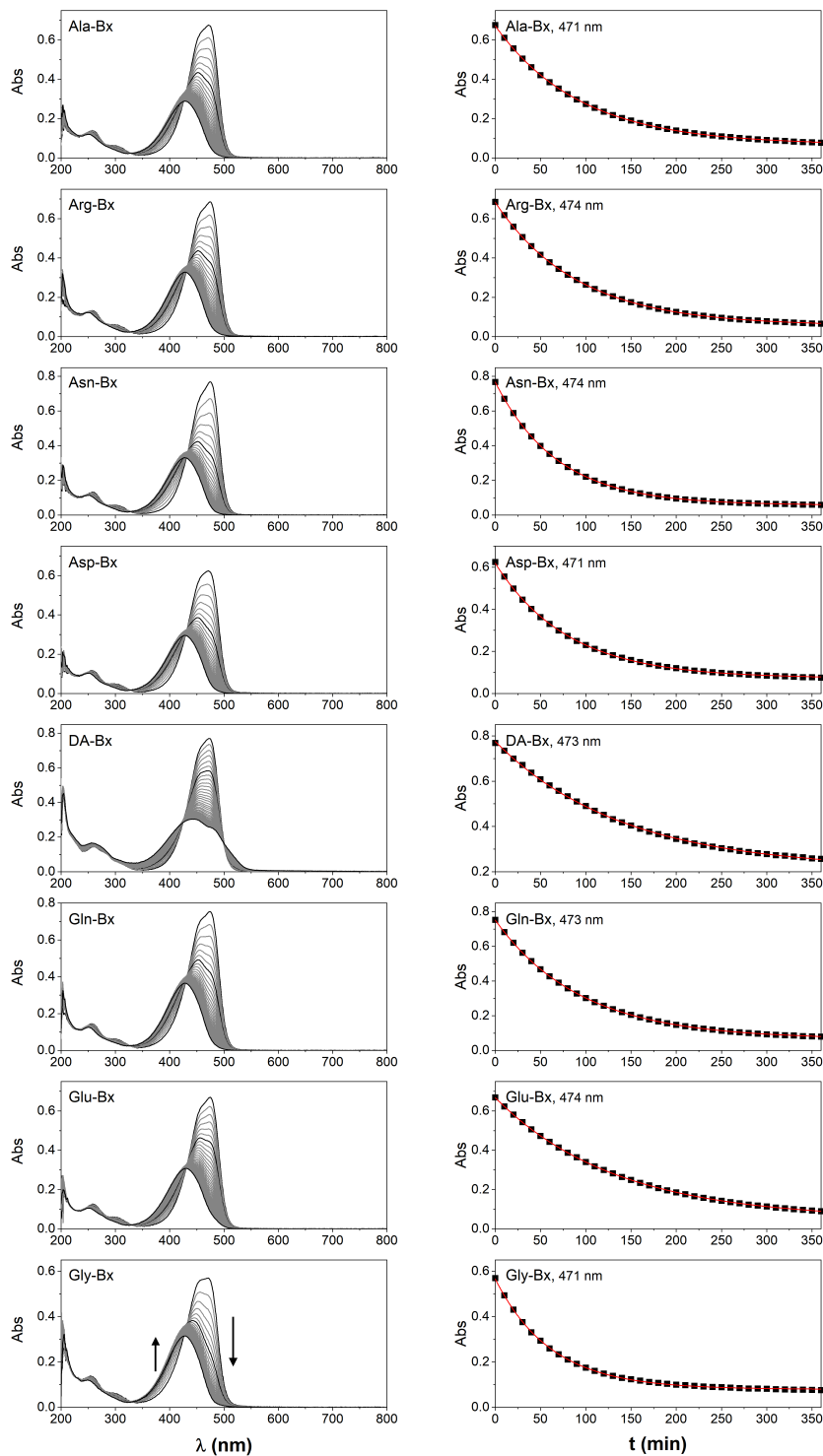


Anexo 39. Espectros de emissão de fluorescência de Pro-Bx, Pyr-Bx, Ser-Bx, Thr-Bx, Trp-Bx, Tyr-Bx e Val-Bx ($\lambda^{Ex} = 430\text{ nm}$; em água) e ajustes lineares da área de emissão em função do valor da absorção.

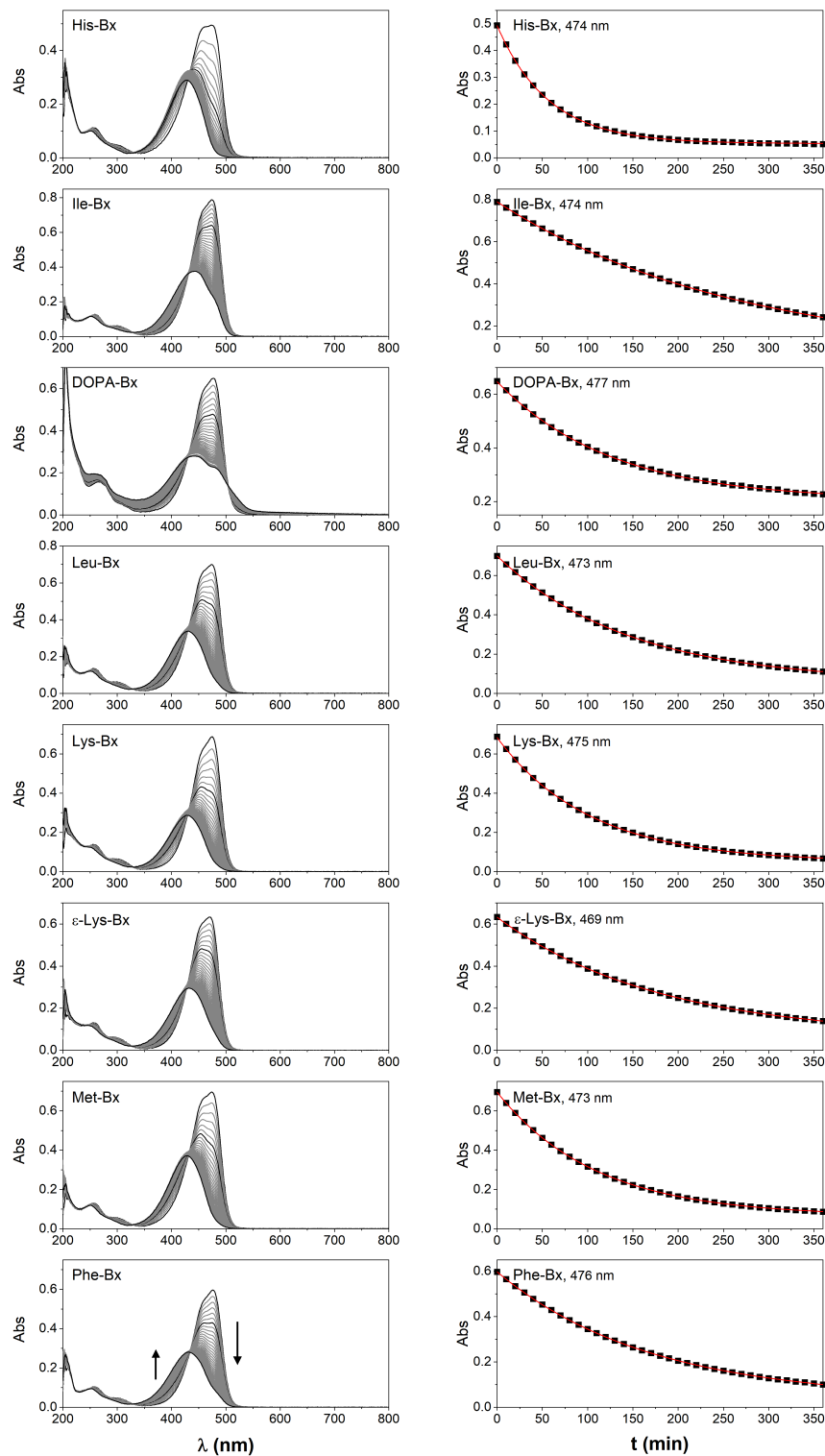


Anexo 40. Espectros de emissão de fluorescência de fluoresceína ($\lambda^{\text{Ex}} = 430 \text{ nm}$) e ajustes lineares da área de emissão em função do valor da absorção.

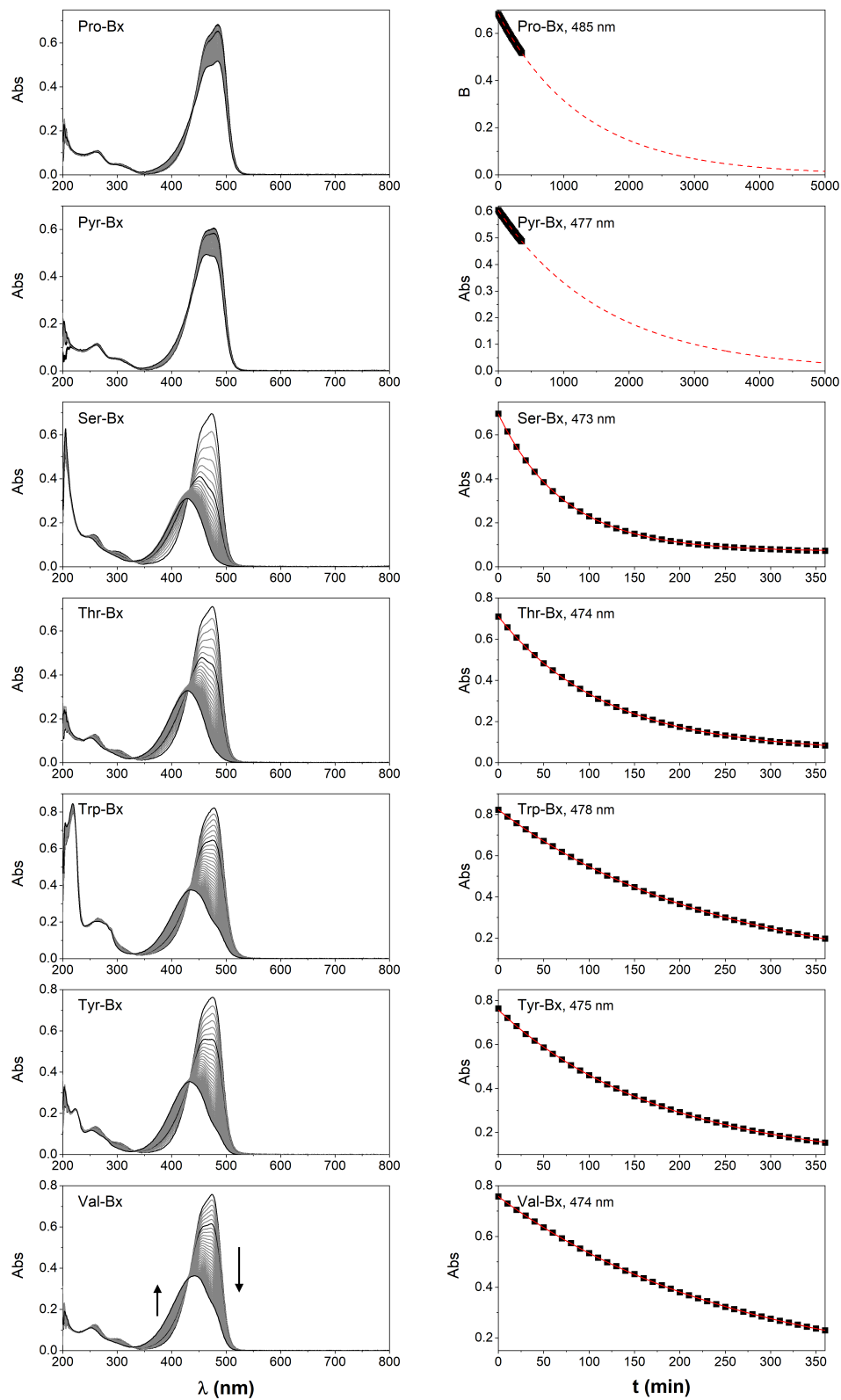
8.5. Estabilidade hidrolítica



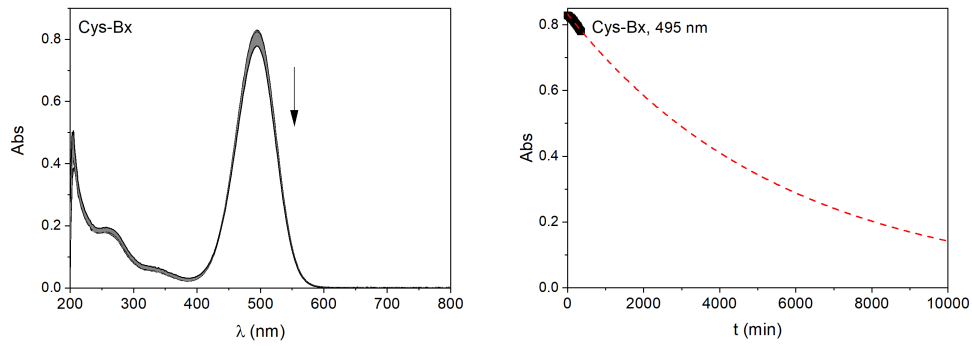
Anexo 41. Espectros da variação da absorção em função do tempo para a hidrólise de Ala-Bx, Arg-Bx, Asn-Bx, Asp-Bx, DA-Bx, Gln-Bx, Glu-Bx e Gly-Bx em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7 a 50 °C; e gráficos dos ajustes monoexponenciais dos dados de absorção no máximo de absorção das betaxantinas em função do tempo. As setas indicam a diminuição da absorção das betaxantinas ($\lambda^{\text{Abs}} \approx 475$ nm) e aumento da absorção do HBt ($\lambda^{\text{Abs}} \approx 428$ nm). Os espectros destacados em preto são os espectros obtidos nos tempos t_0 , $t = 1$ h e $t = 6$ h.



Anexo 42. Espectros da variação da absorção em função do tempo para a hidrólise de His-Bx, Ile-Bx, DOPA-Bx, Leu-Bx, Lys-Bx, ϵ -Lys-Bx, Met-Bx e Phe-Bx em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7 a 50 °C; e gráficos dos ajustes monoexponenciais dos dados de absorção no máximo de absorção das betaxantinas em função do tempo. As setas indicam a diminuição da absorção das betaxantinas ($\lambda^{\text{Abs}} \approx 475$ nm) e aumento da absorção do HBT ($\lambda^{\text{Abs}} \approx 428$ nm). Os espectros destacados em preto são os espectros obtidos nos tempos t_0 , $t = 1$ h e $t = 6$ h.

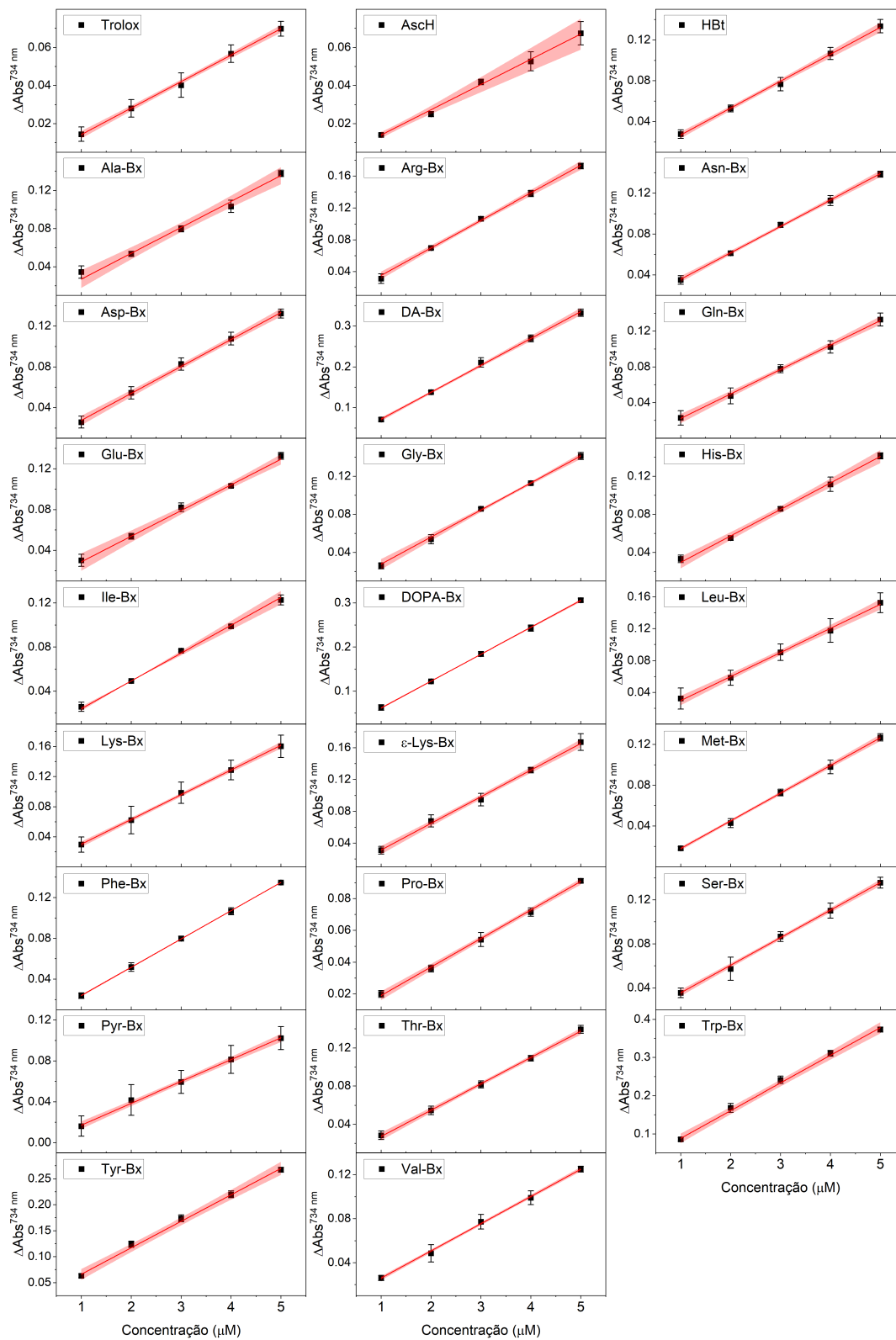


Anexo 43. Espectros da variação da absorção em função do tempo para a hidrólise de Pro-Bx, Pyr-Bx, Ser-Bx, Thr-Bx, Trp-Bx, Tyr-Bx e Val-Bx em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7 a 50 °C; e gráficos dos ajustes monoexponenciais dos dados de absorção no máximo de absorção das betaxantinas em função do tempo. As setas indicam a diminuição da absorção das betaxantinas ($\lambda^{\text{Abs}} \approx 475$ nm) e aumento da absorção do HBt ($\lambda^{\text{Abs}} \approx 428$ nm). Os espectros destacados em preto são os espectros obtidos nos tempos t_0 , $t = 1$ h e $t = 6$ h.

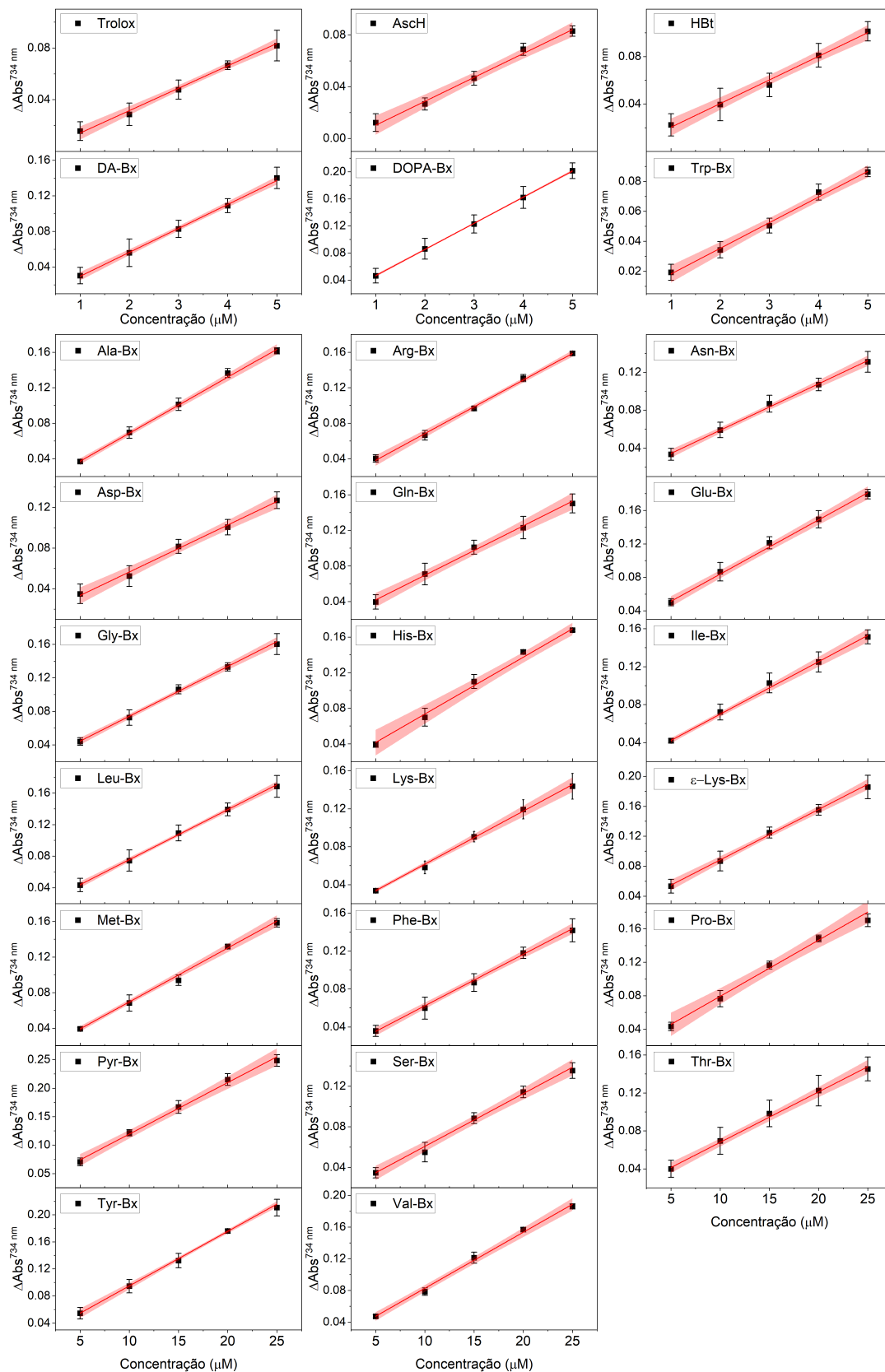


Anexo 44. Espectros da variação da absorção de em função do tempo para a hidrólise de Cys-Bx em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7 a 50 °C; e gráfico do ajuste monoexponencial dos dados de absorção no máximo de absorção ($\lambda^{Abs} = 495$ nm) em função do tempo. A setas indica a diminuição da absorção de Cys-Bx. Os espectros destacados em preto são os espectros obtidos nos tempos t0, t = 1h e t = 6h.

8.6. Propriedades antioxidantes



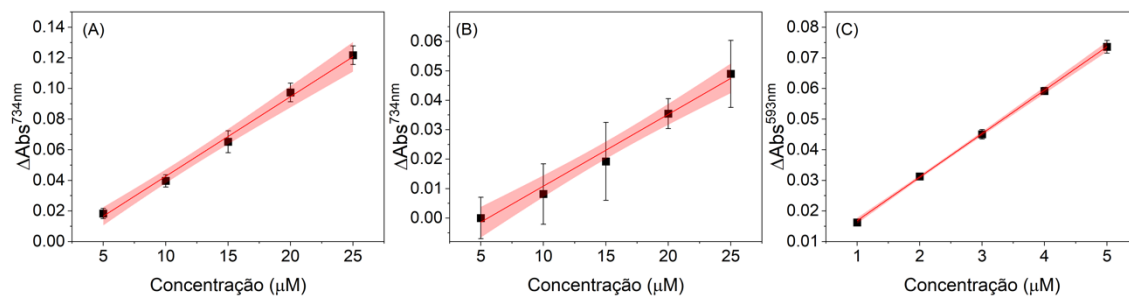
Anexo 45. Variação da absorção (ΔAbs) de ABTS^{++} em 734 nm após 6 minutos de reação em função da concentração de antioxidante, em tampão fosfato 100 mmol L^{-1} , pH 7.



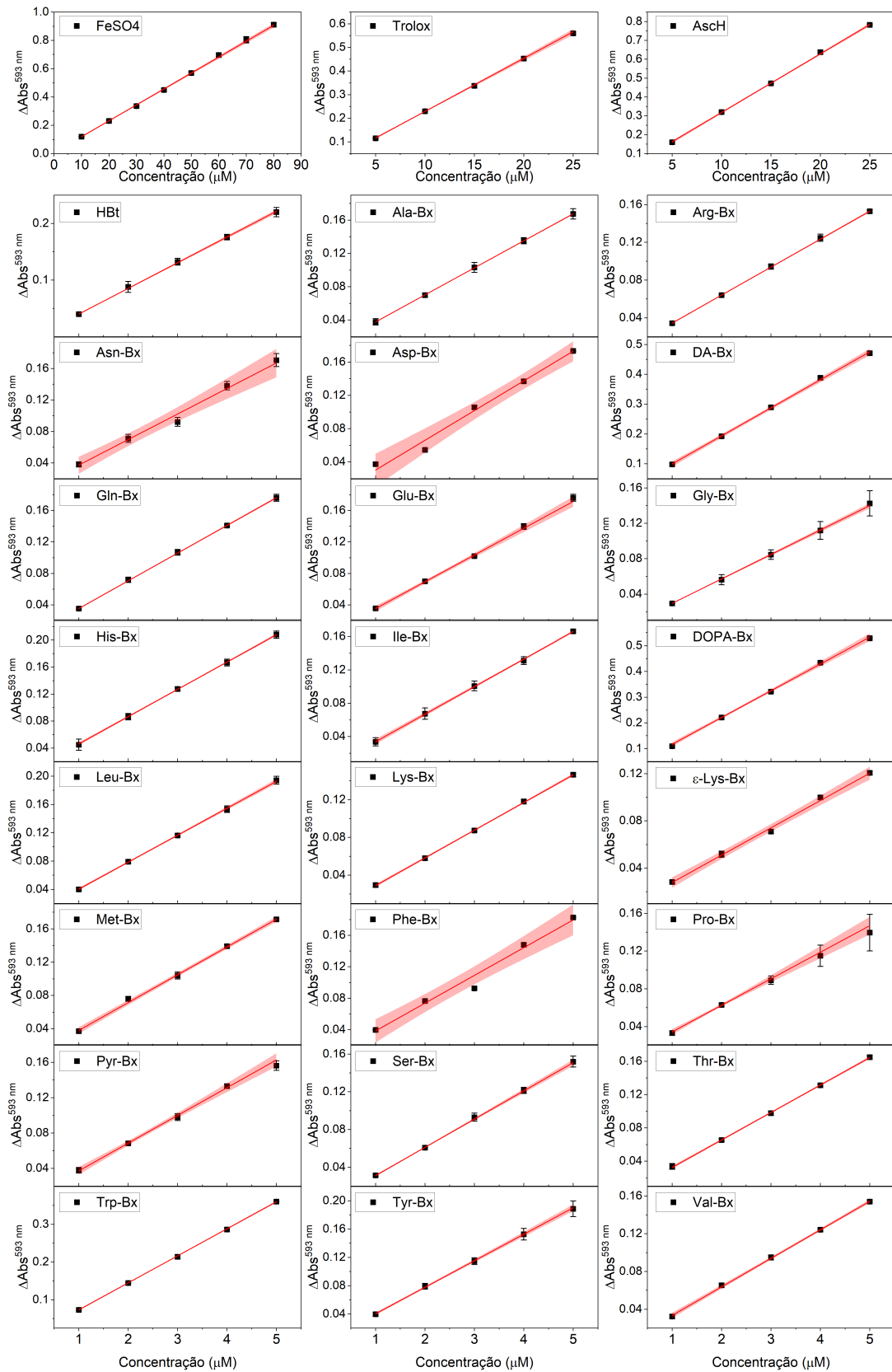
Anexo 46. Variação da absorção (ΔAbs) de ABTS^{++} em 734 nm após 6 minutos de reação em função da concentração de antioxidante, em tampão acetato 300 mmol L^{-1} , pH 3,6.

Tabela Anexo 3. Tabela com os valores de coeficiente angular da regressão linear (α) e coeficiente de determinação ajustado (Adj-R²) dos gráficos com as triplicatas de Δ Abs em 734 nm (TEAC/ABTS) em função da concentração de antioxidante, e o valor médio de coeficiente angular a regressão linear ($\alpha_{\text{médio}}$) dos gráficos ajustados individualmente.

Composto	pH 7			pH 3,6		
	α	Adj-R ²	$\alpha_{\text{médio}}$	α	Adj-R ²	$\alpha_{\text{médio}}$
Trolox	0.0139	0.999	0.014 ± 0.001	0.0173	0.995	0.017 ± 0.001
AscH	0.0133	0.989	0.013 ± 0.001	0.0185	0.992	0.018 ± 0.002
HBt	0.0264	0.998	0.026 ± 0.001	0.020	0.993	0.020 ± 0.001
Ala-Bx	0.0271	0.992	0.026 ± 0.001	0.00631	0.999	0.0063 ± 0.0004
Arg-Bx	0.0346	0.998	0.035 ± 0.001	0.00602	0.998	0.0060 ± 0.0002
Asn-Bx	0.0258	0.999	0.026 ± 0.001	0.00490	0.997	0.0049 ± 0.0002
Asp-Bx	0.0264	0.998	0.027 ± 0.001	0.00462	0.993	0.0046 ± 0.0002
Cys-Bx	0.00521	0.994	0.0053 ± 0.0003	0.00244	0.988	0.0027 ± 0.0002
DA-Bx	0.0658	0.999	0.067 ± 0.002	0.0269	0.998	0.027 ± 0.001
Gln-Bx	0.0274	0.998	0.027 ± 0.001	0.00555	0.993	0.0055 ± 0.0002
Glu-Bx	0.0251	0.994	0.025 ± 0.002	0.00649	0.997	0.0064 ± 0.0001
Gly-Bx	0.0284	0.998	0.029 ± 0.001	0.00595	0.998	0.0059 ± 0.0004
His-Bx	0.0278	0.996	0.027 ± 0.002	0.00639	0.993	0.0066 ± 0.0003
Ile-Bx	0.0253	0.997	0.024 ± 0.001	0.00554	0.998	0.0054 ± 0.0003
DOPA-Bx	0.0611	0.999	0.061 ± 0.002	0.0386	0.999	0.038 ± 0.001
Leu-Bx	0.0303	0.997	0.030 ± 0.001	0.00633	0.999	0.0063 ± 0.0001
Lys-Bx	0.0329	0.999	0.033 ± 0.001	0.00559	0.998	0.0056 ± 0.0005
ϵ-Lys-Bx	0.0335	0.998	0.034 ± 0.001	0.00674	0.997	0.0067 ± 0.0002
Met-Bx	0.0271	0.999	0.027 ± 0.001	0.00606	0.998	0.0060 ± 0.0002
Phe-Bx	0.0277	0.999	0.028 ± 0.001	0.00542	0.998	0.0054 ± 0.0003
Pro-Bx	0.0180	0.999	0.018 ± 0.001	0.00671	0.989	0.0065 ± 0.0002
Pyr-Bx	0.0213	0.998	0.021 ± 0.001	0.00906	0.995	0.0090 ± 0.0002
Ser-Bx	0.0251	0.999	0.025 ± 0.001	0.00519	0.994	0.0052 ± 0.0004
Thr-Bx	0.0276	0.999	0.028 ± 0.001	0.00532	0.996	0.0053 ± 0.0002
Trp-Bx	0.0725	0.998	0.072 ± 0.001	0.0171	0.995	0.017 ± 0.001
Tyr-Bx	0.0510	0.997	0.050 ± 0.002	0.00805	0.998	0.0079 ± 0.0002
Val-Bx	0.0247	0.999	0.025 ± 0.001	0.00709	0.998	0.0071 ± 0.0001



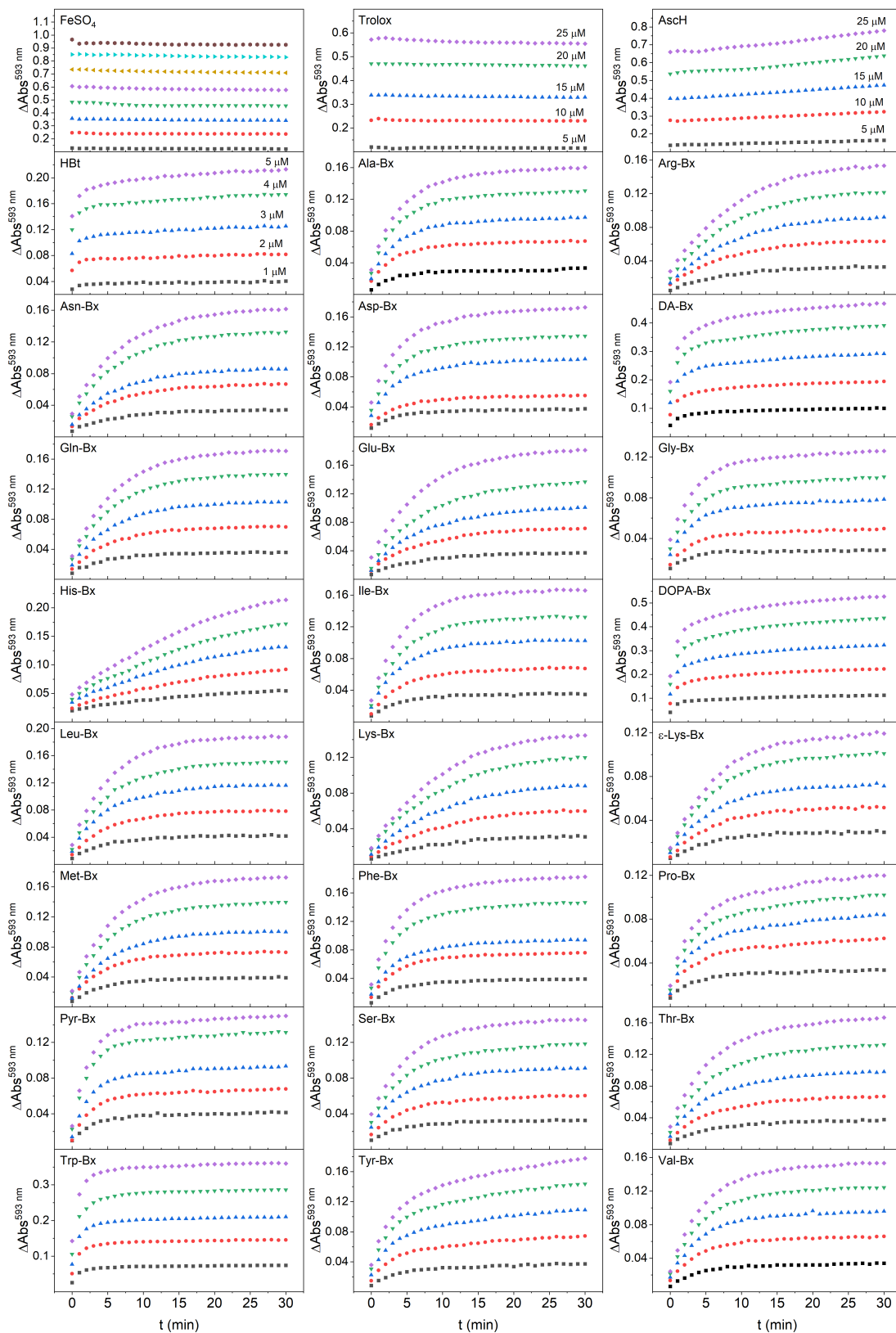
Anexo 47. Variação da absorção (ΔAbs) de (A) ABTS^{++} em 734 nm após 6 minutos de reação, em função da concentração de **Cys-Bx**, em tampão fosfato 100 mmol L, pH 7; (B) ABTS^{++} em 734 nm após 6 minutos de reação, em função da concentração de **Cys-Bx** em tampão acetato 300 mmol L⁻¹, pH 3,6 e (C) FRAP em 593 nm após 30 minutos de reação, em função da concentração de **Cys-Bx** em tampão acetato 300 mmol L⁻¹, pH 3,6.



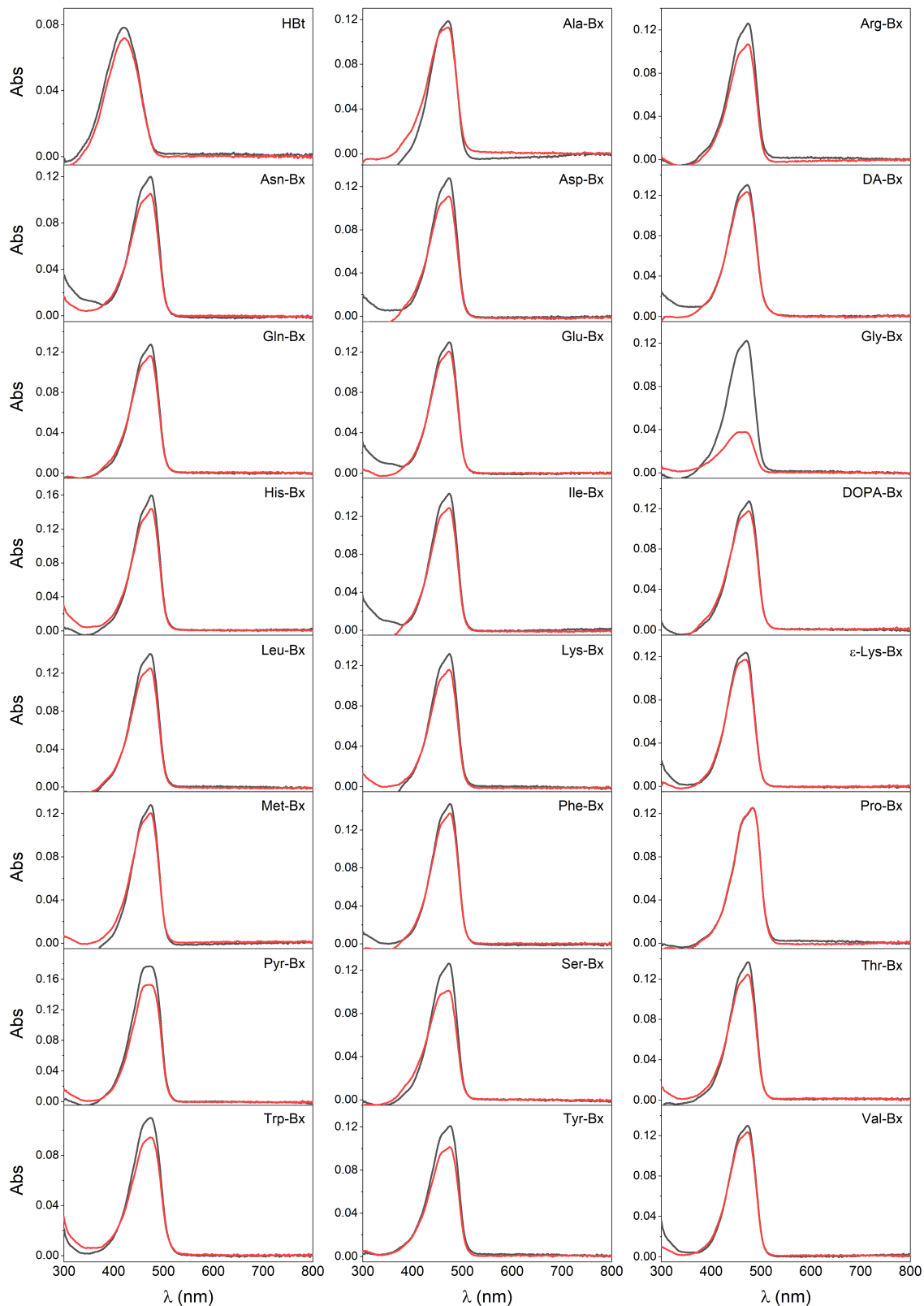
Anexo 48. Variação da absorção (ΔAbs) de FRAP em 593 nm após 30 minutos de reação em função da concentração de antioxidante, em tampão acetato 300 mmol L⁻¹, pH 3,6.

Tabela Anexo 4. Tabela com os valores de coeficiente angular da regressão linear (α) e coeficiente de determinação ajustado (Adj-R²) dos gráficos com as triplicatas de Δ Abs em 593 nm (FRAP) em função da concentração de antioxidante, e o valor médio de coeficiente angular a regressão linear ($\alpha_{\text{médio}}$) dos gráficos ajustados individualmente.

Composto	α	Adj-R²	$\alpha_{\text{médio}}$
FeSO₄	0.0112	0.999	0.012 ± 0.001
Trolox	0.0225	0.999	0.022 ± 0.001
AscH	0.0311	0.999	0.031 ± 0.001
HBt	0.0454	0.999	0.045 ± 0.001
Ala-Bx	0.0325	0.999	0.032 ± 0.001
Arg-Bx	0.0297	0.999	0.030 ± 0.001
Asn-Bx	0.0325	0.987	0.033 ± 0.001
Asp-Bx	0.0357	0.988	0.035 ± 0.001
Cys-Bx	0.0142	0.999	0.014 ± 0.001
DA-Bx	0.0941	0.999	0.094 ± 0.001
Gln-Bx	0.0353	0.999	0.035 ± 0.001
Glu-Bx	0.0340	0.998	0.035 ± 0.001
Gly-Bx	0.0276	0.999	0.028 ± 0.003
His-Bx	0.0405	0.999	0.041 ± 0.001
Ile-Bx	0.0331	0.999	0.033 ± 0.001
DOPA-Bx	0.104	0.999	0.105 ± 0.001
Leu-Bx	0.0381	0.999	0.038 ± 0.002
Lys-Bx	0.0294	0.999	0.029 ± 0.001
ϵ-Lys-Bx	0.0232	0.997	0.023 ± 0.001
Met-Bx	0.0334	0.999	0.033 ± 0.001
Phe-Bx	0.0353	0.987	0.036 ± 0.001
Pro-Bx	0.0281	0.995	0.037 ± 0.002
Pyr-Bx	0.0313	0.997	0.030 ± 0.002
Ser-Bx	0.0299	0.999	0.030 ± 0.002
Thr-Bx	0.0330	0.999	0.033 ± 0.001
Trp-Bx	0.0717	0.999	0.071 ± 0.001
Tyr-Bx	0.0375	0.999	0.037 ± 0.002
Val-Bx	0.0303	0.999	0.030 ± 0.001



Anexo 49. Variação da absorção (ΔAbs) em 593 nm em função do tempo, para todas as concentrações de antioxidantes utilizadas, em tampão acetato 300 mmol L⁻¹, pH 3,6. As concentrações de FeSO₄ variam de 10 μM a 80 μM .



Anexo 50. Espectros de absorção de HbT e betaxantinas em tampão acetato 300 mmol L⁻¹ pH 3,6 a 37 °C, em t = 0 (linha preta) e t = 30 min (linha vermelha).

Tabela Anexo 5. Valores de TEAC obtidos nos ensaios com ABTS^{•+} em pH 7 e 3,6, e valores obtidos no ensaio FRAP, com relação ao FeSO₄ e em equivalentes de Trolox.

Composto	TEAC _{ABTS}		FRAP	
	pH 7	pH 3,6	TEAC _{FRAP}	
Ala-Bx	1,9 ± 0,2	0,37 ± 0,02	2,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Arg-Bx	2,5 ± 0,2	0,35 ± 0,02	2,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Asn-Bx	1,9 ± 0,2	0,29 ± 0,01	2,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Asp-Bx	1,9 ± 0,2	0,27 ± 0,01	3,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Cys-Bx	0,38 ± 0,04	0,16 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,64 ± 0,1
DA-Bx	4,8 ± 0,5	1,60 ± 0,04	8,1 ± 0,1	4,2 ± 0,1
Gln-Bx	2,0 ± 0,2	0,32 ± 0,01	3,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Glu-Bx	1,8 ± 0,2	0,38 ± 0,01	3,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Gly-Bx	2,1 ± 0,2	0,34 ± 0,03	2,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
His-Bx	2,0 ± 0,2	0,39 ± 0,02	3,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Ile-Bx	1,8 ± 0,2	0,32 ± 0,02	2,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1
DOPA-Bx	4,4 ± 0,4	2,27 ± 0,06	9,1 ± 0,1	4,7 ± 0,1
Leu-Bx	2,2 ± 0,2	0,33 ± 0,03	2,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Lys-Bx	2,4 ± 0,3	0,39 ± 0,02	2,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1
ε-Lys-Bx	2,4 ± 0,2	0,36 ± 0,02	2,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Met-Bx	2,0 ± 0,2	0,32 ± 0,02	3,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Phe-Bx	2,0 ± 0,2	0,38 ± 0,02	2,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Pro-Bx	1,3 ± 0,1	0,33 ± 0,03	2,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Pyr-Bx	1,5 ± 0,2	0,53 ± 0,02	2,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Ser-Bx	1,8 ± 0,2	0,31 ± 0,03	2,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Thr-Bx	2,0 ± 0,2	0,31 ± 0,01	2,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Trp-Bx	5,1 ± 0,5	1,01 ± 0,04	6,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
Tyr-Bx	3,6 ± 0,4	0,46 ± 0,02	3,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Val-Bx	1,8 ± 0,2	0,42 ± 0,01	2,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
HBt	1,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1	3,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1
AscH	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	2,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1

Tabela Anexo 6. Valores de potenciais de pico anódico (E_a^I , E_a^{II} e E_a^{III}) e catódico (E_c), de potencial de meia-onda ($E_{1/2}$), potenciais de meio-pico ($E_{p/2}$) e de potenciais de inflexão (E_i) para as betaxantinas investigadas.

Betaxantinas	Potenciais de pico						
	E_a^I	E_a^{II}	E_a^{III}	E_c	$E_{1/2}^a$	$E_{p/2}^b$	E_i^b
Pirrolidina-Bx		998 ^c	1123			901 ^d	909 1068 ^e
DOPA-Bx	680	1114		294	487	959	1019
Dopamina-Bx	675	1072		445	560	925	992
Trp-Bx	455	1133 ^c		301	378	925 ^d	943
Tyr-Bx	521	1203		262	391	996	1004
Met-Bx		1074				954	968
Cys-Bx		885				798	814
Phe-Bx		1008				898	909
His-Bx		1135				976	992
Lys-Bx		1142				989	997
ϵ -Lys-Bx		1133				954	956
Asn-Bx		1125				986	995
Gln-Bx		1133				1003	1019
Ile-Bx		1057				942	956
Arg-Bx		1042				923	943
Thr-Bx		1118				998	1014
Leu-Bx		1055				935	953
Glu-Bx		1116				981	1000
Pro-Bx		1030 ^c	1162			952	968 1114 ^e
Ser-Bx		1103				954 ^d	968
Val-Bx		1072				952	973
Asp-Bx		1133				986	1000
Ala-Bx		1077				957	973
Gly-Bx		1062				942	958

Todos os valores de E estão em V vs. SHE. ^a valor obtido a partir de E_a^I e E_c , $E_{1/2} = (E_a + E_c)/2$; ^b: valor obtido a partir de E_a^{II} ; ^c valores aproximados de E_a^{II} , visto que o pico não é claro, e não possível obter o valor de “ponto zero” pela derivada de 1ª ordem; ^d valor aproximado de $E_{p/2}$, obtido a partir da aproximação de E_a^{II} ; ^e valor de E_i obtido a partir do valor de E_a^{III} (valor do “ponto zero” da derivada de 2ª ordem referente ao E_a^{III}).

Tabela Anexo 7. Valores de pK_a dos aminoácidos, a 25 °C.^a

Composto	pK _{a1} (-COOH)	pK _a (-NH ₃ ⁺)	pK _{a2} ^b	pK _{a3} ^b
Alanina, Ala	2,33	9,71		
Arginina, Arg	2,03	9,00	12,1/13,80 ¹³³	
Asparagina, Asn	2,16	8,73		
Ácido Aspártico, Asp	1,95	9,66	3,71	
Cisteína, Cys	1,91	10,28	8,14	
Dopamina, DA		10,36	8,88	13,68
Glutamina, Gln	2,18	9,00		
Ácido Glutâmico, Glu	2,16	9,58	4,15	
Glicina, Gly	2,34	9,58		
Histidina, His	1,70	9,09	6,04	
Isoleucina, Ile	2,26	9,60		
L-DOPA	2,20	8,75	9,81	13,4
Leucina, Leu	2,32	9,58		
Lisina, Lys	2,15	9,16	10,67	
Metionina, Met	2,16	9,08		
Fenilalanina, Phe	2,18	9,09		
Prolina, Pro	1,95	10,47		
Pirrolidina, Pyr		11,31		
Serina, Ser	2,13	9,05		
Treonina, Thr	2,20	8,96		
Triptofano, Trp	2,38	9,34		
Tirosina, Tyr	2,24	9,04	10,10	
Valina, Val	2,27	9,52		

^a CRC Handbook of Chemistry and Physics 103rd Ed. John R. Rumble, <https://hbcpc.chemnetbase.com>.

^b valores de pK_a dos grupos das cadeias laterais dos aminoácidos.

Tabela Anexo 8. Valores de pK_a estimados para as betaxantinas.

Betaxantina	pK_{a1} C2-COOH	pK_{a2} C6-COOH	pK_{a3} C10-COOH	pK_{a4} N9H	pK_{a5} side
Pirrolidina-Bx	4,13	5,81	—	—	—
DOPA-Bx	3,81	2,35	1,40	8,22	9,33; 12,74
Dopamina-Bx	3,97	2,41	—	11,72	9,30; 13,04
Trp-Bx	3,75	2,41	1,70	8,69	—
Tyr-Bx	3,82	2,38	1,52	8,39	9,54
Met-Bx	3,76	2,38	1,60	8,71	—
Cys-Bx	3,67	2,23	1,36	6,53	—
Phe-Bx	3,78	2,39	1,64	8,62	—
His-Bx	3,72	2,28	1,41	8,81	6,46; 13,10
Lys-Bx	3,76	2,31	1,46	8,81	10,22
ϵ -Lys-Bx	3,94	2,65	2,06	11,95	9,29
Asn-Bx	3,81	2,36	1,46	8,28	—
Gln-Bx	3,77	2,35	1,52	8,59	—
Ile-Bx	3,68	2,35	1,62	8,74	—
Arg-Bx	1,32	3,10	1,89	8,60	12,16
Thr-Bx	3,63	2,23	1,44	7,74	—
Leu-Bx	3,76	2,40	1,65	8,82	—
Glu-Bx	3,76	1,86	2,58	8,58	4,88
Pro-Bx	4,03	5,62	3,05	—	—
Ser-Bx	3,71	2,27	1,40	7,76	—
Val-Bx	3,68	2,32	1,58	8,70	—
Asp-Bx	3,78	2,34	1,38	8,53	5,07
Ala-Bx	3,86	2,41	1,52	8,75	—
Gly-Bx	3,78	2,33	1,45	9,04	—

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Larissa Cerrato Esteves

Local e data de nascimento: São Paulo – SP, 26 de outubro de 1990

EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013 Bacharela em Química Ambiental

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016 Mestra em Ciências – Área: Química

ATIVIDADES ACADÊMICAS

Estágio de monitoria acadêmica realizado no Instituto de Química – USP

Período	1º Semestre/2017
Disciplina	QFL1322 – Reatividade de Compostos Orgânicos
Curso de graduação	Bacharelado em Química
Supervisor	Prof. Dr. Erick Leite Bastos

PUBLICAÇÕES

Artigos completos publicados em periódicos

Esteves, L. C.; Machado, C. O.; Gonçalves, L. C. P.; Cavalcante, V. F.; Obeid, G.; Correr, T. C.; Bastos, E. L. Structural Effects on the Antioxidant Properties of Amino Acid Betaxanthins. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2259.

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.; Bastos, E. L., 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.

Pioli, R. M.; Mattioli, R. R.; Esteves, L. C.; Dochev, S.; Bastos, E. L., Comparison of the effect of N-methyl and N-aryl groups on the hydrolytic stability and electronic properties of betalain dyes. *Dyes Pigm.* **2020**, *183*.

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.

Trabalhos publicados em anais de congressos (resumos)

Esteves, L. C.; Baader, W. J.; Bastos, E.L., Kinetic Study of the Hydrolysis of Model Betalains. In: IUPAC 2017, 2017, São Paulo. Anais da 40^a RASBQ.

Esteves, L. C.; Baader, W. J.; Bastos, E.L.; Influence of Ions and pH on the Hydrolysis of Betanin. In: XII Encontro Latino Americano de Fotoquímica e Fotobiologia (ELAFOT), 2015, Maresias, São Paulo, Brasil.